

BT



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

PCT

DELEGATURA DE PROPIEDAD INDUSTRIAL
DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES

07-33679
SOLICITUD DE PATENTE DE
INVENCION

**TITULO: VACUNAS CANINAS MULTIVALENTES CONTRA LEPTOSPIRA
BRATISLAVA Y OTROS PATOGENOS**

SOLICITANTE: PEIZER PRODUCTS INC

DIRECCIÓN: EASTERN POINT ROAD, GROTON, CONNECTICUT 06340 E.U.A

APODERADO: CARLOS R. OLARTE

BOGOTÁ, 22 de febrero de 2007

P2007/000058

FN 07-9-2007
Cecilia

09/45

OlarteRaisbeck



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
Rad: 07-033679-00000-0000
Fec: 2007-04-09 15:09:24 Dep. 2000 NUECREACIONES
Tra. 11 PATENTEYII
Eva: 379 FASENACIONALI
Act 411 PRESENTACION Folios: 294

PETITORIO - FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD PATENTE PCT ENTRADA EN FASE NACIONAL

SOLICITUD DE:

1

☒

Patente de Invención.

☐

Patente de Modelo de Utilidad.

☐

Capítulo I.

☒

Capítulo II.

2

**SOLICITANTE
(71)**

Nombre: PFIZER PRODUCTS INC

Dirección: Eastern Point Road, Groton,
Connecticut 06340 E.U.A.

Nacionalidad o Domicilio: ESTADOUNIDENSE

Lugar de Constitución: Delaware, Estados
Unidos de América.

Teléfono: _____ Fax: _____

E-mail: _____

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☐ NIT ☐

C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número _____

**REPRESENTANTE
APODERADO**

Nombre: CARLOS R. OLARTE

Dirección: World Trade Center Torre A,
Calle 100 No. 8A-37 Piso 10

Teléfono: 601-7700 Fax: 601-7799

E-mail: office@olarteraisbeck.com

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☒ NIT ☐

C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número 79782747Bta
TP 74.295

**INVENTOR (ES)
(72)**

Nombre: VER PAGINA ADJUNTA

Dirección: VER PAGINA ADJUNTA

Nacionalidad o Domicilio: VER PAGINA ADJUNTA.

3

PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/IB2005/003111

Fecha

Septiembre 23, 2005

Publicación Internacional No. WO 2006/038115

Fecha

Abril 13, 2006

6

**Título (54) VACUNAS CANINAS MULTIVALENTES CONTRA LEPTOSPIRA
BRATISLAVA Y OTROS PATOGENOS**

Clasificación Internacional (51) A61K 39/02, A61P 31/12, A61P 31/04

Prioridad

SI ☒ N ☐

(33) País de Origen

US

(32) Fecha

Octubre 6, 2004

(31) Número de Solicitud

10/959.757

9

Comprobante de pago No. 07 - 23.026

Fecha

Marzo 20, 2007

10

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. **Ver Expediente 06-051.744. Adjunto Copia Simple**

☐

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

11

FIGURA CARACTERÍSTICA:

12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: CARLOS R. OLARTE

FIRMA:

C.C. 79.782.747 Btá T.P. 74.295

Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario, ver reverso de esta página.

LISTA DE INVENTORES PCT/IB2005/003111**Joseph FRANTZ**

601 West Cornhusker Highway,
Lincoln, Nebraska 68501
Estados Unidos de América
Nacionalidad: Estadounidense

Thomas Jack NEWBY

601 West Cornhusker Highway,
Lincoln, Nebraska 68501
Estados Unidos de América
Nacionalidad: Estadounidense

Cassius McAllister TUCKER

7000 Portage Road,
Kalamazoo, MI 49001-0199
Estados Unidos de América
Nacionalidad: Estadounidense

4

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 07 - 23,026
FECHA : MARZO 20 DE 2007

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
Rad: 07-033679-00000-0000
Fec: 2007-04-03 16:09:24 Dep. 2020 NUECREACIONES
Tra. 11 PATENTERII
Ere: 379 FASENACIONALI
Act 411 PRESENTACION Folios: 294

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	Nº. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
OLARTE RAISBEGR	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	56562737	20/03/2007	3,171,000.00

***** C O N C E P T O *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	482,000.00
		TOTAL :	\$ 482,000.00

SON: CUATROCIENTOS OCHENTA Y DOS MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

TRADUCCION OFICIAL No. 05-223

Efectuada el día 9 de diciembre de 2005, de un documento escrito en Inglés, al cual para su identificación se le estampa el sello de Sergio Andrés Rueda Iglesias, Traductor e Intérprete Oficial por Resolución No. 0138 expedida por el Ministerio de Justicia y del Derecho el 11 de febrero de 2002.

Traducción de las Autenticaciones Notariales y subsiguientes correspondientes a un Poder otorgado por PFIZER PRODUCTS, INC., a Carlos R. Olarte y/o J. Ian Raisbeck y/o Ana María Frieri y/o Juan Guillermo Moure y/o Natalia Castro, documento este que viene en español, se explica por sí solo y fue firmado por Grover F. Fuller, Jr. el 17 de noviembre de 2005 en Nueva York, Estados Unidos de América.

También en inglés y en español viene Certificación Notarial mediante la cual se confirma el nombre y cargo de Grover F. Fuller, Jr, así como la existencia legal de la compañía. Dicha certificación notarial está firmada por Susan Z. Killian, Notario Público de Nueva York, cuyo cargo expira el 4 de octubre de 2008, según consta en su correspondiente sello notarial.

Suscrito y jurado ante mí el 17 de noviembre de 2005.

(Fdo.) Susan Z. Killian


SERGIO ANDRÉS RUEDA IGLESIAS
C. G. 223
TRADUCTOR E INTERPRETE OFICIAL
ESPAÑOL - INGLÉS / INGLÉS - ESPAÑOL
RESOLUCION No. 0138 del 11 de febrero de 2002
MINISTERIO DE JUSTICIA Y DEL DERECHO

ESTADO DE NUEVA YORK - CONDADO DE NUEVA YORK No. 467518

El suscrito, Norman Goodman, Escribano del Condado y del Tribunal Supremo del Estado de Nueva York, tribunal éste provisto de sello por ley, por medio de este documento certifico conforme a la ley ejecutiva del Estado de Nueva York que Susan Z. Killian, cuyo nombre aparece suscrito en la declaración jurada o certificado de reconocimiento anexo, desempeñaba en el momento de tomar el mismo, las funciones de Notario Público, en y para el Estado de Nueva York, estando debidamente comisionado bajo juramento y habilitado como tal; que conforme a la ley en mi despacho obra un certificado de su nombramiento con su firma autógrafa; que conozco bien la letra manuscrita de dicho Notario Público o he comparado la firma que aparece en el instrumento anexo con la que reposa en los archivos de mi oficina, y creo en conciencia que la misma es auténtica.

EN FE DE LO CUAL, firmo de mi puño y letra y estampo mi sello oficial, el día 22 de noviembre de 2005.

(Fdo.) Norman Goodman, Escribano del Condado y del Tribunal Supremo del Estado de Nueva York.

SERGIO ANDRÉS RIVERA RIVERA
C. C. S. 773
TRADUCCION E INTERPRETE OFICIAL
ESPAÑOL - INGLES / INGLES - ESPAÑOL
REGISTRACION NACIONAL DE FIRMAS 11/2002
MINISTERIO DE JUSTICIA Y DEL DERECHO

APOSTILLA

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

1. País: Estados Unidos de América

El presente documento público

2. Fue firmado por: Norman Goodman

3. Que actuó en su calidad de: Escribano del Condado

4. Lleva el sello del Condado de Nueva York

Se certificó:

5. En Nueva York, Nueva York

6. El 22 de noviembre de 2005

7. Por parte del Secretario de Estado, (Encargado) del
Estado de Nueva York

8. Bajo el Número NYC-10404952A

9. Aparece Sello del Estado de Nueva York

10. Firmado por: James Bizzarri, Secretario de Estado
Especial Encargado

Es traducción fiel y completa efectuada por:


Sergio Andrés Rueda Iglesias
c.c. 80.424.773 de Bogotá

SERGIO ANDRÉS RUEDA IGLESIAS
C. C. 80.424.773
TRADUCTOR E INTERPRETE OFICIAL
ESPAÑOL - INGLÉS / INGLÉS - ESPAÑOL
BOGOTÁ, COLOMBIA
BOGOTÁ, COLOMBIA

Apostille

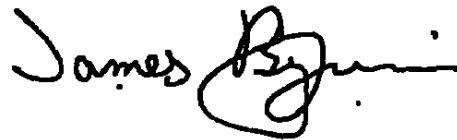
(Convention de La Haye du 5 Octobre 1961)

8

1. Country: **United States of America**
This public document
2. has been signed by **Norman Goodman**
3. acting in the capacity of **County Clerk**
4. bears the seal/stamp of the county of **New York**

Certified

5. At New York, New York
6. the 22nd day of November 2005
7. by Special Deputy Secretary of State, State of New York
8. No. NYC-10404952A
9. Seal/Stamp
10. Signature



James Bizzarri
Special Deputy Secretary of State

Carlos R. Olarte
J. Ian Raisbeck
Ana María Frieri
Juan Guillermo Moure
Natalia Castro
Zayde Chahin
Zaava Ravid
Jacqueline Chaparro
Jose Luis Londoño
Carmelo Alvarez
Felipe Mondaca
Cumbao Rodríguez
Santiago Parolo
Of Counsel
Guillermo Chahin
Graciela Melo

Power of Attorney

Poder

The undersigned,

El suscrito,

PFIZER PRODUCTS INC.,

domiciled in

domiciliado en

Eastern Point Road, Groton, State of Connecticut 06340, United States of America

by means of these presents hereby grants to Carlos R. Olarte and/or J. Ian Raisbeck and/or Ana María Frieri and/or Juan Guillermo Moure and/or Natalia Castro 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 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 and collect refunds. 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 J. Ian Raisbeck y/o Ana María Frieri y/o Juan Guillermo Moure y/o Natalia Castro poder especial, 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, Letras 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 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 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:

PFIZER PRODUCTS INC.,

By:

Grover F. Fuller, Jr.

Vice President, Attorney-In-Fact

Date/Fecha:

17 November 2005

City/Country/Ciudad, País: New York, NY USA

State of New York
County of New York, } ss.



467518

Form 1

I, NORMAN GOODMAN, County Clerk and Clerk of the Supreme Court of the State of New York, in and for the County of New York, a Court of Record, having by law a seal, DO HEREBY CERTIFY pursuant to the Executive Law of the State of New York, that

William Z. Kellian

whose name is subscribed to the annexed affidavit, deposition, certificate of acknowledgment or proof, was at the time of taking the same a NOTARY PUBLIC in and for the State of New York duly commissioned, sworn and qualified to act as such; that pursuant to law, a commission or a certificate of his official character, with his autograph signature has been filed in my office; that at the time of taking such proof, acknowledgment or oath, he was duly authorized to take the same; that I am well acquainted with the handwriting of such NOTARY PUBLIC or have compared the signature on the annexed instrument with his autograph signature deposited in my office, and I believe that such signature is genuine.

IN WITNESS WHEREOF, I have hereunto set my hand affixed my official seal this

FILE PAID \$3.00

FILED 12-2-2005

Norman Goodman

County Clerk and Clerk of the Supreme Court, New York County

11

Notarial Certification

Certificación Notarial

On this date,

En esta fecha,

The undersigned Notary Public certifies:

el Notario Público suscrito certifica:

1. That

1. Que

Grover F. Fuller, Jr.

of legal age and domiciled in

mayor de edad y domiciliado

Street 150 East 42nd Street
City New York
State New York 10017-5612 USA

signed the foregoing document.

suscribió el documento que antecede.

2. That the grantor has executed the foregoing document as Vice President, Attorney-In-Fact of PFIZER PRODUCTS INC.

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

3. That PFIZER PRODUCTS INC, having its principal place of business located in Groton, State of Connecticut 06340, United States of America 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.

4. Que con sede principal ubicada en

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.

NOTARY PUBLIC (Signature): Sharon B. Kilian



SHARON B. KILIAN
Notary Public, State of New York
No. 0136116321
Qualified in New York County
Commission Expires October 4, 2008

State of New York
County of New York
SWORN to and SUBSCRIBED before me
this 17th day of NOV. 2005
Sharon B. Kilian

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
13 April 2006 (13.04.2006)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2006/038115 A1

(51) International Patent Classification:

A61K 39/62 (2006.01) A61P 31/12 (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01)

(21) International Application Number:

PCT/IB2005/003111

(22) International Filing Date:

23 September 2005 (23.09.2005)

(25) Filing Language:

English

(26) Publication Language:

English

(30) Priority Data:

10959,757 6 October 2004 (06.10.2004) US

(71) Applicant (for all designated States except US): PFIZER
PRODUCTS INC. [US/US]; Eastern Point Road, Groton,
CT 06340 (US).

(72) Inventors and

(73) Inventors/Applicants (for US only): FRANTZ, Joseph
[US/US]; c/o Pfizer Inc., 601 West Cornhusker High-
way, Lincoln, NE 68501 (US). NEWBY, Thomas, Jack
[US/US]; c/o Pfizer Inc., 601 West Cornhusker Highway,
Lincoln, NE 68501 (US). TUCKER, Cassius, McAllister
[US/US]; c/o Pfizer Global Research and Development,
301 Henrietta Street, Kalamazoo, MI 49001 (US).(74) Agents: FULLER, Groves, R et al.; c/o DROUIN,
Stephane, European Pharma Patent Department, Pfizer
Global Research and Development, Ramsgate Road,
Sandwich, Kent CT13 9NU (GB).(51) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of national protection available):

AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GR, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KR, KG, KM, KP, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(54) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of regional protection available):

ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LI, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BI, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TO).

Published:

- with international search report
- before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 2006/038115 A1

(54) Title: MULTIVALENT CANINE VACCINES AGAINST LEPTOSPIRA BRATISLAVA AND OTHER PATHOGENS

(57) Abstract: This invention relates to vaccines and methods for protecting dogs against disease caused by *Leptospira bratislava*. This invention also relates to combination vaccines and methods for protecting dogs against disease or disorder caused by canine pathogens, for example, infectious tracheobronchitis caused by *Bordetella bronchiseptica*, canine distemper caused by canine distemper (CD) virus, infectious canine hepatitis (ICH) caused by canine adenovirus type 1 (CAV-1), respiratory disease caused by canine adenovirus type 2 (CAV-2), canine parainfluenza caused by canine parainfluenza (CPI) virus, enteritis caused by canine coronavirus (CCV) and canine parvovirus (CPV), and leptospirosis caused by *Leptospira bratislava*, *Leptospira canicola*, *Leptospira grippityphosa*, *Leptospira interrogans* or *Leptospira pomona*.

MULTIVALENT CANINE VACCINES AGAINST LEPTOSPIRA HEATISLAVA AND OTHER PATHOGENS

FIELD OF THE INVENTION

This invention relates to vaccines containing a *Bordetella bronchiseptica* p68 antigen and the use thereof for protecting dogs against infectious tracheobronchitis ("kennel cough") caused by *Bordetella bronchiseptica*. This invention also relates to combination vaccines containing a *Bordetella bronchiseptica* p68 antigen and one or more antigens of another canine pathogen such as canine distemper (CD) virus, canine adenovirus type 2 (CAV-2), canine parainfluenza (CPI) virus, canine coronavirus (CCV), canine parvovirus (CPV), *Leptospira brasiliensis*, *Leptospira canicola*, *Leptospira grippityphosa*, *Leptospira interrogans* or *Leptospira pomona*. Methods for protecting dogs against diseases caused by canine pathogens using combination vaccines are also provided. This invention relates to vaccines containing *Leptospira brasiliensis* and the use thereof for protecting dogs against infections caused by *Leptospira brasiliensis*. This invention also relates to combination vaccines containing *Leptospira brasiliensis* and one or more antigens of another canine pathogen such as canine distemper (CD) virus, canine adenovirus type 2 (CAV-2), canine parainfluenza (CPI) virus, canine coronavirus (CCV), canine parvovirus (CPV), *Leptospira canicola*, *Leptospira grippityphosa*, *Leptospira interrogans* or *Leptospira pomona*. This invention further relates to combination vaccines of said antigens without *Leptospira brasiliensis*. Methods for protecting dogs against diseases caused by canine pathogens using the combination vaccines are also provided.

BACKGROUND OF THE INVENTION

The present commercially available canine *Bordetella bronchiseptica* vaccine product is composed of an inactivated, nonadjuvanted *Bordetella bronchiseptica* whole cell bacterin. Such whole cell bacterin can lead to cell protein related post-vaccination reactions. The p68 protein of *B. bronchiseptica* is antigenically similar to the Outer Membrane Protein (OMP) of *B. pertussis* and the OMP of *B. parapertussis* (Shahin et al., "Characterization of the Protective Capacity and Immunogenicity of the 68-kD Outer Membrane Protein of *Bordetella pertussis*", *J. Exp. Med.*, 171: 63-72, 1990). A protective role of this OMP has been demonstrated for mice (Shahin et al., *supra*; Novotny et al., "Biologic and Protective Properties of the 68-kD Outer Membrane Protein of *Bordetella pertussis*: A Novel Formulation for a Acellular Pertussis Vaccine", *J. Infect. Dis.*, 164:114-22, 1991), humans (He et al., "Protective Role of Immunoglobulin G Antibodies to Filamentous Hemagglutinin and Pertactin of *Bordetella pertussis* in *Bordetella parapertussis* Infection", *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 10:798-798, 1996) and swine (Koblach et al., "Identification of a 68-Kilodalton Outer Membrane Protein as the Major Protective Antigen of *Bordetella bronchiseptica* by Using Specific-Pathogen-Free Piglets", *Infect. Immun.*, 68(2):352-357, 1990).

Prior to the present invention, there had been no showing that a *Bordetella bronchiseptica* p68 antigen can be a safe and effective vaccine in dogs. Therefore, there is a

14

- 5 need to develop a *Bordetella bronchiseptica* vaccine containing a p68 antigen that is suitable for canine use. It would be even more advantageous if such a *Bordetella bronchiseptica* p68 vaccine is safe for administration to puppies and provides a long-term protection.

CD is a universal, high-mortality viral disease with variable manifestations.

- 10 Approximately 60% of nonvaccinated, nonimmune dogs infected with CD virus develop clinical signs, and approximately 90% of those dogs die.

Infectious canine hepatitis or ICH, caused by canine adenovirus type 1 (CAV-1), is a universal, sometimes fatal, viral disease of dogs characterized by hepatic and generalized endothelial lesions. CAV-2 causes respiratory diseases, which, in severe cases, may include pneumonia and bronchopneumonia.

- 15 CPI is a common viral upper respiratory disease. Uncomplicated CPI may be mild or subclinical, with signs becoming more severe if concurrent infection with other respiratory pathogens exists.

CPV infection results in enteric disease characterized by sudden onset of vomiting and diarrhea, often hemorrhagic. Leukopenia commonly accompanies clinical signs.

- 20 Susceptible dogs of any age can be affected, but mortality is greatest in puppies. In puppies 4-12 weeks of age CPV may occasionally cause myocarditis that can result in acute heart failure after a brief and inconspicuous illness. Following infection many dogs are refractory to the disease for a year or more. Similarly, seropositive bitches may transfer to their puppies CPV antibodies which can interfere with active immunization of the puppies through 16 weeks of age.

- 25 CCV also causes enteric disease in susceptible dogs of all ages worldwide. Highly contagious, the virus is transmitted primarily through direct contact with infectious feces, and may cause clinical enteritis within 1-4 days after exposure. Severity of disease may be exacerbated by concurrent infection with other agents. Primary signs of CCV infection include anorexia, vomiting, and diarrhea. Frequency of vomiting usually diminishes within a day or 2 after onset of diarrhea, but diarrhea may linger through the course of infection, and stools occasionally may contain streaks of blood. With CCV infection most dogs remain afebrile and leukopenia is not observed in uncomplicated cases.

- 30 Leptospirosis occurs in dogs of all ages, with a wide range of clinical signs and chronic nephritis generally following acute infection.

- 35 Some combination vaccines have been developed, including those sold under the Vanguard® trademarks. However, prior to the present invention, there have been no effective combination vaccines that protect dogs against *Bordetella bronchiseptica* and one or more of other canine pathogens such as CD virus, CAV-2, CPI virus, CPV, CCV, and a *Leptospira* species such as *L. bratislava*, *L. canicola*, *L. grippityphosa*, *L. icterohaemorrhagiae* and *L. pomona*. There also have been no effective combination vaccines comprising *L. bratislava* against these other canine pathogens but without *Bordetella bronchiseptica*. A problem in developing combination vaccines involves efficacy interference, namely a failure of one or more antigens in a combination composition to maintain or achieve efficacy because of the

5 presence of the other antigens in the composition. This is believed to be a result of interference with an antigen in the composition administered to a host, e.g., a dog, in the immunological, antigenic, antibody or protective response such antigen induced in the host because of the other antigens present in the composition. However, for other hosts, such as cats, combination vaccines are known. It is believed that efficacy interference in dogs is due to some peculiarity of the canine biological system, or due to the reaction of the antigens with the canine biological system.

10 There is a need, therefore, to develop a combination vaccine suitable for administration to dogs against *Bordetella bronchiseptica* and one or more other canine pathogens, which does not exhibit efficacy interference in canines. There is also a need to develop such combination vaccines without *Bordetella bronchiseptica*. It would be even more advantageous if such combination vaccines are safe for administration to puppies and provide long-term protection.

SUMMARY OF THE INVENTION

20 The present invention provides vaccines and methods for protecting dogs against diseases caused by canine pathogens.

In one embodiment, the present invention provides p88 vaccines suitable for administration to dogs and capable of protecting dogs against disease caused by *Bordetella bronchiseptica*. Such vaccines of the present invention include a *Bordetella bronchiseptica* p88 antigen and a veterinary-acceptable carrier such as an adjuvant.

25 In another embodiment, the present invention provides methods of protecting dogs against disease caused by *Bordetella bronchiseptica* by administering to a dog a vaccine which includes a *Bordetella bronchiseptica* p88 antigen and a veterinary-acceptable carrier such as an adjuvant.

30 In another embodiment, the present invention provides *Leptospira brasiliensis* vaccines suitable for administration to dogs and capable of protecting dogs against disease caused by *Leptospira brasiliensis*. Such vaccines of the present invention include a cell preparation of *Leptospira brasiliensis* and a veterinary-acceptable carrier such as an adjuvant.

35 In another embodiment, the present invention provides methods of protecting dogs against disease caused by *Leptospira brasiliensis* by administering to a dog a vaccine which includes a cell preparation of *Leptospira brasiliensis* and a veterinary-acceptable carrier such as an adjuvant.

40 In still another embodiment, the present invention provides combination vaccines suitable for administration to dogs. The combination vaccines of the present invention include a *Bordetella bronchiseptica* p88 antigen in combination with at least one other antigen from other canine pathogens, capable of inducing a protective immune response in dogs against disease caused by such other pathogen(s). Such other pathogens can be selected from canine distemper (CD) virus, canine adenovirus type 2 (CAV-2), canine parainfluenza (CPI) virus, canine parvovirus (CPV), canine coronavirus (CCV), canine herpesvirus, rabies virus,

5 *Leptospira brasiliensis*, *Leptospira canicola*, *Leptospira grippityphosa*, *Leptospira icterohaemorrhagiae*, *Leptospira pomona*, *Leptospira hardjovicia*, *Porphyromonas* spp., *Bacteriodes* spp., *Leishmania* spp., *Borrelia* spp., *Ehrlichia* spp., *Mycoplasma* spp. and *Microsporium canis*.

10 A preferred combination of the present invention includes two or more antigens from canine pathogens, capable of inducing a protective immune response in dogs against disease caused by such pathogen(s). Such pathogens can be selected from canine distemper (CD) virus, canine adenovirus type 2 (CAV-2), canine parainfluenza (CPI) virus, canine parvovirus (CPV), canine coronavirus (CCV), canine herpesvirus, rabies virus, *Leptospira brasiliensis*, *Leptospira canicola*, *Leptospira grippityphosa*, *Leptospira icterohaemorrhagiae*, *Leptospira pomona*, *Leptospira hardjovicia*, *Porphyromonas* spp., *Bacteriodes* spp., *Leishmania* spp.,
15 *Borrelia* spp., *Ehrlichia* spp., *Mycoplasma* spp. and *Microsporium canis*.

A preferred combination vaccine of the present invention includes attenuated strains of canine distemper (CD) virus, canine adenovirus type 2 (CAV-2), canine parainfluenza (CPI) virus and canine parvovirus (CPV); an inactivated preparation of a strain of canine coronavirus (CCV); and a *Bordetella bronchiseptica* p68 antigen.
20

A preferred combination vaccine of the present invention includes attenuated strains of canine distemper (CD) virus, canine adenovirus type 2 (CAV-2), canine parainfluenza (CPI) virus, and canine parvovirus (CPV); and an inactivated preparation of a strain of canine coronavirus (CCV).

25 Another preferred combination vaccine of the present invention includes attenuated strains of canine distemper (CD) virus, canine adenovirus type 2 (CAV-2), canine parainfluenza (CPI) virus and canine parvovirus (CPV); an inactivated preparation of a strain of canine coronavirus (CCV); a *Bordetella bronchiseptica* p68 protein, and an inactivated cell preparation of five *Leptospira* serovars (*Leptospira brasiliensis*, *Leptospira canicola*, *Leptospira grippityphosa*, *Leptospira icterohaemorrhagiae* and *Leptospira pomona*).
30

Another preferred combination vaccine of the present invention includes attenuated strains of canine distemper (CD) virus, canine adenovirus type 2 (CAV-2), canine parainfluenza (CPI) virus, and canine parvovirus (CPV); and an inactivated preparation of a strain of canine coronavirus (CCV); and a cell preparation of five *Leptospira* serovars
35 (*Leptospira brasiliensis*, *Leptospira canicola*, *Leptospira grippityphosa*, *Leptospira icterohaemorrhagiae* and *Leptospira pomona*).

Another preferred combination vaccine of the present invention includes attenuated strains of canine distemper (CD) virus, canine adenovirus type 2 (CAV-2), canine parainfluenza (CPI) virus, and canine parvovirus (CPV); an inactivated preparation of a strain
40 of canine coronavirus (CCV); and an inactivated cell preparation of four *Leptospira* serovars (*Leptospira canicola*, *Leptospira grippityphosa*, *Leptospira icterohaemorrhagiae* and *Leptospira pomona*).

5 Still another preferred combination vaccine of the present invention includes attenuated strains of CD virus, CAV-2, CPI virus, a CPV strain, and a *Bordetella bronchiseptica* p68 antigen.

Still another preferred combination vaccine of the present invention includes attenuated strains of CD virus, CAV-2, CPI virus, a CPV strain.

10 Another preferred combination vaccine of the present invention includes attenuated strains of CD virus, CAV-2, CPI virus, a CPV strain, a *Bordetella bronchiseptica* p68 antigen; and an inactivated cell preparation of *Leptospira canicola* and *Leptospira icterohaemorrhagiae*.

Another preferred combination vaccine of the present invention includes attenuated strains of CD virus, CAV-2, CPI virus, a CPV strain, and an inactivated cell preparation of *Leptospira canicola* and *Leptospira icterohaemorrhagiae*.

Still another preferred combination vaccine of the present invention includes attenuated strains of CD virus, CAV-2, CPI virus, a CPV strain, a *Bordetella bronchiseptica* p68 antigen and an inactivated cell preparation of five *Leptospira* serovars (*Leptospira* 20 *bratislava*, *Leptospira canicola*, *Leptospira grippityphosa*, *Leptospira icterohaemorrhagiae* and *Leptospira pomona*).

Still another preferred combination vaccine of the present invention includes attenuated strains of CD virus, CAV-2, CPI virus, a CPV strain, and an inactivated cell preparation of five *Leptospira* serovars (*Leptospira bratislava*, *Leptospira canicola*, *Leptospira grippityphosa*, *Leptospira icterohaemorrhagiae* and *Leptospira pomona*).

Still another preferred combination vaccine of the present invention includes attenuated strains of CD virus, CAV-2, CPI virus, a CPV strain, and an inactivated cell preparation of four *Leptospira* serovars (*Leptospira canicola*, *Leptospira grippityphosa*, *Leptospira icterohaemorrhagiae* and *Leptospira pomona*).

30 Another preferred combination vaccine includes a *Bordetella bronchiseptica* p68 antigen and an attenuated CPI virus.

Still another preferred combination vaccine includes a *Bordetella bronchiseptica* p68 antigen, an attenuated CPI virus and an inactivated cell preparation of *Leptospira canicola* and *Leptospira icterohaemorrhagiae*.

35 The present invention also provides methods of protecting dogs against disease caused by a canine pathogen by administering to a dog a combination vaccine of the present invention.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

40 Figure 1. Summary of the geometric mean of p68 ELISA endpoint titres in unvaccinated and *Bordetella* p68 (15 µg/dose) vaccinated dogs-aerosol challenge with *Bordetella bronchiseptica*.

Figure 2. Summary of Serum Amyloid A titre in dogs following aerosol challenge with *Bordetella bronchiseptica*.

5 **Figure 3. Summary of the geometric mean of p68 ELISA endpoint titres in unvaccinated and *Bordetella* p68 vaccinated dogs following vaccination and aerosol challenge with *Bordetella bronchiseptica*.**

Figure 4. Summary of Serum Amyloid A titres in dogs following aerosol challenge with *Bordetella bronchiseptica*.

10 **Figure 5. Western blot showing reactivity of p68 monoclonal antibody Bord 2-7 to p68 whole cell lysate.**

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

 In one embodiment, the present invention provides monovalent vaccines suitable for administration to dogs which are capable of protecting dogs against disease caused by
15 *Bordetella bronchiseptica*. The monovalent vaccines of the present invention include a recombinantly produced *Bordetella bronchiseptica* p68 antigen and a veterinary-acceptable carrier such as an adjuvant.

 In another embodiment, the present invention provides methods of protecting dogs against disease caused by *Bordetella bronchiseptica* by administering to a dog a monovalent
20 vaccine which includes a recombinantly produced *Bordetella bronchiseptica* p68 antigen and a veterinary-acceptable carrier such as an adjuvant.

 In still another embodiment, the present invention provides combination vaccines suitable for administration to dogs. The combination vaccines of the present invention include a recombinantly produced *Bordetella bronchiseptica* p68 antigen in combination with at least
25 one other antigen capable of inducing a protective immune response in dogs against disease caused by such other antigen. Another embodiment of the present invention includes two or more antigens from canine pathogens, capable of inducing a protective immune response in dogs against disease caused by such pathogen(s).

 A preferred combination vaccine of the present invention includes attenuated strains
30 of canine distemper (CD) virus, canine adenovirus type 2 (CAV-2), canine parainfluenza (CPI) virus and canine parvovirus (CPV); an inactivated preparation of a strain of canine coronavirus (CCV); and a preparation of four *Leptospira* serovars (*Leptospira canicola*, *Leptospira grippityphosa*, *Leptospira icterohaemorrhagiae*, and *Leptospira pomona*).

 Another preferred combination vaccine of the present invention includes attenuated
35 strains of canine distemper (CD) virus, canine adenovirus type 2 (CAV-2), canine parainfluenza (CPI) virus and canine parvovirus (CPV); an inactivated preparation of a strain of canine coronavirus (CCV); and a preparation of five *Leptospira* serovars (*Leptospira batellae*, *Leptospira canicola*, *Leptospira grippityphosa*, *Leptospira icterohaemorrhagiae* and *Leptospira pomona*).

40 Still another preferred combination vaccine of the present invention includes attenuated strains of CD virus, CAV-2, CPI virus, a CPV strain; and a preparation of four *Leptospira* serovars (*Leptospira canicola*, *Leptospira grippityphosa*, *Leptospira icterohaemorrhagiae* and *Leptospira pomona*).

5 Another preferred combination vaccine of the present invention includes attenuated strains of CD virus, CAV-2, CFI virus, a CPV strain, a CCV strain, and a preparation of *Leptospira canicola* and *Leptospira icterohaemorrhagiae*.

Still another preferred combination vaccine of the present invention includes attenuated strains of CD virus, CAV-2, CFI virus, a CPV strain and a preparation of five
10 *Leptospira* serovars (*Leptospira bratislava*, *Leptospira canicola*, *Leptospira grippityphosa*, *Leptospira icterohaemorrhagiae* and *Leptospira pomona*).

The present invention also provides methods of protecting dogs against diseases caused by a canine pathogen by administering to a dog a combination vaccine of the present invention.

15 For clarity of disclosure, and not by way of limitation, the detailed description of the invention is divided into the following subsections which describe or illustrate certain features, embodiments or applications of the invention.

Definitions and Abbreviations

20 The term "protecting a dog against a disease caused by a canine pathogen" as used herein means reducing or eliminating the risk of infection by the pathogen, ameliorating or alleviating the symptoms of an infection, or accelerating the recovery from an infection. Protection is achieved if there is a reduction in viral or bacterial load, a reduction in viral or bacterial shedding, a decrease in incidence or duration of infections, reduced acute phase
25 serum protein levels, reduced rectal temperatures, and/or increase in food uptake and/or growth, for example.

The term "p68 antigen" refers to a protein with a molecular weight of 68 kDa as determined by SDS polyacrylamide gel electrophoresis, is recognized by the p68-specific monoclonal antibody Bord 2-7 (ATCC#), and has an amino acid sequence as set forth in SEQ
30 ID NO: 1 or an amino acid sequence that is substantially identical to SEQ ID NO: 1.

By "substantially identical" is meant a degree of sequence identity of at least about 90%, preferably at least about 95%, or more preferably, at least about 98%.

The term "monovalent vaccine" as used herein refers to a vaccine having one principal antigenic component. For example, a p68 monovalent vaccine includes a *Bordetella bronchiseptica* p68 antigen as the principal antigenic component of the vaccine and is capable
35 of protecting the animal to which the vaccine is administered against diseases caused by *Bordetella bronchiseptica*. Another example of a monovalent vaccine includes a cell preparation of *Leptospira bratislava* as the principal antigenic component of the vaccine and is capable of protecting the animal to which the vaccine is administered against diseases caused
40 by *Leptospira bratislava*.

The term "combination vaccine" is meant a bivalent or multivalent combination of antigens which are capable of inducing a protective immune response in dogs. The protective effects of a combination vaccine against a pathogen or pathogens are normally achieved by inducing in the animal subject an immune response, either a cell-mediated or a humoral
45 immune response or a combination of both.

5 By "immunogenic" is meant the capacity of a composition to provoke an immune response in dogs against a particular pathogen. The immune response can be a cellular immune response mediated primarily by cytotoxic T-cells and cytokine-producing T-cells, or a humoral immune response mediated primarily by helper T-cells, which in turn activates B-cells leading to antibody production.

10 The term "therapeutically effective amount" or "effective amount" refers to an amount of a monovalent or combination vaccine sufficient to elicit a protective immune response in the dog to which it is administered. The immune response may comprise, without limitation, induction of cellular and/or humoral immunity. The amount of a vaccine that is therapeutically effective may vary depending on the particular antigen used in the vaccine, the age and
15 condition of the dog, and/or the degree of infection, and can be determined by a veterinary physician.

p88 Vaccine

The present invention has demonstrated for the first time that a vaccine composition containing a *Bordetella bronchiseptica* p88 antigen effectively protected dogs against disease
20 caused by *Bordetella bronchiseptica*. The vaccine composition of the present invention does not cause significant post-vaccination reactions, is safe for administration to puppies, and induces protective immunity in dogs that lasts for an extended period of time.

Accordingly, one embodiment of the present invention is directed to a vaccine composition containing a *Bordetella bronchiseptica* p88 antigen (or "a p88 vaccine"), that is
25 suitable for administration to dogs and is capable of protecting dogs against disease caused by *Bordetella bronchiseptica*, e.g., infectious tracheobronchitis ("kennel cough").

For the purpose of the present invention, the term "p88 antigen" refers to a protein (see Figure 5) with a molecular weight of 88 kDa as determined by SDS polyacrylamide gel electrophoresis, is recognized by the p88-specific monoclonal antibody Bord 2-7 (ATCC®),
30 and has an amino acid sequence as set forth in SEQ ID NO: 1 or an amino acid sequence that is substantially identical to SEQ ID NO: 1. By "substantially identical" is meant a degree of sequence identity of at least about 80%, preferably at least about 85%, or more preferably, at least about 88%. An example of a p88 antigen having an amino acid sequence substantially identical to SEQ ID NO: 1 is the p88 antigen described in WO 92/17557, which is set forth in
35 SEQ ID NO: 3. The p88 specific monoclonal antibody of the present invention recognizes native p88 proteins, recombinant p88 proteins and p88 proteins on the surface of bacteria, for example.

In accordance with the present invention, p88 antigens suitable for use in the present invention include both native p88 proteins (i.e., naturally occurring p88 proteins purified from
40 *Bordetella bronchiseptica*) and recombinantly produced p88 proteins.

Purification of native p88 from *Bordetella bronchiseptica* is described, e.g., in Montaraz et al., *Infection and Immunity* 47: 744-751 (1985), and is also illustrated in the examples provided hereinbelow. Recombinant production of p88 can be achieved using any one of the molecular cloning and recombinant expression techniques known to those skilled in

5 the art. For example, a nucleic acid molecule encoding p68 can be introduced into an appropriate host cell, such as a bacterium, a yeast cell (e.g., a *Pichia* cell), an insect cell or a mammalian cell (e.g., CHO cell). The p68-encoding nucleic acid molecule can be placed in an operable linkage to a promoter capable of effecting the expression of the p68 antigen in the host cell. p68, which is expressed by the host cell, can be readily purified using routine protein
10 purification techniques.

In a preferred embodiment of the present invention, the nucleotide sequence as set forth in SEQ ID NO: 2 coding for the p68 antigen which has the amino acid sequence of SEQ ID NO: 1, is cloned in an expression vector and placed in an operable linkage to a temperature sensitive promoter. The expression vector is introduced into *Escherichia coli* and
15 the p68 antigen is expressed upon heat induction. The cells are lysed and the inclusion bodies where the p68 antigen accumulates are separated by centrifugation. The recombinant p68 in the inclusion bodies is solubilized using SDS or other solubilization agents known in the art such as urea, guanidine hydrochloride, sodium cholate, taurocholate, and sodium deoxycholate. In accordance with the present invention, a purified native or recombinant p68
20 protein is combined with a veterinary-acceptable carrier to form a p68 vaccine composition.

The term "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. Diluents can include water, saline, dextrose, ethanol, glycerol, and the like. Isotonic agents can include
25 sodium chloride, dextrose, mannitol, sorbitol, and lactose, among others. Stabilizers include albumin, among others.

Adjuvants suitable for use in accordance with the present invention include, but are not limited to several adjuvant classes such as; mineral salts, e.g., Alum, aluminum hydroxide, aluminum phosphate and calcium phosphate; surface-active agents and microparticles, e.g.,
30 nonionic block polymer surfactants (e.g., cholesterol), virosomes, saponins (e.g., Quil A, QS-21 and GPI-0100), proteosomes, immune stimulating complexes, cochleates, quaternary amines (dimethyl dioctadecyl ammonium bromide (DDA)), avikins, vitamin A, vitamin E; bacterial products such as the FIBI adjuvant system (Fibi Inc.), cell wall skeleton of *Mycobacterium phlei* (Detox®), muramyl dipeptides (MOP) and tripeptides (MTP),
35 monophosphoryl lipid A, *Bacillus Calmette-Guerin*, heat labile *E. coli* enterotoxins, cholera toxin, trehalose dimycolate, CpG oligodeoxynucleotides; cytokines and hormones, e.g., interleukins (IL-1, IL-2, IL-6, IL-12, IL-15, IL-18); granulocyte-macrophage colony stimulating factor, dehydroepiandrosterone, 1,25-dihydroxy vitamin D₃; polyanions, e.g., dextran;
polyacrylates (e.g., polymethylmethacrylate, Carbopol 834P); carriers e.g., tetanus toxoid,
40 diphtheria toxoid, cholera toxin B subunit, mutant heat labile enterotoxin of enterotoxigenic *E. coli* (mLT), heat shock proteins; oil-in-water emulsions e.g., AMPHIGEN® (Hydronics, USA); and water-in-oil emulsions such as, e.g., Freund's complete and incomplete adjuvants.

Preferred adjuvants for use in the vaccines of the present invention include Quil A and cholesterol.

5 The p68 antigen and the veterinary-acceptable carrier can be combined in any convenient and practical manner to form a vaccine composition, e.g., by admixture, solution, suspension, emulsification, encapsulation, absorption and the like, and can be made in formulations such as tablets, capsules, powder, syrup, suspensions that are suitable for injections, implantations, inhalations, ingestions or the like. Preferably, the vaccine is
10 formulated such that it can be administered to dogs by injection in a dose of about 0.1 to 5 ml, or preferably about 0.5 to 2.5 ml, or even more preferably, in a dose of about 1 ml. When appropriate, the pharmaceutical compositions of the present invention should be made sterile by well-known procedures.

 The amount of p68 in the vaccines should be immunizing-effective and is generally in
15 the range of 0.5 – 1000 µg per dose. Preferably, the amount of p68 is in the range of 1-250 µg per dose. More preferably, the amount of p68 is in the range of 10-100 µg per dose. Even more preferably, the amount of p68 is about 15 to 25 µg per dose.

 The amount of adjuvants suitable for use in the vaccines depends upon the nature of the adjuvant used. For example, when Quil A and cholesterol are used as adjuvant, Quil A is
20 generally in an amount of about 1-1000 µg per dose, preferably 30-100 µg per dose, and more preferably, about 50-75 µg per dose; and cholesterol is generally in an amount of about 1-1000 µg per dose, preferably about 30-100 µg per dose, and more preferably, about 50-75 µg per dose.

 In another embodiment, the present invention provides methods of protecting dogs
25 against disease caused by *Bordetella bronchiseptica* by administering to a dog a p68 vaccine composition, as described hereinabove. In accordance with the present invention, the p68 vaccine composition provides dogs with a long term immunity for at least about 4 months, preferably for at least about 6 months, or even more preferably, for about one year.

 In accordance with the present invention, a p68 vaccine can be administered to a dog
30 by any known routes, including the oral, intranasal, mucosal, topical, transdermal, and parenteral (e.g., intravenous, intraperitoneal, intradermal, subcutaneous or intramuscular). Administration can also be achieved using needle-free delivery devices. Administration can be achieved using a combination of routes, e.g., first administration using a parenteral route and subsequent administration using a mucosal route.

35 Preferred routes of administration include subcutaneous and intramuscular administrations.

 The p68 vaccine composition of the present invention can be administered to dogs of at least 6 weeks old, preferably at least 7 weeks old, and more preferably, at least 8 or 9 weeks old. Dogs can be vaccinated with one dose or with more than one dose of a p68
40 vaccine. Preferably, two doses of a p68 vaccine are administered to dogs with an interval of about 2-4 weeks, preferably about 3 weeks, between the two administrations. If dogs are vaccinated before the age of 4 months, it is recommended that they be revaccinated with a single dose upon reaching 4 months of age, because maternal antibodies may interfere with development of an adequate immune response in puppies less than 4 months old. Dogs can

- 5 also be revaccinated annually with a single dose. Where *B. bronchiseptica* exposure is likely, such as breeding, boarding, and showing situations, an additional booster may be given within 1 year, or preferably 6 months, of the occurrence of these events.

Combination Vaccines

- 10 In another embodiment, the present invention provides combination vaccines and methods for protecting dogs against *Bordetella bronchiseptica* and/or one or more other canine pathogens by administering such combination vaccines. The combination vaccine compositions of the present invention do not exhibit efficacy interference and are safe for administration to puppies.

- 15 The combination vaccines of the present invention include a *Bordetella bronchiseptica* p68 antigen, which can be made as described hereinabove, in combination with at least one antigen from other canine pathogens capable of inducing a protective immune response in dogs against disease caused by such other pathogens. Such combination vaccines also include combinations of two or more such other canine pathogens without the p68 antigen.

- 20 Such other pathogens include, but are not limited to, canine distemper (CD) virus, canine adenovirus type 2 (CAV-2), canine parainfluenza (CPI) virus, canine parvovirus (CPV), canine coronavirus (CCV), canine herpesvirus, and rabies virus. Antigens from these pathogens for use in the vaccine compositions of the present invention can be in the form of a modified live viral preparation or an inactivated viral preparation. Methods of attenuating virulent strains of these viruses and methods of making an inactivated viral preparation are known in the art and are described in, e.g., U.S. Patents 4,567,042 and 4,567,043.

- Other pathogens also include *Leptospira brasiliensis*, *Leptospira canicola*, *Leptospira grippityphosa*, *Leptospira icterohaemorrhagiae*, *Leptospira pomona*, *Leptospira hardjibovis*, *Porphyromonas* spp., *Bacteroides* spp., *Leishmania* spp., *Borrelia* spp., *Ehrlichia* spp., *Mycoplasma* spp. and *Microsporium canis*. Antigens from these pathogens for use in the vaccine compositions of the present invention can be in the form of an inactivated whole or partial cell preparation, using methods well-known in the art. For example, methods of making an inactivated whole or partial *Leptospira* cell preparation are known in the art and are described in, e.g., Yan, K-T, "Aspects of immunity to *Leptospira borgpetersenii* serovar *hardjo*", PhD Thesis, Appendix I, 1998. Faculty of Agriculture and Food Science, The Queen's University of Belfast; Mackintosh et al., "The use of a *hardjo-pomona* vaccine to prevent leptospirosis in cattle exposed to natural challenge with *Leptospira interrogans* serovar *hardjo*", *New Zealand Vet. J.* 28:174-177, 1980; Bolin et al., "Effect of vaccination with a pentavalent leptospiral vaccine on *Leptospira interrogans* serovar *hardjo* type *hardjo-bovis* infection of pregnant cattle", *Am. J. Vet. Res.* 50:161-165, 1989.

40 In accordance with the present invention, the combination vaccines generally include a veterinary-acceptable carrier. As described hereinabove, a veterinary-acceptable carrier includes any and all solvents, dispersion media, coatings, adjuvants, stabilizing agents, diluents, preservatives, antibacterial and antifungal agents, isotonic agents, adsorption

2A

5 delaying agents, and the like. Diluents can include water, saline, dextrose, ethanol, glycerol, and the like. Isotonic agents can include sodium chloride, dextrose, mannitol, sorbitol, and lactose, among others. Stabilizers include albumin, among others.

Adjuvants suitable for use in accordance with the present invention include, but are not limited to several adjuvant classes such as; mineral salts, e.g., Alum, aluminum hydroxide,
10 aluminum phosphate and calcium phosphate; surface-active agents and microparticles, e.g., nonionic block polymer surfactants (e.g., cholesterol), virosomes, saponins (e.g., Quil A, QS-21 and GPI-0100), protosomes, immune stimulating complexes, cochleates, quarternary amines (dimethyl dioctadecyl ammonium bromide (DDA)), avridine, vitamin A, vitamin E; bacterial products such as the RIBI adjuvant system (Ribi Inc.), cell wall skeleton of
15 Mycobacterium phlei (Detox®), muramyl dipeptides (MDP) and tripeptides (MTP), monophosphoryl lipid A, Bacillus Calmette-Guerin, heat labile E. coli enterotoxins, cholera toxin, trehalose dimycolate, CpG oligodeoxynucleotides; cytokines and hormones, e.g., interleukins (IL-1, IL-2, IL-6, IL-12, IL-15, IL-18), granulocyte-macrophage colony stimulating factor, dehydroepiandrosterone, 1,25-dihydroxy vitamin D₃; polyanions, e.g., dextran;
20 polyacrylates (e.g., polymethylmethacrylate, Carbopol 894P); carriers e.g., tetanus toxin, diphtheria toxin, cholera toxin B subunit, mutant heat labile enterotoxin of enterotoxigenic E. coli (mLT), heat shock proteins; oil-in-water emulsions e.g., AMPHIGEN® (Hydronics, USA); and water-in-oil emulsions such as, e.g., Freund's complete and incomplete adjuvants.

Preferred adjuvants for use in the combination vaccines in accordance with the
25 present invention include 1) Quil A plus cholesterol; and 2) aluminum hydroxide. The amount of adjuvants suitable for use in the vaccine depends upon the nature of the adjuvant used. For example, when Quil A and cholesterol are used as adjuvant, Quil A is generally in an amount of about 1-1000 µg per dose, preferably 30-100 µg per dose, and more preferably, about 50-75 µg per dose; and cholesterol is generally in an amount of about 1-1000 µg per
30 dose, preferably about 30-100 µg per dose, and more preferably, about 50-75 µg per dose. When aluminum hydroxide is used as adjuvant, it is generally in an amount of about 0.5-20%, preferably about 0.5-10%, and more preferably about 1-2%.

The p28 antigen, one or more antigens from other pathogens, and/or the veterinary-acceptable carrier can be combined in any convenient and practical manner to form a
35 combination vaccine composition, e.g., by admixture, solution, suspension, emulsification, encapsulation, absorption and the like, and can be made in formulations such as tablets, capsules, powder, syrup, suspensions that are suitable for injections, implantations, inhalations, ingestions or the like. Preferably, the vaccine is formulated such that it can be administered to dogs by injection in a dose of about 0.1 to 5 ml, or preferably about 0.5 to 2.5
40 ml, or even more preferably, in a dose of about 1 ml.

Combination vaccines may be prepared by rehydrating a freeze-dried preparation of the attenuated viral strains (or a preparation made by other methods such as spray drying or desiccation) and viral preparation with a liquid preparation, which liquid preparation is composed of the *Leptospira* antigens, dissolved in sterile saline solution and adjuvanted with

25

5 Quil A and cholesterol. Such combination vaccine may also be prepared by rehydrating a freeze-dried preparation of the attenuated viral strains and Leptospira viral preparation (or a preparation made by other methods such as spray drying or desiccation) with a sterile solution, or rehydrating said freeze-dried preparation with CCV plus diluent.

10 In accordance with the present invention, combination vaccines can be administered to a dog of at least 6 weeks old, preferably at least 7 weeks old, and more preferably, at least 8 or 9 weeks old. The combination vaccines can be administered in 2 to 4 doses, preferably in 2 to 3 doses. The doses can be administered with 2 to 6 weeks between each dose, preferably with 2 to 4 weeks between each dose.

15 The administration can be done by any known routes, including the oral, intranasal, mucosal topical, transdermal, and parenteral (e.g., intravenous, intraperitoneal, intradermal, subcutaneous or intramuscular). Administration can also be achieved using needle-free delivery devices. Administration can also be achieved using a combination of routes, e.g., first administration using a parental route and subsequent administration using a mucosal route. Preferred routes of administration include subcutaneous and intramuscular administrations.

20

Preferred Combination Vaccines and Vaccination Methods

25 A preferred combination vaccine of the present invention includes an attenuated strain of CD virus, an attenuated strain of CAV-2, an attenuated strain of CPI virus, an attenuated strain of CPV, an inactivated preparation of a strain of CCV, and a *Bordetella bronchiseptica* p68 antigen.

30 An especially preferred combination vaccine includes the attenuated CD virus strain designated as the "Snyder Hill" strain (National Veterinary Service Laboratory, Ames, IA), the attenuated CAV-2 strain designated as the "Manhattan" strain (National Veterinary Service Laboratory, Ames, IA), the attenuated CPI virus strain having the designation of "NL-CPI-8" (National Veterinary Service Laboratory, Ames, IA), the attenuated CPV strain having the designation of "NL-85-D" (National Veterinary Service Laboratory, Ames, IA), an inactivated preparation of the CCV strain having the designation of "NL-15" (National Veterinary Service Laboratory, Ames, IA), and the recombinant *Bordetella bronchiseptica* p68 antigen having the sequence of SEQ ID NO: 1. Such combination vaccine, also referred to herein as "the p68/CCV combination vaccine", is preferably prepared by rehydrating a freeze-dried preparation of the attenuated viral strains and viral preparation with a liquid preparation, which liquid preparation is composed of the p68 antigen dissolved in sterile saline solution and adjuvanted with Quil A and cholesterol. This combination without the p68 antigen is referred to herein as the CCV combination. Such combination vaccine is preferably prepared by rehydrating a freeze-dried preparation of the attenuated viral strains and viral preparation with a liquid preparation, which liquid preparation is composed of sterile saline solution and adjuvanted with Quil A and cholesterol.

40

Another especially preferred combination vaccine includes the antigenic components of the p68/CCV combination vaccine as well as inactivated whole cell preparations of five

5 *Leptospira* species: *Leptospira Bratislava* (e.g., a *Leptospira Bratislava* strain which can be obtained from National Veterinary Service Laboratory, Ames, IA), *Leptospira canicola* (e.g., strain C-5, National Veterinary Service Laboratory, Ames, IA), *Leptospira grippityphosa* (e.g., strain MAL 1540, National Veterinary Service Laboratory, Ames, IA.), *Leptospira*
10 *icterohaemorrhagiae* (e.g., strain NADL 11403, National Veterinary Service Laboratory, Ames, IA) and *Leptospira pomona* (e.g., strain T282, National Veterinary Service Laboratory, Ames, IA). Such combination vaccine, also referred to herein as "the p88/5CV-*Leptospira* combination vaccine", is preferably prepared by rehydrating a freeze-dried preparation of the attenuated viral strains (or a preparation made by other methods such as spray drying or desiccation) and viral preparation with a liquid preparation, which liquid preparation is
15 composed of the p88 antigen and *Leptospira* antigens, dissolved in sterile saline solution and adjuvanted with Quil A and cholesterol. This combination without the p88 antigen is referred to herein as the 5CV-5*Leptospira* combination. This combination without the p88 antigen and without *Leptospira Bratislava* is referred to herein as the 5CV-4*Leptospira* combination. The 5CV combination without the p88 antigen and with *Leptospira canicola* and *Leptospira*
20 *icterohaemorrhagiae* is referred to herein as the 5CV-2*Leptospira* combination. Such combination vaccines are preferably prepared by rehydrating a freeze-dried preparation of the attenuated viral strains (or a preparation made by other methods such as spray drying or desiccation) and viral preparation with a liquid preparation, which liquid preparation is composed of the *Leptospira* antigens, dissolved in sterile saline solution and adjuvanted with
25 Quil A and cholesterol. Such combination vaccines are also preferably prepared by rehydrating a freeze-dried preparation of the attenuated viral strains and *Leptospira* viral preparation (or a preparation made by other methods such as spray drying or desiccation) with a sterile solution, or rehydrating said freeze-dried preparation with CCV plus diluent.

In accordance with the present invention, the p88/5CV, p88/5CV-*Leptospira*, 5CV, 5CV-5*Leptospira*, 5CV-4*Leptospira*, and 5CV-2*Leptospira* combination vaccines can be
30 administered to healthy dogs 4 weeks of age or older, preferably 6 weeks or older, and preferably in 3 doses, each administered about 3 weeks apart. Dogs can be revaccinated annually with a single dose. Where *B. bronchiseptica* and/or canine virus exposure is likely, such as breeding, boarding, and showing situations, an additional booster may be given within
35 1 year, or preferably 6 months, of the occurrence of these events.

Still another preferred combination vaccine of the present invention includes an attenuated strain of CD virus, an attenuated strain of CAV-2, an attenuated strain of CPI virus, an attenuated strain of CPV, and a recombinant *Bordetella bronchiseptica* p88 antigen.

An especially preferred combination vaccine includes the attenuated CD virus strain designated as the "Synder Hill" strain (National Veterinary Service Laboratory, Ames, IA), the
40 attenuated CAV-2 strain designated as the "Manhattan" strain (National Veterinary Service Laboratory, Ames, IA), the attenuated CPI virus strain having the designation of "NL-CPI-5" (National Veterinary Service Laboratory, Ames, IA), the attenuated CPV strain designated as "NL-35-B" (National Veterinary Service Laboratory, Ames, IA), and the recombinant *Bordetella*

27

5 *bronchiseptica* p88 antigen having the sequence of SEQ ID NO: 1. Such combination vaccine, also referred to herein as "the p88/DA₂PP combination vaccine", is preferably prepared by rehydrating a freeze-dried preparation of the attenuated viral strains (or a preparation made by other methods such as spray drying or desiccation) with a liquid preparation, which liquid preparation is composed of the p88 antigen dissolved in sterile saline solution and adjuvanted with Quil A and cholesterol. This combination vaccine without the p88 antigen is referred to as the DA₂PP combination vaccine. Such combination vaccine is preferably prepared by rehydrating a freeze-dried preparation of the attenuated viral strains (or a preparation made by other methods such as spray drying or desiccation) with a liquid preparation, which liquid preparation is composed of sterile saline solution and adjuvanted with Quil A and cholesterol.

Another especially preferred combination vaccine includes the antigenic components of the p88/DA₂PP combination vaccine as well as inactivated whole cell preparations of two *Leptospira* species: *Leptospira canicola* (e.g., strain C-51, National Veterinary Service Laboratory, Ames, IA), and *Leptospira icterohaemorrhagiae* (e.g., strain NADL 11403, National Veterinary Service Laboratory, Ames, IA). Alternatively, a preferred combination vaccine can include the antigenic components of the p88/DA₂PP combination vaccine as well as inactivated whole cell preparations of five *Leptospira* species: *Leptospira Bratislava*, *Leptospira canicola*, *Leptospira grippityphosa*, *Leptospira icterohaemorrhagiae* and *Leptospira pomona*. These combination vaccines, also referred to herein as "the p88/DA₂PP-*Leptospira* combination vaccines", are preferably prepared by rehydrating a freeze-dried preparation of the attenuated viral strains (or a preparation made by other methods such as spray drying or desiccation) and viral preparation with a liquid preparation, which liquid preparation is composed of the p88 antigen and *Leptospira* antigens, dissolved in sterile saline solution and adjuvanted with Quil A and cholesterol.

Alternatively, another preferred combination vaccine includes the antigenic components of the DA₂PP combination vaccine as well as inactivated whole cell preparations of five *Leptospira* species: *Leptospira Bratislava*, *Leptospira canicola*, *Leptospira grippityphosa*, *Leptospira icterohaemorrhagiae* and *Leptospira pomona*. Still another preferred combination vaccine includes the antigenic components of the DA₂PP combination vaccine as well as inactivated whole cell preparations of four *Leptospira* species: *Leptospira canicola*, *Leptospira grippityphosa*, *Leptospira icterohaemorrhagiae* and *Leptospira pomona*. These combination vaccines, also referred to herein as "the DA₂PP-*Leptospira* combination vaccines", are preferably prepared by rehydrating a freeze-dried preparation of the attenuated viral strains (or a preparation made by other methods such as spray drying or desiccation) and viral preparation with a liquid preparation, which liquid preparation is composed of the *Leptospira* antigens, dissolved in sterile saline solution and adjuvanted with Quil A and cholesterol.

In accordance with the present invention, the p88/DA₂PP, p88/DA₂PP-*Leptospira*, DA₂PP, and DA₂PP-*Leptospira* combination vaccines can be administered to healthy dogs 6

5 weeks or older, or preferably 8 weeks of age or older, and preferably in 2 doses, each administered about 3 weeks apart. A single dose may be sufficient if given to a dog at least 12 weeks of age. Dogs can be revaccinated annually with a single dose. Where *B. bronchiseptica* and/or canine virus exposure is likely, such as breeding, boarding, and showing situations, an additional booster may be given within 1 year, or preferably 6 months, of the occurrence of these events. Another preferred combination vaccine includes a p88 antigen, preferably the recombinant p88 antigen having SEQ ID NO: 1, in combination with an attenuated strain of CPI.

Still another preferred combination vaccine includes a p88 antigen, preferably the recombinant p88 antigen having SEQ ID NO: 1, an attenuated strain of CPI, and two at least two *Leptospira* species such as *Leptospira canicola* (e.g., strain C-51, National Veterinary Service Laboratory, Ames, IA), and *Leptospira icterohaemorrhagiae* (e.g., strain NADL 11403, National Veterinary Service Laboratory, Ames, IA).

The amount of the p88 antigen and the antigen(s) from one or more other pathogens in the combination vaccines of the present invention should be immunizing-effective. In general, the p88 antigen in a combination vaccine should be in an amount of at least about 0.5 µg per dose. The attenuated CD virus should be in an amount of at least about 10^2 to about 10^8 TCID₅₀ per dose TCID₅₀ (tissue culture infectious dose 50% cytopathic effect) per dose, and preferably in the range of about 10^4 to about 10^6 TCID₅₀ per dose. The attenuated CAV-2 should be in an amount of at least about 10^3 TCID₅₀ to about 10^8 TCID₅₀ per dose, preferably in the range of $10^{4.5}$ to about $10^{6.5}$ TCID₅₀ per dose. The attenuated CPI virus should be in an amount of at least about 10^3 TCID₅₀ to about 10^8 TCID₅₀ per dose, and preferably in the range of 10^5 to about 10^7 TCID₅₀ per dose. The attenuated CPV should be in an amount of at least about 10^3 TCID₅₀ to about 10^8 TCID₅₀ per dose, preferably, an amount in the range of 10^7 to about 10^8 TCID₅₀ per dose. The amount of CGV in an inactivated viral preparation should be at least about 100 relative units per dose, and preferably in the range of 1000-4500 relative units per dose. Each *Leptospira* species in the vaccine should be in the range of about 100-3500 NU (nephelometric units) per vaccine dose, and preferably in the range of 200-2000 NU per dose.

The combination vaccines are formulated such that the vaccines can be administered to dogs by injection in a dose of 0.1 ml to 5 ml, preferably from 0.5 ml to 2.5 ml, and more preferably, about 1 ml.

29

5

The present invention is further illustrated by the following non-limiting examples.

EXAMPLE 1

CANINE BORDETELLA p88 RECOMBINANT ANTIGEN DOSE TITRATION STUDY

10

VACCINE:

The experimental vaccine antigen was a recombinant p88 outer membrane protein (SEQ ID NO: 1) of *B. bronchiseptica* produced by *E. coli* strain LW88. The vaccine contained varying levels of SDS (sodium dodecyl sulfate) solubilized p88, adjuvanted with 50 µg of QAC (Quil A/50µg cholesterol) in a 1 mL dose.

15

CHALLENGE MATERIAL:

An aerosol of *Bordetella bronchiseptica*, dog isolate #88B, passage #3, lot #051887, was used as the challenge material. The mean plate count was 1.59×10^8 CFU/mL.

20

ANIMALS:

Sixty male and female canine pups were randomly allocated to one of six treatment groups (10 pups per group). Pups were bled and tracheal swabs were taken 41 days prior to the first vaccination and again 28 days prior to first vaccination and any seropositive or culture positive animals were removed from the study.

25

Animals were randomly assigned to treatments and rooms according to a randomized complete block design. Post-vaccination observations were done without knowledge of vaccine assignment groups.

DESIGN:

Group	Dose Level	Route ¹	Number of Animals
T01	Saline Control (0.9% saline as a 1 mL dose)	SC	9
T02	1 µg p88	SC	9
T03	4 µg p88	SC	9
T04	16 µg p88	SC	9
T05	64 µg p88	SC	9
T06	256 µg p88	SC	9

30

¹ SC = subcutaneous

5 PROCEDURE:**VP Administration:**

Animals were vaccinated on Day 0 with either the placebo or the experimental vaccine. A second vaccination was administered on Day 21. The first vaccination was administered subcutaneously in the right neck and the second vaccination was administered subcutaneously in the left neck.

Challenge Administration:

All animals were challenged 28 days after the second vaccination with an aerosol of *Bordetella bronchiseptica*. Animals were monitored for coughing for a period of 30 minutes, twice daily (once in the a.m. and once in the p.m.) on days two through fourteen following challenge (Days 51 through 63).

Observations and Samples Collection:

All injection sites were palpated and measured three dimensionally for seven days following each vaccination (Days 0 through 7 and 21 through 28) and on the 14th day post each vaccination (Days 14 and 35).

Rectal temperatures were recorded on the day of vaccination and for three days following each vaccination (Days 0 through 3 and 21 through 24).

Blood was collected on the days of vaccination (Days 0 and 21) and on Days 42, 50, and 63 and assayed by ELISA for specific antibodies against the p68 protein purified from *B. bronchiseptica*. Blood was also collected on Days 42, 48, 50, 52, 54, 58 and 68 and analyzed for Serum Amyloid A (SAA).

All animals were tracheal swabbed for *B. bronchiseptica* isolation and blood was collected for *B. bronchiseptica* agglutination titers prior to vaccination (at the vendor, on Day -41 and Day -28) and on Day 48.

Bordetella P68 Dog and Mouse Antibody Titration DAB ELISA

Purified native p68 was diluted to 800 ng/mL in 0.01 M Borate Buffer and was added to each well at 100 μ L/well. The plates were incubated overnight at 4°C. The plates were then washed once with excess PBS-Tween 20. 1% nonfat dried milk in PBS was added to the plates at 200 μ L/well. The plates were then incubated for 1 hour at 37°C. The plates were then washed once with excess PBS-Tween 20.

Dog or mouse serum was added at a 1:50 dilution to the top row of the ELISA plates and two fold serially diluted serum was added all the way down the plate. The plates were incubated for 1 hour at 37°C. Subsequently, the plates were washed 3 times with excess PBS-Tween 20.

To plates incubated with dog serum above, peroxidase labeled goat anti-dog IgG (H + L), diluted at a 1:2000 dilution, was added at 100 μ L/well. The plates were then incubated for 1 hour at 37°C. To plates incubated with mouse serum above, peroxidase labeled goat anti-mouse IgG (H + L), diluted at a 1:4000 dilution, was added at 100 μ L/well. The plates were then incubated for 1 hour at 37°C. The plates were then washed 3 times with excess PBS-Tween 20.

5 ABTS substrate was added at 100 μ L/well. Approximately 20 minutes later, the plates were read with a Molecular Devices or an equivalent plate reader at 405–490 nm.

DATA ANALYSIS:

Treatment differences in the number of dogs coughing were tested using Fisher's Exact Test. The 5% level of significance was used.

10 ELISA titers were log transformed prior to analysis using a general linear mixed model. The 95% level of confidence was used to assess treatment differences. Challenge observations were monitored twice daily for 30 minutes each.

RESULTS:

Tracheal Swab Culture and Agglutination Tests

15 Tracheal swab cultures and agglutination tests were evaluated to monitor the *B. bronchiseptica* status of animals enrolled in the study. A number of dogs demonstrated increased titers at various time points but no titer increased above 128 prior to challenge.

Injection Site Observations

 Injection site reactions following the first vaccination are presented in Table 1. The
20 largest injection site reactions were observed in T05 (64 μ g) vaccinated animals, with the largest mean injection site reaction measuring only 14.89 cm^3 (two days post vaccination). T03 (4 μ g), T04 (16 μ g) and T06 (256 μ g) vaccinated animals demonstrated varying injection site reactions up to 7 days post vaccination. T02 (1 μ g) vaccinated animals only demonstrated reactions on Day 1 post vaccination. By the seventh day post vaccination, there was no
25 statistically significant difference in injection site reactions among the treatment groups. By Day 14, all injection site reactions had dissipated.

 Injection site reactions following the second vaccination are presented in Table 2. Following the second vaccination the largest mean injection site reactions were observed in
30 T06 (256 μ g), with the largest mean injection site reaction measuring 50.08 cm^3 (one day post vaccination). Injection site reactions were demonstrated in T05 (64 μ g) and T04 (16 μ g) animals up to 7 days post second vaccination. Minimal injection site reactions were demonstrated in T03 (4 μ g) and T02 (1 μ g) animals up to 7 days post vaccination. Injection site reactions that were not statistically different from the placebo group were demonstrated in T02 (1 μ g) and T03 (4 μ g) post vaccination. Fourteen days post second vaccination no
35 injection site reactions were observed.

 Frequency of injection site reactions following first vaccination is presented in Table 3. The highest overall LSM frequency, 78%, of injection sites exhibiting a reaction at any time post first vaccination resulted from vaccination with T06 (256 μ g). The next most frequent were 72% of the injection sites showing a reaction following the first vaccination with T05
40 (64 μ g), 69% following the first vaccination with T04 (16 μ g), and 63% following the first vaccination with T03 (4 μ g). The lowest frequency, 36%, followed the first vaccination of T02 (1 μ g).

5 Frequency of injection site reactions following the second vaccination is presented in Table 4. The overall LSM frequency for each vaccine was consistent with that seen post first vaccination.

 Incidence and duration of injection site reactions following vaccination are summarized in Table 5. The incidence (or the number of dogs showing a reaction at any
10 time) of a measurable injection site reaction was 100% for T03, T04, T05 and T06 (4 µg, 16 µg, 64 µg, and 256 µg, respectively) following the first and second vaccination. Animals that received T02 (1 µg) demonstrated the least incidence of injection site reactions post vaccination (57.1%).

 Duration of the reaction (expressed as a least square means of days with a reaction
15 shown in Table 6) was longer for T04, T05 and T06 (16 µg, 64 µg, and 256 µg, respectively) vaccinated animals following the first and second vaccinations (2.7 to 5.1 days post first vaccination and 6.0 to 6.7 days post second vaccination). T02 and T03 (1 µg and 4 µg, respectively) vaccinated animals demonstrated the fewest number of days with an injection site reaction following the first and second vaccinations (0.3 and 1.3 days post first vaccination
20 and 1.9 and 4.5 days post second vaccination).

Rectal Temperature

 Mean rectal temperature measurements are summarized in Table 6. The LSM rectal temperature for T02 (1 µg) on Day 1 and 24, for T03 (4 µg) on Day 1, 21, and 24, for T04 (16 µg) on Day 2 and 24, for T05 (64 µg) on Day 23, and for T06 (256 µg) on Day 0, 1, and 24
25 were significantly different from the placebo. On Day 23 all comparisons were not statistically significant ($P > 0.05$) from the placebo.

p68 ELISA Serology

 Summary of p68 ELISA data are presented in Table 7. The pre-vaccination geometric mean virus titers of p68 ELISA specific antibodies in all groups were low (range
30 24.9 to 28.9) and titers for the placebo remained low throughout the duration of the study. Twenty-one days following the first vaccination, p68 ELISA geometric mean titers had increased in the vaccinated treatment (range 55.2 to 4,411.7), however T02 (1 µg) titer was not statistically different from the Placebo (T01). Forty-two days after the second vaccination, geometric mean titers were further increased in all vaccinated groups (range 674.6 to
35 48,982.0) demonstrating good serological response to vaccination.

Serum Amyloid A (SAA) Serology

 SAA titers are summarized in Table 8. Prior to challenge, geometric mean SAA titers were low in all the treatment groups (range 0.1 to 0.5). Post challenge, T01 GMT titers ranged from 1.5 to 146.0, where p68 treatment groups ranged from 0.9 to 23.1. All treatment groups
40 were statistically different than the placebo on Days 50, 52, 54, and 56. No statistical differences were demonstrated among the p68 vaccines with the exception of T02 (1 µg) on Day 52 when it demonstrated a statistically different geometric mean from all other p68 treatment groups.

5

Challenge Response

Challenge response data are presented in Table 9. The response was determined by monitoring coughing following challenge and the observations were analyzed using two methods: least square mean number of days with cough and two consecutive days of coughing (Incidence of Disease).

10

Analysis of the mean number of days coughing demonstrated no statistically significant difference between the p68 treatment groups; but in the dogs vaccinated with placebo coughed a mean of 8.8 days whereas dogs administered p68 vaccines coughed significantly less, means ranging between 2.2 to 4.7 days.

15

When dogs were evaluated using Incidence of Disease, all T01 (placebo) were observed coughing for two consecutive days (100% Incidence of Disease). T04 (16 µg) and T05 (64 µg) vaccinated dogs demonstrated an Incidence of Disease of 55.6% and 66.7%, respectively. Only 28.6% of T02 (1 µg), 50% of T03 (4 µg), and 33.3% of T06 (256 µg) vaccinated dogs were observed coughing for two consecutive days.

20

DISCUSSION:

In this study, the objective was to establish a relationship between antigen dose, immune response, and protection in dogs. The p68 antigen doses examined were 1 µg, 4 µg, 16 µg, 64 µg, and 256 µg.

Analysis of injection site reaction measurements demonstrated a negligible reaction in the p68 treatment groups, with the exception of T06 (256 µg) on the first day post second vaccination. Reactions that were observed tended to be small, generally decreasing in size during the observation periods. The size of these reactions was clinically insignificant and would most likely go unnoticed on unshaven dogs.

25

Rectal temperatures post vaccination were unremarkable and were within normal limits for all dogs in all groups.

30

Serological response to vaccination was excellent in T03 through T06 groups. In these treatment groups, all demonstrated significantly higher p68 ELISA titers when compared to the placebo from Day 21 through Day 63. T02 (1 µg) demonstrated significant p68 ELISA titers compared to the T01 (placebo) from Day 42 through Day 63. The highest titers were observed in T05 (64 µg) and T06 (256 µg).

35

Examination of the SAA response in all p68 vaccinated dogs following challenge indicated a much smaller rise in the SAA post-challenge when compared to control dogs. No difference was demonstrated between the p68 vaccine dose levels post-challenge with the exception of T02 (1 µg) on Day 52 that demonstrated a statistically different geometric mean from all other p68 treatment groups.

40

Post challenge coughing observations were analyzed using least squares means (LSM) of the number of days with cough or two consecutive days coughing (Incidence of disease). Using LSM of days coughing, a significant difference was demonstrated between placebo and all p68 vaccinated groups although no difference was demonstrated between the

34

- 5 different p68 vaccine dose levels. Using the incidence of Disease T02 (1 μ g), T03 (4 μ g) and T08 (256 μ g) vaccinated dogs coughed significantly less than the placebo. 34

CONCLUSIONS:

- The study was conducted to establish a relationship between antigen dose, immune response, and protection in dogs. The p68 antigen doses examined were 1 μ g, 4 μ g, 16 μ g, 10 64 μ g, and 256 μ g.

- All vaccines were safe as demonstrated by minimal injection site reactions, normal rectal temperatures and absence of adverse response to vaccination. The size of the injection site reactions and the duration of these reactions were less in the lower antigenic treatment groups. Serological response to vaccination as measured by ELISA titers was excellent with 15 the higher antigenic dose groups demonstrating higher serological responses. When using LSM days coughing as a method of comparison, all treatment groups demonstrated a significant reduction in coughing when compared to placebo. No differences were noted between the treatment groups. When two consecutive days coughing (or incidence of Disease) was used for comparison, T02 (1 μ g), T03 (4 μ g) and T08 (256 μ g) vaccinated dogs 20 coughed significantly less than the placebo.

Table 1 Volume of Injection Site Reaction in Dogs Following First Vaccination with p68 Antigen or Placebo

Treatment (n)		LS Mean Size (cm²) of Injection Site Reactions After First Vaccination by Day of Study¹								
		0	1	2	3	4	5	6	7	14
T01	Placebo (9)	0.00 ^a	0.00 ^a	0.00 ^a	0.00 ^a	0.00 ^a	0.00 ^a	0.00 ^a	0.00 ^a	0.00 ^a
T02	p68, 1 µg (7)	0.00 ^a	4.00 ^b	0.00 ^{ab}	0.00 ^a	0.00 ^a	0.00 ^a	0.00 ^{ab}	0.00 ^a	0.00 ^a
T03	p68, 4 µg (8)	0.00 ^a	0.00 ^{ab}	0.84 ^{ab}	4.58 ^b	1.14 ^{ab}	0.39 ^a	0.00 ^a	0.00 ^a	0.00 ^a
T04	p68, 16 µg (9)	0.00 ^a	0.00 ^a	3.58 ^b	4.89 ^b	1.92 ^{ab}	1.79 ^{ab}	2.36 ^{ab}	0.36 ^a	0.00 ^a
T05	p68, 64 µg (9)	0.00 ^a	10.44 ^c	14.69 ^c	10.68 ^b	4.01 ^{ab}	4.40 ^b	2.82 ^{ab}	1.18 ^a	0.00 ^a
T06	p68, 256 µg (9)	0.00 ^a	7.00 ^b	8.89 ^b	7.50 ^{ab}	5.82 ^b	4.36 ^b	3.86 ^b	1.24 ^a	0.00 ^a

Table 2 Volume of Injection Site Reaction Following Second Vaccination with p68 Antigen or Placebo

Treatment (n)		LS Mean Size (mm²) of Injection Site Reactions After Second Vaccination by Day of Study¹								
		0 (21)	1 (22)	2 (23)	3 (24)	4 (25)	5 (26)	6 (27)	7 (28)	14 (35)
T01	Placebo (9)	0.00 ^a	0.00 ^a	0.00 ^a	0.00 ^a	0.00 ^a	0.00 ^a	0.00 ^a	0.00 ^a	0.00 ^a
T02	p68, 1 µg (7)	0.00 ^a	0.54 ^a	2.38 ^{ab}	1.14 ^a	0.45 ^a	0.61 ^a	0.50 ^a	0.16 ^a	0.00 ^a
T03	p68, 4 µg (8)	0.00 ^a	0.00 ^a	5.33 ^{ab}	4.20 ^a	2.89 ^{ab}	2.89 ^{ab}	1.59 ^a	1.29 ^{ab}	0.00 ^a
T04	p68, 16 µg (9)	0.00 ^a	0.00 ^a	7.58 ^{ab}	10.67 ^b	7.25 ^{ab}	7.25 ^a	7.97 ^b	5.14 ^{ab}	0.00 ^a
T05	p68, 64 µg (9)	0.00 ^a	2.89 ^a	10.99 ^b	14.29 ^b	8.79 ^b	8.75 ^b	11.14 ^b	6.50 ^b	0.00 ^a
T06	p68, 256 µg (9)	0.00 ^a	50.09 ^b	8.58 ^{ab}	13.44 ^b	11.32 ^b	7.42 ^{ab}	9.51 ^b	2.89 ^{ab}	0.00 ^a

¹ Values with different superscripts are statistically different (P≤0.05)

Table 3. Frequency of Injection Site Reaction Following First Vaccination with p68 Antigen or Placebo
LS Mean Percent Dogs per Pen^a with Reaction After First Vaccination by Day of Study^a

Treatment (N)		0	1	2	3	4	5	6	7	14
T01	Placebo (8)	0.00 ^a	0.00 ^a	0.00 ^a	0.00 ^a	0.00 ^a	0.00 ^a	0.00 ^a	0.00 ^a	0.00 ^a
T02	p68, 1 µg (7)	0.00 ^a	100.00 ^b	83.33 ^b	80.00 ^b	25.00 ^a	12.50 ^a	37.50 ^b	37.50 ^b	0.00 ^a
T03	p68, 4 µg (8)	0.00 ^a	80.00 ^{ba}	80.00 ^b	90.00 ^b	80.00 ^b	68.33 ^b	80.00 ^a	80.00 ^a	0.00 ^a
T04	p68, 16 µg (8)	0.00 ^a	82.50 ^a	87.50 ^b	100.00 ^a	100.00 ^b	77.50 ^{ba}	87.50 ^a	100.00 ^a	10.00 ^a
T05	p68, 64 µg (8)	0.00 ^a	80.00 ^{ba}	100.00 ^b	100.00 ^a	90.00 ^b	90.00 ^{ba}	90.00 ^a	90.00 ^a	0.00 ^a
T06	p68, 256 µg (8)	0.00 ^a	100.00 ^{ba}	100.00 ^b	100.00 ^a	100.00 ^b	100.00 ^a	87.50 ^a	100.00 ^a	0.00 ^a

Table 4. Frequency of Injection Site Reaction Following Second Vaccination with p68 Antigen or Placebo
LS Mean Percent Dogs per Pen^a with Reaction After Second Vaccination by Day of Study^a

Treatment (N)		0 (21)	1 (22)	2 (23)	3 (24)	4 (25)	5 (26)	6 (27)	7 (28)	14 (35)
T01	Placebo (8)	0.00 ^a	0.00 ^a	20.00 ^a	16.67 ^a	0.00 ^a	0.00 ^a	0.00 ^a	0.00 ^a	0.00 ^a
T02	p68, 1 µg (7)	0.00 ^a	88.33 ^b	88.33 ^b	88.33 ^b	48.83 ^b	41.67 ^b	41.67 ^b	28.17 ^b	0.00 ^a
T03	p68, 4 µg (8)	0.00 ^a	83.33 ^a	100.00 ^a	100.00 ^a	90.00 ^a	73.33 ^a	73.33 ^a	73.33 ^a	0.00 ^a
T04	p68, 16 µg (8)	0.00 ^a	90.00 ^{ad}	100.00 ^a	100.00 ^a	100.00 ^a	100.00 ^d	100.00 ^d	100.00 ^d	0.00 ^a
T05	p68, 64 µg (8)	0.00 ^a	100.00 ^d	100.00 ^a	100.00 ^a	100.00 ^a	100.00 ^d	100.00 ^d	100.00 ^d	0.00 ^a
T06	p68, 256 µg (8)	0.00 ^a	100.00 ^d	100.00 ^a	100.00 ^a	100.00 ^a	100.00 ^d	100.00 ^d	87.50 ^{ad}	0.00 ^a

^a Two pens per treatment
^b Values with different superscripts are statistically different (P<0.05).

25

Table 6: Duration of Injection Site Reactions Following Vaccination with p88 Antigen or Placebo

Treatment (N)		Measurable Reaction (n/N%)	LS Mean Days with Reaction ^a (post first vaccination)	LS Mean Days with Reaction ^a (post second vaccination)
T01	Placebo (9)	0/9 (0%)	0.0 ^a	-0.0 ^a
T02	p88, 1 µg (7)	4/7 (57.1%)	0.3 ^a	1.9 ^b
T03	p88, 4 µg (8)	8/8 (100%)	1.3 ^{a,b}	4.5 ^c
T04	p88, 16 µg (9)	9/9 (100%)	2.7 ^b	8.0 ^d
T05	p88, 64 µg (9)	9/9 (100%)	4.9 ^c	8.3 ^d
T06	p88, 256 µg (9)	9/9 (100%)	8.1 ^e	6.7 ^d

5

^a Values with different superscripts are statistically different ($P \leq 0.05$).

38

Table 6. Mean Rectal Temperatures for Dogs Following Vaccination with p68 Antigen or Placebo
LS Mean Rectal Temperature by Day of Study^a

Treatment (N)		0	1	2	3	21	22	23	24
T01	Placebo (9)	38.8 ^{ab}	38.8 ^a	38.8 ^{ab}	38.8 ^a	38.8 ^a	38.8 ^a	38.9 ^{ab}	38.8 ^a
T02	p68, 1 µg (7)	38.8 ^{ab}	38.8 ^b	38.8 ^a	38.4 ^b	38.7 ^a	38.8 ^a	38.7 ^{ab}	38.8 ^{ab}
T03	p68, 4 µg (8)	38.8 ^a	38.7 ^{ab}	38.8 ^b	38.8 ^b	38.8 ^b	38.8 ^a	38.8 ^a	38.4 ^a
T04	p68, 16 µg (9)	38.8 ^a	38.8 ^a	38.8 ^b	38.7 ^{ab}	38.7 ^a	38.8 ^a	38.7 ^{ab}	38.8 ^{ab}
T05	p68, 64 µg (9)	38.8 ^{ab}	38.8 ^a	38.8 ^{ab}	38.8 ^a	38.7 ^a	38.7 ^a	38.8 ^b	38.7 ^{ab}
T06	p68, 256 µg (9)	38.7 ^b	38.8 ^a	38.8 ^{ab}	38.8 ^a	38.8 ^a	38.8 ^a	38.8 ^{ab}	38.8 ^{ab}

Table 7. Serology p68 DAS ELISA Titers in Dogs Following Vaccination with p68 Antigen or Placebo^a
Geometric Mean Virus Titers for p68 ELISA by Day of Study^a

Treatment (N)		0	21	42	49	53
T01	Placebo (9)	28.2 ^a	48.3 ^a	30.0 ^a	28.2 ^a	230.4 ^a
T02	p68, 1 µg (7)	25.5 ^a	85.2 ^b	674.8 ^b	294.4 ^b	1301.7 ^b
T03	p68, 4 µg (8)	25.3 ^a	310.9 ^b	7885.0 ^b	4414.8 ^b	10880.1 ^b
T04	p68, 16 µg (9)	28.9 ^a	815.4 ^b	12180.4 ^b	5824.4 ^b	11429.3 ^b
T05	p68, 64 µg (9)	25.3 ^a	1699.5 ^b	38480.8 ^b	17593.9 ^b	22889.3 ^b
T06	p68, 256 µg (9)	24.9 ^a	4411.7 ^b	48382.0 ^b	28980.9 ^b	30584.3 ^b

¹ Vaccinations were administered on Study Days 0 and 21. Values with different superscripts are statistically different (P<0.05).
^a Vaccinations were administered on Study Days 0 and 21 and challenge was administered on Study Day 49.
² Values with different superscripts are statistically different (P<0.05).

W0 2006030115

26

PC17/00065003111

28

Table 8. Serum Amyloid A (SAA) Titers in Dogs Following Challenge of Dogs Vaccinated with p28 Antigen or Placebo (Geometric Mean Serum Amyloid A Titers by Day of Study Postchallenge)

Treatment (N)		49	50	52	54	56	58
T01	Placebo (5)	0.2 ^a	148.0 ^a	67.3 ^a	163.6 ^a	14.7 ^a	1.8 ^a
T02	p28, 1 µg (7)	0.2 ^a	8.5 ^b	1.2 ^b	0.7 ^b	0.6 ^b	0.3 ^a
T03	p28, 4 µg (8)	0.2 ^a	9.8 ^b	6.4 ^b	2.3 ^b	1.2 ^b	1.8 ^a
T04	p28, 16 µg (8)	0.1 ^a	19.3 ^b	11.9 ^b	3.0 ^b	1.6 ^b	1.4 ^a
T05	p28, 64 µg (8)	0.5 ^a	11.4 ^b	8.0 ^b	3.4 ^b	1.3 ^b	1.2 ^a
T06	p28, 256 µg (8)	0.5 ^a	23.1 ^b	16.4 ^b	3.8 ^b	1.1 ^b	0.4 ^a

^aValues with different superscripts are statistically different (P<0.05)

W02658315

27

PCT/DE2005/03111

284

Table 3. Incidence and Duration of Coughing in Dogs Following Challenge of Dogs Vaccinated with p68 Antigen or Placebo

Treatment (N)		Incidence of Disease ^{a,b}	LS Mean Days with Cough ^a
T01	Placebo (8)	8/8 ^a (100%)	6.6 ^a
T02	p68, 1 µg (7)	2/7 ^b (28.6%)	2.2 ^b
T03	p68, 4 µg (8)	4/8 ^b (50%)	3.0 ^b
T04	p68, 16 µg (8)	5/8 ^b (62.5%)	3.7 ^b
T05	p68, 64 µg (8)	6/8 ^{ab} (75.0%)	4.7 ^b
T06	p68, 256 µg (8)	3/8 ^b (37.5%)	3.0 ^b

^a Based on two consecutive days coughing.
^b Values with different superscripts are statistically different (P<0.05)

WFO 2006/03/15

28

PC1/02005/00111

AE

EXAMPLE 2**CANINE BORDETELLA p68 IMMUNOGENICITY STUDY****Animals**

5 Forty-five male and female mixed breed dogs were purchased. A MLV parvovirus vaccine was administered to all puppies on the day the puppies arrived at the study site. No other vaccines, other than the experimental products, were administered to the puppies during the study. Dogs were approximately 9 weeks of age (± 1 week) on Day 0 (day of first vaccination).

10 Dogs were kept in an isolation facility necessary to prevent exposure to *Bordetella* and other canine pathogens prior to challenge. After aerosol challenge with *Bordetella*, isolation procedures were continued to prevent exposure to other canine pathogens.

Vaccines

15 Sterile saline was used as a placebo vaccine in treatment groups T01 and T02. Canine recombinant p68 *Bordetella Bronchiseptica* Vaccine was used in treatment groups T03 and T04. The structural gene of the p68 antigen was cloned in *Escherichia coli* and expression of the gene was regulated by a temperature sensitive promoter. The cells were lysed and the inclusion bodies were separated by centrifugation. The recombinant p68 in the
20 inclusion bodies was solubilized by SDS treatment. The recombinant p68 (15 μ g per mL) was combined with 50 μ g of Quil A and 50 μ g of cholesterol per mL in sterile saline as the diluent. Each one mL dose contained 0.28% of ethanol and 0.01% thimerosal.

Challenge inoculum

25 *Bordetella bronchiseptica* Bhr Cat strain was prepared as the challenge inoculum using the method currently employed by Biological Control Laboratories-Microbiology. Bordet-Gengou agar plates were plated with a confluent growth of *Bordetella bronchiseptica* - Bhr Cat strain and incubated for 48 hours at $37.5 \pm 2.5^\circ\text{C}$. Virulent phase I colonies were selected and streaked on Bordet-Gengou agar and incubated for 24 hours at $37.5 \pm 2.5^\circ\text{C}$. After
30 incubation, Bordetella saline was used to wash colonies from the agar and the antigen was diluted to an optical density of 0.80 at 600 nm. A cell count was performed pre- and post-challenge for confirmation of the nephelometer reading. Challenge target concentration was approximately 1×10^8 CFU. The pre-challenge concentration was 2.37×10^8 CFU (100% Phase I) and post-challenge concentration count was 1.88×10^8 CFU (100% Phase I).

Study Design

Summary Table

Treatment Group	Treatment	Route	Number of Animals
T01	Saline Control	Intramuscular	8
T02	Saline Control	Subcutaneous	7
T03	p68 15 µg/dose	Subcutaneous	15
T04	p68 15 µg/dose	Intramuscular	15

Randomization/Blinding

For the time period from vaccination to day of challenge, animals were assigned to treatments according to a generalized block design. Treatments were randomly assigned to rooms. On the day of challenge, animals were randomly assigned to challenge rooms by block.

Qualified individuals, unaware of the assigned treatment groups, conducted microbiological and serological assays and assessments of injection sites, measurements of rectal temperatures, and observations of coughing.

Data Analysis

Post vaccination response variables consisted of injection site data, rectal temperatures and p68 ELISA titers. Injection site data was summarized in the following ways: 1) number of animals having a measurable reaction by treatment and day of study, 2) number of animal time points having a measurable reaction by treatment, 3) number of animals having a measurable reaction at any time point by treatment.

Separately for first and second vaccinations, injection site volume (cubic cm), rectal temperatures and natural log transformed p68 ELISA titer data was analyzed using a general linear mixed model.

A priori linear contrasts of the treatment by observation time-point least squares mean were constructed to test treatment group differences at each observation time-point and to compare time-points within each treatment. The 5% level of significance was used for all comparisons.

Post challenge response variables consisted of daily coughing observations, p68 ELISA titers and serum amyloid A titers. Number of days coughing during the post challenge period was analyzed using a general linear mixed model.

A priori contrasts of the treatment least squares mean was constructed to test treatment group differences. The 5% level of significance was used for all comparisons.

Separately for first and second vaccinations, Fisher's Exact test was used to compare treatment groups for the incidence of two days of consecutive coughing. The 5% level of significance was used for all comparisons.

For serum amyloid A (SAA) titer data post challenge, the natural log transformation was applied to titer values prior to analysis using a general linear mixed model.

A *priori* linear contrasts of the treatment by observation time-point least squares mean was constructed to test treatment group differences at each observation time-point and to compare time-points within each treatment. The 5% level of significance was used for all comparisons.

5

Study Procedure

Detailed Animal Procedures

Forty-five (45) seronegative and culture negative pups were randomly assigned to one of 4 treatment groups. Eight and seven dogs were allocated to the intramuscular (IM) or subcutaneous (SC) control groups respectively, for a total of 15 control dogs. Fifteen dogs were allocated to the p68 SC treatment group and 15 dogs were allocated to the p68 IM treatment group. Treatment Groups are detailed in the Study Design Section above.

Day 0 was designated as the day of first vaccination. Vaccinations were administered on Day 0 and repeated 21 days later. For the first vaccination, the right side of the neck was used and for the second vaccination, the left side of the neck was used. Intramuscular injections were administered in the right and left semimembraneous muscle for the first and second vaccinations, respectively. All injection sites were measured three dimensionally for seven days following each vaccination with a follow-up measurement conducted 14 days following vaccination. Rectal temperatures were monitored on the day of vaccination (prior to vaccination) and for three days following each vaccination.

On Day 35, all animals were tracheal swabbed for *B. bronchiseptica* culture and blood was collected for agglutination titers. All animals were negative by tracheal swab and serologically negative to *Bordetella* and deemed eligible for challenge.

On Day 45, twenty-four days after the second vaccination, an aerosol challenge of *B. bronchiseptica* was administered to all dogs. Sedated dogs were challenged using a disposable nose cone, which was fitted snugly over the muzzle of the sedated dog. The nose cone was attached to a nebulizer which was attached to a vacuum pressure pump set at 5.5 to 6.0 psi. One mL of challenge material was placed in the nebulizer and the aerosolized challenge material was administered to each dog for 4 minutes. Personnel making observations were unaware of treatment group assignments.

Animals were monitored for coughing for 14 days following challenge (Days 46-59). Observations were made in 2 (two), approximately 30-minute periods at approximately the same time each day, one conducted in the AM and one in the PM and results were recorded.

35 Blood Collection

Blood for agglutination titers was collected prior to first vaccination and prior to challenge. Blood for anti-p68 ELISA evaluation was collected prior to vaccination on Days 0 and 21 and on Days 35, 45, and 59. Blood for Serum Amyloid A (SAA) assay was collected on the day of challenge (Day 45) and on Days 46, 48, 50, 52 and 54.

24
44

Tests Performed on Samples

Tracheal swabs were evaluated for the presence of *B. bronchiseptica* by culture. Each tracheal swab was streaked onto a Bordetella Selective Agar plate. Positive and negative controls were included. The plates were incubated at $37.5 \pm 2.5^\circ \text{C}$ for 48 ± 4 hours.

- 5 The resulting colonies on each plate were compared to the positive control and any colony which appeared identical to the positive control was further tested to confirm the presence of *B. bronchiseptica*. Confirmational testing included the use of TSI, Citrate and Urea Agar and Nitrate Red media.

- 10 Sera were evaluated for agglutination titers, p68 ELISA analysis or SAA analysis using the following methods:

- Agglutination titers – Sera were serially diluted in microtiter plates using Bordetella saline. Positive and negative controls were included on each plate. *B. bronchiseptica* Strain 87 (grown on Bordet Gengou agar, harvested, inactivated and diluted to 20% T at 630nm) was used as the agglutinating antigen and was added to each well. Plates were shaken and
15 incubated at $35 \pm 2^\circ \text{C}$ for 2 hours. Plates were read after a second incubation at room temperature for 22 hours. The endpoint titer was determined using the last well to show 50% agglutination.

- p68 ELISA titers – The recombinant p68 antigen was captured on a 96 well microtiter plate coated with a polyclonal antiserum specific to the Bordetella p68 antigen. Serial two-fold
20 dilutions of the canine serum were added to the plate and incubated. Positive and negative controls at a 1:1000 dilution were included on each plate. A peroxidase labeled affinity purified goat anti-dog IgG indicator conjugate was used to detect antibodies specific for the p68 antigen. A chromogenic substrate ABTS was then added and the plate read when the
25 positive control wells had an O.D. of 1.2 ± 0.2 . The titer of a given sample was calculated as the reciprocal of the last dilution with an optical density greater than the mean of the negative control serum dilution plus five standard deviations.

- SAA titers – The canine Serum Amyloid A titers were evaluated using a kit purchased from Accuplex Co., University of Nebraska Medical Center, Omaha, NE 68198. Briefly, canine
30 SAA was captured on a microtiter plate coated with a monoclonal anti-canine SAA antibody. Diluted samples of the canine serum were added to the plate followed by a biotin labeled anti-canine antibody conjugate. Following incubation, a peroxidase conjugated streptavidin chromogenic substrate was added. The plate was read after 30 minutes.

Results

- 35 Rectal Temperatures

Summary of rectal temperature measurements are presented in Tables 10 and 11.

A25
45

Table 10: Least squares mean of rectal temperatures (C°) in dogs following saline or p88 Bordetella vaccination (post first vaccination^a)

Treatment	Rectal Temperatures (C°)				Std Error
	Day of Study				
	0	1	2	3	
T01 saline IM	38.2	38.2	38.2	38.2	0.08
T02 saline SC	38.0	38.3	38.2	38.2	0.08
T03 p88 SC	38.1	38.3	38.1	38.0	0.08
T04 p88 IM	38.2	38.4	38.2	38.2	0.08

^a First vaccination administered on Day 0.

Table 11: Least squares mean of rectal temperatures (C°) in dogs following saline or p88 Bordetella vaccination (post second vaccination^a)

Treatment	Rectal Temperatures (C°)				Std Error
	Day of Study				
	21	22	23	24	
T01 saline IM	38.1	38.3	38.2	38.2	0.10
T02 saline SC	38.5	38.5	38.2	38.2	0.10
T03 p88 SC	38.0	38.3	38.1	38.1	0.08
T04 p88 IM	38.1	38.4	38.4	38.4	0.08

^a Second vaccination administered on Day 21.

No significant difference was noted between any groups on any day following the first vaccination. A significant difference was noted between saline vaccinated dogs and all p88 vaccinated dogs ($p=0.0059$ for T01/T02 v T03/T04) on Day 21. A significant difference ($p=0.0124$) between p88 SC and IM vaccines was demonstrated on Day 24.

Injection Site Reactions

Injection site reactions are summarized in Tables 12 and 13. Due to technical oversight, no injection site observations were conducted at the 14-day observation following the second vaccination (Day 35).

Measurable site reactions were observed in T03 (p88 SC) and were minimal in size. A small injection site reaction was noted in one dog in T04 (p88 IM) on Day 3 but the minimal impact of the measurement is not reflected in the overall mean for the group.

Table 12: Least squares mean (cubic cm) of injection site reactions in dogs following saline or p88 (16µg/dose) Bordetella vaccination (post first vaccination^a)

Treatment	Mean Size (cubic cm) of Injection Site Reactions							
	Day of Study							
	1	2	3	4	5	6	7	14
T01 saline IM	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
T02 saline SC	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
T03 p88 SC	7.4	4.3	6.8	3.4	2.5	2.8	1.9	0.1
T04 p88 IM	0.0	0.0	0.0 ^b	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

^a First vaccination administered on Day 0

^b standard error for T01= 0.80, T02=0.84, T03=0.70, and T04=0.70

^c one dog had a small site reaction (0.5cm³) but due to rounding, the minimal impact of value is not reflected in overall mean.

Table 13. Least squares mean (cube cm) of injection site reactions in dogs following saline or p68 (15 µg/dose) Bordetella vaccination (post second vaccination*)

Treatment ^b	Mean Size (cube cm) of Injection Site Reactions						
	Day of Study						
	22	23	24	25	26	27	28
T01 saline IM	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
T02 saline SC	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
T03 p68 SC	6.6	8.2	9.5	7.2	5.2	4.7	5.1
T04 p68 IM	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

* Second vaccination administered on Day 21

^b standard error for T01=1.12, T02 = 1.19, T03 = 0.92, and T04 = 0.92

Significant differences in injection site measurements are summarized in Table 14.

A significant difference in injection site measurements between T02 (saline SC) versus T03 (p68 15µg SC) was noted for six days following the first vaccination. By Day 7 and again on

Day 14 (the two week re-evaluation observation), no significant differences were noted between any treatment group.

A significant difference in injection site measurements between T02 (saline SC) versus T03 (p68 15µg SC) was noted for seven days following the second vaccination.

Table 14. Significance values for *a priori* contrasts among least squares mean of injection site reaction measurements.

Day of Study	Contrasts (treatment v. treatment)	p-value
1	T02 v T03	0.0001
	T03 v T04	0.0001
	T01T02 v T03T04	0.0001
2	T02 v T03	0.0007
	T03 v T04	0.0008
	T01T02 v T03T04	0.0101
3	T02 v T03	0.0001
	T03 v T04	0.0001
	T01T02 v T03T04	0.0002
4	T02 v T03	0.0044
	T03 v T04	0.0042
	T01T02 v T03T04	0.0339
5	T02 v T03	0.0313
	T03 v T04	0.0293
22	T02 v T03	0.0001
	T03 v T04	0.0001
	T01T02 v T03T04	0.0002
23	T02 v T03	0.0001
	T03 v T04	0.0001
	T01T02 v T03T04	0.0001
24	T02 v T03	0.0001
	T03 v T04	0.0001
	T01T02 v T03T04	0.0001
25	T02 v T03	0.0001
	T03 v T04	0.0001
	T01T02 v T03T04	0.0013

26	T02 v T03 T03 v T04 T01/T02 v T03/T04	0.0019 0.0007 0.0172
27	T02 v T03 T03 v T04 T01/T02 v T03/T04	0.0036 0.0010 0.0313

Only significant ($P < 0.05$) contrasts are presented.

p68 ELISA Titers

p68 ELISA data are summarized in Table 18 and Figure 1. Due to the considerable
 5 titration responses to p68 in the vaccinated dogs, various titration minimums were used at different
 time-points in the study. Titrations for Days 0 and 21 were started at 50. For Days 35, 45 and
 59, titrations were begun at 200. Any value reported as "less than" was divided by 2 prior to
 analysis. The incremental rise observed in p68 ELISA values for control groups (T01 and
 T02) during the course of the study is due to these minimum titration values. Agglutination
 10 titers remained <4.

All p68 vaccinated animals demonstrated at least a four-fold increase in titers from the
 first day of vaccination to the day of challenge (Day 0 vs. Day 45) when compared to placebo
 vaccinated animals.

15 Table 18. Geometric mean and standard errors of p68 (15 µg/dose) ELISA
 endpoint titers^a in dogs following saline or p68 (15 µg/dose) vaccination
 and following *S. bronchiseptica* aerosol challenge.

Treatment	Day of Study ^b									
	0	Std error	21	Std error	35	Std error	45	Std error	59	Std error
T01 saline IM	25.0	4.78	25.0	4.78	125.4	23.98	100.0	18.14	130.0	22.24
T02 saline SC	25.0	5.09	25.0	5.09	112.5	23.00	100.0	18.39	100.0	22.50
T03 p68 SC	25.0	3.99	189.5	29.77	10993.7	1679.20	4595.1	603.43	8799.0	1592.43
T04 p68 IM	25.0	3.99	121.4	19.09	11093.7	1791.85	4419.2	603.44	13719.1	2493.54

20 ^a Titrations for Days 0 and 21 were started at 50. Titrations for Days 35, 45 and 59
 were started at 200. Any value reported as "less than" was divided by 2 prior to analysis.

^b First vaccination occurred on Day 0; Second vaccination occurred on Day 21 and
 challenge was administered on Day 45.

Significant differences for least squares mean of post vaccination and post challenge
 25 ELISA titers are listed in Table 18. No significant difference was noted between the p68 SC
 and p68 IM vaccinated animals after vaccination was complete.

Table 16: Significance values for *a priori* contrasts among least square mean of post vaccination and post challenge p68 ELISA endpoint titers.

Day of study	Contrast	p-value
21	T01 v T04	0.0001
	T02 v T03	0.0001
	T03 v T04	0.0491
35	T01 v T04	0.0001
	T02 v T03	0.0001
45	T01 v T04	0.0001
	T02 v T03	0.0001
59	T01 v T04	0.0001
	T02 v T03	0.0001

5

Only significant ($P < 0.05$) contrasts are presented.

Serum Amyloid A Titers

SAA values were determined on Days 0, 1, 3, 5, 7 and 9 following challenge. Serum Amyloid A values are presented in Table 17 and represented in Figure 2.

10

Table 17: Geometric mean and standard errors of Serum Amyloid A titers in saline and p68 (16 µg/dose) *Bordetella* vaccinated dogs following aerosol challenge with *Bordetella bronchiseptica*

Geometric Mean and Standard Errors of Serum Amyloid A												
Day of Study ^a												
THT	45		49		49		80		82		84	
	Mean	Std. error	Mean	Std. error	Mean	Std. Error	Mean	Std. error	Mean	Std. error	Mean	Std. error
T01	0.1	0.02	277.3	125.30	82.4	42.17	69.8	29.60	6.0	2.34	1.2	0.33
T02	0.4	0.08	394.5	185.63	128.9	70.46	215.9	94.56	29.0	11.23	3.7	1.11
T03	0.6	0.05	31.7	10.51	6.0	2.25	2.3	0.68	0.8	0.23	1.3	0.27
T04	0.3	0.04	83.0	16.55	8.9	3.22	5.0	1.50	2.4	0.65	0.7	0.14

15

^aChallenge administered on Day 45

Significant differences in SAA titers are summarized in Table 18. Saline controls demonstrated higher SAA titers than vaccinated dogs on Days 1, 3 and 5 following challenge. Saline SC controls continued to demonstrate significantly higher SAA titers when compared to vaccinated SC dogs on Day 7 and 9 following challenge.

20

Table 18. Significance values for *a priori* contrasts among least square mean of Serum Amyloid A fibers postchallenge.

Day of study	Contrast (treatment v treatment)	p-value
48	T01 v T04	0.0085
	T02 v T03	0.0001
48	T01 v T04	0.0007
	T02 v T03	0.0001
50	T01 v T04	0.0001
	T02 v T03	0.0001
52	T01 v T02	0.0083
	T02 v T03	0.0001
54	T02 v T03	0.0483

5 Only significant (*P*<0.05) contrasts are presented.

Coughing Observations:

10 Aerosol challenge for all treatment groups occurred 24 days following the second
vaccination (Day 45). Coughing observations were examined using two methods – disease
status based on two consecutive days coughing (presented in Table 19) and percentage of
days coughing (presented in Tables 20 and 21). When dogs were evaluated using criteria of
two consecutive days coughing, 80% of the p88 vaccinated dogs (SC and IM) coughed at
least two consecutive days whereas the Saline SC and Saline IM vaccinated dogs coughed
15 100% and 87.5%, respectively. When dogs were evaluated using percentage of days
observed coughing, p88 SC and IM vaccinated dogs coughed 38.72% and 41.05% of the days
observed, respectively. Saline SC and Saline IM vaccinated dogs coughed 88.04% and
82.65%, respectively.

20 **Table 19. Summary of disease status in saline and p88 (15 µg/dose) Bordetella
vaccinated dogs based on two consecutive days coughing following aerosol challenge
with *Bordetella bronchiseptica***

Treatment Number	# of Dogs	Percent Dogs with Two Consecutive Days Coughing
T01 Saline IM	8	87.5
T02 Saline SC	7	100.0
T03 p88 15 µg/dose SC	15	80.0
T04 p88 15 µg/dose IM	15	80.0

25 No significant difference was demonstrated between saline vaccinated and p88
vaccinated dogs when disease status was based on two consecutive days coughing.

50

Table 20. Mean percentage of days coughing in saline and p68 (15 µg/dose) Bordetella vaccinated dogs following aerosol challenge with Bordetella bronchiseptica

	Treatment	Number of Dogs	Mean	Std Error
T01	Saline IM	8	62.66%	8.67
T02	Saline SC	7	62.04%	8.86
T03	p68 15 µg SC	15	38.72%	6.38
T04	p68 15 µg IM	15	41.05%	6.44

A significant difference ($p=0.0112$) was demonstrated between T02 (saline SC) and T03 (p68 15 µg SC). No significant difference was demonstrated between T01 (saline IM) and T04 (p68 15 µg IM).

Table 21. Mean percentage of days coughing by treatment in saline and p68 (15 µg/dose) Bordetella vaccinated dogs following aerosol challenge with Bordetella bronchiseptica

Parameter	Estimate	Std error
Saline mean (T01 & T02)	62.66%	1.10
15 µg/dose mean (T03 & T04)	39.89%	4.94

A significant difference ($p=0.0022$) was demonstrated between the saline controls and p68-vaccinated dogs.

Discussion

The study was designed to demonstrate the safety and efficacy of a p68 Bordetella 15 µg/dose vaccine in dogs.

Safety was examined using injection site and rectal temperature observations.

Analysis of injection site reaction measurements demonstrated a negligible reaction in the IM vaccinated group and minimal reactions in SC vaccinated group. Reactions that were observed tended to be small, generally decreasing in size during the observation periods. The size of these reactions would most likely go unnoticed on unshaven dogs. Although a significant difference was observed between saline and vaccinated on Day 21 and between IM and SC vaccines on Day 24, rectal temperatures were clinically unremarkable and were within normal limits for all dogs in all groups.

Efficacy was examined using observations of measurement of p68 ELISA endpoint titre and coughing. Regardless of the route of administration, a good p68 antibody response was demonstrated in p68-vaccinated groups by Day 35. A good anamnestic response was observed in vaccines post challenge. Although higher antibody responses have traditionally been obtained with the more vascular and less fatty IM route as compared to the SC route, the difference between p68 SC and IM vaccines was not significant through the course of the study.

Examination of the SAA response in vaccinated and unvaccinated p68 Bordetella dogs following challenge indicated a much smaller rise in the SAA values in vaccinated animals groups especially on days 1, 3 and 5 days post-challenge.

Conclusions

In this study, efficacy a 15 µg/dose p68 canine *Bordetella* vaccine was examined using a canine challenge model 24 days after vaccination. The vaccine was safe as demonstrated by normal rectal temperatures, minimal injection site reactions and efficacy was demonstrated in combined IM and SC groups. Comparison of SAA values demonstrated a significant difference between saline and p68 vaccinated dogs on Days 1, 3 and 5 following aerosol challenge.

EXAMPLE 3 SIX MONTH DURATION OF IMMUNITY STUDY OF CANINE BORDETELLA p68 VACCINE

Animals

Ninety male and female mixed breed dogs were purchased and the majority of puppies were 8 weeks (± 1 week) on the day of first vaccination.

A MLV parvovirus vaccine was administered to dogs upon arrival at the study site. To be eligible for the study, animals were determined to be negative to *B. bronchiseptica* by tracheal swab and agglutination titer. No vaccines, other than the experimental products, were administered during the study.

Dogs were kept in an isolation facility necessary to prevent exposure to *B. bronchiseptica* and canine pathogens prior to challenge. After aerosol challenge with *B. bronchiseptica*, isolation procedures were continued to prevent exposure to other canine pathogens.

Vaccines

Sterile saline was used as a placebo vaccine in treatment groups T01 and T02. Canine recombinant p68 *Bordetella Bronchiseptica* Vaccine was used in treatment groups T03 and T04. The structural gene of the p68 antigen was cloned in *Escherichia coli* and expression of the gene was regulated by a temperature sensitive promoter. The cells were lysed and the inclusion bodies were separated by centrifugation. The recombinant p68 in the inclusion bodies was solubilized by SDS treatment. Separately, the 15 µg p68 and 60 µg p68 were combined with 50 µg of Quil A and 80 µg of cholesterol per mL in sterile Lepto saline as the diluent. The combined components were mixed at 4°C for 24 hours and passed three times through a microfluidizer. Each one mL dose contained 2.7 µl of ethanol and 0.0001% thimerosal. p68 concentrations in the experimental vaccines were measured by p68 ELISA. All assays were done in replicates of five (5). All vaccines were used within 6 months of assembly.

Challenge inoculum

Bordet-Gengou agar plates were plated with *Bordetella bronchiseptica* – BBr Cat strain and incubated for 48 hours at 37.5 $\pm$ 2.5°C. Virulent phase I colonies were selected and streaked on Bordet-Gengou agar and incubated for 24 hours at 37.5 $\pm$ 2.5°C. After

Incubation, *Bordetella* saline was used to wash colonies from agar and the cells diluted to an optical density of 0.80 at 600 nm. A cell count was performed pre and post challenge for confirmation of the nephelometer reading. Challenge target concentration was approximately 1×10^8 CFU. For Group I, the prechallenge concentration count was 1.84×10^8 and the post challenge concentration count was 1.43×10^8 . For Group II, the prechallenge concentration count was 2.55×10^8 and the post challenge concentration count was 2.13×10^8 .

Study Design

Summary Table

10

Treatment Group	Treatment	Route	Number of Animals Day of First Vaccination		
			Day 0 (Group I)	Day 20 (Group II)	Total Number of Animals
T01	Saline Control	Subcutaneous	8	7	15
T02	Saline Control	Intramuscular	8	7	15
T03	p88 60 µg/dose	Subcutaneous	8	7	15
T04	p88 60 µg/dose	Intramuscular	8	7	15
T05	p88 15 µg/dose	Subcutaneous	8	7	15
T06	p88 15 µg/dose	Intramuscular	8	7	15

The study was conducted in two phases or groups consisting of 48 dogs in Group I and 42 dogs in Group II. Vaccination #1 occurred on Day 0 for the each Group. Vaccination #2 occurred 20 days later. Events in Group I were offset from the events in Group II by approximately 15 days. Dogs were aerosol challenged with *B. bronchiseptica* 181 days after the last vaccination.

15

Randomization/Blinding

Animals were randomly assigned to treatments and rooms according to a complete randomized design.

For the time period from vaccination #1 to day of challenge within each study group, animals were randomly assigned to treatments and rooms (3 to 5 dogs per room) using a randomization plan.

20

On the day of challenge, the previously treated animals were randomized to challenge rooms within study group using a generalized block design.

Qualified individuals, unaware of the assigned treatment groups, conducted microbiological and serological assays and assessments of coughing and injection sites.

25

Data Analysis

Post vaccination response variables consisted of injection site data, rectal temperatures and p88 ELISA titers. Injection site data was summarized as follows: 1) number of animals having a measurable reaction by treatment and day of study, 2) number of animal time points having a measurable reaction by treatment, 3) number of animals having a measurable reaction at any time point by treatment, 4) duration of a measurable reaction for each animal.

30

53

Separately for first and second vaccinations, injection site volume (cubic cm), rectal temperatures and natural log transformed p68 ELISA titer data was analyzed using a general linear mixed model.

5 *A priori* linear contrasts of the treatment by observation time point least squares mean was constructed to test treatment group differences at each observation time point and to compare time points within each treatment. The specific comparisons of interest were T01 vs. T03, T01 vs. T05, T03 vs. T05, T02 vs. T04, T02 vs. T06, and T04 vs. T06. If the time point-by-treatment-by-study group interaction term was significant at $P < 0.05$, contrasts among treatment groups at each time point and among time points within treatment groups was within
10 each study group, otherwise these contrasts were based on the time point-by-treatment interaction effect least squares mean. The 5% level of significance was used for all comparisons.

Post challenge response variables consisted of p68 ELISA titers, Serum Amyloid A titers and daily coughing observations. Post challenge p68 ELISA titers were analyzed as
15 previously described. For Serum Amyloid A (SAA) titer data post challenge, the natural log transformation was applied to titer values prior to analysis using a general linear mixed model.

The analysis of coughing was amended to reflect USDA requirements. For each dog, the percentage of observation periods during which coughing was observed was calculated. Prior to analysis, the percentage was transformed using the arcsin square root transformation.
20 A general linear mixed model was used for analysis of coughing.

Least squares mean from this analysis were back-transformed to percentages and the percent reduction in coughing was calculated as:

$$\text{Percent Reduction} = 100 \times \frac{(\text{control group mean} - \text{treatment group mean})}{(\text{control group mean})}$$

25 *A priori* linear contrasts of the treatment least squares mean was constructed to test treatment group differences. The specific comparisons of interest were T01 vs. T03, T01 vs. T05, T03 vs. T05, T02 vs. T04, T02 vs. T06, and T04 vs. T06. If the treatment-by-study group interaction term was significant at $P < 0.05$, contrasts among treatment groups was within each study group otherwise contrasts among treatment groups were based on the treatment main
30 effect least squares mean. The 5% level of significance was used for all comparisons.

Study Procedure

Detailed Animal Procedures

35 Prior to arrival on study premises and prior to the first vaccination, puppies were tracheal swabbed for *B. bronchiseptica* culture and blood was collected for agglutination titers. All animals were negative by tracheal swab and serologically negative to *Bordetella* and deemed eligible for the study. Forty-eight puppies were randomly assigned to one of six treatment groups for Group I. The procedure was repeated using forty-two dogs for Group II. Animals were acclimated to the study site for at least five days.

59

54

Groups and treatments are detailed in Section 7.4.A. Due to facility constraints and to enhance the accuracy of coughing observations following challenge, the vaccination and the respective challenge periods were staggered by 15 days to generate the two dog groups. Day 0 refers to the day of vaccination #1 for both Group I and II. Vaccination #2 occurred 20 days later. Treatments T01, T03, and T05 were administered via the subcutaneous route. Treatments T02, T04, and T06 were administered via the intramuscular route. Subcutaneous injections were administered in the dorsolateral aspect of the neck. For vaccination #1, the right side of the neck was used and for vaccination #2, the left side of the neck was used. Intramuscular injections were administered in the right and left semimembranous muscle for vaccination #1 and vaccination #2, respectively. All injection sites were measured three dimensionally for seven days following each vaccination with a follow-up measurement done 14 days following vaccination. Rectal temperatures were monitored on the day of vaccination (prior to vaccination) and for three days following each vaccination. Blood was collected prior to each vaccination (on Day -1 and Day 18) and on Day 50 for p68 ELISA titer determination.

Each month, all dogs were tracheal swabbed for *B. bronchiseptica* culture under sedation to confirm *B. bronchiseptica* negative status. Blood was also collected for agglutination and ELISA titers. The procedure was repeated 7 days prior to challenge for each group. Evidence of a positive tracheal swab culture or a rising agglutination titer excluded the animal from the study.

Challenge was administered to dogs 181 days after vaccination #2. Sedated dogs were challenged using a disposable nose cone, which was fitted snugly over the muzzle of the sedated dog. The nose cone was attached to a nebulizer which was attached to a vacuum pressure pump set at 5.5 to 6.0 psi. One mL of challenge material was placed in the nebulizer and the aerosolized challenge material was administered to each dog for 4 minutes.

Post challenge coughing observations were amended prior to challenge to comply with USDA recommendations. After challenge, each group of dogs was observed between the third and tenth day following challenge, for a total of 8 days. Animals were observed twice daily for coughing for approximately 45 minutes at each observation period. The interval between observation periods was approximately 12 hours. Personnel unaware of the assigned treatment groups recorded coughing observations.

Blood Collection

Blood for agglutination titer was collected prior to first vaccination, monthly and prior to challenge for each group.

Blood for anti-p68 ELISA evaluation was collected the day before vaccination #1 and #2, on Day 50 and at approximately 30 day intervals thereafter for each group. Blood was also collected the day of challenge and on the final day of post challenge observation.

Blood for Serum Amyloid A (SAA) assay was collected on the day of challenge (prior to challenge) and on 1, 3, 5, 7, and 9 days post challenge for each group.

Tests Performed on Samples

Tracheal swabs were evaluated for the presence of *B. bronchiseptica* by culture. Each tracheal swab was streaked onto a Bordetella Selective Agar plate. Positive and negative controls are included. The plates were incubated at $37.5 \pm 2.5^\circ\text{C}$ for 48 ± 4 hours.

- 5 The resulting colonies on each plate were compared to the positive control and any colony which appeared identical to the positive control was further tested to confirm the presence of *B. bronchiseptica*. Confirmational testing included the use of TSI, Citrate and Urea Agar and Nitrate Red media.

- 10 Sera were evaluated for agglutination titers, p68 ELISA analysis or SAA analysis using the following methods:

- Agglutination titers – Sera were serially diluted in microtiter plates using Bordetella saline. Positive and negative controls were included on each plate. *B. bronchiseptica* Strain 87 (grown on Bordet Gancu agar, harvested, inactivated and diluted to 20%T at 630nm) was used as the agglutinating antigen and was added to each well. Plates were shaken and
15 incubated at $35 \pm 2^\circ\text{C}$ for 2 hours. Plates were read after a second incubation at room temperature for 22 hours. The endpoint titer was determined using the last well to show 80% agglutination.

- p68 ELISA titers – The recombinant p68 antigen was captured on a 96 well microtiter plate coated with a polyclonal antiserum specific to the Bordetella p68 antigen. Serial two fold
20 dilutions of the canine serum were added to the plate and incubated. Positive and negative controls at a 1:1000 dilution were included on each plate. A peroxidase labeled affinity purified goat anti-dog IgG indicator conjugate was used to detect antibodies specific for the p68 antigen. A chromogenic substrate ABTS was then added and the plate read when the positive control wells had an O.D. of 1.2 ± 0.2 . The titer of a given sample was calculated as the
25 reciprocal of the last dilution with an optical density greater than the mean of the negative control serum dilution plus five standard deviations.

- SAA titers – The canine Serum Amyloid A was captured on a 96 well microtiter plate coated with a monoclonal anti-canine SAA antibody. Diluted samples of the canine serum were added to the plate and incubated. A reference standard was added to obtain a standard
30 curve from 0.31 ng/ml to 20 ng/ml. A biotin labeled anti-canine antibody conjugate was added. Following the incubation of the biotin labeled anti-canine antibody, a peroxidase conjugated streptavidin was added. A chromogenic substrate TMB was added and the plate was read after 30 minutes. The concentration of Serum Amyloid A was determined by comparison the sample to the standard curve and multiplication by the appropriate dilution factor.

35 Results

Unless otherwise noted, results are the combined data from Group I and II.

Tracheal Swab Culture and Agglutination Titers

- 40 Positive tracheal swab cultures and/or rising agglutination titers were demonstrated in eleven dogs during the course of the study. These dogs and any dog housed with the positive dogs were removed from the study, resulting in a loss of 20 dogs. The number of dogs

56

removed from each group was: T01-4 dogs, T02-2 dogs, T03-3 dogs, T04-1 dog, T05-5 dogs, T06-5 dogs.

Injection Site Observations

Injection site reactions are summarized in Tables 22-23. Injection site information was not collected for Dog 81595 on Day 21 for Group I due to technical oversight. The protocol was amended so that injection site reaction data was not collected for dogs in Group II on Day 22 therefore, summary of data from Day 22 contains only information from the eight dogs per treatment group in Group I. Injection site reactions were not observed for any dog receiving an IM treatment. Injection site measurements were minimal for both SC vaccinated treatment groups (T03 and T05).

Table 22. Least squares mean (cubic cm) of injection site reactions in dogs following saline or p88 Bordetella vaccination (post first vaccination^a)

Treatment	Mean Size (cubic cm) ^a							
	Day of Study							
	1	2	3	4	5	6	7	14
T01 saline SC	0	0	0	0	0	0	0	0
T02 saline IM	0	0	0	0	0	0	0	0
T03 60 µg SC	5.8	5.4	7.3	8.3	5.0	4.9	2.7	0
T04 60 µg IM	0	0	0	0	0	0	0	0
T05 15 µg SC	4.4	4.6	3.1	2.1	1.2	0.9	0.7	0
T06 15 µg IM	0	0	0	0	0	0	0	0

^a Vaccination #1 administered on Day 0

^b standard error for all means = 0.64

Table 23. Least squares mean (cubic cm) of injection site reactions in dogs following saline or p88 Bordetella vaccination (post second vaccination^a)

Treatment	Mean Size (cubic cm)							
	Day of Study							
	21 ^b	22 ^c	23 ^b	24 ^b	25 ^b	26 ^b	27 ^b	34 ^b
T01 saline SC	0	0	0	0	0	0	0	0
T02 saline IM	0	0	0	0	0	0	0	0
T03 60 µg SC	5.0	3.2	4.2	5.8	5.9	5.8	4.3	0.1
T04 60 µg IM	0	0	0	0	0	0	0	0
T05 15 µg SC	3.7	2.4	2.2	2.6	2.1	2.0	1.8	0
T06 15 µg IM	0 ^d	0	0	0	0	0	0	0

^a Vaccination #2 administered on Day 20

^b standard error for means on this day = 0.55

^c standard error for means on this day = 0.70

^d standard error for T06 on Day 21 = 0.57

Table 24. Percent of dogs having a measurable injection site reaction following vaccination with saline or p88 Bordetella (post first vaccination^a)

Treatment	Percent Measurable Reaction								
	n	1	2	3	4	5	6	7	14
T01 saline SC	15	0	0	0	0	0	0	0	0

57

T02 saline IM	15	0	0	0	0	0	0	0	0
T03 60 µg SC	15	66.7	73.3	73.3	73.3	73.3	73.3	66.7	0
T04 60 µg IM	15	0	0	0	0	0	0	0	0
T05 15 µg SC	15	73.3	73.3	60.0	60.0	53.3	46.7	46.7	0
T06 15 µg IM	15	0	0	0	0	0	0	0	0

^aVaccination #1 administered on Day 0

Table 25. Percent of dogs having a measurable injection site reaction following vaccination with saline or pPS Bordetella (post second vaccination^a)

5

Treatment	n	Percent Measurable Reaction							
		Day of Study							
		21	22 ^b	23	24	25	26	27	34
T01 saline SC	15	0	0	0	0	0	0	0	0
T02 saline IM	15	0	0	0	0	0	0	0	0
T03 60 µg SC	15	80.0	50.0	66.7	66.7	80.0	80.0	80.0	6.7
T04 60 µg IM	15	0	0	0	0	0	0	0	0
T05 15 µg SC	15	73.3	50.0	73.3	73.3	73.3	73.3	66.7	0
T06 15 µg IM	15	0 ^c	0	0	0	0	0	0	0

^aVaccination #2 administered on Day 0

^bn=8 for Day 22

^cn=14 for T06 on Day 21

10

Significant differences in injection site measurements are summarized in Table 26. A significant difference in injection site measurements between T01 (saline SC) versus T03 (60 µg SC) was noted for seven days after the first vaccination. A significant difference between T01 (saline SC) and T05 (15 µg SC) was noted for only the first four days after the first vaccination. A significant difference was found between T03 (60 µg SC) and T05 (15 µg SC) on Days 3 through 7. By Day 14 (the two week re-evaluation observation), no difference was noted between any of the groups.

15

A significant difference ($P=0.0138$) in injection site measurements between T01 (saline SC) versus T03 (60 µg SC) and T05 (15 µg SC) was noted for seven days after the second vaccination. A significant difference was found between T03 (60 µg SC) and T05 (15 µg SC) on Days 23 through 27. By Day 34 (the two week re-evaluation observation), no difference was noted between any of the groups.

20

Table 26. Significance values for *a priori* contrasts among least squares mean of injection site reaction measurements.

25

Day of Study	Contrasts (treatment v. treatment)	p-value
1	T01 v T03	0.0001
	T01 v T05	0.0001
2	T01 v T03	0.0001
	T01 v T05	0.0001
3	T01 v T03	0.0001
	T01 v T05	0.0006
	T03 v T05	0.0001
4	T01 v T03	0.0001
	T01 v T05	0.0214
	T03 v T05	0.0001
5	T01 v T03	0.0001
	T03 v T05	0.0001
6	T01 v T03	0.0001
	T03 v T05	0.0001

7	T01 v T03	0.0031
	T03 v T05	0.0258
21	T01 v T03	0.0001
	T01 v T05	0.0001
22	T01 v T03	0.0010
	T01 v T05	0.0188
23	T01 v T03	0.0001
	T01 v T05	0.0055
	T03 v T05	0.0113
24	T01 v T03	0.0001
	T01 v T05	0.0008
	T03 v T05	0.0001
25	T01 v T03	0.0001
	T01 v T05	0.0087
	T03 v T05	0.0001
26	T01 v T03	0.0001
	T01 v T05	0.0104
	T03 v T05	0.0001
27	T01 v T03	0.0001
	T01 v T05	0.0475
	T03 v T05	0.0004

Only significant ($P<0.05$) contrasts are presented.

Rectal Temperature

Rectal temperature measurements are summarized in Tables 27 and 28. The protocol was amended so that rectal temperature data were not collected for Group II dogs on Day 22, therefore, summary of data from Day 22 contains only information from the dogs per treatment group in Group I.

Table 27. Least squares mean of rectal temperature (°C) in dogs following saline or p88 Bordetella vaccination (post first vaccination)^a

Treatment	Rectal Temperature (°C) ^a			
	Day of Study			
	0	1	2	3
T01 saline SC	38.5	38.4	38.3	38.2
T02 saline IM	38.4	38.2	38.4	38.2
T03 60 µg SC	38.4	38.5	38.2	38.3
T04 60 µg IM	38.4	38.5	38.4	38.4
T05 15 µg SC	38.5	38.5	38.2	38.2
T06 15 µg IM	38.5	38.4	38.3	38.4

^a Vaccination #1 administered on Day 20.
^b standard error = 0.09

Table 28. Least squares mean of rectal temperature (°C) in dogs following saline or p88 Bordetella vaccination (post second vaccination)^a

Treatment	Rectal Temperature (°C)			
	Day of Study			
	20 ^b	21 ^b	22 ^c	23 ^b
T01 saline SC	38.6	38.5	38.3	38.4
T02 saline IM	38.6	38.6	38.3	38.4
T03 60 µg SC	38.7	38.6	38.6	38.4
T04 60 µg IM	38.6	38.7	38.5	38.5
T05 15 µg SC	38.6	38.6	38.5	38.4
T06 15 µg IM	38.7	38.7	38.4	38.5

^a Vaccination #2 administered on Day 20
^b standard error = 0.08
^c standard error = 0.11

A significant difference was noted in rectal temperatures between T02 (saline IM) and T04 (60 µg IM) on Day 1 after the first vaccination. No significant difference was found in rectal temperatures between any group on any day after the second vaccination.

p68 ELISA Titers

- 5 Prechallenge p68 ELISA data are summarized in Table 29. Due to the response of Group I dogs in T06 on Day 19, an effect due to group was observed in the data analysis of p68 ELISA titers. The effect was small and did not influence other analyzed timepoints. Therefore, data from Group I and II are combined for reporting purposes.

- 10 Due to the considerable titer response to p68 in the vaccinated dogs, various titration minimums were used at different timepoints in the study. Titrations for Days -1 and 19 were started at 50. For days 50 through 195, titrations were begun at 200. Titrations for samples collected on Day 201 and 211 were started at 1000. Any value reported as "less than" was divided by 2 prior to analysis. The incremental rise observed in p68 ELISA values for control groups (T01 and T02) during the course of the study is due to these minimum titration values.
- 15 Agglutination titers, except as previously noted, remained <4.

All placebo vaccinated dogs had p68 titers <200 on Day 50. All p68-vaccinated animals demonstrated at least a four-fold increase in titers after the second vaccination (Day 0 vs. Day 50) when compared to placebo vaccinated animals.

- 20 **Table 29. Geometric mean and standard errors of p68 ELISA endpoint titers in dogs following p68 Bordetella vaccination on Day 0 and Day 20.**

Treatment		Day of Study					
		-1 ^a		19 ^a		50 ^b	
		Mean	std. error	Mean	std. error	Mean	std. error
T01	Saline SC	91.4	8.08	90.5	4.82	100.0	16.14
T02	Saline IM	27.7	4.47	25.0	4.03	100.0	16.14
T03	P68 60 µg SC	29.8	4.80	807.6	81.82	10833.5	1715.9
T04	P68 60 µg IM	29.7	4.31	246.7	40.28	4722.2	762.02
T05	P68 15 µg SC	25.0	4.03	268.7	43.36	5822.8	907.36
T06	P68 15 µg IM	23.4	5.40	91.8	14.61	3826.9	608.46

- ^a Titrations for Days -1 and 19 were started at 50. Any value reported as "less than" was divided by 2 prior to analysis
- 25 ^b Titrations for Day 50 were started at 200. Any value reported as "less than" was divided by 2 prior to analysis

- Significant differences for least squares mean of post vaccination ELISA titers are listed in Table 30. No significant difference in p68 ELISA titers was observed between SC controls and SC vaccinees or IM controls and IM vaccinees prior to vaccination (Day -1).
- 30

Table 30. Significance values for *a priori* contrasts among least square mean of post vaccination p88 ELISA endpoint titre.

Day of study	Contrast	p-value
19	T01 v T03	0.0001
	T01 v T05	0.0001
	T02 v T04	0.0001
	T02 v T06	0.0001
	T03 v T05	0.0061
	T04 v T06	0.0001
50	T01 v T03	0.0001
	T01 v T05	0.0001
	T02 v T04	0.0001
	T02 v T06	0.0001
	T03 v T05	0.0059

Only significant ($P < 0.05$) contrasts are presented.

5

p88 ELISA titre measured during the course of the study are summarized in Table 31 and illustrated in Figure 3.

During the course of the study, every attempt was made to coordinate activities between Groups I and II. For pivotal data collection time points (i.e. events surrounding vaccination and challenge), this was achieved. In three instances during the interim of the study, blood and tracheal swab collection varied by 1 or 2 days between groups. In order to summarize and report p88 ELISA data for this interim period, data from these days were combined. Therefore, Day 79 contains combined data from Day 79 (Group I) and Day 81 (Group II), Day 111 corresponds to Day 110 (Group II) and Day 111 (Group I) and Day 169 corresponds to Day 168 (Group II) and Day 170 (Group I). Per the protocol, data analysis was not performed on p88-ELISA data beyond Day 50.

15

Table 31. Summary of geometric mean of p88 ELISA endpoint titre in unvaccinated and p88 Bordetella vaccinated dogs following vaccination and aerosol challenge with Bordetella bronchiseptica

20

Treatment	Geometric Mean of p88 ELISA Endpoint Titre ^a						
	79	110	140	169	185	201	211
T01 Saline SC	100.00	184.92	108.00	109.89	117.18	108.14	800.0
T02 Saline IM	112.85	145.33	130.61	116.51	113.43	112.37	800.0
T03 60 µg SC	3434.24	2684.97	1881.84	1895.58	3097.24	2408.81	81584.79
T04 60 µg IM	1608.80	1164.81	932.12	987.84	1142.01	1547.87	88240.47
T05 15 µg SC	1688.20	1811.80	1829.35	1812.82	2246.83	2244.47	29008.29
T06 15 µg IM	874.18	918.21	873.51	878.15	1605.01	1488.18	11503.28

^a Titrations Days 50 through 185, were started at 200. Titrations for samples collected on Day 201 and 211 were started at 1000. Any value reported as "less than" was divided by 2 prior to analysis.

25

^b Vaccination #1 and #2 was administered on Day 0 and 20, respectively. Challenge was administered on Day 201.

During the course of the study, every attempt was made to coordinate activities between Groups I and II. In three instances, blood collection for the Groups varied by 1 or 2 days. Data from these days were combined for data summary. Analysis was not done on p68 ELISA titers values collected beyond Day 50. Day 78 corresponds to Day 79 and 81, Day 110 corresponds to Day 110 and 111, Day 169 corresponds to Day 169 and 170.

Coughing Observations

Aerosol challenge for both groups occurred 161 days following the second vaccination. To comply with USDA recommendations, coughing criteria was amended to approximately 45-minute observations, approximately twelve hours apart on the third through eighth day following challenge. Coughing observations are summarized in Tables 32 and 33.

Table 32. Mean percentage of timepoints coughing in unvaccinated and p68 *Bordetella* vaccinated dogs following aerosol challenge with *Bordetella bronchiseptica*

Treatment	Number of Dogs	Mean	Std Error
T01 Saline SC	11	78.44%	7.73
T02 Saline IM	13	80.50%	6.64
T03 p68 60 µg SC	12	67.30%	8.12
T04 p68 60 µg IM	14	71.81%	7.32
T05 p68 15 µg SC	10	38.30%	8.19
T06 p68 15 µg IM	10	39.55%	8.18

Table 33. Mean percentage of timepoints coughing by treatment in unvaccinated and p68 *Bordetella* vaccinated dogs following aerosol challenge with *Bordetella bronchiseptica*

Parameter	Estimate	Std error
Saline mean (T01 & T02)	79.97%	6.68
60 µg/dose mean (T03 & T04)	69.55%	6.88
15 µg/dose mean (T05 & T06)	37.92%	6.70

The percent reduction in coughing when compared to the saline control was 51.55% for the 15 µg/dose groups and 11.06% for the 60 µg/dose groups. Statistical significant differences are summarized in Table 34.

Table 34. Significance values for *a priori* contrasts among least squares mean for percentages of timepoints coughing

Contrast	p-value
T01 v T06	0.0041
T03 v T06	0.0189
T02 v T06	0.0019
T04 v T06	0.0119
T01 & T02 v T05 & T06	0.0001

(Only significant ($P < 0.05$) contrasts are presented.)

Serum Amyloid A

SAA values were determined on Days 0, 1, 3, 5, 7 and 9 following challenge. Serum Amyloid A values are presented in Table 35 and represented in Figure 4.

Table 3E: Geometric mean and standard errors of Serum Amyloid A titers in unvaccinated and p88 *Bordetella* vaccinated dogs following aerosol challenge with *Bordetella bronchiseptica*

TX	Geometric Mean and Standard Errors of Serum Amyloid A ^a											
	Day of Study											
	201		202		204		206		208		210	
	Mean	Std. error	Mean	Std. error	Mean	Std. error	Mean	Std. error	Mean	Std. error	Mean	Std. error
T01	1.1	0.33	257.3	84.61	371.8	116.44	548.7	171.93	68.0	21.31	8.4	2.96
T02	1.0	0.28	114.0	32.83	111.9	32.21	103.9	31.36	16.6	4.48	1.7	0.49
T03	0.8	0.25	135.7	40.55	119.7	35.75	74.6	22.25	10.9	3.39	1.0	0.30
T04	0.8	0.23	134.7	38.20	158.0	43.59	174.8	48.89	34.8	9.67	1.9	0.54
T05	0.8	0.28	88.4	22.85	88.3	29.50	9.3	3.12	1.9	0.84	2.0	0.68
T06	0.8	0.27	45.7	14.94	84.0	17.57	8.4	3.07	1.9	0.83	0.8	0.27

^a challenge administered on Day 201.

Significant differences in SAA titers are summarized in Table 3F.

Table 3F. Significance values for *a priori* contrasts among least square mean of Serum Amyloid A titers postchallenge.

Day of study	Contrast (treatment v treatment)	p-value
202	T01 v T06	0.0054
	T02 v T06	0.0383
	T04 v T06	0.0154
204	T01 v T06	0.0097
	T01 v T05	0.0020
	T04 v T06	0.0154
206	T01 v T06	0.0001
	T01 v T05	0.0001
	T02 v T06	0.0001
	T03 v T06	0.0001
	T04 v T06	0.0001
208	T01 v T06	0.0001
	T01 v T05	0.0001
	T02 v T06	0.0001
	T03 v T06	0.0023
	T04 v T06	0.0001
210	T01 v T06	0.0002
	T01 v T05	0.0089

Only significant (*P*<0.05) contrasts are presented.

15 Discussion

The study was designed to demonstrate the safety and six-month efficacy of a recombinant p88 *Bordetella* vaccine in dogs. Safety of both the 15 µg/dose and the 60 µg/dose vaccine was demonstrated. The efficacy and 6 month duration of immunity of the 15 µg/dose was well supported in the study.

20

Safety was examined using injection site and rectal temperature observations. Analysis of injection site reaction measurements demonstrated no reactions in the IM vaccinated groups and minimal reactions in both the 15 µg/dose and 60 µg/dose SC vaccinated groups. Reactions that were observed tended to be smaller in the 15µg/dose SC vaccinated dogs. Such reactions that were seen were transient, generally resolving in 14 days

or less. The size of these reactions would most likely go unnoticed on dogs where injection sites were not shaven. Rectal temperatures post vaccination were unremarkable and were within normal limits for all dogs in all groups.

Efficacy and duration of immunity were examined 181 days from vaccination using observations of coughing and measurement of p68 ELISA endpoint titers. The percentage of coughing in the saline controls (78.26%) indicated that the challenge administered to the study animals was acceptable. Percentage of time points coughing for the 15 µg/dose group (37.82%) demonstrated a 51.55% reduction in coughing when compared to the controls, satisfying the efficacy requirements mandated by the USDA. No protection was demonstrated in the 60 µg/dose group (66.66%) with dogs demonstrating minimal reduction in coughing when compared to the controls.

Although not statistically compared, it can be seen from Tables 29 and 31 that SC vaccinees tended to have higher antibody responses when compared to IM vaccinees. For the purposes of the discussion, further comments regarding the different dose groups combine the results of the IM and SC routes of administration.

Regardless of the route of administration, an excellent p68 antibody response was demonstrated in both vaccinated groups by Day 60 and was maintained by vaccinees throughout the course of the study. A good anamnestic response was observed in vaccinees post challenge.

Comparison of the p68 ELISA titers of the 15 µg/dose and 60 µg/dose during the course of the study indicated that the 60 µg/dose group showed a slightly higher titer response (Figure 3). This response, although excellent, did not correlate with protection following aerosol challenge. p68 ELISA titer responses were variable in dogs removed from the study with positive tracheal swabs or rising agglutination titers. Three of the six controls removed from the study with positive tracheal swab cultures and/or rising agglutination titers maintained p68 ELISA titers of <200. There appears to be no correlation of p68 ELISA titers to the tracheal swab or agglutination titer status of dogs removed from the study.

Examination of the SAA response in vaccinated and unvaccinated p68 *Bordetella* dogs following challenge indicated a much smaller rise in the SAA values in the 15 µg/dose groups especially on days 5 and 7 post-challenge.

Conclusions

In this study, efficacy of 15 µg/dose and 60 µg/dose of a p68 canine *Bordetella* vaccine was examined using a canine challenge model 6 months after vaccination. Both vaccines were safe as demonstrated by normal rectal temperatures and minimal injection site reactions. Although both the 15 µg/dose and the 60 µg/dose vaccinated dogs showed good serological response to vaccination as measured by p68 ELISA titers, the response did not correlate with clinical protection in the 60 µg/dose vaccinated dogs. The 60 µg/dose vaccinated dogs demonstrated no significant difference in coughing when compared to unvaccinated controls. Good efficacy of the 15 µg/dose vaccine was demonstrated by a greater than 50%

reduction in coughing when compared to controls. It is postulated that increased levels of SDS in the 60 µg/dose vaccine may result in the demonstrated difference in protection. Comparison of SAA values demonstrated a difference between vaccinees and controls.

EXAMPLE 4

Safety and Efficacy of VANGUARD® Plus 5/CV-L

5

VANGUARD® Plus 5/CV-L is a freeze-dried preparation of attenuated strains of CD virus, CAV-2, CPI virus, CPV, and inactivated whole cultures of *L. canicola* and *L. icterohaemorrhagiae*, plus a liquid preparation of inactivated CCV with an adjuvant. All viruses were propagated on established cell lines. The CPV fraction was attenuated by low passage on the canine cell line which gave it the immunogenic properties capable of overcoming maternal antibody interference at the levels indicated in Table 38. The liquid component was used to rehydrate the freeze-dried component, which had been packaged with inert gas in place of vacuum.

10

Laboratory evaluation demonstrated that VANGUARD® Plus 5/CV-L immunized dogs against CD, ICH, CAV-2 and CPI respiratory diseases, enteritis caused by CCV and CPV, and leptospirosis caused by *L. canicola* and *L. icterohaemorrhagiae*, and that no immunologic interference existed among the vaccine fractions. Extensive field safety trials showed it to be safe and essentially reaction-free in dogs as young as 6 weeks of age under normal usage conditions.

15

It was also demonstrated that CAV-2 vaccine cross-protects against ICH caused by CAV-1. Studies demonstrated that CAV-2 not only protects against ICH, but against CAV-2 respiratory disease as well. Canine adenovirus type 2 challenge virus was not recovered from CAV-2-vaccinated dogs in tests conducted.

20

The CPV fraction in VANGUARD® Plus 5/CV-L was subjected to comprehensive safety and efficacy testing. It was shown to be safe and essentially reaction-free in laboratory tests and in clinical trials under field conditions. Product safety was further demonstrated by a backpassage study which included oral administration of multiple doses of the vaccine strain to susceptible dogs, all of whom remained normal.

25

Research demonstrated that 3 doses of the vaccine with increased CPV virus titer can overcome serum neutralization (SN) titers associated with maternal antibody. Serum neutralization titers as low as 1:4 were shown by others to interfere with active immunization using conventional modified live vaccines. A clinical trial was conducted with fifty 6-week-old puppies [25 vaccinees (SN titer range -886) and 25 nonvaccinated controls (SN titer range 4-1024)] (Table 37). The group of vaccinees received 3 doses, with vaccinations administered 3 weeks apart beginning at 6 weeks of age. After 1 vaccination, 13/25 puppies exhibited a 4-fold or greater increase in CPV SN titer (seroconversion) (Table 38). Twelve of these 13 puppies had maternal SN titers $\leq 1:16$ at the time of the first vaccination with the remaining puppy having an SN titer of 1:64. Another 8 puppies with initial SN titers between 1:16 and 1:256 seroconverted after the second vaccination. Their maternal antibody SN titers had declined to $\leq 1:64$ at the time of the second vaccination. Similarly, the last 3 vaccinees, with

30

35

40

Initial SN titers of 1:128, seroconverted after the third vaccination, after their maternal antibody CPV titer dropped $\leq 1:64$. Therefore, in this study, when 3 doses of vaccine were given beginning at 6 weeks of age, all 25 vaccinates, even those with the highest maternal antibody levels, became actively immunized (GM = 1:1176; range of SN titers 128-4096). All 50 dogs were challenged 3 weeks after the third vaccination with a heterologous CPV challenge virus. Fourteen of 25 nonvaccinated control dogs died or showed illness severe enough to warrant euthanasia, while all 25 vaccinates remained essentially healthy. The high-titer, low-passage vaccine virus in VANGUARD® Plus 5/5V-L was therefore highly immunogenic and capable of stimulating active immunity in the presence of maternal antibodies.

The efficacy of the CCV fraction of VANGUARD® Plus 5/5V-L was demonstrated in an extensive vaccination challenge study. Sixteen 7- to 8-week-old puppies were vaccinated with VANGUARD® Plus 5/5V-L (vaccinates) and 17 with Vanguard® Plus 5/L (controls). All puppies received three 1-mL doses at 3-week intervals. Three weeks following the third vaccination, puppies were challenged with a virulent strain of CCV (CV-8). Clinical observations, temperatures, weights, and blood parameters were monitored for 21 days following infection. CCV vaccinates demonstrated a reduction in the occurrence of diarrhea and amount of virulent CCV shed when compared to controls. At 21 days postchallenge, fluorescent antibody staining for virulent CCV of small intestinal sections demonstrated a significant reduction (P) in detectable CCV antigen between CCV vaccinates and controls (Table 36).

Table 37 Initial Serum Neutralization (SN) Titers of Vaccinates and Controls

SN Titer	# Vaccinates Included	# Controls Included
<1:2	3	0
1:4	4	3
1:8	1	3
1:16	4	1
1:32	2	5
1:64	3	1
1:128	6	3
1:256	2	3
1:512	0	5
1:1024	0	1

Table 38. Postvaccination Serum Neutralization (SN) Titers Geometric Mean (Range)*

Groups	N	Prevaccination	Postvaccination		
			1	2	3
All Vaccinated Dogs	25	1:24 (<2-256)	1:108 (8-1024)	1:905 (8-4096)	1:1176 (128-4096)
Responders Post 1st Vaccination	13	1:8 (<2-64)	1:480 (64-1024)	1:1745 (256-4096)	1:1410 (256-4096)
Responders Post 2nd Vaccination	9	1:87 (16-256)	1:20 (8-64)	1:378 (256-1024)	1:1625 (256-4096)
Responders Post 3rd Vaccination	3	1:128 (128)	1:32 (16-64)	1:28 (8-64)	1:203 (128-256)
Nonvaccinated Control Dogs	25	1:64 (4-1024)	1:8 (<2-64)	1:3 (<2-64)	<1:2 (<2-4)

^aDogs were vaccinated at 8, 9, and 12 weeks of age.

^bPre-challenge SN titers

Table 39. Fluorescent Antibody Staining of Small Intestinal Sections 21 Days Following Challenge

5

	Gut Section	% Dogs Fluorescent Antibody Positive	
		Vaccinates	Controls
Duodenum	1	0	89
	2	0	100
	3	0	100
Jejunum	4	0	89
	5	0	100
	6	12.5	89
Ileum	7	0	78
	8	12.5	78
	9	0	87
	10	12.5	89

Conclusions

10 In this study, an adjuvanted combination vaccine containing CD virus, CAV-2, CPI virus, CPV and inactivated whole cultures of *L. canicola* and *L. icterohaemorrhagiae* and OCV, was shown to be both safe and efficacious as a vaccine when used in puppies. The combination vaccine was also shown to overcome serum neutralization (SN) titers associated with maternal antibody.

EXAMPLE 5

15

CANINE BORDETELLA NATIVE AND IMMUNOGENICITY STUDY

Animals

The study included two litters of SPF beagles and two litters of random source dogs. Dogs were assigned randomly to vaccinated or non-vaccinated groups. The study included a
20 total of 10 vaccinated and 11 non-vaccinated dogs.

Preparation of Experimental Vaccine

B. bronchiseptica (strain 110H) was harvested from 48 hour Bordet-Gengou blood agar spread plates by washing the plate surface with 5 to 10 ml heat extraction buffer.
25 Alternatively, cells grown in both culture (Charlotte Parker Defined Medium) were harvested by centrifugation discarding the supernatant fraction. Harvested cells were suspended in 25 mM Tris-HCl, pH 8.8 and incubated at 60°C for 1 hour. Cell debris was separated from heat extract by centrifugation at 20,000 x g at 4°C for 30 minutes. Sodium azide (0.01%) was added to the heat extracted supernatant fraction which was then further clarified by
30 microporous filtration.

Monoclonal antibody affinity resin was prepared by conjugation of monoclonal antibody (designated Bord 2-7) to CNBr-activated Sepharose 4B using standard procedures. Approximately 30.35 mg of monoclonal antibody was conjugated to 1 gram of affinity resin. Clarified heat extracted supernatant fraction (above) and Bord 2-7 affinity resin was combined at an approximate ratio of 1 liter extract to 20 ml resin.

Binding of the native p68 to the resin was facilitated by incubating the mixture at ambient temperature, with gentle shaking, overnight, followed by resin settling and aspiration of the supernatant fraction. The resin was then packed into a 2.8 cm diameter column and the column washed sequentially with PBS, pH 7.5 and 10 mM phosphate buffer, pH 8.0 at a flow rate of 5 ml/min. When absorbance at 280 nm reached a baseline level, bound material was eluted using 100 mM triethylamine and fractions under the single large peak of 280 nm absorbance were collected and tested for the presence of p68 by ELISA. Fractions containing p68 were pooled and dialyzed against PBS to remove triethylamine.

An experimental vaccine serial formulated was formulated to contain approximately 100 micrograms of purified p68 and 1% aluminum hydroxide gel. Formalin (0.01%) was used as a preservative in a final vaccine dose volume of 1 mL.

Challenge inoculum

Challenge material was prepared essentially as described in examples above.

Study Procedure

Twenty-one (21) seronegative and culture negative pups were randomly assigned to one of two treatment groups. Eleven dogs were assigned to the non-vaccinated, control group and ten dogs to the vaccinated group. Day 0 was designated as the day of first vaccination. One mL of vaccine was administered subcutaneously on Day 0 and repeated 21 days later. Blood was collected for serological p68 ELISA prior to first and second vaccination.

On Day 35, fourteen days after the second vaccination, an aerosol challenge of *B. bronchiseptica* was administered to all dogs as described above. Animals were monitored for coughing for 14 days following challenge as described in previous examples.

Results

Summary of clinical observations and serologic responses to p68 are presented in Table 40.

Table 40: Summary of Clinical Observations and Serologic Responses

GROUP	N	NUMBER COUGH ON TWO CONSECUTIVE DAYS	NORMAL/ TOTAL	TITER (GMT) PRE-VAX	TITER (GMT) PRE- CHALLENGE	TITER (GMT) POST CHALLENGE
VACCINE	10	0	10/10	5.03	348.15	391.30
CONTROL	11	11	0/11	8.10	6.45	18.81

Discussion

In this study, 10 of 10 control dogs coughed on at least two consecutive days. A dog is considered clinically diseased if it coughs for two consecutive days. By this criteria, 100% of the non-vaccinated control dogs were diseased. In the vaccinated group, one dog coughed on day 4 post-challenge and one dog coughed on days 4 and 6 post-challenge. Two dogs coughed on day 14. None of the vaccinated dogs coughed for two consecutive days. Therefore, 100% of the dogs in the native p88 vaccinated group were judged to remain normal following challenge.

10 Conclusions

This trial demonstrates the ability of a native p88 vaccine to protect against *B. bronchiseptica* disease.

EXAMPLE 2

15 Efficacy of multivalent canine vaccines against *Leptospira Bratislava* challenge

The purpose of this study was to demonstrate the efficacy of vaccines containing fractions to *Leptospira* serovars *bratislava*, *canicola*, *grippotyphosa*, *icterohaemorrhagiae* and *pomona* against *L. bratislava* challenge in dogs.

MATERIALS

20 Vaccines: Vaccines used were the following:

1. A lyophilized vaccine comprising canine distemper, adenovirus type 2,

parainfluenza, and parvovirus antigens (VANGUARD® PLUS 5) was used. The vaccine contained release antigen levels. Product code 13D1.22

2. A canine coronavirus vaccine in a liquid diluent formulation (FIRSTDOSE® CV) was used. The vaccine contained release antigen levels. Product code 14P5.20

25 3. A lyophilized vaccine comprising canine distemper, adenovirus type 2, parainfluenza, parvovirus, *bratislava*, *canicola*, *grippotyphosa*, *icterohaemorrhagiae* and *pomona* antigens was used. The vaccine contained approximately 800 nephels of each *Leptospira* serovar, and release antigen levels of the modified live virus fractions (canine adenovirus, distemper virus, parainfluenza virus, parvovirus). Product code 4637.2A

30 **Study Animals:** Beagle puppies of approximately 5-6 weeks of age of either sex were used. They were seronegative (< 1:5) to *Leptospira* serovars *bratislava*, *canicola*, *grippotyphosa*, *icterohaemorrhagiae* and *Pomona* at vaccination. They were allowed commercial feed and city-system sourced water *ad libitum*.

35 **Challenge Organisms:** Each animal was administered one dose of approximately 2 mL (10^7 dilution of infected hamster liver tissue) of *Leptospira bratislava* as an intraperitoneal injection.

Study Design

Trt. No.	Vaccine Descrip.*	Route	No. Dogs	Vacc. Day	Leptospira Challenge**			Blood Sample Collection Days
					Day	Dose	Dilution	
T1	Control	SQ	10	0 & 21	49	2 mL	10 ⁻¹	0, 21, 35, 48, 50, 52, 55, 58, 61, 64, 67, 70
T2	Control	IM	10	0 & 21	49	2 mL	10 ⁻¹	0, 21, 35, 48, 50, 52, 55, 58, 61, 64, 67, 70
T3	Leptospira	SQ	10	0 & 21	49	2 mL	10 ⁻¹	0, 21, 35, 48, 50, 52, 55, 58, 61, 64, 67, 70
T4	Leptospira	IM	10	0 & 21	49	2 mL	10 ⁻¹	0, 21, 35, 48, 50, 52, 55, 58, 61, 64, 67, 70

PROCEDURES

Vaccination Phase: On Study Days 0 and 21, 40 dogs in 4 vaccine groups (10 animals/group) were given an injection of the control or test vaccines as outlined below:

T1: 1 mL of control vaccine containing canine distemper, adenovirus type 2, parainfluenza, parvovirus vaccine reconstituted with canine coronavirus diluent and given by subcutaneous (SQ) injection. (Product Code 13D1.22 reconstituted with Product Code 14P5.20)

T2: 1 mL of control vaccine containing canine distemper, adenovirus type 2, parainfluenza, parvovirus vaccine reconstituted with canine coronavirus diluent and given by intramuscular (IM) injection. (Product Code 13D1.22 reconstituted with Product Code 14P5.20)

T3: 1 mL of Leptospira vaccine containing canine distemper, adenovirus type 2, parainfluenza, parvovirus, brucella, canicola, grippotyphosa, leishmaniasis and pomona vaccine reconstituted with canine coronavirus diluent and given by SQ injection. (Product Code 48J7.2A; a combination of Product Codes 48J7.2A and 14P5.20)

T4: 1 mL of Leptospira vaccine containing canine distemper, adenovirus type 2, parainfluenza, parvovirus, brucella, canicola, grippotyphosa, leishmaniasis and pomona vaccine reconstituted with canine coronavirus diluent and given by IM injection. (Product Code 48J7.2A; a combination of Product Codes 48J7.2A and 14P5.20)

Post-vaccination observations for untoward systemic reactions were made at approximately 1 hour and 5 hours following vaccination.

Leptospira Challenge: On Study Day 49, the test animals were challenged via an approximate 2 mL dose of *L. brucella* by intraperitoneal injection.

Blood Sample Collection: Serum samples were collected from available animals on Study Days 0, 21, 35, 48, 50, 52, 55, 58, 61, 64, 67 and 70. Similarly, plasma samples were collected on Study Days 48, 50, 52, 55, 58, 61, 64, 67 and 70.

Bacterial Serology: Serum samples obtained on Study Days 0, 21, 35, 48, 58 and 70 were assayed via a microagglutination test for circulating antibodies to *L. bratislava*.

Spirochetemia: Plasma samples obtained on Study Days 48, 50, 52, 55, 58, 61, 64, 67 and 70 were examined by dark-field microscopy for spirochetes and cultured for *Leptospira* re-isolation.

Complete Blood Count / Serum Chemistry Panel: Plasma samples obtained on Study Days 48, 50, 52, 55, 58, 61, 64, 67 and 70 were assayed for, but not limited to, platelet counts and sedimentation rate. Serum samples, obtained at those same intervals were assayed for, but not limited to, amylase, alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST) and creatinine. A CBC and sedimentation rate was not completed for 2 animals (Nos. QPH3, RVG3) on Study Day 55, for one animal (No. RBH3) on Study Day 58, for 3 animals (Nos. OLH3, OUH3, PTG3) on Study Day 61, nor for one animal (No. OWG3) on Study Day 70 because the plasma sample collected clotted prior to testing. On Study Day 67, a sedimentation rate was not completed for 2 animals (Nos. OUH3, SAG3) because the plasma sample quantity was insufficient for testing. Those outcomes had no impact on these study parameters.

Rectal Body Temperatures: Rectal body temperatures were recorded on Study Days 47-70. Post-challenge (Study Day 80), an elevated body temperature of ≥ 39.2 °C was considered indicative of leptospirosis.

Urine Cultures: Urine samples obtained on Study Days 48, 55 and 70 were cultured for *Leptospira*, and submitted for urinalysis. On Study Day 48, a urinalysis was not completed for one animal (No. CBC3) as the quantity of urine available at collection was insufficient for testing. On Study Day 55, a urinalysis was not completed for 2 animals (No. OPH3, RXG3) as the quantity of urine available at collection was insufficient for testing. On Study Day 70, a urinalysis was not completed for 10 animals (Nos. OYG3, FIG3, FUG3, CHG3, QCH3, QSG3, RDG3, RUG3, RVG3, RYG3) as the quantities of urine available at collection were insufficient for testing. Those outcomes had no impact on this study parameter.

Necropsy and *Leptospira* Isolation: Animals euthanized during or at conclusion of the post-challenge period were necropsied. Body fluids and tissues (i.e., liver, kidney and urine) were collected and submitted to BCL for *Leptospira* re-isolation. On Study Day 58, bacterial re-isolation was not completed for 2 animals (No. OPH3, RXG3) as the quantity of urine available at collection was insufficient for testing. On Study Day 70, bacterial re-isolation was not completed for 4 animals (Nos. OYG3, FUG3, QSG3, RUG3) as the quantities of urine available at collection were insufficient for testing. Those outcomes had no impact on this study parameter.

Health Observations: Animals were monitored daily for general health status.

DATA SUMMARY AND ANALYSIS

Data were analyzed with a mixed model or categorical (SAS/STAT Software Changes and Enhancements through Release 6.12, SAS Institute, Cary, North Carolina) procedure.

A general linear repeated measures mixed model (fixed effect model terms are treatment, study day, and treatment by study day) was used to analyze temperature, serum antibody titer, blood platelet count, sedimentation rate, amylase, alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST) and creatinine. Contrasts of interest were made after detecting a significant ($P \leq 0.05$) treatment or treatment by day of study interaction effect. These were log-transformed as appropriate for analysis, and when transformed, the least-squares means were back-transformed to geometric means for presentation. Observations not analyzed (i.e., necropsy results and post-vaccination observations) were not entered into the database for summary.

Frequency distributions of animals with platelet counts < 200 at least once and animals with rectal temperatures greater than or equal to 39.2°C were calculated for each treatment.

Animals were classified as normal or ill on each day post-challenge during the study. The presence of any of the following signs resulted in a classification of ill: conjunctivitis, depression, inappetence, muscle tremors, nasal discharge, pyrexia ($\geq 39.2^\circ\text{C}$) or watery eyes.

A general linear mixed model (fixed effect model term is treatment) was used to analyze the number of days post-challenge that an animal was classified as ill. The binomial variable died or euthanized was analyzed with Fisher's Exact test. Spirochetemia, and bacteria re-isolation in the urine, kidney and liver were analyzed using Fisher's Exact test to compare treatment groups.

In the absence of a significant difference between the routes of administration and route by treatment interaction ($P \leq 0.05$ two-sided), contrasts were used to compare the average of treatments T1 and T2 to the average of treatments T3 and T4 ($P \leq 0.05$ one-sided). If the analysis was a repeated measures analysis, then the comparison was made at each time point data was collected. Otherwise, contrasts were used to compare T1 to T3 and T2 to T4 ($P \leq 0.05$ one-sided). These comparisons were made at each time point if the analysis was a repeated measures.

The efficacy of the *Leptospira* vaccine against *L. Bratislava* was demonstrated by a lower incidence ($P \leq 0.05$, one sided) of illness in the vaccinated animals. The following variables supported the efficacy of the *Leptospira* vaccine: (1) The mean platelet count was significantly ($P \leq 0.05$, one sided) higher for the vaccinees; (2) The mean sedimentation rate was significantly ($P \leq 0.05$, one sided) lower for the vaccinees; (3) The incidence of spirochetemia was significantly ($P \leq 0.05$, one sided) reduced for the vaccinees.

RESULTS

Clinical Signs Post-Challenge: The mean number of days that the test animals displayed clinical signs indicative of leptospirosis (e.g., conjunctivitis, depression, diarrhea, hematuria, icterus, inappetence, moribund, muscle tremors, pyrexia, vomiting) is presented in Table 1. Post-challenge (Study Days 50-70), the mean number of days the T1 and T2 controls were ill was 4.8 and 3.3, respectively. Conversely, the means for the T3 and T4 vaccinates were 0.7 and 0.5, and those results were significantly improved ($P<0.05$) when compared to the T1-T2 controls. The percent of animals presenting with clinical signs post-challenge is also provided in Table 1. Signs of Leptospirosis was displayed by 75% of the T1-T2 controls, while similar signs were observed for only 30% of the T3-T4 vaccinates. The number of infected animals requiring euthanasia during the challenge phase of the study is also presented in Table 1. Five animals (25%) in the T1-T2 control groups displayed severe signs of leptospirosis and were euthanized. Conversely, the T3-T4 vaccinates remained otherwise healthy during that same interval, and that comparison (T1-T2 vs T3-T4) was significantly improved ($P<0.05$) for the vaccinates. A representation of mean body temperatures post-challenge is presented in Table 2. During the initial 9 days after challenge (Study Days 50-58), the mean temperatures for the T1-T2 controls ranged from 37.8 to 38.4°C. During that same interval, the mean temperatures for the T3-T4 vaccinates ranged from 38.2 to 38.7 °C. Notably, the mean temperatures for the T3-T4 vaccinates were significantly lower ($P<0.05$) at 2, 3 and 5 days post-challenge when compared to the T1-T2 mean temperatures. The frequency of animals with at least one temperature ≥ 39.2 °C is also presented in Table 2. An elevated body temperature of ≥ 39.2 °C was considered indicative of *Leptospira* infection. During the course of the post-challenge observation period, 60-70% of the T1-T2 controls presented with a temperature of ≥ 39.2 °C. Conversely, only 30% of the T3-T4 vaccinates presented with that clinical sign.

Spirochetemia Post-Challenge: The frequency of spirochetemia is presented in Table 3. The presence of spirochetes in the blood (detected via bacterial culture) is a clinical outcome demonstrating leptospirosis. One day post-challenge (Study Day 50), spirochetemia was established in 80% of the T1 controls, 60% of the T2 controls, 60% of the T3 vaccinates and 70% of the T4 vaccinates. Bacterial re-isolation was expected from the blood at 24 hours after intraperitoneal injections regardless of the status of vaccination. Thereafter, spirochetemia was established for the T1 controls as follows: 100% on Day 3 post-challenge (Study Day 52), 58% on Day 6 (Study Day 55) and 33% of Day 9 (Study Day 58). Similarly, spirochetemia was established for the T2 controls as follows: 60% on Day 3 post-challenge, 50% on Day 6 and 29% of Day 9. Conversely, it was not established in the T3-T4 vaccinates during that same post-challenge period nor during the remainder of the post-challenge period (i.e., Study Days 50-70).

Overall, the percentage of animals that were positive for spirochetemia including one day post-challenge (Study Days 50-70) was 60% - 100% for the T1-T2 controls and 60%-70% for the T3-T4 vaccinates. In contrast, the percentage of animals that were positive excluding one day post-challenge (Study Days 52-70) was 60% - 100% for the T1-T2 controls and 0% for the T3-T4 vaccinates.

73
73**Leptospira Re-isolation from Body Fluids and Tissues Post-Challenge:**

Leptospira re-isolation from blood, urine, kidney and liver samples is presented in Table 4. A summary of Leptospira re-isolation results from blood is provided in the preceding section. Beginning at 3 days post-challenge (i.e., excluding day 1 post-challenge), spirochetemia was established in 80-100% of the T1-T2 controls, and was not established in the T3-T4 vaccinees during that same period. Notably, that comparison (T1-T2 vs T3-T4) was significantly improved ($P<0.05$) for the vaccinees.

Kidney samples were collected at necropsy. Leptospira was re-isolated from 50% of the kidney samples obtained from the T1 and T2 controls. It was not re-isolated from samples derived from the T3-T4 vaccinees. That comparison (T1-T2 vs T3-T4) was significantly improved ($P<0.05$) for the vaccinees.

Liver samples were collected at necropsy. Leptospira was re-isolated from 10% and 20% of the liver samples obtained from the T1 and T2 controls, respectively. It was not re-isolated from samples derived from the T3-T4 vaccinees. That comparison (T1-T2 vs T3-T4) was significantly improved ($P<0.05$) for the vaccinees.

Urine samples were collected at 2 intervals post-challenge and at necropsy. Leptospira was re-isolated from 2 T1 controls at 8 days post-challenge (Study Day 55). Leptospira was not re-isolated from any sample for the T2 controls nor T3-T4 vaccinees.

Platelet Counts Post-Challenge: Mean platelet counts are presented in Table 5. A decrease in the number of blood platelets (thrombocytopenia) is a clinical result indicative of leptospirosis. Mean concentrations for the T1-T2 controls ranged between 61 and 937. During the same interval, the mean counts for the T3-T4 vaccinees ranged between 400 and 568. Notably, the platelet counts for the T3-T4 vaccinees were significantly improved ($P<0.05$) at 3, 6 and 9 days post-challenge when compared to the T1-T2 controls.

The frequency of animals with at least one platelet count <200 is also presented in Table 5. During the course of the post-challenge period, 80% of the T1 controls and 80% of the T2 controls were determined to be thrombocytopenic (platelet count <200). Conversely, only 10% of the T3 vaccinees and none of the T4 vaccinees were thrombocytopenic post-infection.

Sedimentation Rate Post-Challenge: Mean sedimentation rates are presented in Table 6. An increase in sedimentation rate is a clinical result indicative of leptospirosis.

Mean rates for the T1-T2 controls ranged between 2.4 and 16.0. During the same interval, the mean rates for the T3-T4 vaccinees ranged between 1.5 and 6.3. Notably, the rates for the T3-T4 vaccinees were significantly lower ($P<0.05$) at 3, 6, 9, 12, 15, 18 and 21 days post-challenge when compared to the T1-T2 controls.

ALT Concentrations Post-Challenge: Mean alanine aminotransferase (ALT) concentrations are presented in Table 7. An increase in ALT is a clinical result indicative of bacterial infection (i.e., as liver function deteriorates, ALT levels rise). Mean concentrations for the T1-T2 controls ranged between 22 and 79. During the same interval, the mean concentrations for the T3-T4 vaccinees ranged between 21 and 61. Notably, the concentrations for the T3-T4 vaccinees were significantly lower ($P<0.05$) at 3, 6, 9 and 12 days post-challenge when compared to the T1-T2 controls.

Creatinine Concentrations Post-Challenge: Mean creatinine concentrations are presented in Table 8. An increase in creatinine concentrations is a clinical result indicative of bacterial infection (i.e., as kidney function deteriorates due to leptospirosis, creatinine levels rise). Mean concentrations for the T1 controls (i.e., SQ administration) ranged between 0.30 and .59. During the same interval, the mean concentrations for the T3 vaccinees (i.e., SQ administration) ranged between 0.28 and 0.40. Notably, the concentrations for the T3 vaccinees were significantly lower ($P<0.05$) at 1, 6, 9, 12, 15, 18 and 21 days post-challenge when compared to the T1 controls. Mean concentrations for the T2 controls (i.e., IM administration) ranged between 0.30 and 1.31. During the same interval, the mean concentrations for the T4 vaccinees (i.e., IM administration) ranged between 0.32 and 0.46. There were no significant differences between the T2 and T4 values post-challenge.

Amylase, AST and Urinalysis Post-Challenge: There were no significant differences in the mean concentrations for the T3-T4 vaccinees when compared to the T1-T2 controls. However, in general the post-challenge concentrations were more dramatically increased for the T1-T2 controls. By and large, post-challenge changes in AST (aspartate aminotransferase) and urinalysis results were not observed for the T1- T4 test animals. The results for these 3 parameters are not otherwise tabulated herein.

Serum Antibody Titers: Mean serum *L. bratislava* antibody titers are presented in Table 9. During the vaccination phase of the investigation (Study Days 0-45), the mean titers for the T1-T2 controls were approximately 2 (i.e., seronegative). Correspondingly, the means for the T3-T4 vaccinees ranged between 2 (pre-vaccination) and 1151 (post-vaccination). Notably, the mean titers for the T3-T4 vaccinees were significantly higher ($P<0.05$) at 21, 35 and 48 days post-vaccination when compared to the mean T1- T2 titers.

During the challenge phase of the investigation (Study Days 59 & 70), the mean titers for the T1-T2 controls ranged between 2135 and 41160. Correspondingly, the mean titers for the T3 and T4 vaccinees ranged between 727 and 10691, and were significantly lower ($P<0.05$) on Study Days 59 (i.e., 9 days post-challenge) and 70 days post-vaccination (i.e., Day 21 PC) when compared to the T1-T2 controls. As a result, the controls demonstrated a dramatic primary response to *L. bratislava* post-challenge (i.e., infection established), while the response for the T3-T4 vaccinees was less robust (i.e., typical anamnestic response).

Systemic Reactions Post-Vaccination: No post-vaccinal systemic reactions were observed in the T1-T4 test animals when evaluated at approximately 1 and 5 hours after the primary and booster vaccinations. That result is not tabulated herein.

CONCLUSION

The efficacy of a multivalent *Leptospira* vaccine given by SQ or IM injection against *L. bratislava* was demonstrated post-challenge by, inter alia: (1) a significantly lower incidence of *Leptospira*-associated illness, (2) a significantly lower incidence of spirochetemia, (3)

75

significantly higher platelet counts, and (4) significantly lower mean sedimentation rates, when compared to controls:

Table 41 Summary of clinical signs after challenge with *L. brevislava* for dogs immunized with a control or multivalent *Leptospira* vaccine

Treatment (Vaccinate) Group		No. of Animals Challenged	Number of Days Displaying Clinical Signs of <i>Leptospira</i> Post-Challenge			Percent Animals with Clinical Signs Post-Challenge [†]	Percent of Infected Animals Requiring Euthanasia [†]
			Mean [†]	Minimum	Maximum		
T1	CONTROL (SQ)	10	4.3	0	9	90% N = 9/10	10% N = 1/10
T2	CONTROL (IM)	10	3.3	0	10	60% N = 6/10	40% N = 4/10
T3	LEPTO VACCINE (SQ)	10	0.7	0	4	30% N = 3/10	0% N = 0/10
T4	LEPTO VACCINE (IM)	10	0.5	0	3	30% N = 3/10	0% N = 0/10

[†]Percent or treatment least squares means. The average of the controls (T1-T2) is significantly different (P<0.05) from the average of the vaccinates (T3-T4)

W/O 2806/03115

2

PC1/152965/003111

96

Table 42: Mean body temperatures after challenge with *L. bratislava* for dogs immunized with a control or multivalent *Leptospira* vaccine

Treatment (Vaccinate) Group		Mean Temperatures By Study Day** (day post-challenge)										Frequency (%) with a Temperature ≥ 39.2 °C
		48 (0)	50 (1)	51 (2) [†]	52 (3) [†]	53 (4)	54 (5) [†]	55 (6)	56 (7)	57 (8)	58 (9)	
T1	CONTROL (SQ)	38.1 N=10	38.6 N=10	38.4 N=10	38.9 N=10	38.5 N=10	38.8 N=9	38.8 N=9	38.2 N=9	38.2 N=9	38.3 N=9	70 N=7/10
T2	CONTROL (IM)	38.3 N=10	38.5 N=10	38.4 N=10	38.9 N=10	38.7 N=10	38.6 N=8	38.3 N=8	37.8 N=8	38.2 N=7	38.1 N=7	60 N=6/10
T3	LEPTO VACCINE (SQ)	38.2 N=10	38.4 N=10	38.5 N=10	38.3 N=10	38.7 N=10	38.5 N=10	38.5 N=10	38.2 N=10	38.5 N=10	38.4 N=10	30 N=3/10
T4	LEPTO VACCINE (IM)	38.2 N=10	38.5 N=10	38.5 N=10	38.3 N=10	38.5 N=10	38.5 N=10	38.3 N=10	38.3 N=10	38.4 N=10	38.6 N=10	30 N=3/10

**Treatment least squares means. N=number of animals, or number with a post-challenge temperature ≥ 39.2 °C / number of animals.

[†]The average of the controls (T1-T2) is significantly different ($P \leq 0.05$) from the average of the vaccinates (T3-T4)

W0 206020115

53

PC32220A000111

27

Table 43- Frequency of spirochetemia after challenge with *L. bratislava* for dogs immunized with a control or multivalent *Leptospira* vaccine

Treatment (Vaccinate) Group		Frequency (%) of Spirochetemia By Study Day** (day post-challenge)								
		48 (-1)	50 (1)	52 (3)	55 (6)	58 (9)	61 (12)	64 (15)	67 (18)	70 (21)
T1	CONTROL (SQ)	0 N=0/10	90 N=9/10	100 N=10/10	55 N=5/9	33 N=3/9	0 N=0/9	0 N=0/9	0 N=0/9	0 N=0/9
T2	CONTROL (IM)	0 N=0/10	60 N=6/10	60 N=6/10	50 N=4/8	29 N=2/7	0 N=0/6	0 N=0/6	0 N=0/6	0 N=0/6
T3	LEPTO VACCINE (SQ)	0 N=0/10	60 N=6/10	0 N=0/10	0 N=0/10	0 N=0/10	0 N=0/10	0 N=0/10	0 N=0/10	0 N=0/10
T4	LEPTO VACCINE (IM)	0 N=0/10	70 N=7/10	0 N=0/10	0 N=0/10	0 N=0/10	0 N=0/10	0 N=0/10	0 N=0/10	0 N=0/10

**N = number positive for spirochetemia / number animals.

WFO 2006/063115

25

PC7/102006/063111

78

79

Table 44: Frequency of Leptospira re-isolation from body fluids and tissues after challenge with L. bratislava for dogs immunized with a control or multivalent Leptospira vaccine

Treatment (Vaccinate) Group		Frequency (%) of Leptospira Re-isolation From Body Fluids and Tissues**				
		Blood†		Urine	Kidney††	Liver††
		Including Day +1 post-challenge	Excluding Day +1 post-challenge††			
T1	CONTROL (SQ)	100 N=10/10	100 N=10/10	22 N=2/9	50 N=5/10	10 N=1/10
T2	CONTROL (IM)	60 N=6/10	60 N=6/10	0 N=0/7	50 N=5/10	20 N=2/10
T3	LEPTO VACCINE (SQ)	60 N=6/10	0 N=0/10	0 N=0/10	0 N=0/10	0 N=0/10
T4	LEPTO VACCINE (IM)	70 N=7/10	0 N=0/10	0 N=0/10	0 N=0/10	0 N=0/10

**N = number positive for apirochetemia / number animals.
†Bacteria expected in the bloodstream at 24 hours after intraperitoneal injection regardless of the status of vaccination. Therefore, the re-isolation data is also summarized excluding the results obtained at 1 day post-challenge (Study Day 50)
††The average of the controls (T1-T2) is significantly different (P<0.05) from the average of the vaccinates (T3-T4).

Table 48: Mean platelet counts after challenge with *L. brucei* for dogs immunized with a control or multivalent *Leptospira* vaccine

Treatment (Vaccinate) Group		Mean Platelet Counts By Study Day** (day post-challenge)									Frequency (%) with a Platelet Count <200
		48 (-1)	50 (1)	52 (3) [†]	55 (6) [†]	58 (9) [†]	61 (12)	64 (15)	67 (18)	70 (21)	
T1	CONTROL (SQ)	534 N=10	428 N=10	61 N=10	128 N=8	499 N=8	937 N=9	724 N=9	588 N=8	490 N=8	90 N=8/10
T2	CONTROL (IM)	549 N=10	451 N=10	174 N=10	204 N=8	480 N=7	738 N=5	735 N=6	604 N=8	499 N=8	60 N=6/10
T3	LEPTO VACCINE (SQ)	557 N=10	450 N=10	463 N=10	560 N=10	538 N=10	506 N=9	490 N=10	458 N=10	465 N=10	10 N=1/10
T4	LEPTO VACCINE (IM)	521 N=10	442 N=10	400 N=10	532 N=8	569 N=10	483 N=9	478 N=10	472 N=10	472 N=10	0 N=0/10

**Treatment least squares means. N=number of animals, or number with a post-challenge platelet count of <200 / number of animals.
[†]The average of the controls (T1-T2) is significantly different (P<0.05) from the average of the vaccinates (T3-T4)

W/O 2006/03/11

2

PC1/03/05/003111

80

Table 48- Mean sedimentation rates after challenge with *L. bradyslava* for dogs immunized with a control or multivalent *Leptospira* vaccine

Treatment (Vaccinate) Group		Mean Sedimentation Rates By Study Day** (day post-challenge)								
		48 (-1)	50 (1)	52 (3) [†]	55 (6) [†]	58 (9) [†]	61 (12) [†]	64 (15) [†]	67 (18) [†]	70 (21) [†]
T1	CONTROL (SQ)	1.3 N=10	6.7 N=10	10.4 N=10	9.0 N=8	6.8 N=8	4.5 N=9	4.6 N=9	3.0 N=9	2.4 N=8
T2	CONTROL (IM)	1.2 N=10	5.7 N=10	10.2 N=10	9.7 N=8	16.0 N=7	5.9 N=5	5.1 N=6	3.6 N=6	3.3 N=6
T3	LEPTO VACCINE (SQ)	1.1 N=10	5.3 N=10	2.9 N=10	3.0 N=10	3.3 N=10	2.3 N=9	2.1 N=10	1.9 N=9	1.5 N=10
T4	LEPTO VACCINE (IM)	1.3 N=9	6.3 N=10	3.6 N=10	4.3 N=9	3.9 N=10	2.0 N=9	2.4 N=10	2.5 N=9	2.1 N=10

**Treatment least squares means. N=number of animals.
[†]The average of the controls (T1-T2) is significantly different (P<0.05) from the average of the vaccinates (T3-T4)

Table 47- Mean ALT (alanine aminotransferase) concentrations after challenge with L. bratislava for dogs immunized with a control or multivalent Leptospira vaccine

Treatment (Vaccinate) Group		ALT Concentrations By Study Day** (day post-challenge)								
		48 (-1)	50 (1)	52 [†] (3)	55 [†] (6)	58 [†] (9)	61 [†] (12)	64 (15)	67 (18)	70 (21)
T1	CONTROL (SQ)	33 N=10	58 N=10	79 N=10	32 N=8	34 N=8	28 N=8	24 N=8	22 N=8	24 N=8
T2	CONTROL (IM)	35 N=10	60 N=10	63 N=10	30 N=8	32 N=7	34 N=8	26 N=8	24 N=8	24 N=8
T3	LEPTO VACCINE (SQ)	30 N=10	57 N=10	27 N=10	22 N=10	23 N=10	22 N=10	23 N=10	21 N=10	22 N=10
T4	LEPTO VACCINE (IM)	32 N=10	61 N=10	30 N=10	22 N=10	25 N=10	26 N=10	26 N=10	24 N=10	25 N=10

**Treatment least squares means. N=number of animals.
[†]The average of the controls (T1-T2) is significantly different (P<0.05) from the average of the vaccinates (T3-T4)

Table 4b: Mean creatinine concentrations after challenge with *L. brucei* for dogs immunized with a control or multivalent *Leptospira* vaccine

Treatment (Vaccinate) Group		Mean Creatinine Concentrations By Study Day ^a (day post-challenge)								
		48 (-1)	50 (1)	52 (3)	55 (6)	58 (9)	61 (12)	64 (15)	67 (18)	70 (21)
T1	CONTROL (SQ)	0.32 ^a N=10	0.33 ^a N=10	0.30 ^a N=10	0.50 ^a N=8	0.55 ^a N=8	0.70 ^a N=8	0.63 ^a N=8	0.52 ^a N=8	0.36 ^a N=8
T3	LEPTO VACCINE (SQ)	0.31 ^a N=10	0.26 ^b N=10	0.32 ^a N=10	0.37 ^b N=10	0.38 ^b N=10	0.33 ^b N=10	0.40 ^b N=10	0.36 ^b N=10	0.27 ^b N=10
T2	CONTROL (IM)	0.31 ^a N=10	0.33 ^a N=10	0.30 ^a N=10	1.31 ^a N=8	1.06 ^a N=7	0.51 ^a N=8	0.51 ^a N=8	0.42 ^a N=8	0.30 ^a N=8
T4	LEPTO VACCINE (IM)	0.33 ^a N=10	0.32 ^a N=10	0.33 ^a N=10	0.41 ^a N=10	0.43 ^a N=10	0.36 ^a N=10	0.45 ^a N=10	0.38 ^a N=10	0.32 ^a N=10

^aTreatment least squares means. N=number of animals.
^aValues in columns (for T1 vs T3 and T2 vs T4) with different superscripts are significantly different (P ≤ 0.05)

WFO 2006/03/01/15

71

PC/12/20/05/003111

Table 49: Mean serum *L. bratislava* antibody titres for dogs immunized with a control or multivalent *Leptospira* vaccine

Treatment (Vaccinate) Group		Mean <i>L. bratislava</i> Antibody Titres** (study day post-vaccination)					
		0	21 [†]	35 [†]	49 [†]	65 [†]	70 [†]
T1	CONTROL (SQ)	2 N=10	3 N=10	2 N=10	2 N=10	41160 N=9	4770 N=9
T2	CONTROL (IM)	2 N=10	2 N=10	2 N=10	3 N=10	22571 N=7	2135 N=6
T3	LEPTO VACCINE (SQ)	2 N=10	55 N=10	1032 N=10	159 N=10	10891 N=10	1108 N=10
T4	LEPTO VACCINE (IM)	2 N=10	97 N=10	1181 N=10	257 N=10	8819 N=10	727 N=10

**Treatment geometric means. N=number of animals.

[†]The average of the controls (T1-T2) is significantly different ($P \leq 0.05$) from the average of the vaccinees (T3-T4)

89

WHAT IS CLAIMED IS:

1. A vaccine composition comprising a *Leptospira* cell preparation of *Leptospira*
bratislava and a carrier.
2. The vaccine composition of claim 1 wherein the amount of *Leptospira bratislava* is in
the range of about 100-3500 nephelometric units per vaccine dose.
3. The vaccine composition of claim 1 wherein the amount of *Leptospira bratislava* is in
the range of about 200-2000 nephelometric units) per dose.
4. The vaccine composition of claim 1 wherein the carrier comprises saponin and a
surfactant.
5. The vaccine composition of claim 4 wherein the saponin is Quil A and the surfactant
is cholesterol.
6. The vaccine composition of claim 5 wherein the amount of Quil A is in the range of 1
to 1000 µg per dose, and the amount of cholesterol is in the range of 1 to 1000 µg per
dose.
7. The vaccine composition of claim 1 wherein the carrier comprises aluminum
hydroxide.
8. The vaccine composition of claim 1 in which the carrier comprises Quil A and
cholesterol, and wherein the *Leptospira bratislava* and the carrier are in an amount
effective to protect dogs against *Leptospira bratislava*.
9. A method of protecting dogs against *Leptospira bratislava* comprising administering to
a dog the vaccine composition of claim 1 in a therapeutically effective amount.
10. The method of claim 9, wherein said vaccine composition is administered by an
intravenous, intranasal, oral, intramuscular or subcutaneous route.
11. The method of claim 9, wherein said dog receives said vaccine composition two or
three times with an interval of about 2-4 weeks between the administrations.
12. The vaccine composition of claim 1, wherein said *Leptospira* cell preparation further
comprises a cell preparation of at least one of *Leptospira canicola*, *Leptospira*
grippityphosa, *Leptospira icterohaemorrhagiae*, or *Leptospira pomona*.

13. The vaccine composition of claim 1, wherein said *Leptospira* cell preparation further comprises a cell preparation of *Leptospira canicola*, *Leptospira grippityphosa*, *Leptospira icterohaemorrhagiae*, and *Leptospira pomona*.
- 5 14. The vaccine composition of claim 13 wherein the amount of each *Leptospira* strain in the vaccine is in the range of about 100-5500 nephelometric units per vaccine dose.
15. The vaccine composition of claim 13, wherein the amount of each *Leptospira* strain in the vaccine is in the range of about 200 to 2000 nephelometric units per dose.
- 10 16. A combination vaccine for immunizing dogs against canine pathogens comprising the composition of claim 13, and further comprising an attenuated strain of canine distemper (CD) virus, an attenuated strain of canine adenovirus type 2 (CAV-2), an attenuated strain of canine parainfluenza (CPI) virus, an attenuated strain of canine parvovirus (CPV), and a carrier.
- 15 17. The combination vaccine of claim 16, wherein the amount of each *Leptospira* strain in the vaccine is in the range of about 100-5500 nephelometric units per vaccine dose.
- 20 18. The combination vaccine of claim 16, wherein the amount of each *Leptospira* strain in the vaccine is in the range of about 200 to 2000 nephelometric units per dose.
- 25 19. The combination vaccine of claim 16, wherein the amount of said attenuated strain of CD virus in said vaccine is in the range of 10^2 to 10^8 TCID₅₀ per dose.
- 30 20. The combination vaccine of claim 16, wherein the amount of said attenuated strain of CAV-2 in said vaccine is in the range of 10^2 to 10^8 TCID₅₀ per dose.
- 35 21. The combination vaccine of claim 16, wherein the amount of said attenuated strain of CPI virus in said vaccine is in the range of 10^4 to 10^8 TCID₅₀ per dose.
22. The combination vaccine of claim 16, wherein the amount of said attenuated strain of CPV in said vaccine is in the range of 10^2 to 10^8 TCID₅₀ per dose.
- 40 23. The combination vaccine of claim 16 wherein the carrier comprises saponin and a surfactant.
24. The combination vaccine of claim 23 wherein the saponin is Quil A and the surfactant is cholesterol.

25. The combination vaccine of claim 24 wherein the amount of Outil A is in the range of 1 to 1000 µg per dose, and the amount of cholesterol is in the range of 1 to 1000 µg per dose.
26. The vaccine composition of claim 16 wherein the carrier comprises aluminum hydroxide.
27. A method of protecting dogs against canine pathogens comprising administering to a dog the combination vaccine of claim 16 in a therapeutically effective amount.
28. The method of claim 27, wherein said combination vaccine is administered by an intravenous, intranasal, oral, intramuscular or subcutaneous route.
29. The method of claim 27, wherein said dog receives said combination vaccine two or three times with an interval of about 2-4 weeks between the administrations.
30. The combination vaccine of claim 16 further comprising an inactivated whole or partial cell preparation of a strain of canine coronavirus (CCV).
31. The combination vaccine of claim 30 wherein the amount of each *Leptospira* strain in the vaccine is in the range of about 100-5500 nephelometric units per vaccine dose.
32. The combination vaccine of claim 30, wherein the amount of each *Leptospira* strain in the vaccine is in the range of about 200 to 2000 nephelometric units per dose.
33. The combination vaccine of claim 30, wherein the amount of said attenuated strain of CD virus in said vaccine is in the range of 10^2 to 10^8 TCID₅₀ per dose.
34. The combination vaccine of claim 30, wherein the amount of said attenuated strain of CAV-2 in said vaccine is in the range of 10^2 to 10^8 TCID₅₀ per dose.
35. The combination vaccine of claim 30, wherein the amount of said attenuated strain of CP1 virus in said vaccine is in the range of 10^2 to 10^8 TCID₅₀ per dose.
36. The combination vaccine of claim 30, wherein the amount of said attenuated strain of CPV in said vaccine is in the range of 10^2 to 10^8 TCID₅₀ per dose.
37. The combination vaccine of claim 30, wherein the amount of the cell preparation of said strain of CCV in said vaccine is at least about 100 relative units per dose.

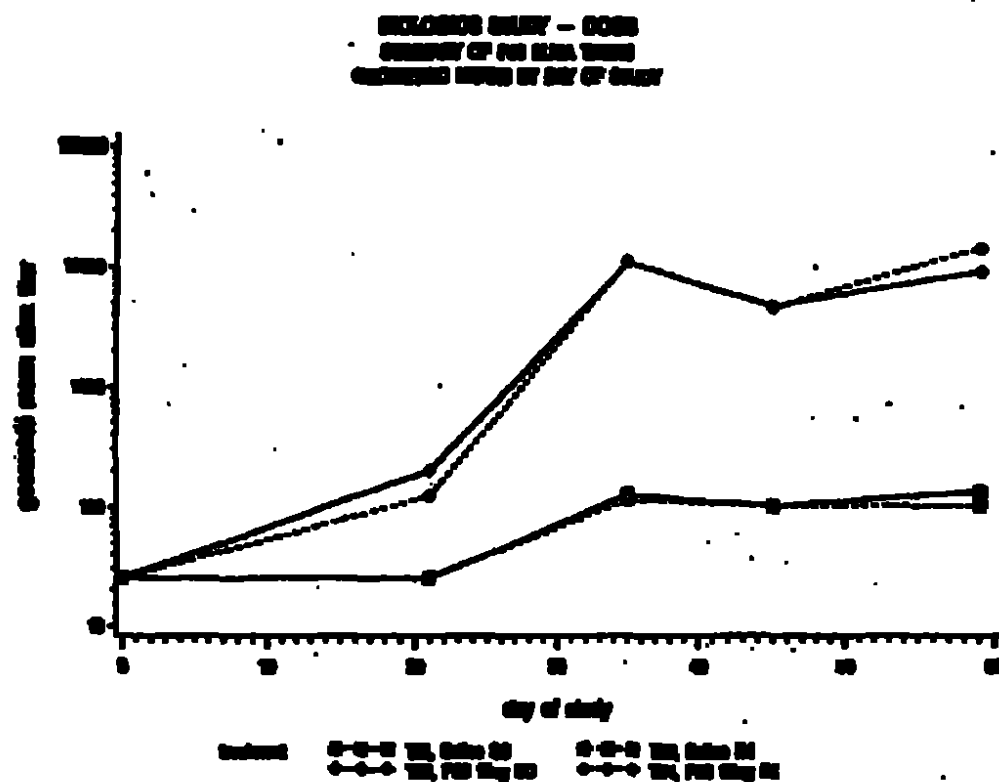
38. The combination vaccine of claim 30 wherein said carrier comprises saponin and a surfactant.
39. The combination vaccine of claim 38, wherein said saponin is Quil A and said surfactant is cholesterol.
40. The combination vaccine of claim 39 wherein the amount of Quil A is in the range of 1 to 1000 μg per dose, and the amount of cholesterol is in the range of 1 to 1000 μg per dose.
41. The vaccine composition of claim 30 wherein the carrier comprises aluminum hydroxide.
42. A method for immunizing dogs against canine pathogens comprising administering to a dog the combination vaccine of claim 30.
43. The method of claim 42, wherein said combination vaccine is administered by an intravenous, intranasal, oral, intramuscular or subcutaneous route.
44. The method of claim 42, wherein said dog receives said combination vaccine two or three times with an interval of about 2 to 3 weeks between the administrations.
45. A combination vaccine for immunizing dogs against canine pathogens comprising a *Leptospira* cell preparation of *Leptospira canicola*, *Leptospira grippityphosa*, *Leptospira interrogans*, and *Leptospira pomona*, and further comprising an attenuated strain of canine distemper (CD) virus, an attenuated strain of canine adenovirus type 2 (CAV-2), an attenuated strain of canine parainfluenza (CPI) virus, an attenuated strain of canine parvovirus (CPV), and a carrier.
46. The combination vaccine of claim 45, wherein the amount of each *Leptospira* strain in the vaccine is in the range of about 100-3500 nephelometric units per vaccine dose.
47. The combination vaccine of claim 45, wherein the amount of each *Leptospira* strain in the vaccine is in the range of about 200 to 2000 nephelometric units per dose.
48. The combination vaccine of claim 45, wherein the amount of said attenuated strain of CD virus in said vaccine is in the range of 10^2 to 10^8 TCID₅₀ per dose.
49. The combination vaccine of claim 45, wherein the amount of said attenuated strain of CAV-2 in said vaccine is in the range of 10^2 to 10^8 TCID₅₀ per dose.

50. The combination vaccine of claim 45, wherein the amount of said attenuated strain of CPV virus in said vaccine is in the range of 10^2 to 10^8 TCID₅₀ per dose.
51. The combination vaccine of claim 45, wherein the amount of said attenuated strain of CPV in said vaccine is in the range of 10^2 to 10^8 TCID₅₀ per dose.
52. The combination vaccine of claim 45, wherein said carrier comprises saponin and a surfactant.
53. The combination vaccine of claim 52, wherein said saponin is Quil A and said surfactant is cholesterol.
54. The combination vaccine of claim 53 wherein the amount of Quil A is in the range of 1 to 1000 µg per dose, and the amount of cholesterol is in the range of 1 to 1000 µg per dose.
55. The vaccine composition of claim 45 wherein the carrier comprises aluminum hydroxide.
56. A method for immunizing dogs against canine pathogens comprising administering to a dog the combination vaccine of claim 45.
57. The method of claim 56, wherein said combination vaccine is administered by an intravenous, intranasal, oral, intramuscular or subcutaneous route.
58. The method of claim 56, wherein said dog receives said combination vaccine two or three times with an interval of about 2 to 3 weeks between the administrations.
59. The combination vaccine of claim 45, further comprising an inactivated whole or partial cell preparation of a strain of canine coronavirus (CCV).
60. The combination vaccine of claim 59, wherein the amount of each *Leptospira* strain in the vaccine is in the range of about 100-3600 nephelometric units per vaccine dose.
61. The combination vaccine of claim 59, wherein the amount of each *Leptospira* strain in the vaccine is in the range of about 200 to 2000 nephelometric units per dose.
62. The combination vaccine of claim 59, wherein the amount of said attenuated strain of CD virus in said vaccine is in the range of 10^2 to 10^8 TCID₅₀ per dose.

63. The combination vaccine of claim 59, wherein the amount of said attenuated strain of CAV-2 in said vaccine is in the range of 10^5 to 10^8 TCID₅₀ per dose.
- 5 64. The combination vaccine of claim 59, wherein the amount of said attenuated strain of CP1 virus in said vaccine is in the range of 10^5 to 10^8 TCID₅₀ per dose.
65. The combination vaccine of claim 59, wherein the amount of said attenuated strain of CPV in said vaccine is in the range of 10^5 to 10^8 TCID₅₀ per dose.
- 10 66. The combination vaccine of claim 59, wherein the amount of the cell preparation of said strain of CCV in said vaccine is at least about 100 relative units per dose.
67. The combination vaccine of claim 59, wherein said carrier comprises saponin and a surfactant.
- 15 68. The combination vaccine of claim 67, wherein said saponin is Quil A and said surfactant is cholesterol.
69. The combination vaccine of claim 68 wherein the amount of Quil A is in the range of 1 to 1000 µg per dose, and the amount of cholesterol is in the range of 1 to 1000 µg per dose.
- 20 70. The vaccine composition of claim 59 wherein the carrier comprises aluminum hydroxide.
- 25 71. A method for immunizing dogs against canine pathogens comprising administering to a dog the combination vaccine of claim 59.
72. The method of claim 71, wherein said combination vaccine is administered by an intravenous, intranasal, oral, intramuscular or subcutaneous route.
- 30 73. The method of claim 71, wherein said dog receives said combination vaccine two or three times with an interval of about 2 to 3 weeks between the administrations.

91

Figure 1: Summary of Geometric Mean of PPS ELISA Endpoint Titers in Unvaccinated and pPS Bordetella (10 µg/dose) Vaccinated Dogs Aerosol Challenge with Bordetella Bronchiseptica



92

Figure 2. Summary of Serum Amyloid A (SAA) in Days Following Aerosol Challenges with *Beauveria brachyosporea*

INDICES STUDY - 1000
SERUM AMYLOID A (SAA) LEVELS A (µg) TIME
CHALLENGE INDEX BY DAY OF STUDY

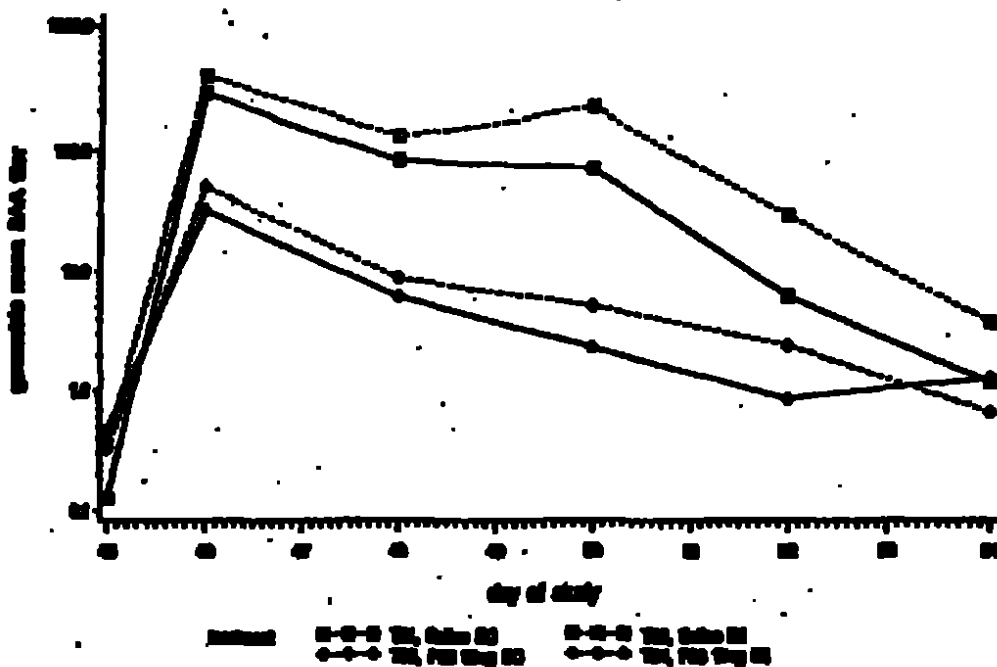
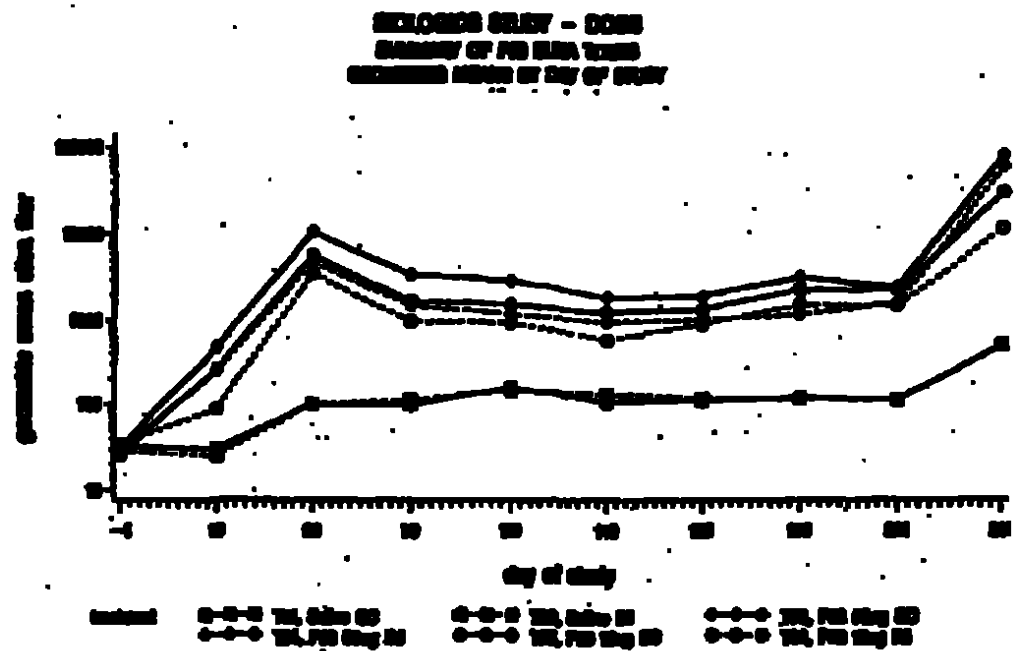


Figure 3 Summary of Geometric Mean of IgG ELISA Endpoint Titers in Unvaccinated and pBS Bordetella Vaccinated Dogs following Vaccination and Aerosol Challenge with Bordetella bronchiseptica

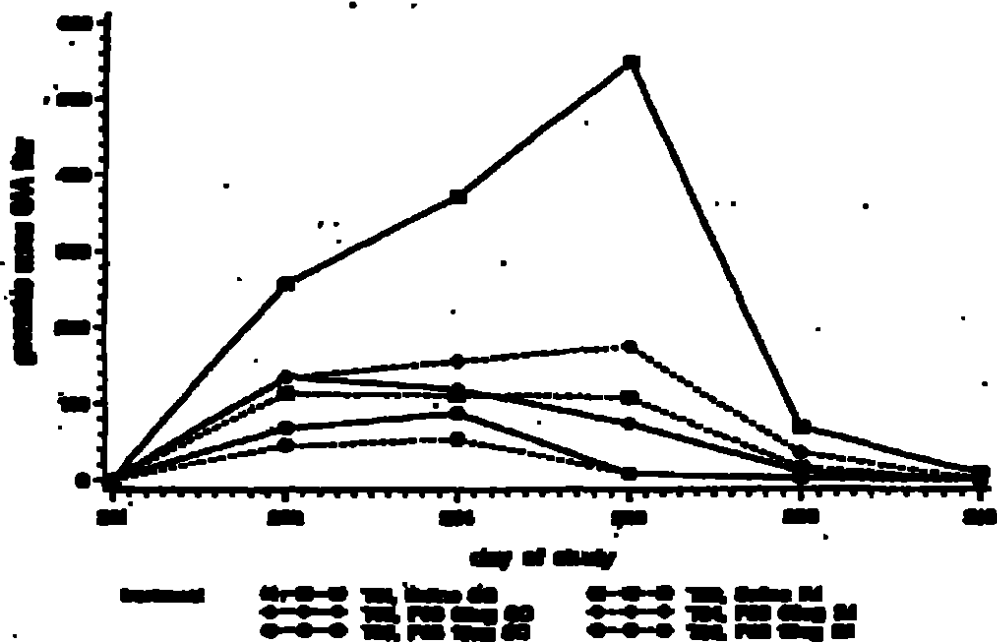


Day 10 corresponds to uninfected data from day 10 and 21, day 75 corresponds to 75 and 91, day 125 corresponds to 125 and 151.

94
94

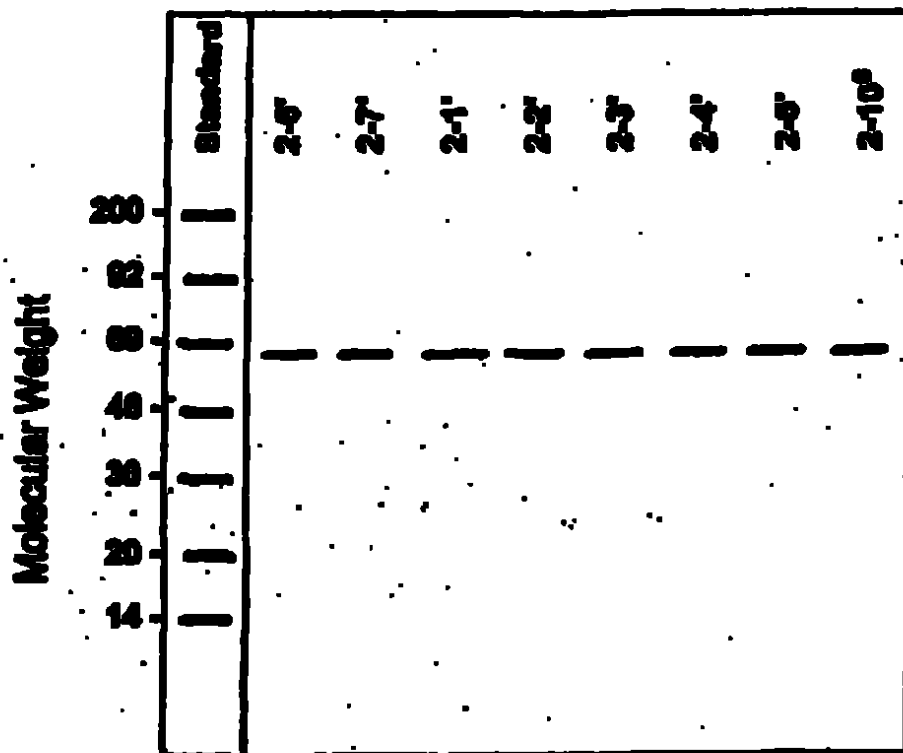
Figure 4. Summary of Serum Antiold A titre in Dogs Following Aerosol Challenge with Bordetella bronchiseptica

ECOLOGICAL STUDY - DOGS
REPORTED MEANLESS ANALYSIS OF SERUM ANTIOLD A (PAV) TITRE
OBTAINED BEFORE BY DAY OF STUDY



95

Figure 5.



98

SEQUENCE LISTING

<110> Frantz, Joseph C.
Tucker, Cassius M.
Newby, Thomas J.

<120> CANINE VACCINES AGAINST BORDETELLA BRONCHISEPTICA

<130> PC32220

<140> 60/443,418

<141> 2003-02-29

<160> 3

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1

<211> 602

<212> PRT

<213> Bordetella bronchiseptica

<400> 1

Asp Pro Asn Thr Val Ser Ile Ile Lys Ala Gly Glu Arg Gln His Gly
1 5 10 15

Ile His Ile Lys Gln Ser Asp Gly Ala Gly Val Arg Thr Ala Thr Gly
20 25 30

Thr Thr Ile Lys Val Ser Gly Arg Gln Ala Gln Gly Val Leu Leu Glu
35 40 45

Asn Pro Ala Ala Glu Leu Arg Phe Gln Asn Gly Ser Val Thr Ser Ser
50 55 60

Gly Gln Leu Phe Asp Glu Gly Val Arg Arg Phe Leu Gly Thr Val Thr
65 70 75 80

Val Lys Ala Gly Lys Leu Val Ala Asp His Ala Thr Leu Ala Asn Val
85 90 95

Ser Asp Thr Arg Asp Asp Asp Gly Ile Ala Leu Tyr Val Ala Gly Glu
100 105 110

Gln Ala Gln Ala Ser Ile Ala Asp Ser Thr Leu Gln Gly Ala Gly Gly
115 120 125

Val Arg Val Glu Arg Gly Ala Asn Val Thr Val Gln Arg Ser Thr Ile
130 135 140

Val Asp Gly Gly Leu His Ile Gly Thr Leu Gln Pro Leu Gln Pro Glu

99

145	150	155	160
Asp Leu Pro Pro Ser Arg Val Val Leu Gly Asp Thr Ser Val Thr Ala	165	170	175
Val Pro Ala Ser Gly Ala Pro Ala Ala Val Ser Val Phe Gly Ala Asn	180	185	190
Glu Leu Thr Val Asp Gly Gly His Ile Thr Gly Gly Arg Ala Ala Gly	195	200	205
Val Ala Ala Met Asp Gly Ala Ile Val His Leu Gln Arg Ala Thr Ile	210	215	220
Arg Arg Gly Asp Ala Pro Ala Gly Gly Ala Val Pro Gly Gly Ala Val	225	230	235
Pro Gly Gly Phe Gly Pro Leu Leu Asp Gly Trp Tyr Gly Val Asp Val	245	250	255
Ser Asp Ser Thr Val Asp Leu Ala Gln Ser Ile Val Glu Ala Pro Gln	260	265	270
Leu Gly Ala Ala Ile Arg Ala Gly Arg Gly Ala Arg Val Thr Val Ser	275	280	285
Gly Gly Ser Leu Ser Ala Pro His Gly Asn Val Ile Glu Thr Gly Gly	290	295	300
Gly Ala Arg Arg Phe Pro Pro Pro Ala Ser Pro Leu Ser Ile Thr Leu	305	310	315
Arg Ala Gly Ala Arg Ala Gln Gly Arg Ala Leu Leu Tyr Arg Val Leu	325	330	335
Pro Glu Pro Val Lys Leu Thr Leu Ala Gly Gly Ala Gln Gly Gln Gly	340	345	350
Asp Ile Val Ala Thr Glu Leu Pro Pro Ile Pro Gly Ala Ser Ser Gly	355	360	365
Pro Leu Asp Val Ala Leu Ala Ser Gln Ala Arg Trp Thr Gly Ala Thr	370	375	380
Arg Ala Val Asp Ser Leu Ser Ile Asp Asn Ala Thr Trp Val Met Thr	385	390	395
			400

100

Asp Asn Ser Asn Val Gly Ala Leu Arg Leu Ala Ser Asp Gly Ser Val
405 410 415

Asp Phe Gln Gln Pro Ala Glu Ala Gly Arg Phe Lys Val Leu Met Val
420 425 430

Asp Thr Leu Ala Gly Ser Gly Leu Phe Arg Met Asn Val Phe Ala Asp
435 440 445

Leu Gly Leu Ser Asp Lys Leu Val Val Met Arg Asp Ala Ser Gly Gln
450 455 460

His Arg Leu Trp Val Arg Asn Ser Gly Ser Glu Pro Ala Ser Ala Asn
465 470 475 480

Thr Met Leu Leu Val Gln Thr Pro Arg Gly Ser Ala Ala Thr Phe Thr
485 490 495

Leu Ala Asn Lys Asp Gly Lys Val Asp Ile Gly Thr Tyr Arg Tyr Arg
500 505 510

Leu Ala Ala Asn Gly Asn Gly Gln Trp Ser Leu Val Gly Ala Lys Ala
515 520 525

Pro Pro Ala Pro Lys Pro Ala Pro Gln Pro Gly Pro Gln Pro Gly Pro
530 535 540

Gln Pro Gly Pro Gln Pro Pro Gln Pro Pro Gln Pro Pro Gln Pro Pro
545 550 555 560

Gln Arg Gln Pro Glu Ala Pro Ala Pro Gln Pro Pro Ala Gly Arg Glu
565 570 575

Leu Ser Ala Ala Ala Asn Ala Ala Val Asn Thr Gly Gly Val Gly Leu
580 585 590

Ala Ser Thr Leu Trp Tyr Ala Glu Ser Asn
595 600

<210> 2

<211> 1806

<212> DNA

<213> Bordetella bronchiseptica

<400> 2

gatcaaaaca ctgtgtcaat catcaaggcc ggcgagcgcc agcacggcat ccacatcaag 60

caaagcgatg ggcgcggcgt aaggaacgac accggaacga ccatcaaggt aagcggtcgt 120
 caggcccaagg gcgtcctgct ggaaatccc ggcgcgcgac tgcgggttcca gaacggcagc 180
 gtcacgtctt cgggacagct gttcgacgaa ggcgtccggc gctttctggg caccgtcacc 240
 gtcagggcgg gcaagctggc cgcgcgtcac gacacgtcgg caaacgtcag cgaaccccg 300
 gacgacgacg gcacgcgcgt ctatgtggc ggcgagcagg ccaggccag catcgccgac 360
 agcaccctgc agggcgccgg cggcgtgcgg gtcgagtcgg gcgcacatgt caaggtccaa 420
 cgcagcacca tcgttgacgg gggcttgcat atcggcaccc tgcagcgcgt gcagccggaa 480
 gaacttcgc ccagccgggt ggtgctggc gacacagcg tgaccccggt gcgcgcagc 540
 ggcgcgcgcg cggcgggtgtc tgtattcggg gccaatgagc ttaagggtga tggcgggac 600
 atcacccggg ggcgggcagc ggggggtggc gccatggac ggcgcgcgt gcacctgcag 660
 cgcgcgcgaa tacggcgggg ggaagcgccg gcgcggggtg cggttccagg cggtcgggtt 720
 ccggcgggct tcggccccc ccttgacggc tggtatggc tggatgtac ggaotccaa 780
 gtcgaactcg ctacgtcgt cgtcgaggcg ccgcagctgg gcgcgcgcgt ccggcgggcg 840
 cgcgcgcgca gggtgacggc gtcggcgggc agcttgctcg caccgcacgg caatgtcacc 900
 gagaacggcg gcggtcgcgg tcgcttcacg cctccggcct cgcacctga gatcaccttg 960
 cggcgcgcgg caagggcgca ggggagggcg ctgctgtacc gggtaactgc ggaacccgtg 1020
 aagctgacgc tggcgggcgg cgcacagggc caggcgacaa tcgtcgagac ggaactgcct 1080
 ccattccag gcgcgtcag cgggcgcgtc gacgtggcg tggccagcca ggcgcgatgg 1140
 acgggcgcta ccgcgcggc cgaactcgtg tcacgcgaa aagccactg ggtcatgacg 1200
 gacaactoga aagtcggcg gctggggctg gacagcgac gcagcgtoga tttccagcag 1260
 ccggcgaaag ctggcggtt caaggtcctg atggctgata cgtggcggg ttcggggctg 1320
 ttcgcgatga atgtcttgc ggaactgggg ctgagcgaca agctggctgt catgcgggac 1380
 gcagcgggc agcaccggct gtcggctcgc aacagcgga gcagcgcgc cagcgcgaac 1440
 acatgtctgc tggtcagac ggcacagggc agcgcggcga cctttaccc tgccaaag 1500
 gaaggcaagg tcgatatgg taactacgg tatcgattgg ccgcacagg caatgggag 1560
 tggagactgg tggcgcgaa ggcgcgcgc gcgcacagc ccgcgcgcga gcgcgctcc 1620
 cagcccggtc ccagcccggt tcccagcg ccgcagcgc gcagcgcgc gcagcgcga 1680
 cagggcagc cggagcgcc ggcgcgcga ccgcggcggg gcaggaggt gtcgcgcgc 1740
 gcaacgcgc cggtaacaa ggcgggggtg ggcctggcca gcaagctct gtacgcgaa 1800
 agcaat 1806

102

<210> 3

<211> 599

<212> PRT

<213> Bordetella bronchiseptica

<400> 3

Asp Trp Asn Asn Gln Ser Ile Ile Lys Ala Gly Glu Arg Gln His Gly
1 5 10 15

Ile His Ile Lys Gln Ser Asp Gly Ala Gly Val Arg Thr Ala Thr Gly
20 25 30

Thr Thr Ile Lys Val Ser Gly Arg Gln Ala Gln Gly Val Leu Leu Glu
35 40 45

Asn Pro Ala Ala Glu Leu Arg Phe Gln Asn Gly Ser Val Thr Ser Ser
50 55 60

Gly Gln Leu Phe Asp Glu Gly Val Arg Arg Phe Leu Gly Thr Val Thr
65 70 75 80

Val Lys Ala Gly Lys Leu Val Ala Asp His Ala Thr Leu Ala Asn Val
85 90 95

Ser Asp Thr Arg Asp Asp Asp Gly Ile Ala Leu Tyr Val Ala Gly Glu
100 105 110

Gln Ala Gln Ala Ser Ile Ala Asp Ser Thr Leu Gln Gly Ala Gly Gly
115 120 125

Val Arg Val Glu Arg Gly Ala Asn Val Thr Val Gln Arg Ser Thr Ile
130 135 140

Val Asp Gly Gly Leu His Ile Gly Thr Leu Gln Pro Leu Gln Pro Glu
145 150 155 160

Asp Leu Pro Pro Ser Arg Val Val Leu Gly Asp Thr Ser Val Thr Ala
165 170 175

Val Pro Ala Ser Gly Ala Pro Ala Ala Val Ser Val Phe Gly Ala Asn
180 185 190

Glu Leu Thr Val Asp Gly Gly His Ile Thr Gly Gly Arg Ala Ala Gly
195 200 205

Val Ala Ala Met Asp Gly Ala Ile Val His Leu Gln Arg Ala Thr Ile

103

210 215 220
 Arg Arg Gly Asp Ala Pro Ala Gly Gly Ala Val Pro Gly Gly Ala Val
 225 230 235 240
 Pro Gly Gly Phe Gly Pro Leu Leu Asp Gly Trp Tyr Gly Val Asp Val
 245 250 255
 Ser Asp Ser Thr Val Asp Leu Ala Gln Ser Ile Val Glu Ala Pro Gln
 260 265 270
 Leu Gly Ala Ala Ile Arg Ala Gly Arg Gly Ala Arg Val Thr Val Ser
 275 280 285
 Gly Gly Ser Leu Ser Ala Pro His Gly Asn Val Ile Glu Thr Gly Gly
 290 295 300
 Gly Ala Arg Arg Phe Pro Pro Pro Ala Ser Pro Leu Ser Ile Thr Leu
 305 310 315 320
 Gln Ala Gly Ala Arg Ala Gln Gly Arg Ala Leu Leu Tyr Arg Val Leu
 325 330 335
 Pro Glu Pro Val Lys Leu Thr Leu Ala Gly Gly Ala Gln Gly Gln Gly
 340 345 350
 Asp Ile Val Ala Thr Glu Leu Pro Pro Ile Pro Gly Ala Ser Ser Gly
 355 360 365
 Pro Leu Asp Val Ala Leu Ala Ser Gln Ala Arg Trp Thr Gly Ala Thr
 370 375 380
 Arg Ala Val Asp Ser Leu Ser Ile Asp Asn Ala Thr Trp Val Met Thr
 385 390 395 400
 Asp Asn Ser Asn Val Gly Ala Leu Arg Leu Ala Ser Asp Gly Ser Val
 405 410 415
 Asp Phe Gln Gln Pro Ala Glu Ala Gly Arg Phe Lys Cys Leu Met Val
 420 425 430
 Asp Thr Leu Ala Gly Ser Gly Leu Phe Arg Met Asn Val Ala Phe Ala
 435 440 445
 Asp Leu Gly Leu Ser Asp Lys Leu Val Val Met Arg Asp Ala Ser Gly
 450 455 460

104

Gln His Arg Leu Leu Val Arg Asn Ser Gly Ser Glu Pro Ala Ser Gly
465 470 475 480

Asn Thr Met Leu Leu Val Gln Thr Pro Arg Gly Ser Ala Ala Thr Phe
485 490 495

Thr Leu Ala Asn Lys Asp Gly Lys Val Asp Ile Gly Thr Tyr Arg Tyr
500 505 510

Arg Leu Ala Ala Asn Gly Asn Gly Gln Trp Ser Leu Val Gly Ala Lys
515 520 525

Ala Pro Pro Ala Pro Lys Pro Ala Pro Gln Pro Gly Pro Gln Pro Gly
530 535 540

Pro Gln Pro Pro Gln Pro Pro Gln Pro Pro Gln Pro Pro Gln Arg Gln
545 550 555 560

Pro Glu Ala Pro Ala Pro Gln Pro Pro Ala Gly Arg Glu Leu Ser Ala
565 570 575

Ala Ala Asn Ala Ala Val Asn Thr Gly Gly Val Gly Leu Ala Ser Thr
580 585 590

Leu Trp Tyr Ala Glu Ser Asn
595

**VACUNAS CANINAS MULTIVALENTES CONTRA LEPTOSPIRA
BRATISLAVA Y OTROS PATÓGENOS**

CAMPO DE LA INVENCION

5 La invención se refiere a vacunas que contienen un antígeno p68 de *Bordetella bronchiseptica* y al uso de las mismas para proteger perros contra traqueobronquitis infecciosa ("tos perruna") provocada por *Bordetella bronchiseptica*. Esta invención también se refiere a vacunas de combinación que contienen un antígeno p68 de *Bordetella bronchiseptica* y uno o más

10 antígenos de otro patógeno canino tal como virus de moquillo canino (CD), adenovirus canino de tipo 2 (CAV-2), virus de la parainfluenza canina (CPI), coronavirus canino (CCV), parvovirus canino (CPV), *Leptospira bratislava*, *Leptospira canicola*, *Leptospira grippotyphosa*, *Leptospira icterohaemorrhagiae* o *Leptospira pomona*. También se proporcionan los procedimientos para

15 proteger perros contra enfermedades provocadas por patógenos caninos que usan vacunas de combinación. Esta invención se refiere a vacunas que contienen *Leptospira bratislava* y al uso de las mismas para proteger perros contra infecciones provocadas por *Leptospira bratislava*. Esta invención también se refiere a vacunas de combinación que contienen *Leptospira*

20 *bratislava* y uno o más antígenos de otro patógeno canino tal como virus de moquillo canino (CD), adenovirus canino de tipo 2 (CAV-2), virus de la parainfluenza canina (CPI), coronavirus canino (CCV), parvovirus canino (CPV), *Leptospira canicola*, *Leptospira grippotyphosa*, *Leptospira icterohaemorrhagiae* o *Leptospira pomona*. Esta invención además se refiere a

25 vacunas de combinación de dichos antígenos sin *Leptospira bratislava*.

También se proporcionan los procedimientos para proteger perros contra enfermedades provocadas por patógenos caninos que usan las vacunas de combinación.

5

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

El producto presente de vacuna de *Bordetella bronchiseptica* canina comercialmente disponible está compuesto de una bacterina celular entera de *Bordetella bronchiseptica* no adyuvantada e inactivada. Tal bacterina celular entera puede conducir a reacciones después de la vacunación relacionadas
10 con la proteína celular. La proteína p68 de *B. bronchiseptica* es antigénicamente similar a la Proteína de la Membrana Externa (OMP) de *B. pertussis* y a la OMP de *B. para pertussis* (Shahin y col., "Characterization of the Protective Capacity and immunogenicity of the 69-kD Outer Membrane Protein of *Bordetella pertussis*", J. Exp. Med., 171: 63 - 73, 1990). Un papel
15 protector de esta OMP se ha demostrado para ratones (Shahin y col., *supra*, Novotny y col., "Biologic and Protective Properties of the 69-kD Outer Membrane Protein of *Bordetella pertussis*", A Novel Formulation for a Acellular Pertussis Vaccine", J. Infect. Dis. 164: 114 - 22, 1991), seres humanos (He y col., "Protective Role of Immunoglobulin G Antibodies to Filamentous
20 Hemmagglutinin and Pertactin of *Bordetella pertussis* in *Bordetella parapertussis* Infection", Eur. J. Clin. Microbiol Infect Dis. 10: 793 - 798, 1996) y cerdos (Kobish y col., "Identification of a 68-Kilodalton Outer Membrane Protein as the Major Protective Antigen of *Bordetella bronchiseptica* by Using Specific-Pathogen - Free Piglets", Infect. Immun. 58 (2): 352 - 357, 1990).

25

Antes de la presente invención, no se ha mostrado que un antígeno p68

de *Bordetella bronchiseptica* puede ser una vacuna segura y eficaz en perros. Por lo tanto, existe una necesidad de desarrollar una vacuna de *Bordetella bronchiseptica* que contenga un antígeno p68 que sea adecuada para uso canino. Sería incluso más ventajoso si tal vacuna de p68 de *Bordetella*
5 *bronchiseptica* fuera segura para la administración a cachorros y proporcionara protección a largo plazo.

CD es una enfermedad viral, universal de alta mortalidad con manifestaciones variables. Aproximadamente el 50% de perros no vacunados, no inmunes infectados con el virus CD desarrollan signos clínicos, y
10 aproximadamente el 90% de esos perros muere.

La hepatitis canina infecciosa o ICH, provocada por adenovirus canino de tipo 1 (CAV-1), es una enfermedad viral, universal, algunas veces fatal de perros caracterizada por lesiones hepáticas y endoteliales generalizadas. El CAV-2 provoca enfermedad respiratoria, que, en los casos graves puede incluir
15 neumonía y bronconeumonía.

CPI es una enfermedad común respiratoria de las vías superiores viral. La CPI no complicada puede ser suave o subclínica, con signos que se hacen más graves si existe una infección concurrente con otros patógenos respiratorios.

20 La infección de CPV da como resultado enfermedad entérica caracterizada por la aparición repentina de vómitos y diarrea, a menudo con hemorragia. La leucopenia comúnmente acompaña a signos clínicos. Los perros susceptibles de cualquier edad pueden estar afectados, pero la mayor mortalidad se da en cachorros. En los cachorros de 4 - 12 semanas de edad
25 CPV puede de manera ocasional provocar miocarditis que puede dar como

resultado fallo cardíaco agudo después de una enfermedad breve e inocua. Después de la infección muchos perros son refractarios a la enfermedad durante un año o más. De manera similar, perras seropositivas pueden transferir a sus cachorros anticuerpos CPV que pueden interferir con la
5 inmunización activa de los cachorros a lo largo de las 16 semanas de edad.

CCV también provoca enfermedad entérica en perros susceptibles de todas las edades en todo el mundo. Altamente contagioso, el virus se transmite principalmente por contacto directo con heces infecciosas, y pueden provocar enteritis clínica dentro de los 1 - 4 días después de la exposición. La gravedad
10 de la enfermedad se puede exacerbar por la infección simultánea con otros agentes. Los signos principales de la infección por CCV incluyen anorexia, vómitos, y diarrea. La frecuencia de vómitos usualmente disminuye dentro de un día o dos después de la aparición de la diarrea, pero la diarrea puede persistir a lo largo del curso de la infección, y las evacuaciones ocasionalmente
15 pueden contener rayas de sangre. Con la infección con CCV la mayoría de los perros permanecen sin fiebre y no se observa leucopenia en los casos no complicados.

La leptospirosis se produce en perros de todas las edades, con un amplio intervalo de signos clínicos y nefritis crónica generalmente después de
20 infección aguda.

Se han desarrollado algunas vacunas de combinación, que incluyen las vendidas bajo la marca comercial Vanguard ®. Sin embargo, antes de la presente invención, no existían vacunas de combinación eficaces para proteger a perros contra *Bordetella bronchiseptica* y uno o más de otros patógenos
25 caninos tales como virus CD, CAV-2, virus CPI, CPV, CCV, y especies de

Leptospira tales como *L. bratislava*, *L. canicola*, *L. grippotyphosa*, *L. icterohaemorrhagiae* y *L. pomona*. Tampoco había vacunas de combinación eficaces que comprendieran *L. bratislava* contra estos otros patógenos caninos pero sin *Bordetella bronchiseptica*. Un problema en el desarrollo de las vacunas de combinación implica la interferencia de eficacia, a saber imposibilidad de uno o más antígenos en una composición de combinación para mantener o lograr eficacia debido a la presencia de los otros antígenos en la composición. Se cree que es un resultado de la interferencia con un antígeno en la composición administrada a un huésped, por ejemplo, un perro, en la respuesta inmunológica, antigénica, de anticuerpo o protectora que dicho antígeno indujo en el huésped debido a los otros antígenos presentes en la composición. Sin embargo, se conocen vacunas de combinación para otros huéspedes, tales como gatos. Se cree que la interferencia de eficacia en perros se debe a alguna particularidad del sistema biológico canino, o se debe a la reacción de los antígenos con el sistema biológico canino.

Por lo tanto existe una necesidad de desarrollar una vacuna de combinación adecuada para la administración a perros contra *Bordetella bronchiseptica* y uno o más de otros patógenos caninos, que no muestre interferencia de eficacia en caninos. También existe una necesidad de desarrollar tales vacunas de combinación sin *Bordetella bronchiseptica*. Incluso sería más ventajoso si tales vacunas de combinación son seguras para la administración a cachorros y proporcionan protección a largo plazo.

SUMARIO DE LA INVENCION

La presente invención proporciona vacunas y procedimientos para

proteger perros contra enfermedades provocadas por patógenos caninos.

En una realización, la presente invención proporciona vacunas de p68 adecuadas para la administración a perros y capaces de proteger perros contra enfermedades provocadas por *Bordetella bronchiseptica*. Tales vacunas de la
5 presente invención incluyen un antígeno p68 de *Bordetella bronchiseptica* y un vehículo veterinariamente aceptable tal como un adyuvante.

En otra realización la presente invención proporciona procedimientos de protección de perros contra enfermedad provocada por *Bordetella bronchiseptica* mediante la administración a un perro de una vacuna que
10 incluye un antígeno p68 de *Bordetella bronchiseptica* y un vehículo veterinariamente aceptable tal como un adyuvante.

En otra realización la presente invención proporciona vacunas de *Leptospira bratislava* adecuadas para la administración a perros y capaz de proteger perros contra una enfermedad provocada por *Leptospira bratislava*.
15 Tales vacunas de la presente invención incluyen una preparación de células de *Leptospira bratislava* y un vehículo veterinariamente aceptable tal como un adyuvante.

En otra realización la presente invención proporciona procedimientos de protección de perros contra una enfermedad provocada por *Leptospira bratislava* mediante la administración a un perro de una vacuna que incluye una
20 preparación de células de *Leptospira bratislava* y un vehículo veterinariamente aceptable tal como un adyuvante.

En todavía otra realización, la presente invención proporciona vacunas de combinación adecuadas para la administración a perros. Las vacunas de
25 combinación de la presente invención incluyen un antígeno p68 de *Bordetella*

bronchiseptica en combinación con al menos otro antígeno de otros patógenos caninos, capaces de inducir una respuesta inmune protectora en perros contra una enfermedad provocada por dicho (s) otro (s) patógeno (s). Tales otros patógenos se pueden seleccionar entre virus de moquillo canino (CD),
5 adenovirus canino de tipo 2 (CAV-2), virus de la parainfluenza canina (CPI), parvovirus canino (CPV), coronavirus canino (CCV), herpesvirus canino, virus de la rabia, *Leptospira bratislava*, *Leptospira canicola*, *Leptospira grippotyphosa*, *Leptospira icterohaemorrhagiae*, *Leptospira pomona*, *Leptospira hardjobovis*, *Prophyromonas spp.*, *Bacteriodes spp.*, *Leishmania spp*, *Borrelia*
10 *spp.*, *Ehrlichia spp.*, *Mycoplasma spp.* y *Microsporum canis*.

Una combinación preferida de la presente invención incluye dos o más antígenos de patógenos caninos, capaces de inducir una respuesta inmune protectora en perros contra enfermedad provocada por tal (es) patógeno (s). Tales patógenos se pueden seleccionar entre virus de moquillo canino (CD),
15 adenovirus canino de tipo 2 (CAV-2), virus de la parainfluenza canina (CPI), parvovirus canino (CPV), coronavirus canino (CCV), herpesvirus canino, virus de la rabia, *Leptospira bratislava*, *Leptospira canicola*, *Leptospira grippotyphosa*, *Leptospira icterohaemorrhagiae*, *Leptospira pomona*, *Leptospira hardjobovis*, *Prophyromonas spp.*, *Bacteriodes spp.*, *Leishmania spp*, *Borrelia*
20 *spp.*, *Ehrlichia spp.*, *Mycoplasma spp.* y *Microsporum canis*.

Una vacuna de combinación preferida de la presente invención incluye cepas atenuadas de virus de moquillo canino (CD), adenovirus canino de tipo 2 (CAV-2), virus de la parainfluenza canina (CPI) y parvovirus canino (CPV); una preparación inactivada de una cepa de coronavirus canino (CCV); y un
25 antígeno p68 de *Bordetella bronchiseptica*.

Una vacuna de combinación preferida de la presente invención incluye cepas atenuadas de virus de moquillo canino (CD), adenovirus canino de tipo 2 (CAV-2), virus de la parainfluenza canina (CPI) y parvovirus canino (CPV); y una preparación inactivada de una cepa de coronavirus canino (CCV).

5 Otra vacuna de combinación preferida de la presente invención incluye cepas atenuadas de virus de moquillo canino (CD), adenovirus canino de tipo 2 (CAV-2), virus de la parainfluenza canina (CPI) y parvovirus canino (CPV); una preparación inactivada de una cepa de coronavirus canino (CCV); una proteína p68 de *Bordetella bronchiseptica*, y una preparación de células inactivada de
10 cinco *Leptospira* serovars (*Leptospira bratislava*, *Leptospira canicola*, *Leptospira grippotyphosa*, *Leptospira icterohaemorrhagiae* y *Leptospira pomona*).

Otra vacuna de combinación preferida de la presente invención incluye cepas atenuadas de virus de moquillo canino (CD), adenovirus canino de tipo 2
15 (CAV-2), virus de la parainfluenza canina (CPI), y parvovirus canino (CPV); y una preparación inactivada de una cepa de coronavirus canino (CCV); y una preparación de células de cinco *Leptospira* serovars (*Leptospira bratislava*, *Leptospira canicola*, *Leptospira grippotyphosa*, *Leptospira icterohaemorrhagiae* y *Leptospira pomona*).

20 Otra vacuna de combinación preferida de la presente invención incluye cepas atenuadas de virus de moquillo canino (CD), adenovirus canino de tipo 2 (CAV-2), virus de la parainfluenza canina (CPI) y parvovirus canino (CPV); una preparación inactivada de una cepa de coronavirus canino (CCV); y una preparación de células inactivada de cuatro *Leptospira* serovars (*Leptospira*
25 *canicola*, *Leptospira grippotyphosa*, *Leptospira icterohaemorrhagiae* y

Leptospira pomona).

Todavía otra vacuna de combinación preferida de la presente invención incluye cepas atenuadas de virus CD, CAV-2, virus CPI, una cepa CPV; y un antígeno p68 de *Bordetella bronchiseptica*.

- 5 Todavía otra vacuna de combinación preferida de la presente invención incluye cepas atenuadas de virus CD, CAV-2, virus CPI y una cepa CPV.

Otra vacuna de combinación preferida de la presente invención incluye cepas atenuadas de virus CD, CAV-2, virus CPI, una cepa CPV; un antígeno p68 de *Bordetella bronchiseptica* y una preparación de células inactivada de
10 *Leptospira canicola* y *Leptospira icterohaemorrhagiae*.

Otra vacuna de combinación preferida de la presente invención incluye cepas atenuadas de virus CD, CAV-2, virus CPI, una cepa CPV; y una preparación de células inactivada de *Leptospira canicola* y *Leptospira icterohaemorrhagiae*.

- 15 Todavía otra vacuna de combinación preferida de la presente invención incluye cepas atenuadas de virus CD, CAV-2, virus CPI, una cepa CPV, un antígeno p68 de *Bordetella bronchiseptica* y una preparación de células inactivada de cinco *Leptospira* serovars (*Leptospira bratislava*, *Leptospira canicola*, *Leptospira grippotyphosa*, *Leptospira icterohaemorrhagiae* y
20 *Leptospira pomona*).

Todavía otra vacuna de combinación preferida de la presente invención incluye cepas atenuadas de virus CD, CAV-2, virus CPI, una cepa CPV y una preparación de células inactivada de cinco *Leptospira* serovars (*Leptospira bratislava*, *Leptospira canicola*, *Leptospira grippotyphosa*, *Leptospira*
25 *icterohaemorrhagiae* y *Leptospira pomona*).

Todavía otra vacuna de combinación preferida de la presente invención incluye cepas atenuadas de virus CD, CAV-2, virus CPI, una cepa CPV y una preparación de células inactivada de cuatro *Leptospira* serovars (*Leptospira canicola*, *Leptospira grippotyphosa*, *Leptospira icterohaemorrhagiae* y *Leptospira pomona*).

Otra vacuna de combinación preferida incluye un antígeno p68 de *Bordetella bronchiseptica* y un virus CPI atenuado.

Todavía otra vacuna de combinación preferida incluye un antígeno p68 de *Bordetella bronchiseptica*, un virus CPI atenuado y una preparación de células inactivada de *Leptospira canicola* y *Leptospira icterohaemorrhagiae*.

La presente invención también proporciona procedimientos de protección de perros contra una enfermedad provocada por un patógeno canino mediante la administración a un perro de una vacuna de combinación de la presente invención.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Figura 1. Sumario de la media geométrica de las titulaciones de punto final ELISA de p68 en perros no vacunados y vacunados con p68 de *Bordetella* (15 µg/dosis) - exposición de aerosol con *Bordetella bronchiseptica*.

Figura 2. Sumario de las titulaciones de Amiloide A sérico A en perros después de una exposición de aerosol con *Bordetella bronchiseptica*.

Figura 3. Sumario de la media geométrica de las titulaciones de punto final ELISA de p68 en perros no vacunados y vacunados con p68 de *Bordetella* después de la vacunación y exposición de aerosol con *Bordetella bronchiseptica*.

Figura 4. Sumario de las titulaciones de Amiloide A sérico en perros

después de una exposición de aerosol con *Bordetella bronchiseptica*.

Figura 5. Transferencia de Western que muestra reactividad de anticuerpo monoclonal Bord 2 - 7 de p68 a lisado de células enteras de p68.

5

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

En una realización, la presente invención proporciona vacunas monovalentes adecuadas para la administración a perros que son capaces de proteger perros contra enfermedad provocada por *Bordetella bronchiseptica*. Las vacunas monovalentes de la presente invención incluyen un antígeno p68
10 de *Bordetella bronchiseptica* producido de manera recombinante y un vehículo veterinariamente aceptable tal como un adyuvante.

En otra realización la presente invención proporciona procedimientos de protección de perros contra enfermedad provocada por *Bordetella bronchiseptica* mediante la administración a un perro de una vacuna
15 monovalente que incluye un antígeno p68 de *Bordetella bronchiseptica* producido de manera recombinante y un vehículo veterinariamente aceptable tal como un adyuvante.

En todavía otra realización, la presente invención proporciona vacunas de combinación adecuadas para la administración a perros. Las vacunas de
20 combinación de la presente invención incluyen un antígeno p68 de *Bordetella bronchiseptica* producido de manera recombinante en combinación con al menos otro antígeno capaz de inducir una respuesta inmune protectora en perros contra enfermedad provocada por dicho otro antígeno. Otra realización de la presente invención incluye dos o más antígenos de patógenos caninos,
25 capaces de inducir una respuesta inmune protectora en perros contra

enfermedad provocada por tal (es) patógeno (s).

Una vacuna de combinación preferida de la presente invención incluye cepas atenuadas de virus de moquillo canino (CD), adenovirus canino de tipo 2 (CAV-2), virus de la parainfluenza canina (CPI) y parvovirus canino (CPV); una
5 preparación inactivada de una cepa de coronavirus canino (CCV); y una preparación de cuatro *Leptospira* serovars (*Leptospira canicola*, *Leptospira grippotyphosa*, *Leptospira icterohaemorrhagiae* y *Leptospira pomona*).

Otra vacuna de combinación preferida de la presente invención incluye cepas atenuadas de virus de moquillo canino (CD), adenovirus canino de tipo 2
10 (CAV-2), virus de la parainfluenza canina (CPI) y parvovirus canino (CPV); una preparación inactivada de una cepa de coronavirus canino (CCV); y una preparación de cinco *Leptospira* serovars (*Leptospira bratislava*, *Leptospira canicola*, *Leptospira grippotyphosa*, *Leptospira icterohaemorrhagiae* y *Leptospira pomona*).

15 Todavía otra vacuna de combinación preferida de la presente invención incluye cepas atenuadas de virus CD, CAV-2, virus CPI, una cepa CPV; y una preparación de cuatro *Leptospira* serovars (*Leptospira canicola*, *Leptospira grippotyphosa*, *Leptospira icterohaemorrhagiae* y *Leptospira pomona*).

Otra vacuna de combinación preferida de la presente invención incluye
20 cepas atenuadas de virus CD, CAV-2, virus CPI, una cepa CPV, una cepa CCV; y una preparación de *Leptospira canicola* y *Leptospira icterohaemorrhagiae*.

Todavía otra vacuna de combinación preferida de la presente invención incluye cepas atenuadas de virus CD, CAV-2, virus CPI, una cepa CPV y una
25 preparación de cinco *Leptospira* serovars (*Leptospira bratislava*, *Leptospira*

canicola, *Leptospira grippotyphosa*, *Leptospira icterohaemorrhagiae* y *Leptospira pomona*).

La presente invención también proporciona procedimientos de protección de perros contra enfermedad provocada por un patógeno canino mediante la administración a un perro de una vacuna de combinación de la presente invención.

Para claridad de la descripción, y no a modo de limitación, la descripción detallada de la invención se divide en las siguientes subsecciones que describen o ilustran ciertas características, realizaciones o aplicaciones de la invención.

Definiciones y Abreviaturas

El término "proteger un perro contra enfermedad provocada por un patógeno canino" como se usa en esta memoria descriptiva significa reducir o eliminar el riesgo de infección por el patógeno, mejorando o aliviando los síntomas de una infección, o acelerando la recuperación de una infección. La protección se logra si existe una reducción en la carga viral o bacteriana, una reducción en el derramamiento viral o bacteriano, una disminución en la incidencia o duración de infecciones, niveles de proteína en suero de fase aguda reducidos, temperaturas rectales reducidas, y/o incremento en la captación de alimento y/o crecimiento, por ejemplo.

El término "antígeno p68" se refiere a una proteína con un peso molecular de 68 kDa como se determina por la electroforesis en gel de poliacrilamida SDS, se reconoce por el anticuerpo monoclonal Bord 2 - 7 específico de p68 (ATCC #), y tiene una secuencia de aminoácidos como se

establece en la SEQ ID N° 1 o una secuencia de aminoácidos que es sustancialmente idéntica a la SEQ ID N° 1.

Por "sustancialmente idéntico" se quiere decir un grado de identidad de secuencia de al menos aproximadamente 90%, preferiblemente al menos
5 aproximadamente 95%, o más preferiblemente, al menos aproximadamente 98%.

El término "vacuna monovalente" como se usa en esta memoria descriptiva se refiere a una vacuna que tiene un componente antigénico principal. Por ejemplo, una vacuna monovalente de p68 incluye un antígeno
10 p68 de *Bordetella bronchiseptica* como el componente antigénico principal de la vacuna y es capaz de proteger el animal al que se administra la vacuna contra enfermedades provocadas por *Bordetella bronchiseptica*. Otro ejemplo de una vacuna monovalente incluye una preparación de células de *Leptospira*
bratislava como el componente antigénico principal de la vacuna y es capaz de
15 proteger el animal al que se administra la vacuna contra enfermedades provocadas por *Leptospira bratislava*.

El término "vacuna de combinación" significa una combinación bivalente o multivalente de antígenos que son capaces de inducir una respuesta inmune protectora en perros. Los efectos protectores de una vacuna de combinación
20 contra un patógeno o patógenos se logran normalmente induciendo en el sujeto animal una respuesta inmune, una respuesta inmune o bien mediada por célula o humoral o una combinación de ambas.

Por "inmunogénica" se quiere decir la capacidad de una composición para provocar una respuesta inmune en perros contra un patógeno particular.
25 La respuesta inmune puede ser una respuesta inmune celular mediada

principalmente por células T citotóxicas y células T productoras de citoquinas, o una respuesta inmune humoral mediada principalmente por células T auxiliares, que a su vez activa las células B que conducen a la producción de anticuerpos.

- 5 El término "cantidad terapéuticamente eficaz" o "cantidad eficaz" se refiere a una cantidad de vacuna monovalente o de combinación suficiente para provocar una respuesta inmune protectora en el perro al que se administra. La respuesta inmune puede comprender, sin limitación, la inducción de inmunidad celular y/o humoral. La cantidad de una vacuna que es
- 10 terapéuticamente eficaz puede variar dependiendo del antígeno particular usado en la vacuna, la edad y condición del perro, y/o el grado de infección, y se puede determinar por un veterinario.

Vacunas de p68

- 15 La presente invención ha demostrado por primera vez que una composición de vacuna que contiene antígeno p68 de *Bordetella bronchiseptica* protege de manera eficaz a perros contra enfermedad provocada por *Bordetella bronchiseptica*. La composición de vacuna de la presente invención no provoca reacciones después de vacunación
- 20 significativas, es segura para la administración a cachorros, e induce inmunidad protectora en perros que dura durante un largo período de tiempo.

- De acuerdo con lo anterior, una realización de la presente invención se refiere a una composición de vacuna que contiene un antígeno p68 de *Bordetella bronchiseptica* (o "una vacuna de p68"), que es adecuada para la
- 25 administración a perros y es capaz de proteger a perros contra enfermedad

provocada por *Bordetella bronchiseptica*, por ejemplo, traqueobronquitis infecciosa ("tos perruna").

Para el propósito de la presente invención, el término "antígeno p68" se refiere a una proteína (véase la Figura 5) con un peso molecular de 68 kDa como se determina por electroforesis de gel de poliacrilamida SDS, se reconoce por el anticuerpo monoclonal Bord 2 - 7 específico de p68 (ATCC#), y tiene una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID N° 1 o una secuencia de aminoácidos que es sustancialmente idéntica a la SEQ ID N° 1. Por "sustancialmente idéntico" se quiere decir un grado de identidad de secuencia de al menos aproximadamente 90%, preferiblemente al menos aproximadamente 95%, o más preferiblemente, al menos aproximadamente 98%. Un ejemplo de antígeno p68 que tiene una secuencia de aminoácidos sustancialmente idéntica a la SEQ ID N° 1 es el antígeno p68 descrito en el documento WO 92/17587, que se expone en la SEQ ID N° 3. El anticuerpo monoclonal específico de p68 de la presente invención reconoce proteínas de p68 nativas, proteínas de p68 recombinantes y proteínas de p68 en la superficie de la bacteria, por ejemplo.

De acuerdo con la presente invención, los antígenos p68 adecuados para uso en la presente invención incluyen proteínas p68 nativas (es decir, proteínas de p68 de origen natural purificadas a partir de *Bordetella bronchiseptica*) y proteínas de p68 producidas de manera recombinante.

La purificación de p68 nativa de *Bordetella bronchiseptica* se describe en, por ejemplo, Montaraz y col., *Infection and Immunity* 47: 744 - 751 (1985), y también se ilustra en los ejemplos proporcionados en esta memoria descriptiva más adelante. La producción recombinante de p68 se puede lograr

usando una cualquiera de las técnicas de expresión recombinante y de clonación molecular conocidas por los expertos en la técnica. Por ejemplo una molécula de ácido nucleico que codifica p68 se puede introducir en una célula huésped apropiada, tal como una bacteria, una célula de levadura (por ejemplo, una célula de *Pichia*), una célula de insecto o una célula de mamífero (por ejemplo, célula CHO). La molécula de ácido nucleico que codifica p68 se puede colocar en un enlace operable a un promotor capaz de efectuar la expresión del antígeno p68 en la célula huésped. p68, que está expresado por la célula huésped, se puede purificar fácilmente usando técnicas de purificación de proteínas de rutina.

En una realización preferida de la presente invención, la secuencia de nucleótidos como se establece en la SEQ ID N° 2 que codifica el antígeno p68 que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N° 1, se clona en un vector de expresión y se coloca en un enlace operable a un promotor sensible a la temperatura. El vector de expresión se introduce en *Escherichia coli* y el antígeno p68 se expresa tras la inducción por calor. Las células se lisan y los cuerpos de inclusión en los que se acumula el antígeno p68 se separan mediante centrifugación. El p68 recombinante en los cuerpos de inclusión se solubiliza usando SDS u otros agentes de solubilización conocidos en la técnica tales como urea, clorhidrato de guanidina, clorhidrato, colato de sodio, taurocolato, y desoxicolato de sodio. De acuerdo con la presente invención, una proteína de p68 nativa o recombinante purificada se combina con un vehículo veterinariamente aceptable para formar una composición de vacuna de p68.

El término "un vehículo veterinariamente aceptable" incluye cualquiera y

todos los disolventes, medios de dispersión, revestimientos, adyuvantes, agentes de estabilización, diluyentes, conservantes, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos, agentes retardadores de la adsorción, y los similares. Los diluyentes pueden incluir agua, solución salina, dextrosa, etanol, glicerol, y los similares. Los agentes isotónicos pueden incluir cloruro sódico, dextrosa, manitol, sorbitol, y lactosa, entre otros. Los estabilizantes incluyen albúmina entre otros.

Los adyuvantes adecuados para uso de acuerdo con la presente invención incluyen, pero no se limitan a varias clases de adyuvantes tales como; sales minerales, por ejemplo, Alumbre, hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio y fosfato de calcio; los agentes tensioactivos y micropartículas, por ejemplo tensioactivos de polímeros de bloque no iónicos (por ejemplo, colesterol), virosomas, saponinas (por ejemplo, Quil A, QS-21 y GPI-0100), proteosomas, complejos de estimulación inmune, cocleatos, aminos cuaternarios (bromuro de dimetil dioctadecil amonio (DDA)), avridina, vitamina A, vitamina E; productos bacterianos tales como el sistema adyuvante RIBI (Ribi Inc.), esqueleto de pared celular de *Mycobacterium phlei* (Detox), muramil dipéptidos (MDP) y tripéptidos (MTP), monofosforil lípido A, *Bacillus Calmette-Guerin*, enterotoxinas de *E. coli* lábiles al calor, toxina de cólera, trehalosa dimicolato, CpG oligodesoxinucleótidos; citoquinas y hormonas, por ejemplo, interleuquinas (IL-1, IL-2, IL-6, IL-12, IL-15, IL-18), factor estimulante de la colonias de granulocitos - macrófagos, deshidroepiandrosterona, 1,25-dihidroxi vitamina D₃; polianiones, por ejemplo dextrano; poliacrílicos (por ejemplo, polimetilmetacrilato, Carbopol 934P); vehículos por ejemplo, toxoide de tétanos, toxoide de difteria, subunidad B de la toxina de cólera, enterotoxina

lábil al calor mutante de *E. coli* enterotoxigénica (mLT), proteínas de choque térmico; emulsiones de aceite en agua, por ejemplo AMPHIGEN ® (Hydronics, Estados Unidos); y emulsiones de agua en aceite como, por ejemplo, adyuvantes completos e incompletos de Freund's.

- 5 Los adyuvantes preferidos para uso en las vacunas de la presente invención incluyen Quil A y colesterol.

El antígeno p68 y el vehículo veterinariamente aceptable se pueden combinar de cualquier manera práctica y conveniente para formar una composición de vacuna, por ejemplo, mediante mezcla, solución, suspensión,
10 emulsión, encapsulación, absorción y similares, y se pueden preparar en formulaciones tales como comprimidos, cápsulas, polvo, jarabe, suspensiones que son adecuados para inyecciones, implantes, inhalaciones, ingestiones o similares. Preferiblemente, la vacuna se formula de tal manera que se pueda administrar a perros mediante inyección en una dosis de aproximadamente 0,1
15 a 5 ml, o preferiblemente aproximadamente 0,5 a 2,5 ml, o incluso más preferiblemente, en una dosis de aproximadamente 1 ml. Cuando sea apropiado, las composiciones farmacéuticas de la presente invención se deben hacer estériles mediante procedimientos bien conocidos.

La cantidad de p68 en las vacunas debe ser eficaz para la inmunización
20 y está generalmente en el intervalo entre 0,5 - 1000 µg por dosis. Preferiblemente, la cantidad de p68 está en el intervalo entre 1 - 260 µg por dosis. Más preferiblemente, la cantidad de p68 está en el intervalo de 10 - 100 µg por dosis. Incluso más preferiblemente, la cantidad de p68 está aproximadamente entre 15 y 25 µg por dosis.

- 25 La cantidad de adyuvantes adecuada para uso en las vacunas depende

de la naturaleza del adyuvante usado. Por ejemplo, cuando Quil A y colesterol se usan como adyuvante, Quil A está generalmente en una cantidad entre aproximadamente 1 - 1000 μ g por dosis, preferiblemente entre 30 - 100 μ g por dosis, y más preferiblemente, entre aproximadamente 50 - 75 μ g por dosis; y el

5 colesterol está en general en una cantidad entre aproximadamente 1 - 1000 μ g por dosis, preferiblemente entre aproximadamente 30 - 100 μ g por dosis, y más preferiblemente, entre aproximadamente 50 - 75 μ g por dosis.

En otra realización, la presente invención proporciona procedimientos de protección de perros contra enfermedad provocada por *Bordetella*

10 *bronchiseptica* mediante la administración a un perro de una composición de vacuna de p68, como se ha descrito en esta memoria descriptiva anteriormente. De acuerdo con la presente invención, la composición de vacuna de p68 proporciona perros con una inmunidad a largo plazo durante al menos aproximadamente 4 meses, preferiblemente durante al menos

15 aproximadamente 6 meses, o incluso más preferiblemente durante aproximadamente un año.

De acuerdo con la presente invención, una vacuna de p68 se puede administrar a un perro mediante cualesquiera vías conocidas, incluyendo la oral, intranasal, mucosal, tópica, transdérmica, y parenteral (por ejemplo,

20 intravenosa, intraperitoneal, intradérmica, subcutánea o intramuscular). La administración también se puede lograr usando dispositivos de administración sin aguja. La administración se puede lograr usando una combinación de vías, por ejemplo, primera administración usando una vía parenteral y posteriormente la administración usando vía mucosal.

25 Las vías preferidas de administración incluyen administraciones

subcutánea e intramuscular.

La composición de vacuna de p68 de la presente invención se puede administrar a perros de al menos 6 semanas de edad, preferiblemente al menos 7 semanas de edad, y más preferiblemente, al menos 8 ó 9 semanas de edad. Los perros se pueden vacunar con una dosis o con más de una dosis de una vacuna de p68. Preferiblemente, dos dosis de una vacuna de p68 se administran a perros con un intervalo de aproximadamente 2 - 4 semanas, preferiblemente aproximadamente 3 semanas, entre las dos administraciones. Si los perros se vacunan antes de la edad de 4 meses, se recomienda que se vuelvan a vacunar con una sola dosis tras alcanzar 4 meses de edad, debido a que los anticuerpos maternos pueden interferir con el desarrollo de una respuesta inmune adecuada en cachorros de menos de 4 meses de edad. Los perros también se pueden volver a vacunar anualmente con una sola dosis. Cuando es probable la exposición de *B. bronchiseptica*, tal como en situaciones de reproducción, alojamiento, y situaciones de exposición, se puede proporcionar una dosis de recuerdo adicional dentro de un año, o preferiblemente 6 meses, de la aparición de estos episodios.

Vacunas de combinación

En otra realización, la presente invención proporciona vacunas de combinación y procedimientos para proteger perros contra *Bordetella bronchiseptica* y/o uno o más de otros patógenos caninos mediante la administración de tales vacunas de combinación. Las composiciones de vacuna de combinación de la presente invención no muestran interferencia de eficacia y son seguras para la administración a cachorros.

Las vacunas de combinación de la presente invención incluyen un antígeno p68 de *Bordetella bronchiseptica*, que se puede preparar como se ha descrito en esta memoria descriptiva anteriormente, en combinación con al menos un antígeno entre otros patógenos caninos capaces de inducir una
5 respuesta inmune protectora en perros contra la enfermedad provocada por tales otros patógenos. Tales vacunas de combinación también incluyen combinaciones de dos o más de tales otros patógenos caninos sin el antígeno p68.

Tales otros patógenos incluyen, pero no se limitan a, virus de moquillo
10 canino (CD), adenovirus canino de tipo 2 (CAV-2), virus de la parainfluenza canina (CPI), parvovirus canino (CPV), coronavirus canino (CCV), herpesvirus canino, y virus de la rabia. Los antígenos de estos patógenos para uso en las composiciones de vacuna de la presente invención pueden estar en la forma de una preparación de virus vivos modificados o preparación de virus inactivados.
15 Los procedimientos de atenuación de cepas virulentas de estos virus y procedimientos de preparación de una preparación de virus inactivados se conocen en la técnica y se describen en, por ejemplo las patentes de Estados Unidos 4.567.042 y 4.567.043.

Otros patógenos también incluyen *Leptospira bratislava*, *Leptospira*
20 *canicola*, *Leptospira grippotyphosa*, *Leptospira icterohaemorrhagiae*, *Leptospira pomona*, *Leptospira hardjobovis*, *Porphyromonas spp.*, *Bacteriodes spp.*, *Leishmania spp.*, *Borrelia spp.*, *Ehrlichia spp.*, *Mycoplasma spp.* y *Microsporum canis*. Los antígenos de estos patógenos para uso en las composiciones de vacuna de la presente invención pueden estar en la forma de
25 una preparación de células enteras o parciales inactivada, usando

procedimientos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, procedimientos de preparación de preparación de células *Leptospira* enteras o parciales inactivadas se conocen en la técnica y se describen, por ejemplo, en Yan, K.T, "Aspects of Immunity to *Leptospira borgpetersenii* serovar *hardjo*", Tesis posdoctoral, Apéndice I, 1996. Faculty of Agriculture and Food Science, The Queen's University of Belfast; Mackintosh y col., "The use of a *hardjo-pomona* vaccine to prevent leptospirosis in cattle exposed to natural challenge with *Leptospira interrogans* serovar *hardjo*", New Zealand Vet. J. 28: 174 - 177, 1980; Bolin y col., "Effect of vaccination with a pentavalente leptospiral vaccine on *Leptospira interrogans* serovar *hardjo* type *hardjo-bovis* infection of pregnant cattle", Am. J. Vet. Res. 50: 161 - 165, 1989.

De acuerdo con la presente invención, las vacunas de combinación en general incluyen un vehículo veterinariamente aceptable. Como se ha descrito anteriormente en esta memoria descriptiva, un vehículo veterinariamente aceptable incluye cualquiera y todos los disolventes, medios de dispersión, revestimientos, adyuvantes, agentes de estabilización, diluyentes, conservantes, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos, agentes retardadores de la adsorción, y los similares. Los diluyentes pueden incluir agua, solución salina, dextrosa, etanol, glicerol, y los similares. Los agentes isotónicos pueden incluir cloruro sódico, dextrosa, manitol, sorbitol, y lactosa, entre otros. Los estabilizantes incluyen albúmina entre otros.

Los adyuvantes adecuados para uso de acuerdo con la presente invención incluyen, pero no se limitan a varias clases de adyuvantes tales como; sales minerales, por ejemplo, Alumbre, hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio y fosfato de calcio; los agentes tensioactivos y micropartículas, por

ejemplo tensioactivos de polímeros de bloque no iónicos (por ejemplo, colesterol), virosomas, saponinas (por ejemplo, Quil A, QS-21 y GPI-0100), proteosomas, complejos de estimulación inmune, cocleatos, aminos cuaternarios (bromuro de dimetil dioctadecil amonio (DDA)), avridina, vitamina A, vitamina E; productos bacterianos tales como el sistema adyuvante RIBI (Ribi Inc.), esqueleto de pared celular de *Mycobacterium phlei* (Detox ®), muramil dipéptidos (MDP) y tripéptidos (MTP), monofosforil lípido A, *Bacillus Calmete-Guerin*, enterotoxinas de *E. coli* lábiles al calor, toxina de cólera, trehalosa dimicolato, CpG oligodesoxinucleótidos; citoquinas y hormonas, por ejemplo, interleuquinas (IL-1, IL-2, IL-6, IL-12, IL-15, IL-18), factor estimulante de la colonias de granulocitos - macrófagos, deshidroepiandrosterona, 1,25-dihidroxi vitamina D₃; polianiones, por ejemplo dextrano; poliacrílicos (por ejemplo, polimetilmetacrilato, Carbopol 934P); vehículos por ejemplo, toxoide de tétanos, toxoide de difteria, subunidad B de la toxina de cólera, enterotoxina lábil al calor mutante de *E. coli* enterotoxigénica (mLT), proteínas de choque térmico; emulsiones de aceite en agua, por ejemplo AMPHIGEN ® (Hydronics, Estados Unidos); y emulsiones de agua en aceite como, por ejemplo, adyuvantes completos e incompletos de Freund.

Los adyuvantes preferidos para uso en las vacunas de combinación de la presente invención incluyen 1) Quil A más colesterol; y 2) hidróxido de aluminio. La cantidad de adyuvantes adecuada para uso en la vacuna depende de la naturaleza del adyuvante usado. Por ejemplo, cuando se usan Quil A y colesterol como adyuvante, Quil A está generalmente en una cantidad entre aproximadamente 1 - 1000 µg por dosis, preferiblemente entre 30 - 100 µg por dosis, y más preferiblemente, entre aproximadamente 50 - 75 µg por dosis; y el

colecsterol está en general en una cantidad entre aproximadamente 1 - 1000 µg por dosis, preferiblemente entre aproximadamente 30 - 100 µg por dosis, y más preferiblemente, entre aproximadamente 50 - 75 µg por dosis. Cuando se usa hidróxido de aluminio como adyuvante, está en general en una cantidad entre 5 aproximadamente 0,5 - 20%, preferiblemente entre aproximadamente 0,5 - 10%, y más preferiblemente entre aproximadamente 1 - 2%.

El antígeno p68, uno o más antígenos de otros patógenos, y/o el vehículo veterinariamente aceptable se puede combinar de cualquier manera práctica y conveniente para formar una composición de vacuna de 10 combinación, por ejemplo, mediante mezcla, solución, suspensión, emulsión, encapsulación, absorción y similares, y se puede preparar en formulaciones tales como comprimidos, cápsulas, polvo, jarabe, suspensiones que son adecuados para inyecciones, implantes, inhalaciones, ingestiones o similares. Preferiblemente, la vacuna se formula de tal manera que se pueda administrar 15 a perros mediante inyección en una dosis de aproximadamente 0,1 a 5 ml, o preferiblemente aproximadamente 0,5 a 2,5 ml, o incluso más preferiblemente, en una dosis de aproximadamente 1 ml.

Las vacunas de combinación se pueden preparar rehidratando una preparación secada por congelación de las cepas virales atenuadas (o una 20 preparación hecha por otros procedimientos tales como secado por pulverización o desecación) y preparación viral con una preparación líquida, dicha preparación líquida se compone de antígenos Leptospirales, disueltos en solución salina estéril y potenciada con el adyuvante Quil A y colecsterol. Tal vacuna de combinación también se puede preparar rehidratando una 25 preparación secada por congelación de las cepas virales atenuadas y

preparación viral de *Leptospira* (o una preparación hecha mediante otros procedimientos tales como secado por pulverización o desecación) con una solución estéril, o rehidratando dicha preparación secada por congelación con CCV más diluyente.

- 5 De acuerdo con la presente invención, las vacunas de combinación se pueden administrar a un perro de al menos 6 semanas de edad, preferiblemente al menos 7 semanas de edad, y más preferiblemente, al menos 8 ó 9 semanas de edad. Las vacunas de combinación se pueden administrar en 2 - 4 dosis, preferiblemente en 2 a 3 dosis. Las dosis se pueden administrar
10 con 2 a 6 semanas entre cada dosis, preferiblemente con 2 a 4 semanas entre cada dosis.

La administración se puede hacer mediante cualesquiera vías conocidas, incluyendo la oral, intranasal, mucosal, tópica, transdérmica, y parenteral (por ejemplo, intravenosa, intraperitoneal, intradérmica, subcutánea
15 o intramuscular). La administración también se puede lograr usando dispositivos de administración sin aguja. La administración también se puede lograr usando una combinación de vías, por ejemplo, primera administración usando una vía parenteral y posteriormente la administración usando vía mucosal.

- 20 Las vías preferidas de administración incluyen administraciones subcutánea e intramuscular.

Vacunas de combinación preferidas y procedimientos de vacunación

- Una vacuna de combinación preferida de la presente invención incluye
25 una cepa atenuada de virus CD, una cepa atenuada de CAV-2, una cepa

atenuada de virus CPI, una cepa atenuada de CPV, una preparación inactivada de una cepa de CCV, y un antígeno p68 de *Bordetella bronchiseptica*.

Una vacuna de combinación especialmente preparada incluye la cepa de virus CD atenuada denominada la cepa "Snyder Hill" (National Veterinary Service Laboratory, Ames, IA), la cepa CAV-2 atenuada denominada la cepa "Manhattan" (National Veterinary Service Laboratory, Ames, IA), la cepa de virus CPI atenuada que tiene la denominación de "NL-CPI-5" (National Veterinary Service Laboratory, Ames, IA), la cepa de CPV atenuada que tiene la denominación de "NL-35-D" (National Veterinary Service Laboratory, Ames, IA), una preparación inactivada de la cepa de CCV que tiene la denominación de "NL-18" (National Veterinary Service Laboratory, Ames, IA), y el antígeno p68 de *Bordetella bronchiseptica* recombinante que tiene la secuencia de SEQ ID N° 1. Tal vacuna de combinación, también denominada en esta memoria descriptiva como "la vacuna de combinación p68/5CV", se prepara preferiblemente rehidratando una preparación secada por congelación de las cepas virales atenuadas y la preparación viral con una preparación líquida, dicha preparación líquida se compone del antígeno p68 disuelto en solución salina estéril y potenciada con el adyuvante Quil A y colesterol. Esta combinación sin el antígeno p68 se denomina en esta memoria descriptiva como la combinación 5CV. Tal vacuna de combinación se prepara preferiblemente rehidratando una preparación secada por congelación de las cepas virales atenuadas y preparación viral con una preparación líquida, dicha preparación líquida se compone de solución salina estéril y está potenciada con adyuvante Quil A y colesterol.

Otra vacuna de combinación especialmente preferida incluye los

componentes antigénicos de la vacuna de combinación p68/5CV así como preparaciones de células enteras inactivadas de cinco especies de *Leptospira*: *Leptospira bratislava* (por ejemplo una cepa de *Leptospira bratislava* que se puede obtener del National Veterinary Service Laboratory, Ames, IA),

5 *Leptospira canicola* (por ejemplo la cepa C-5, National Veterinary Service Laboratory, Ames, IA), *Leptospira grippotyphosa*, (por ejemplo la cepa MAL 1540, National Veterinary Service Laboratory, Ames, IA), *Leptospira icterohaemorrhagiae* (por ejemplo la cepa NADL 11403, National Veterinary Service Laboratory, Ames, IA), y *Leptospira pomona* (por ejemplo la cepa

10 T262, National Veterinary Service Laboratory, Ames, IA). Tal vacuna de composición, también denominada en esta memoria descriptiva como "la vacuna de combinación p68/5CV - *Leptospira*", se prepara preferiblemente rehidratando una preparación secada por congelación de las cepas virales atenuadas (o una preparación hecha por otros procedimientos tales como

15 secado por pulverización o desecación) y preparación viral con una preparación líquida, dicha preparación líquida está compuesta por el antígeno p68 y antígenos *Leptospirales*, disueltos en solución salina estéril y potenciada con adyuvante Quil A y colesterol. Esta combinación sin el antígeno p68 se denomina en esta memoria descriptiva la combinación 5CV - 5 *Leptospira*. Esta

20 combinación sin el antígeno p68 y sin *Leptospira bratislava* se denomina en esta memoria descriptiva la combinación 5CV-4 *Leptospira*. La combinación 5CV sin el antígeno p68 y con *Leptospira canicola* y *Leptospira icterohaemorrhagiae* se denomina en esta memoria descriptiva la combinación 5CV-2 *Leptospira*. Tales vacunas de combinación se preparan de manera

25 preferida rehidratando una preparación secada por congelación de las cepas

virales atenuadas (o una preparación hecha por otros procedimientos tales como secado por pulverización o desecación) y preparación viral con una preparación líquida, dicha preparación líquida está compuesta por antígenos *Leptospirales*, disueltos en solución salina estéril y potenciada con adyuvante Quil A y colesterol. Tales vacunas de combinación también se preparan de manera preferida rehidratando una preparación secada por congelación de las cepas virales atenuadas y preparación viral de *Leptospira* (o una preparación hecha por otros procedimientos tales como secado por pulverización o desecación) con una solución estéril, o rehidratando dicha preparación secada por congelación con CCV más diluyente.

De acuerdo con la presente invención, las vacunas de combinación p68/5CV, p68/5CV - *Leptospira*, 5CV, 5 CV- 5 *Leptospira* 5CV - 4 *Leptospira*, y 5CV - 2 *Leptospira* se pueden administrar a perros sanos de 4 semanas de edad o mayores, preferiblemente 6 semanas o mayores, y preferiblemente en 3 dosis, cada una de ellas administrada aproximadamente con 3 semanas de separación. Los perros se pueden revacunar anualmente con una sola dosis. Cuando la exposición a virus de *B. bronchiseptica* y/o virus caninos es probable, tal como situaciones de reproducción, alojamiento, y situaciones de exposición, se puede proporcionar una dosis de recuerdo adicional dentro de un año, o preferiblemente 6 meses, de la aparición de estos episodios.

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

Una vacuna de combinación especialmente preparada incluye la cepa

de virus CD atenuada denominada la cepa "Synder Hill" (National Veterinary Service Laboratory, Ames, IA), la cepa CAV-2 atenuada denominada la cepa "Manhattan" (National Veterinary Service Laboratory, Ames, IA), la cepa de virus CPI atenuada que tiene la denominación de "NL-CPI-5" (National Veterinary Service Laboratory, Ames, IA), la cepa de CPV atenuada que tiene la denominación de "NL-35-D" (National Veterinary Service Laboratory, Ames, IA), y el antígeno p68 de *Bordetella bronchiseptica* recombinante que tiene la secuencia de SEQ ID N° 1. Tal vacuna de combinación, también denominada en esta memoria descriptiva como "la vacuna de combinación p68/DA₂PP", se prepara preferiblemente rehidratando una preparación secada por congelación de las cepas virales atenuadas (o una preparación realizada mediante otros procedimientos tales como secado por pulverización o desecación) con una preparación líquida, dicha preparación líquida se compone del antígeno p68 disuelto en solución salina estéril y potenciada con el adyuvante Quil A y colesterol. Esta vacuna de combinación sin el antígeno p68 se denomina en esta memoria descriptiva como la vacuna de combinación DA₂PP. Tal vacuna de combinación se prepara preferiblemente rehidratando una preparación secada por congelación de las cepas virales atenuadas (o una preparación realizada mediante otros procedimientos tales como secado por pulverización o desecación) con una preparación líquida, dicha preparación líquida se compone de solución salina estéril y potenciada con adyuvante Quil A y colesterol.

Otra vacuna de combinación especialmente preferida incluye los componentes antigénicos de la vacuna de combinación p68/DA₂PP así como preparaciones de células enteras inactivadas de dos especies de *Leptospira*:

Leptospira canicola (por ejemplo la cepa C-51, National Veterinary Service Laboratory, Ames, IA), y *Leptospira icterohaemorrhagiae* (por ejemplo la cepa NADL 11403, National Veterinary Service Laboratory, Ames, IA). Como alternativa, una vacuna de combinación preferida puede incluir los

5 componentes antigénicos de la vacuna de combinación p68/DA₂PP así como preparaciones de células enteras inactivadas de cinco especies de *Leptospira*: *Leptospira bratislava*, *Leptospira canicola*, *Leptospira grippotyphosa*, *Leptospira icterohaemorrhagiae* y *Leptospira pomona*. Estas vacunas de combinación también denominadas en esta memoria descriptiva como "las

10 vacunas de combinación de p68/DA₂PP-*Leptospira*", se preparan preferiblemente rehidratando una preparación secada por congelación de las cepas virales atenuadas (o una preparación hecha por otros procedimientos tales como secado por pulverización o desecación) y preparación viral con una preparación líquida, dicha preparación líquida está compuesta por el antígeno

15 p68 y antígenos *Leptospirales*, disueltos en solución salina estéril y potenciada con adyuvante Quil A y colesterol.

Como alternativa, otra vacuna de combinación preferida incluye los componentes antigénicos de la vacuna de combinación de DA₂PP así como preparaciones de células enteras inactivadas de cinco especies de *Leptospira*:

20 *Leptospira bratislava*, *Leptospira canicola*, *Leptospira grippotyphosa*, *Leptospira icterohaemorrhagiae* y *Leptospira pomona*. Todavía otra vacuna de combinación preferida incluye los componentes antigénicos de la vacuna de combinación de DA₂PP así como preparaciones de células enteras inactivadas de cuatro especies de *Leptospira*: *Leptospira canicola*, *Leptospira grippotyphosa*,

25 *Leptospira icterohaemorrhagiae* y *Leptospira pomona*. Estas

vacunas de combinación también denominadas en esta memoria descriptiva como "las vacunas de combinación de *Leptospira* - DA₂PP", se preparan preferiblemente rehidratando una preparación secada por congelación de las cepas virales atenuadas (o una preparación hecha por otros procedimientos
5 tales como secado por pulverización o desecación) y preparación viral con una preparación líquida, dicha preparación líquida está compuesta por los antígenos *Leptospirales*, disueltos en solución salina estéril y potenciada con adyuvante Quil A y colesterol.

De acuerdo con la presente invención, las vacunas de combinación
10 p68/DA₂PP, p68/DA₂PP - *Leptospira*, DA₂PP y DA₂PP - *Leptospira* se pueden administrar a perros sanos de seis semanas de edad o mayores, o preferiblemente de 8 semanas de edad o mayores, y preferiblemente en 2 dosis cada una de ellas administradas aproximadamente con 3 semanas de diferencia. Una sola dosis puede ser suficiente si se proporciona a un perro de
15 al menos 12 semanas de edad. Los perros se pueden volver a vacunar anualmente con una sola dosis. Cuando la exposición a *B. bronchiseptica* y/o virus canino es probable, tal como situaciones de reproducción, alojamiento, y situaciones de exposición, se puede proporcionar una dosis de recuerdo adicional dentro de un año, o preferiblemente 6 meses, de la aparición de estos
20 episodios. Otra vacuna de combinación preferida incluye un antígeno p68, preferiblemente el antígeno p68 recombinante que tiene la SEQ ID N° 1, en combinación con una cepa atenuada de CPI.

Todavía otra vacuna de combinación preferida incluye un antígeno p68, preferiblemente el antígeno p68 recombinante que tiene la SEQ ID N° 1, una
25 cepa atenuada de CPI, y al menos dos especies de *Leptospira* tal como

Leptospira canicola (por ejemplo la cepa C-51 National Veterinary Service Laboratory, Ames, IA), y *Leptospira icterohaemorrhagiae* (por ejemplo, la cepa NADL 11403, National Veterinary Service Laboratory, Ames, IA).

La cantidad del antígeno p68 y el (los) antígeno (s) de uno o más de
5 otros patógenos en las vacunas de combinación de la presente invención
deben de ser eficaces para la inmunización. En general el antígeno p68 en una
vacuna de combinación debe de estar en una cantidad de al menos
aproximadamente 0,5 µg por dosis. El virus CD atenuado debe estar en una
cantidad de al menos aproximadamente 10^2 a aproximadamente 10^9 de
10 TCID₅₀ por dosis TCID₅₀ (efecto citopático del 50% de dosis infecciosa de
cultivo de tejido) por dosis, y preferiblemente en el intervalo de
aproximadamente 10^4 a aproximadamente 10^6 TCID₅₀ por dosis. El CAV-2
atenuado debe estar en una cantidad de al menos aproximadamente 10^2 de
TCID₅₀ a aproximadamente 10^9 de TCID₅₀ por dosis, preferiblemente en el
15 intervalo de $10^{4,0}$ a aproximadamente $10^{6,0}$ de TCID₅₀ por dosis. El virus CPI
atenuado debe estar en una cantidad de al menos aproximadamente 10^2 de
TCID₅₀ a aproximadamente 10^9 de TCID₅₀ por dosis, y preferiblemente en el
intervalo de 10^6 a aproximadamente 10^8 de TCID₅₀ por dosis. El CPV atenuado
debe estar en una cantidad de al menos aproximadamente 10^2 de TCID₅₀ a
20 aproximadamente 10^9 de TCID₅₀ por dosis, preferiblemente una cantidad en el
intervalo de 10^7 a aproximadamente 10^9 de TCID₅₀ por dosis. La cantidad de
CCV en una preparación viral inactivada debe ser al menos aproximadamente
100 unidades relativas por dosis, y preferiblemente en el intervalo de 1000 -
4500 unidades relativas por dosis. Cada especie de *Leptospira* en la vacuna
25 debe estar en el intervalo de aproximadamente 100 - 3500 UN (unidades

nefelométricas) por dosis de vacuna, y preferiblemente en el intervalo de 200 - 2000 UN por dosis.

Las vacunas de combinación se formulan de manera que las vacunas se pueden administrar a perros mediante inyección en una dosis de 0,1 ml a 5 ml, preferiblemente entre 0,5 ml y 2,5 ml, y más preferiblemente aproximadamente 1 ml.

La presente invención se ilustra adicionalmente por los siguientes ejemplos no limitantes.

10

EJEMPLO 1

ESTUDIO DE TITULACIÓN DE DOSIS DE ANTÍGENO RECOMBINANTE p68 DE BORDETELLA CANINA

VACUNA:

15

El antígeno de vacuna experimental era una proteína de la membrana externa p68 recombinante (SEQ ID N°: 1) de *B. bronchiseptica* producida por la cepa de *E. coli* LW68. La vacuna contenía niveles variables de p68 solubilizado en SDS (dodecil sulfato sódico), potenciado con 50 µg de adyuvante QAC (Quil A/50 µg de colesterol) en 1 ml de dosis.

20

MATERIAL DE EXPOSICIÓN

Un aerosol de *Bordetella bronchiseptica*, aislamiento de perros n° 85B, subcultivo n° 3, lote n° 051597, se usó como material de exposición. El recuento medio en placa era $1,59 \times 10^8$ UFC/ml.

ANIMALES:

25

Sesenta cachorros de perro machos y hembras se distribuyeron al azar

a uno de seis grupos de tratamiento (10 cachorros por grupo). A los cachorros se les tomó muestra de sangre y se tomaron hisopos traqueales 41 días antes de la primera vacunación y de nuevo 28 días antes de la primera vacunación y se retiraron del estudio cualesquiera animales seropositivos o positivos para el cultivo.

Los animales se asignaron al azar a tratamientos y habitaciones de acuerdo a un diseño de bloque completo al azar. Las observaciones después de la vacunación se realizaron sin conocimiento de los grupos asignados de vacuna.

10

DISEÑO

Grupo	Nivel de dosis	Vía ¹	Nº de animales
T01	Control de solución salina (solución salina al 0,9% como una dosis de 1 ml)	SC	9
T02	1 µg de p68	SC	8
T03	4 µg de p68	SC	8
T04	16 µg de p68	SC	9
T05	64 µg de p68	SC	9
T06	256 µg de p68	SC	9

¹ SC = Subcutánea

PROCEDIMIENTO

Administración IVP

5 Los animales se vacunaron el día 0 con o bien el placebo o la vacuna experimental. Se administró una segunda vacunación el día 21. La primera vacunación se administró por vía subcutánea en la parte derecha del cuello y la segunda vacunación se administró por vía subcutánea en la parte izquierda del cuello.

10 **Administración de exposición**

Todos los animales se expusieron 28 días después de la segunda vacunación con un aerosol de *Bordetella bronchiseptica*. Los animales se controlaron para evaluar la tos durante un período de 30 minutos, dos veces al día (una vez en la a. m. y una vez en la p. m.) los días dos a catorce después de la exposición (días 51 a 63).

Observaciones y recogida de muestras

Todos los sitios de inyección se palparon y se midieron en tres dimensiones durante siete días después de cada vacunación (días 0 a 7 y 21 a 28) y el día 14 después de cada vacunación (días 14 y 35).

20 Se registraron las temperaturas rectales el día de la vacunación y durante tres días después de cada vacunación (días 0 a 3 y 21 a 24).

Se recogió sangre los días de la vacunación (días 0 y 21) y los días 42, 50 y 63 y se ensayaron mediante ELISA para evaluar los anticuerpos específicos contra la proteína de p68 purificada de *B. bronchiseptica*. También se recogió la sangre los días 42, 49, 50, 52, 54, 56 y 58 y se analizó para

amiloide A sérico (SAA).

A todos los animales se les tomó una muestra de la tráquea con un hisopo para aislamiento de *B. bronchiseptica* y se recogió sangre para evaluar las titulaciones de aglutinación de *B. bronchiseptica* antes de la vacunación (en el proveedor, el día -41 y el día -28) y el día 49.

ELISA DAB de la titulación de anticuerpo de perro y de ratón de p68 de Bordetella

Se diluyó p68 nativo purificado hasta 600 ng/ml en tampón borato 0,01 M y se añadió a cada pocillo a 100 µl/pocillo. Las placas se incubaron durante toda una noche a 4°C. Las placas se lavaron después una vez con exceso de PBS - Tween 20. Se añadió leche seca no grasa al 1% en PBS a las placas a 200 µl/pocillo. Después las placas se incubaron durante una hora a 37°C. Después las placas se lavaron una vez con exceso de PBS - Tween 20.

Se añadió suero de perro o ratón a una dilución 1:50 a la fila superior de las placas ELISA y se añadió suero diluido en serie a lo largo de la placa. Las placas se incubaron durante una hora a 37°C. Posteriormente, las placas se lavaron 3 veces con exceso de PBS - Tween 20.

A las placas incubadas con el suero de perro anterior, se añadió IgG (H + L) de cabra anti-perro marcada con peroxidasa, diluido a una dilución 1:2000, a 100 µl/pocillo. Después las placas se incubaron durante 1 hora a 37°C. A las placas incubadas con suero de ratón anterior, se añadió IgG (H + L) de cabra anti ratón marcada con peroxidasa, diluido a una dilución 1:4000, a 100 µl/pocillo. Después las placas se incubaron durante 1 hora a 37°C. Después las placas se lavaron 3 veces con exceso de PBS - Tween 20.

Se añadió sustrato ABTS a 100 µl/pocillo. Aproximadamente 20 minutos

más tarde, las placas se leyeron con un equipo de Molecular Devices o un lector de placas equivalente a 405 - 490 nm.

ANÁLISIS DE DATOS:

Se ensayaron diferencias de tratamiento en el número de perros que tosen usando ensayo exacto de Fisher. Se usó el nivel 5% de significación.

Las titulaciones de ELISA eran se transformaron logarítmicamente antes del análisis usando un modelo mixto lineal general. El nivel del 95% de confianza se usó para determinar diferencias de tratamiento. Las observaciones de exposición se controlaron dos veces al día durante 30 minutos cada una.

RESULTADOS

Cultivo de hisopo traqueal y titulaciones de aglutinación

Cultivos de hisopo traqueal y titulaciones de aglutinación se evaluaron para controlar el estado de *B. bronchiseptica* de los animales reclutados en el estudio. Un número de perros demostró titulaciones aumentadas en diversos puntos de tiempo pero ninguna titulación se incrementó por encima de 128 antes de la exposición.

Observaciones de los sitios de inyección

Las reacciones en los sitios de inyección después de la primera vacunación se presentan en la Tabla 1. Las reacciones en los sitios de inyección más grandes se observaron en animales vacunados con T05 (64 µg), midiendo la mayor reacción media en el sitio de inyección solamente 14,69 cm³ (dos días después de la vacunación). Los animales vacunados con T03 (4 µg), T04 (16 µg) y T06 (256 µg) demostraron reacciones en el sitio de inyección

variables hasta 7 días después de la vacunación. Los animales vacunados con T02 (1 µg) solamente mostraron reacciones el día 1 después de la vacunación. El séptimo día después de la vacunación, no había diferencia estadísticamente significativa en las reacciones en los sitios de inyección entre los grupos de tratamiento. El día 14, todas las reacciones en los sitios de inyección habían desaparecido.

Las reacciones en los sitios de inyección después de la segunda vacunación se presentan en la Tabla 2. Después de la segunda vacunación las mayores reacciones medias en el sitio de inyección se observaron en T06 (256 µg), midiendo la mayor reacción del sitio de reacción media en el sitio de inyección en 50,03 cm³ (un día después de la vacunación). Las reacciones de los sitios de inyección se mostraron en los animales tratados con T05 (64 µg) y T04 (16 µg) hasta 7 días después de la segunda vacunación. Las reacciones en los sitios de inyección mínimas se mostraron en los animales tratados con T03 (4 µg) y T02 (1 µg) hasta 7 días después de la segunda vacunación. Las reacciones en los sitios de inyección que no eran estadísticamente diferentes del grupo placebo se mostraron en T02 (1 µg) y T03 (4 µg) después de la vacunación. Catorce días después de la segunda vacunación no se observaron reacciones en el sitio de inyección.

La frecuencia de las reacciones en los sitios de inyección después de la primera vacunación se presenta en la tabla 3. La frecuencia de LSM global más alta, 76% de los sitios de inyección que muestran una reacción en cualquier momento después de la primera vacunación se produjo por la vacunación con T06 (256 µg). Las siguientes más frecuentes eran 72% de los sitios de inyección mostrando una reacción después de la primera vacunación con T05

(64 µg), 69% después de la primera vacunación con T04 (16 µg) y 63% después de la primera vacunación con T03 (4 µg). La frecuencia más baja, 38%, después de la primera vacunación de T02 (1 µg).

La frecuencia de las reacciones en los sitios de inyección después de la segunda vacunación se presenta en la Tabla 4. La frecuencia LSM global para cada vacuna era consistente con la observada después de la primera vacunación.

La incidencia y duración de las reacciones en los sitios de inyección después de la vacunación se resumen en la tabla 5. La incidencia (o el número de perros que muestran una reacción en cualquier momento) de una reacción en el sitio de inyección mensurable era 100% para T03, T04, T05 y T06 (4 µg, 16 µg, 64 µg, y 256 µg, respectivamente) después de la primera y segunda vacunación. Los animales que recibían T02 (1 µg) demostraron la menor incidencia de las reacciones de los sitios de inyección después de la vacunación (57,1%).

La duración de la reacción (expresada como unas medias de mínimos cuadrados de días con una reacción mostrada en la tabla 5) era mayor para animales vacunados con T04, T05 y T06 (16 µg, 64 µg, y 256 µg, respectivamente) después de la primera y segunda vacunaciones (2,7 a 5,1 días después de la primera vacunación y 6,0 a 6,7 días después de la segunda vacunación). Los animales vacunados con T02 y T03 (1 µg y 4 µg, respectivamente) mostraron el menos número de días con una reacción en el sitio de inyección después de la primera y segunda vacunaciones (0,3 y 1,3 días después de la primera vacunación y 1,9 y 4,5 días después de la segunda vacunación).

Temperaturas rectales

Las mediciones de temperaturas rectales medias se resumen en la tabla 6. La temperatura rectal LSM para T02 (1 µg) el día 1 y 24, para T03 (4 µg) el día 1, 21, y 24, para T04 (16 µg) el día 2 y 24, para T05 (64 µg) el día 23, y para T06 (256 µg) el día 0, 1, y 24 eran significativamente diferentes del placebo. El día 23 todas las comparaciones no eran estadísticamente significativas ($P > 0,05$) del placebo.

Serología ELISA de p68

El sumario de los datos de ELISA p68 se presentan en la tabla 7. La media geométrica de las titulaciones de virus de antes de la vacunación de los anticuerpos específicos ELISA de p68 fue baja en todos los grupos (intervalo 24,9 a 28,9) y las titulaciones para el placebo permanecieron bajas bajo a lo largo de la duración del estudio. Veintiún días después de la primera vacunación, la media geométrica de las titulaciones de ELISA de p68 había aumentado en el tratamiento vacunado (intervalo 55,2 a 4.411,7), sin embargo la titulación de T02 (1 µg) no era estadísticamente diferente del Placebo (T01). Cuarenta y dos días después de la segunda vacunación, la media geométrica de las titulaciones se incrementó adicionalmente en todos los grupos vacunados (intervalo 674,6 a 48.382,0) que demuestran una buena respuesta serológica a vacunación.

Serología de Amiloide A sérico (SAA)

Las titulaciones de SAA se resumen en la tabla 8. Antes de la exposición, las medias geométricas de las titulaciones de SAA eran bajas en todos los grupos de tratamiento (intervalo 0,1 a 0,5). Después de la exposición, las titulaciones GMT de T01 variaban entre 1,5 y 146,0, donde los grupos de

tratamiento de p68 variaban entre 0,3 y 23,1. Todos los grupos de tratamiento eran estadísticamente diferentes que el placebo los días 50, 52, 54, y 56. No se mostró ninguna diferencia estadística entre las vacunas de p68 con la excepción de T02 (1 µg) el día 52 cuando se demostró una media geométrica
5 estadísticamente diferente de todos los otros grupos de tratamiento de p68.

Respuesta a la exposición

Los datos de respuesta a la exposición se presentan en la tabla 9. La respuesta se determinó controlando la tos después de la exposición y las observaciones se analizaron usando dos procedimientos: número medio de
10 mínimos cuadrados de días con tos y dos días consecutivos de tos (incidencia de enfermedad).

El análisis del número medio de días de tos no mostró diferencia estadísticamente significativa entre los grupos de tratamiento p68; pero en los perros vacunados con placebo tosían una media de 8,6 días mientras que los
15 perros a los que se administró vacunas de p68 tosían significativamente menos, variando las medias entre 2,2 y 4,7 días.

Cuando los perros se evaluaron usando incidencia de enfermedad, todos los T01 (placebo) se observó que tosían durante dos días consecutivos (100% de incidencia de enfermedad). Los perros vacunados con T04 (16 µg) y
20 T05 (64 µg) mostraron una incidencia de enfermedad de 55,6% y 66,7%, respectivamente. Solamente 28,6% de perros vacunados con T02 (1 µg), 50% de T03 (4 µg), y 33,3% de T06 (256 µg) se observó que tosían durante dos días consecutivos.

DISCUSIÓN

25 En este estudio, el objetivo era establecer una relación entre dosis de

antígeno, respuesta inmune, y protección en perros. Las dosis de antígeno p68 examinadas fueron 1 µg, 4 µg, 16 µg, 64 µg, y 256 µg.

El análisis de las mediciones de reacción de los sitios de inyección demostró una reacción insignificante en los grupos de tratamiento de p68, con la excepción de T06 (256 µg) en el primer día después de la segunda
5 vacunación. Las reacciones que se observaron tendían a ser pequeñas, disminuyendo generalmente en tamaño durante los períodos de observación. El tamaño de estas reacciones era clínicamente insignificante y con la mayor probabilidad pasarían desapercibidas en perros sin afeitar.

10 Las temperaturas rectales después de la vacunación no eran dignas de mención y estaban dentro de los límites normales para todos los perros en todos los grupos.

La respuesta serológica a la vacunación era excelente en grupos T03 a T06. En estos grupos de tratamiento, todos demostraron titulaciones de ELISA
15 de p68 significativamente más altas cuando se comparan con el placebo desde el día 21 al día 63, T02 (1 µg) mostró titulaciones de ELISA de p68 significativas comparadas con la T01 (placebo) desde el día 42 al día 63. Las titulaciones más altas se observaron en T05 (64 µg) y T06 (256 µg).

El examen de la respuesta de SAA en todos los perros vacunados con p68 después de la exposición indicó un incremento mucho más pequeño en el
20 SAA después de la exposición cuando se compara con perros control. No se mostró ninguna diferencia entre los niveles de dosis de la vacuna de p68 después de la exposición con la excepción de T02 (1 µg) el día 52 que mostró una media geométrica estadísticamente diferente de todos los otros grupos de
25 tratamiento de p68.

Después de la exposición las observaciones de tos se analizaron usando medias de mínimos cuadrados (LSM) del número de días con tos o dos días consecutivos tosiendo (incidencia de enfermedad). Usando LSM de días de tos, se demostró una diferencia significativa entre placebo y todos los grupos vacunados con p68 aunque no se demostró diferencia entre niveles de dosis de vacuna de p68 diferentes. Usando la incidencia de enfermedad perros vacunados con T02 (1 µg), T03 (4 µg) y T06 (256 µg) toslan significativamente menos que el placebo.

10 CONCLUSIONES:

El estudio se llevó a cabo para establecer una relación entre dosis de antígeno, respuesta inmune, y protección en perros. Las dosis de antígeno p68 examinadas fueron 1 µg, 4 µg, 16 µg, 64 µg, y 256 µg.

Todas las vacunas eran seguras como se demuestra por reacciones en los sitios de inyección mínimas, temperaturas rectales normales y ausencia de respuesta adversa a la vacunación. El tamaño de las reacciones en los sitios de inyección y la duración de estas reacciones eran menor en los grupos de tratamiento antigénico inferior. La respuesta serológica a la vacunación medida mediante titulaciones ELISA era excelente demostrando los grupos de dosis antigénica más alta respuestas serológicas mayores. Cuando se usa las LSM de días tosiendo como un procedimiento de comparación, todos los grupos de tratamiento demostraron una reducción significativa en la tos cuando se comparan con el placebo. No se observaron diferencias entre los grupos de tratamiento. Cuando se usó para comparación dos días consecutivos de tos (o incidencia de enfermedad), los perros vacunados con T02 (1 µg), T03 (4 µg) y

T06 (256 µg) tosían significativamente menos que el placebo.

Tabla 1 Volumen de la reaccion en los sitios de inyección en perros después de la primera vacunación con antígeno p68 o placebo

Tamaño medio por LS (cm ³) de reacciones en el sitio de inyección después de la primera vacunación el día de estudio ¹										
Tratamiento (N)		0	1	2	3	4	5	6	7	14
T01	Placebo (9)	0 00 ^a	0 00 ^a	0 00 ^a	0 00 ^a	0 00 ^a	0 00 ^a	0 00 ^a	0 00 ^a	0 00 ^a
T02	p68 1 µg (7)	0 00 ^a	4 00 ^b	0 00 ^{a,b}	0 00 ^a	0 00 ^a	0 00 ^a	0 00 ^{a,b}	0 00 ^a	0 00 ^a
T03	p68 4 µg (8)	0 00 ^a	0 00 ^{ac}	0 64 ^{a,b}	4 56 ^b	1 14 ^{a,b}	0 39 ^a	0 00 ^a	0 00 ^a	0 00 ^a
T04	p68 16 µg (9)	0 00 ^a	0 00 ^a	3 56 ^b	4 28 ^b	1 32 ^{a,b}	1 79 ^{a,b}	2 36 ^{a,b}	0 38 ^a	0 00 ^a
T05	p68 64 µg (9)	0 00 ^a	10 44 ^d	14 69 ^c	10 56 ^c	4 01 ^{b,c}	4 40 ^b	2 82 ^{a,b}	1 15 ^a	0 00 ^a
T06	p68 256 µg (9)	0 00 ^a	7 00 ^a	8 53 ^d	7 50 ^{b,c}	5 62 ^c	4 36 ^b	3 56 ^b	1 24 ^a	0 00 ^a

Tabla 2 Volumen de la reacción en los sitios de inyección después de la segunda vacunación con antígeno p68 o placebo

Tamaño medio por LS (cm ³) de reacciones en el sitio de inyección después de la segunda vacunación el día de estudio ¹										
	Tratamiento (N)	0 (21)	1 (22)	2 (23)	3 (24)	4 (25)	5 (26)	6 (27)	7 (28)	14 (35)
T01	Placebo (9)	0 00 ^a	0 00 ^a	0 00 ^a	0 00 ^a	0 00 ^a	0 00 ^a	0 00 ^a	0 00 ^a	0 00 ^a
T02	p68 1 µg (7)	0 00 ^a	0 54 ^a	2 36 ^{a,b}	1 14 ^a	0 45 ^a	0 61 ^a	0 50 ^a	0 16 ^a	0 00 ^a
T03	p68 4 µg (8)	0 00 ^a	0 00 ^a	5 33 ^{a,b,c}	4 20 ^a	2 59 ^{a,b}	2 89 ^{a,b}	1 53 ^a	1 23 ^{a,b}	0 00 ^a
T04	p68 16 µg (9)	0 00 ^a	0 00 ^a	7 58 ^{b,c}	10 67 ^b	7 25 ^{b,c}	7 28 ^c	7 97 ^b	5 14 ^{a,b}	0 00 ^a
T05	p68 64 µg (9)	0 00 ^a	2 89 ^a	10 99 ^c	14 28 ^b	9 79 ^c	9 75 ^c	11 14 ^b	6 50 ^b	0 00 ^a
T06	p68 256 µg (9)	0 00 ^a	50 03 ^b	8 58 ^{b,c}	13 44 ^b	11 32 ^c	7 42 ^{b,c}	9 51 ^b	2 69 ^{a,b}	0 00 ^a

5 ¹ Los valores con diferentes superíndices son estadísticamente diferentes (P ≤ 0 05)

Tabla 3 Frecuencia de la reacción en los sitios de inyección después de la primera vacunación con antígeno p68 o placebo

		Porcentaje medio por LS de perros por Corral ² con reacción después de la primera vacunación el día de estudio ³								
Tratamiento (N)		0	1	2	3	4	5	6	7	14
T01	Placebo (9)	0 00 ^a	0 00 ^a	0 00 ^a	0 00 ^a	0 00 ^a	0 00 ^a	0 00 ^a	0 00 ^a	0 00 ^a
T02	p68 1 µg (7)	0 00 ^a	100 00 ^b	83 33 ^b	50 00 ^b	25 00 ^a	12 50 ^a	37 50 ^b	37 50 ^b	0 00 ^a
T03	p68 4 µg (8)	0 00 ^a	90 00 ^{b,c}	80 00 ^b	90 00 ^c	80 00 ^b	83 33 ^b	80 00 ^c	80 00 ^c	0 00 ^a
T04	p68 16 µg (9)	0 00 ^a	62 50 ^c	87 50 ^b	100 00 ^c	100 00 ^b	77 50 ^{b,c}	87 50 ^c	100 00 ^c	10 00 ^a
T05	p68 64 µg (9)	0 00 ^a	90 00 ^{b,c}	100 00 ^b	100 00 ^c	90 00 ^b	90 00 ^{b,c}	90 00 ^c	90 00 ^c	0 00 ^a
T06	p68 256 µg (9)	0 00 ^a	100 00 ^{b,d}	100 00 ^b	100 00 ^c	100 00 ^b	100 00 ^c	87 50 ^c	100 00 ^c	0 00 ^a

152

Tabla 4. Frecuencia de la reacción de los sitios de inyección después de la segunda vacunación con antígeno p68 o placebo

Porcentaje medio por LS de perros por Corral ¹ con reacción después de la segunda vacunación el día de estudio ²										
Tratamiento (N)		0 (21)	1 (22)	2 (23)	3 (24)	4 (25)	5 (26)	6 (27)	7 (28)	14 (35)
T01	Placebo (9)	0 00 ^a	0 00 ^a	20 00 ^a	10 00 ^a	0 00 ^a	0 00 ^a	0 00 ^a	0 00 ^a	0 00 ^a
T02	p68 1 µg (7)	0 00 ^a	58 33 ^b	58 33 ^b	58 33 ^b	45 83 ^b	41 67 ^b	41 67 ^b	29 17 ^b	0 00 ^a
T03	p68 4 µg (8)	0 00 ^a	83 33 ^c	100 00 ^c	100 00 ^c	90 00 ^c	73 33 ^c	73 33 ^c	73 33 ^c	0 00 ^a
T04	p68 16 µg (9)	0 00 ^a	90 00 ^{c,d}	100 00 ^c	100 00 ^c	100 00 ^c	100 00 ^d	100 00 ^d	100 00 ^d	0 00 ^a
T05	p68 64 µg (9)	0 00 ^a	100 00 ^c	100 00 ^c	100 00 ^c	100 00 ^c	100 00 ^d	100 00 ^d	100 00 ^d	0 00 ^a
T06	p68 256 µg (9)	0 00 ^a	100 00 ^d	100 00 ^c	100 00 ^c	100 00 ^c	100 00 ^d	100 00 ^d	87 50 ^{c,d}	0 00 ^a

5 ² Dos Corrales por tratamiento

³ Los valores con diferentes superíndices son estadísticamente diferentes ($P \leq 0.05$)

Tabla 5 Duración de las reacciones en los sitios de inyección después de la vacunación con antígeno p68 o placebo

	Tratamiento (N)	Reacción medible (cualquier momento)	Días medios por LS con reacción ⁴ (después de la primera vacunación)	Días medios por LS con reacción ⁴ (después de la segunda vacunación)
T01	Placebo (9)	0/9 (0%)	0 0 ^a	-0 0 ^a
T02	p68 1 µg (7)	4/7 (57.1%)	0 3 ^a	1 9 ^b
T03	p68 4 µg (8)	8/8 (100 %)	1 3 ^{a,b}	4 5 ^c
T04	p68 16 µg (9)	9/9 (100 %)	2 7 ^b	6 0 ^d
T05	p68 64 µg (9)	9/9 (100 %)	4 9 ^c	6 3 ^d
T06	p68 256 µg (9)	9/9 (100 %)	5 1 ^c	6 7 ^d

5 ⁴ Los valores con diferentes superíndices son estadísticamente diferentes (P ≤ 0.05)

Tabla 6 Temperaturas rectales medias para los perros después de la vacunación con antígeno p68 o placebo

		Temperatura rectal media por LS el día de estudio ⁶							
	Tratamiento (N)	0	1	2	3	21	22	23	24
T01	Placebo (9)	38 9 ^{ab}	38 9 ^a	38 9 ^{ab}	39 0 ^a	39 0 ^a	38 8 ^a	38 9 ^{ab}	39 0 ^a
T02	p68 1 µg (7)	39 0 ^{ab}	38 5 ^b	38 8 ^a	38 4 ^b	38 7 ^a	38 6 ^a	38 7 ^{ab}	38 6 ^{b,c}
T03	p68 4 µg (8)	39 0 ^a	38 7 ^{ab}	38 6 ^a	39 0 ^a	38 6 ^b	38 6 ^a	38 6 ^a	38 4 ^c
T04	p68 16 µg (9)	39 0 ^a	39 0 ^a	38 9 ^b	38 7 ^{ab}	38 7 ^a	38 8 ^a	38 7 ^{ab}	38 6 ^{b,c}
T05	p68 64 µg (9)	38 9 ^{ab}	38 9 ^a	38 9 ^{ab}	38 8 ^a	38 7 ^a	38 7 ^a	39 0 ^b	38 7 ^{ab}
T06	p68 256 µg (9)	38 7 ^b	39 3 ^c	38 8 ^{ab}	39 0 ^a	38 8 ^a	38 8 ^a	38 9 ^{ab}	38 6 ^{b,c}

Tabla 7 Titulaciones de ELISA DAB de p68 serológicas en perros después de la vacunación con antígeno p68 o placebo ⁵

Tratamiento (N)		Media geométrica de las titulaciones de virus para ELISA de p68 el día del estudio ²				
		0	21	42	49	63
T01	Placebo (9)	25 2 ^a	48 3 ^a	30 0 ^a	28 2 ^a	230 4 ^a
T02	p68 1 µg (7)	25 5 ^a	55 2 ^a	674 6 ^b	294 4 ^b	1301 7 ^b
T03	p68 4 µg (8)	25 3 ^a	310 9 ^b	7865 0 ^c	4414 8 ^c	10580 1 ^c
T04	p68 16 µg (9)	28 9 ^a	515 4 ^b	12180 4 ^c	5824 4 ^c	11429 3 ^c
T05	p68 64 µg (9)	25 3 ^a	1699 5 ^c	36460 6 ^d	17593 9 ^d	22689 3 ^{c,d}
T06	p68 256 µg (9)	24 9 ^a	4411 7 ^d	48382 0 ^d	25980 9 ^d	30594 3 ^d

5 ¹ Las vacunaciones se administraron los días del estudio 0 y 21 Los valores con diferentes superíndices son estadísticamente diferentes ($P \leq 0.05$)

² Las vacunaciones se administraron los días del estudio 0 y 21 y la exposición se administró el día de estudio 49

³ Los valores con diferentes superíndices son estadísticamente diferentes ($P \leq 0.05$)

Tabla 8 Titulaciones de amiloide A sérico (SAA) en perros después de la exposición de perros vacunados con antígeno p68 o placebo

Tratamiento (N)		Media geométrica de las titulaciones de amiloide A sérico el día del estudio después de la exposición ⁷					
		49	50	52	54	56	58
T01	Placebo (9)	0 2 ^a	146 0 ^a	87 2 ^a	153 6 ^a	14 7 ^a	1 5 ^a
T02	p68 1 µg (7)	0 2 ^a	8 3 ^b	1 2 ^b	0 7 ^b	0 6 ^b	0 3 ^a
T03	p68 4 µg (8)	0 2 ^a	9 9 ^b	6 4 ^c	2 3 ^b	1 2 ^b	1 8 ^a
T04	p68 16 µg (9)	0 1 ^a	16 3 ^b	11 6 ^c	3 0 ^b	1 6 ^b	1 4 ^a
T05	p68 64 µg (9)	0 5 ^a	11 4 ^b	8 0 ^c	3 4 ^b	1 3 ^b	1 2 ^a
T06	p68 256 µg (9)	0 5 ^a	23 1 ^b	16 4 ^c	3 8 ^b	1 1 ^b	0 4 ^a

5 ¹ Los valores con diferentes superíndices son estadísticamente diferentes (P ≤ 0 05)

Tabla 9 Incidencia y duración de tos en perros después de la exposición de perros vacunados con antígeno p68 o placebo

	Tratamiento (N)	Incidencia de enfermedad ^{a, 2}	Días medios por LS con tos ²
T01	Placebo (9)	9/9 ² (100%)	8 6 ^a
T02	p68 1 µg (7)	2/7 ^b (28 6%)	2 2 ^b
T03	p68 4 µg (8)	4/8 ^b (50 %)	3 8 ^b
T04	p68 16 µg (9)	5/9 ^{a,b} (55 6 %)	3 7 ^b
T05	p68 64 µg (9)	6/9 ^{a,b} (66 7 %)	4 7 ^b
T06	p68 256 µg (9)	3/9 ^b (33 3 %)	3 0 ^b

5 ⁸ Basándose en dos días consecutivos de tos

² Los valores con diferentes superíndices son estadísticamente diferentes (P ≤ 0 05)

EJEMPLO 2

ESTUDIO DE INMUNOGENICIDAD DE p68 DE BORDETELLA CANINA

Animales

Se compraron cuarenta y cinco perros de raza mixta machos y hembras.

- 5 Se administró una vacuna de parvovirus MLV a todos los cachorros el día que los cachorros llegaron al sitio de estudio. No se administró ninguna otra vacuna, diferente de los productos experimentales a los cachorros durante el estudio. Los perros eran aproximadamente de 9 semanas de edad (± 1 semana) el día 0 (día de la primera vacunación).
- 10 Los perros se mantuvieron en una instalación de aislamiento necesaria para prevenir la exposición a *Bordetella* y a otros patógenos caninos antes de la exposición. Después de la exposición por aerosol de *Bordetella*, los procedimientos de aislamiento se continuaron para prevenir la exposición a otros patógenos caninos.

15 Vacunas

- Se usó solución salina estéril como una vacuna placebo en los grupos de tratamiento T01 y T02. Se usó vacuna de p68 de *Bordetella bronchiseptica* recombinante canina en los grupos de tratamiento T03 y T04. El gen estructural del antígeno p68 se clonó en *Escherichia coli* y la expresión del gen se reguló
- 20 mediante un promotor sensible a temperatura. Las células se lisaron y los cuerpos de inclusión se separaron mediante centrifugación. El p68 recombinante en los cuerpos de inclusión se solubilizó mediante tratamiento con SDS. El p68 recombinante (15 μg por ml) se combinó con 50 μg de Quil A y 50 μg de colesterol por ml en solución salina estéril como diluyente. Cada ml
- 25 de dosis contenía 0,28% de etanol y 0,01% de timerosal.

Inóculo de desafío

La cepa Bihir Cat de *Bordetella bronchiseptica* se preparó como inóculo de exposición usando el procedimiento actualmente empleado por Biologicals Control Laboratories - Microbiology. Placas de agar de Bordet - Genou se sembraron con un crecimiento confluyente de cepa Bihir Cat de *Bordetella bronchiseptica* y se incubó durante 48 horas a 37,5 +/- 2,5°C. Las colonias de fase I virulentas se seleccionaron y se sembraron por estría en agar Bordet - Genou y se incubaron durante 24 horas a 37,5°C +/- 2,5°C. Después de incubación, se usó solución salina de Bordetella para lavar las colonias del agar y el antígeno se diluyó hasta una densidad óptica de 0,80 a 600 nm. Se realizó un recuento celular antes y después de la exposición para la confirmación de la lectura de nefelómetro. La concentración diana de exposición era aproximadamente 1 x 10⁹ UFC. La concentración antes de la exposición era 2,37 x 10⁹ UFC (100% fase I) y el recuento de la concentración después de la exposición era 1,35 x 10⁹ UFC (100% fase I).

Diseño de estudio

Tabla resumen

Grupo de tratamiento	Tratamiento	Vía	Número de animales
T01	Control de solución salina	Intramuscular	8
T02	Control de solución salina	Subcutánea	7
T03	p68 15 µg/dosis	Subcutánea	15

T04	p68 15 µg/dosis	Intramuscular	15
-----	-----------------	---------------	----

Distribución al azar/Ciego

Durante el período de tiempo de la vacunación al día de la exposición, los animales se asignaron a tratamientos de acuerdo con el diseño de bloque generalizado. Los tratamientos se asignaron al azar a habitaciones. El día de la exposición, los animales se asignaron al azar a habitaciones de exposición por bloque.

Individuos cualificados, sin conocimiento de los grupos de tratamiento asignados, llevaron a cabo ensayos microbiológicos y serológicos y valoraciones de los sitios de inyección, mediciones de temperaturas rectales, y observaciones de tos.

Análisis de datos

Las variables de respuesta después de la vacunación estaban constituidos por datos de sitio de inyección, temperaturas rectales y titulaciones de ELISA de p68. Los datos de los sitios de inyección se resumen de las siguientes formas:

1) número de animales que tienen una reacción medible por tratamiento y día de estudio, 2) número de momentos en el animal en que tienen una reacción medible por tratamiento, 3) número de animales que tienen una reacción medible en cualquier momento por tratamiento.

De manera separada para las primera y segunda vacunaciones, volumen de sitio de inyección (cm cúbicos), temperaturas rectales y datos de titulación de ELISA de p68 transformados por log natural se analizaron usando

un modelo mixto lineal general.

Contrastes lineales *a priori* del tratamiento por media de mínimos cuadrados de los momentos de observación se construyeron para ensayar diferencias entre los grupos de tratamiento en cada momento de observación y para comparar los momentos en cada tratamiento. El nivel del 5% de significación se usó para todas las comparaciones.

Las variables de respuesta después de la exposición constaban de observaciones de tos diarias, titulaciones de ELISA de p68 y titulaciones de amiloide A sérico. El número de días de tos durante el período después de la exposición se analizó usando un modelo mixto lineal general.

Contrastes *a priori* de la media de mínimos cuadrados de tratamiento se construyeron para ensayar las diferencias entre los grupos de tratamiento. El nivel del 5% de significación se usó para todas las comparaciones.

De manera separada para la primera y segunda vacunaciones, se usó el ensayo exacto de Fisher para comparar grupos de tratamiento para evaluar la incidencia de dos días consecutivos de tos. El nivel del 5% de significación se usó para todas las comparaciones.

Para los datos de titulación de amiloide A sérico (SAA) después de la exposición, la transformación mediante el logaritmo natural se aplicó a los valores de titulación antes del análisis usando un modelo mixto lineal general.

Contrastes lineales *a priori* del tratamiento por media de mínimos cuadrados de los momentos de observación se construyeron para ensayar las diferencias entre los grupos de tratamiento en cada momento de observación y para comparar los momentos en cada tratamiento. El nivel del 5% de significación se usó para todas las comparaciones.

Procedimiento de estudio

Procedimientos de animales detallados

Cuarenta y cinco (45) cachorros seronegativos y negativos para el cultivo se asignaron al azar a uno de los 4 grupos de tratamiento. Ocho y siete
5 perros se distribuyeron a grupos de control intramuscular (IM) o subcutáneo (SC) respectivamente, para un total de 15 perros de control. Se distribuyeron quince perros al grupo de tratamiento SC de p68 y 15 perros se distribuyeron al grupo de tratamiento IM de p68. Los grupos de tratamiento se detallan en la sección de diseño de estudio anterior.

10 El día 0 se designó como el día de la primera vacunación. Las vacunaciones se administraron el día 0 y se repitió 21 días más tarde. Para la primera vacunación, se usó el lado derecho del cuello, para la segunda vacunación, se usó el lado izquierdo del cuello. Las inyecciones intramusculares se administraron en el músculo semimembranoso derecho e
15 izquierdo para la primera y segunda vacunaciones, respectivamente. Todos los sitios de inyección se midieron en tres dimensiones durante siete días después de cada vacunación con una medición de seguimiento llevada a cabo 14 días después de la vacunación. Se controlaron las temperaturas rectales el día de la vacunación (antes de la vacunación) y durante tres días después de cada
20 vacunación.

El día 35, a todos los animales se les tomó una muestra de la tráquea con un hisopo para cultivo de *B. bronchiseptica* y se recogió sangre para titulaciones de aglutinación. Todos los animales eran negativos por hisopo traqueal y serológicamente negativos para *Bordetella* y se consideraron
25 aceptables para exposición.

El día 45, veinticuatro días después de la segunda vacunación, una exposición por aerosol de *B. bronchiseptica* se administró a todos los perros. Los perros sedados se expusieron usando un cono nasal desechable, que se ajustó de manera ceñida al hocico del perro sedado. El cono nasal se unió a un nebulizador que estaba unido a una bomba de presión de vacío fijada a 5,5 a 6,0 psi (37,921 a 41,369 KPa). Un ml de material de exposición se colocó en el nebulizador y el material de exposición en aerosol se administró a cada perro durante 4 minutos. El personal que hace las observaciones no tenía conocimiento de las asignaciones de los grupos de tratamiento.

10 Los animales se controlaron para evaluar la tos durante 14 días después de la exposición (días 46 - 59). Las observaciones se realizaron en 2 (dos), períodos de aproximadamente 30 minutos a aproximadamente el mismo tiempo cada día, uno se lleva a cabo en AM y el otro en PM y se registraron los resultados.

15

Recogida de sangre

Se recogió sangre para titulaciones de aglutinación antes de la primera vacunación y antes de la exposición. Se recogió sangre para evaluación ELISA anti-p68 antes de la vacunación los días 0 y 21 y los días 35, 45, y 59. Se 20 recogió sangre para el ensayo de amiloide A sérico (SAA) el día de la exposición (día 45) y los días 46, 48, 50, 52 y 54.

Ensayos realizados sobre las muestras

Se evaluaron hisopos traqueales para la presencia de *B. bronchiseptica* mediante cultivo. Cada hisopo traqueal se sembró por estría sobre una placa 25 de agar selectivo de Bordetella. Se incluyeron controles positivos y negativos.

Las placas se incubaron a $37,5 \pm 2,5$ °C durante 48 ± 4 horas. Las colonias resultantes en cada placa se compararon con el control positivo y cualquier colonia que parecía idéntica al control positivo se ensayó posteriormente para confirmar la presencia de *B. bronchiseptica*. Los ensayos de confirmación
5 incluyeron el uso de TSI, Citrato y urea agar y medio de rojo nitrato.

Se evaluaron los sueros para titulaciones de aglutinación, análisis de ELISA de p68 o análisis de SAA usando los siguientes procedimientos:

Titulaciones de aglutinación - Se diluyeron en serie los sueros en placas de microvaloración usando solución salina de Bordetella. Los controles
10 positivos y negativos se incluyeron en cada placa, la cepa 87 de *B. bronchiseptica* (crecida en agar de Bordet Genou, recogida, inactivada y diluida hasta 20% de T a 630 nm) se usó como el antígeno de aglutinación y se añadió a cada pocillo. Las placas se agitaron y se incubaron a $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 2 horas. Las placas se leyeron después de una segunda incubación a
15 temperatura ambiente durante 22 horas. La titulación del punto final se determinó usando el último pocillo que mostraba 50% de aglutinación.

Titulaciones de ELISA de p68- el antígeno p68 recombinante se capturó en una placa de microvaloración de 96 pocillos revestida con un antisuero policlonal específico del antígeno p68 de *Bordetella*. Se añadieron diluciones
20 en serie 2x del suero canino a la placa y se incubaron. Se incluyeron en cada placa controles positivos y negativos a una dilución 1:1000. Se usó un conjugado indicador de IgG anti - perro de cabra purificado por afinidad marcado con peroxidasa para detectar anticuerpos específicos para el antígeno p68. Después se añadió un sustrato cromogénico ABTS y la placa se leyó
25 cuando los pocillos de control positivo tenían una D. O. de $1,2 \pm 0,2$. La

titulación de una muestra dada se calculó como el recíproco de la última dilución con una densidad óptica mayor que la media de la dilución de suero de control negativo más cinco desviaciones típicas.

5 Titulaciones SAA - Las titulaciones de amiloide A sérico canino se
evaluaron usando un kit comprado en Accuplex Co., Centro Médico de la
Universidad de Nebraska , Omaha, NE 68198. En resumen, SAA canino se
capturó en una placa de microvaloración revestida con un anticuerpo
monoclonal de SAA anti-canino. Se añadieron muestras diluidas del suero
10 con biotina. Después de la incubación, se añadió un sustrato cromogénico de
estreptavidina conjugado con peroxidasa. La placa se leyó después de 30
minutos.

Resultados

15 Temperaturas rectales

El sumario de mediciones de temperatura rectal se presenta en la tabla
10 y 11.

20 **Tabla 10. Media de mínimos cuadrados de temperaturas rectales
(°C) en perros después de vacunación con solución salina o p 68 de
Bordetella (después de la primera vacunación *)**

Tratamiento	Temperaturas rectales (°C)				
	Día de estudio				
	0	1	2	3	error

167
168

					típico
T01 solución salina IM	38,2	38,2	38,2	38,2	0,08
T02 solución salina SC	38,0	38,3	38,2	38,2	0,09
T03 p68 SC	38,1	38,3	38,1	38,0	0,06
T04 p68 IM	38,2	38,4	38,2	38,2	0,06

^a La primera vacunación se administró el día 0.

**Tabla 11. Media de mínimos cuadrados de temperaturas rectales
5 (°C) en perros después de vacunación con solución salina o con p68 de
Bordetella (después de la segunda vacunación ^a)**

Tratamiento	Temperaturas rectales (°C)				
	Día de estudio				
	21	22	23	24	error típico
T01 solución salina IM	38,1	38,3	38,2	38,2	0,10
T02 solución salina SC	38,5	38,5	38,2	38,2	0,10
T03 p68 SC	38,0	38,3	38,1	38,1	0,08
T04 p68 IM	38,1	38,4	38,4	38,4	0,08

^a La segunda vacunación se administró el día 21.

No se observó ninguna diferencia significativa entre ningún grupo en cualquier día después de la primera vacunación. Se observó una diferencia significativa entre perros vacunados con solución salina y todos los perros vacunados con p68 ($p = 0,0053$ para T01 T02 frente a T03T04) el día 21. Se demostró una diferencia significativa ($p = 0,0124$) entre vacunados con p68 SC e IM el día 24.

Reacciones en el sitio de inyección

Las reacciones en el sitio de inyección se resumen en las tablas 12 y 13.

10 Debido al descuido técnico, no se llevaron a cabo ningunas observaciones en el sitio de inyección el día 14 de observación después de la segunda vacunación (día 35).

Se observaron reacciones en el sitio medibles en T03 (p68SC) y eran mínimas en tamaño. Se observó una pequeña reacción en el sitio de inyección en un perro en T04 (p68 IM) el día 3 pero el impacto mínimo de la medición no se reflejó en la media global para el grupo.

15

Tabla 12. Media de mínimos cuadrados (cm cúbicos) de reacciones en los sitios de inyección en perros después de vacunación con solución salina o p68 de Bordetella (15 µg/dosis) (después de la primera vacunación ^a)

20

	tamaño medio (cm cúbicos) de reacciones en el sitio de inyección
	Día de estudio

Tratamiento ^b	1	2	3	4	5	6	7	14
T01 solución salina IM	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
T02 solución salina SC	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
T03 p68 SC	7,4	4,3	6,8	3,4	2,5	2,6	1,9	0,1
T04 p68 IM	0,0	0,0	0,0 ^c	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

^a Primera vacunación administrada el día 0

^b Error típico para T01 = 0,80, T02 = 0,84, T03 = 0,70, y T04 = 0,70

^c un perro tenía una pequeña reacción en el sitio (0,5 cm²) pero debido al
5 redondeo, el impacto mínimo de valor no se refleja en la media global.

**Tabla 13. Media de mínimos cuadrados (cm cúbicos) de reacciones en los sitios de inyección en perros después de vacunación con solución salina o p68 de Bordetella (15 µg/dosis) (después de la segunda
10 vacunación ^a)**

Tratamiento ^b	Tamaño medio (cm cúbicos) de reacciones en el sitio de inyección						
	Día de estudio						
	22	23	24	25	26	27	28
T01 solución salina IM	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

120
171

T02 solución salina SC	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
T03 p68 SC	8,6	9,2	9,5	7,3	5,2	4,7	5,1
T04 p68 IM	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

^a Segunda vacunación administrada el día 21.

^b Error típico para T01 = 1,12, T02 = 1,19, T03 = 0,92, y T06 = 0,92

5 Las diferencias significativas en las mediciones en los sitios de inyección se resumen en la tabla 14. Se observó una diferencia significativa en las mediciones en los sitios de inyección entre T02 (solución salina SC) contra T03 (p68 15 µg SC) durante seis días después de la primera vacunación. El día 7 y de nuevo el día 14 (la observación de reevaluación de dos semanas), no se
10 observaron diferencias significativas entre ningún grupo de tratamiento.

Se observó una diferencia significativa en las mediciones en los sitios de inyección entre T02 (solución salina SC) contra T03 (p68 15 µg SC) durante siete días después de la segunda vacunación.

15 **Tabla 14. Valores de significación para contrastes *a priori* entre media de mínimos cuadrados de mediciones de reacción en el sitio de inyección.**

Día de estudio	Contrastes	valor de p
	(tratamiento contra tratamiento)	
1	T02 contra T03	0,0001

171
172

	T03 contra T04	0,0001
	T01 T02 contra T03 T04	0,0001
2	T02 contra T03	0,0007
	T03 contra T04	0,0008
	T01 T02 contra T03 T04	0,0101
3	T02 contra T03	0,0001
	T03 contra T04	0,0001
	T01 T02 contra T03 T04	0,0002
4	T02 contra T03	0,0044
	T03 contra T04	0,0042
	T01 T02 contra T03 T04	0,0339
5	T02 contra T03	0,0313
	T03 contra T04	0,0253
22	T02 contra T03	0,0001
	T03 contra T04	0,0001

172
~~173~~

	T01 T02 contra T03 T04	0,0002
23	T02 contra T03	0,0001
	T03 contra T04	0,0001
	T01 T02 contra T03 T04	0,0001
24	T02 contra T03	0,0001
	T03 contra T04	0,0001
	T01 T02 contra T03 T04	0,0001
25	T02 contra T03	0,0001
	T03 contra T04	0,0001
	T01 T02 contra T03 T04	0,0013
26	T02 contra T03	0,0013
	T03 contra T04	0,0007
	T01 T02 contra T03 T04	0,0172
27	T02 contra T03	0,0035
	T03 contra T04	0,0019

174.
~~175~~

salina IM	25,0	4,78	25,0	4,78	125,4	23,88	100,0	18,14	130,0	32,24
T02 solución										
salina SC	25,0	5,08	25,0	5,08	113,5	23,00	100,0	19,38	100,0	28,50
T03 p68 SC	25,0	3,93	189,5	29,77	10888,7	1678,20	4555,1	803,43	8798,0	1582,43
T04 p68 IM	25,0	3,93	121,4	19,08	11023,7	1731,85	4419,2	585,44	13718,1	2483,54

^a Las Titulaciones para los días 0 y 21 se comenzaron en 50. Las titulaciones para los días 35, 45 y 59 se comenzaron en 200. Cualquier valor reseñado como “menos de” se dividió por 2 antes del análisis.

5 ^b La primera vacunación se produjo en día 0; la segunda vacunación se produjo el día 21 y la exposición se administró el día 45.

10 Las diferencias significativas para la media de mínimos cuadrados de las titulaciones de ELISA después de la vacunación y después de la exposición se enumeran en la tabla 16. No se observó diferencia significativa entre animales vacunados con p68 SC y p68 IM después que se completó la vacunación.

15 **Tabla 16. Valores de significación para contrastes *a priori* entre media de mínimos cuadrados de titulaciones de punto final de ELISA de p68 después de la vacunación y después de exposición.**

Día de estudio	Contrastes	valor de p
21	T01 contra T04	0,0001
	T02 contra T03	0,0001

175
+76

	T03 contra T04	0,0491
35	T01 contra T04	0,0001
	T02 contra T03	0,0001
45	T01 contra T04	0,0001
	T02 contra T03	0,0001
59	T01 contra T04	0,0001
	T02 contra T03	0,0001

Solamente se presentan contrastes significativos ($p < 0,05$)

Titulaciones de amiloide A sérico

Los valores de SAA se determinaron los días 0, 1, 3, 5, 7 y 9 después de la exposición. Los valores de amiloide A sérico se presentan en la tabla 17 y se representan en la figura 2.

Tabla 17. Media geométrica y errores típicos de las titulaciones de amiloide A sérico en perros vacunados con solución salina y p68 de *Bordetella* (15 µg/dosis) después de exposición de aerosol con *Bordetella*

176
177

bronchiseptica.

Media geométrica y errores típicos de amiloide A sérico												
Día de estudio ^a												
TRT	45		46		48		50		52		54	
	Media	Error típico	Media	Error típico	Media	Error típico.	Media	Error típico.	Media	Error típico	Media	Error típico.
T01	0,1	0,02	277,3	125,30	82,4	42,17	89,8	28,60	8,0	2,24	1,2	0,33
T02	0,4	0,06	384,5	185,63	128,9	70,46	215,9	94,56	28,0	11,23	3,7	1,11
T03	0,5	0,05	31,7	10,51	6,0	2,25	2,3	0,68	0,8	0,23	1,3	0,27
T04	0,3	0,04	50,0	16,58	8,8	3,22	5,0	1,50	2,4	0,65	0,7	0,14

5 ^a Exposición administrada el día 45

Las diferencias significativas en las titulaciones de SAA se resumen en la tabla 18. Los controles de solución salina demostraron unas titulaciones de SAA mayores que los perros vacunados los días 1, 3 y 5 después de la exposición. Los controles de solución salina SC continuaban para demostrar

10 titulaciones de SAA significativamente mayores cuando se comparan con perros vacunados SC el día 7 y 9 después de la exposición.

Tabla 18. Valores de significación para contrastes *a priori* entre media de mínimos cuadrados de titulaciones de amiloide A sérico

15 después de la exposición.

177
178

Día de estudio	Contraste (tratamiento contra tratamiento)	valor de p
46	T01 contra T04	0,0025
	T02 contra T03	0,0001
48	T01 contra T04	0,0007
	T02 contra T03	0,0001
50	T01 contra T04	0,0001
	T02 contra T03	0,0001
52	T01 contra T02	0,0093
	T02 contra T03	0,0001
54	T02 contra T03	0,0493

Solamente se presentan contrastes significativos ($p < 0,05$)

Observaciones de los

La exposición de aerosol para todos los grupos de tratamiento se produjo 24 días después de la segunda vacunación (día 45). Las

178
179

observaciones de tos se examinaron usando dos procedimientos - estado de la enfermedad en base a dos días consecutivos de tos (presentados en la tabla 19) y porcentaje de días de tos (presentados en la tabla 20 y 21). Cuando los perros se evaluaron usando criterios de dos días consecutivos tosiendo, 80%
5 de los perros vacunados con p68 (SC e IM) tosían al menos dos días consecutivos mientras que los perros vacunados con solución salina SC y solución salina IM tosían el 100% y 87,5%, respectivamente. Cuando los perros se evaluaron usando porcentaje de días observados tosiendo, los perros vacunados con p68 SC e IM tosían el 38,72% y 41,05% de los días
10 observados, respectivamente. Los perros vacunados con solución salina SC y solución salina IM tosían 69,04% y 62,66% respectivamente.

**Tabla 19: Sumario del estado de enfermedad en perros vacunados con solución salina y p68 (15 µg/dosis) de Bordetella basándose en dos días
15 consecutivos de tos después de la exposición con aerosol con *Bordetella bronchiseptica***

Número de tratamiento	Nº de perros	Porcentaje de perros con dos días consecutivos de tos
T01 solución salina IM	8	87,5
T02 solución salina SC	7	100,0
T03 p68 15 µg/dosis SC	15	80,0
T04 p68 15 µg/dosis IM	15	80,0

No se mostró ninguna diferencia significativa entre perros vacunados con solución salina y con p68 cuando el estado de enfermedad se basaba en dos días consecutivos de tos.

Tabla 20. Porcentaje medio de días de tos en perros vacunados con solución salina y p68 (15 µg/dosis) de Bordetella después de la exposición con aerosol con Bordetella bronchiseptica

10

	Tratamiento	Nº de perros	Media	Error típico
T01	solución salina IM	8	62,66%	8,67
T02	solución salina SC	7	69,04%	8,86
T03	p68 15 µg/ SC	15	38,72%	6,38
T04	p68 15 µg/ IM	15	41,05%	6,44

Se demostró una diferencia significativa ($p = 0,0112$) entre T02 (solución salina SC) y T03 (p68 15 µg/ SC). No se mostró diferencia significativa entre T01 (solución salina IM) y T04 (p68 15 µg/ IM).

15

Tabla 21. Porcentaje medio de días de tos mediante tratamiento en perros vacunados con solución salina y p68 (15 µg/dosis) de Bordetella después de la exposición con aerosol con Bordetella bronchiseptica

180
107

Parámetro	Estimado	Error típico
Media de solución salina (T01 y T02)	65,89%	1,10
Media de 15 µg/dosis (T03 y T04)	39,88%	4,34

Se mostró una diferencia significativa ($p = 0,0022$) entre los controles de solución salina y perros vacunados con p68.

5 **Discusión**

El estudio se diseñó para demostrar la seguridad y eficacia de una vacuna de p68 de Bordetella 15 µg/dosis en perros.

Se examinó la seguridad usando observaciones de sitios de inyección y temperaturas rectales. El análisis de las mediciones de la reacción en los sitios de inyección demostró una reacción insignificante en el grupo vacunado IM y reacciones mínimas en el grupo vacunado SC. Las reacciones que se observaron tendían a ser pequeñas, disminuyendo generalmente en tamaño durante los períodos de observación. El tamaño de estas reacciones con la mayor probabilidad resultaría inadvertido en perros sin afeitar. Aunque se observó una diferencia significativa entre solución salina y vacunados el día 21 y entre vacunados IM y SC el día 24, las temperaturas rectales eran clínicamente insignificantes y estaban dentro de los límites normales para todos los perros en todos los grupos.

La eficacia se examinó usando observaciones de medición de titulaciones de punto final de ELISA de p68 y tos. Independientemente de la vía de administración, se demostró una buena respuesta de anticuerpo p68 en los

grupos vacunados con p68 el día 35. Se observó una buena respuesta de anamnesia en los vacunados después de la exposición. Aunque tradicionalmente se han obtenido respuestas de anticuerpos superiores con la vía IM más vascular y menos grasa cuando se compara con la vía SC, la
5 diferencia entre vacunados con p68 SC e IM no era significativa a lo largo del curso del estudio.

El examen de la respuesta SAA en perros vacunados y no vacunados con p68 de Bordetella después de la exposición indicaban un incremento mucho más pequeño en los valores de SAA en grupos de animales vacunados
10 especialmente los días 1, 3 y 5 después de la exposición.

Conclusiones

En este estudio, se examinó la eficacia de una vacuna de p68 de Bordetella canina 15 µg/dosis usando un modelo de exposición canina 24 días después de la vacunación. La vacuna era segura como se demuestra por las
15 temperaturas rectales normales, reacciones mínimas en el sitio de inyección y eficacia en grupos IM y SC combinados. La comparación de los valores de SAA demostró una diferencia significativa entre perros vacunados con solución salina y con p68 los días 1, 3 y 5 después de la exposición con aerosol.

20

EJEMPLO 3

DURACIÓN DE SEIS MESES DE ESTUDIO DE INMUNIDAD DE VACUNA DE p68 DE BORDETELLA CANINA

Animales

Se compraron noventa perros de raza mixta machos y hembras y la
25 mayoría de cachorros eran de 9 semanas de edad ($\pm$ 1 semana) el día de la

primera vacunación.

Se administró una vacuna de parvovirus MLV a todos los perros tras la llegada al sitio de estudio. Para que fueran aceptables para el estudio, los animales se determinaron que eran negativos a *B. bronchiseptica* mediante hisopo traqueal y titulación de aglutinación. No se administró ninguna otra
5 vacuna, diferente de los productos experimentales durante el estudio.

Los perros se mantuvieron en una instalación de aislamiento necesaria para prevenir la exposición a *B. bronchiseptica* y a patógenos caninos antes de la exposición. Después de la exposición con aerosol con *B. bronchiseptica*, los
10 procedimientos de aislamiento se continuaron para prevenir la exposición a otros patógenos caninos.

Vacunas

Se usó solución salina estéril como una vacuna placebo en los grupos de tratamiento T01 y T02. Se usó vacuna de p68 de *Bordetella bronchiseptica* recombinante canina en los grupos de tratamiento T03 y T04. El gen estructural del antígeno p68 se clonó en *Escherichia coli* y la expresión del gen se reguló mediante un promotor sensible a temperatura. Las células se lisaron y los cuerpos de inclusión se separaron mediante centrifugación. El p68
15 recombinante en los cuerpos de inclusión se solubilizó mediante tratamiento con SDS. De manera separada 15 µg de p68 y 60 µg de p68 se combinaron con 50 µg de Quil A y 50 µg de colesterol por ml en solución salina estéril Lepto como diluyente. Los componentes combinados se mezclaron a 4°C durante 24 horas y se pasaron tres veces a través de un microfluidificador. Cada ml de
20 dosis contenía 2,7 µl de etanol y 0,0001% de timerosal, las concentraciones de

183
~~184~~

p68 en las vacunas experimentales se midieron por ELISA p68. Todos los ensayos se realizaron por replicado de cinco (5). Todas las vacunas se usaron dentro de 6 meses de ensamblaje.

Inóculo de exposición

5 Placas de agar Bordet - Genou se sembraron con la cepa Bihir Cat de *Bordetella bronchiseptica* y se incubaron durante 48 horas a 37,5 +/- 2,5°C. Las colonias de fase I virulentas se seleccionaron y se sembraron por estría en agar Bordet - Genou y se incubaron durante 24 horas a 37,5°C +/- 2,5°C. Después de incubación, se usó solución salina de Bordetella para lavar las

10 colonias del agar y las células se diluyeron hasta una densidad óptica de 0,80 a 600 nm. Se realizó un recuento celular antes y después de la exposición para la confirmación de la lectura de nefelómetro. La concentración diana de exposición era aproximadamente 1 x 10⁹ UFC. Para el grupo I, el recuento de la concentración antes de la exposición era 1,94 x 10⁹ y el recuento de la

15 concentración después de la exposición era 1,43 x 10⁹. Para el grupo II, el recuento de la concentración antes de la exposición era 2,55 x 10⁹ y el recuento de la concentración después de la exposición era 2,13 x 10⁹.

Diseño de estudio

20 Tabla sumario

Grupo de tratamiento	Tratamiento	Vía	Número de animales		
			Día de la primera vacunación		
			Día 0	Día 20	Número total de animales

			(grupo 1)	(Grupo II)	
T01	Control de solución salina	Subcutánea	8	7	15
T02	Control de solución salina	Intramuscular	8	7	15
T03	60 µg/dosis de p68	Subcutánea	8	7	15
T04	60 µg/dosis de p68	Intramuscular	8	7	15
T05	15 µg/dosis de p68	Subcutánea	8	7	15
T06	15 µg/dosis de p68	Intramuscular	8	7	15

El estudio se llevó a cabo en dos fases o grupos constituidos por 48 perros en el grupo I y 42 perros en el grupo II. La vacunación nº 1 se produjo el día 0 para cada grupo. La vacunación nº 2 se produjo 20 días más tarde. Los episodios del grupo 1 estaban desfasadas respecto a los episodios en el grupo II durante aproximadamente 15 días. Los perros se expusieron con aerosol con *B. bronchiseptica* 181 días después de la última vacunación.

Distribución al azar/Ciego

10 Los animales se asignaron al azar a tratamientos y habitaciones según un completo diseño al azar.

Durante el periodo de tiempo de la vacunación nº 1 al día de la exposición dentro de cada grupo de estudio, los animales se asignaron al azar a tratamientos y habitaciones (3 a 5 perros por habitación) usando un plan de distribución al azar.

- 5 El día de la exposición, los animales previamente tratados se distribuyeron al azar a las habitaciones de exposición dentro del grupo de estudio usando un diseño de bloque generalizado.

Individuos cualificados, sin conocimiento de los grupos de tratamiento asignados, llevaron a cabo ensayos microbiológicos y serológicos y
10 valoraciones de tos y los sitios de inyección.

Análisis de datos

Las variables de respuesta después de la vacunación constaban de datos de sitio de inyección, temperaturas rectales y titulaciones de ELISA de
15 p68. Los datos de los sitios de inyección se resumen como sigue: 1) número de animales que tienen una reacción medible por tratamiento y día de estudio, 2) número de momentos en el animal que tiene una reacción medible por tratamiento, 3) número de animales que tienen una reacción medible en cualquier momento por tratamiento, 4) duración de la reacción medible para
20 cada animal.

De manera separada para la primera y segunda vacunaciones, se analizaron el volumen del sitio de inyección (cm cúbicos), temperaturas rectales y datos de titulación de ELISA de p68 transformados por log natural se analizaron usando un modelo mixto lineal general.

- 25 Contrastes lineales *a priori* del tratamiento por media de mínimos

cuadrados de los momentos de observación se construyeron para ensayar las diferencias entre los grupos de tratamiento en cada momento de observación y para comparar los momentos en cada tratamiento. Las comparaciones específicas de interés eran T01 contra T03, T01 contra T05, T03 contra T05, 5 T02 contra T04, T02 contra T06, y T04 contra T06. Si el término interacción momento por tratamiento por grupo de estudio era significativo a $P < 0,05$, contrastes entre grupos de tratamiento en cada momento y entre momentos dentro de grupos de tratamiento estaban dentro de cada grupo de estudio, por lo demás estos contrastes se basaron en la media de mínimos cuadrados del 10 efecto de interacción momento por tratamiento. El nivel del 5% de significación se usó para todas las comparaciones.

Las variables de respuesta después de la exposición constaban de observaciones de titulaciones de ELISA de p68, titulaciones de amiloide A sérico y observaciones de tos diaria. Las titulaciones de ELISA de p68 después 15 de la exposición se analizaron como se ha descrito previamente. Para los datos de titulación de amiloide A séric (SAA) después de la exposición, se aplicó la transformación de log natural a los valores de titulación antes del análisis usando un modelo mixto lineal general.

El análisis de tos se modificó para reflejar los requerimientos de USDA. 20 Para cada perro, se observó el porcentaje de períodos de observación durante los que se observó la tos. Antes de análisis, se transformó el porcentaje usando la transformación de raíz cuadrada de arco seno. Se usó un modelo lineal general para análisis de tos.

La media de mínimos cuadrados de este análisis se volvió a transformar 25 a porcentajes y el porcentaje de reducción en tos se calculó como:

$$(\text{media de grupo control} - \text{media de grupo de tratamiento})$$

$$\text{Porcentaje de reducción} = 100 \times \frac{\text{---}}{\text{(media de grupo de control)}}$$

5 Contrastes lineales *a priori* de la media de mínimos cuadrados de tratamiento se construyeron para ensayar las diferencias entre los grupos de tratamiento. Las comparaciones específicas de interés eran T01 contra T03, T01 contra T05, T03 contra T05, T02 contra T04, T02 contra T06, y T04 contra T06. Si el término interacción tratamiento por grupo de estudio era significativo
10 a $P < 0,05$, los contrastes entre grupos de tratamiento estaban dentro de cada grupo de estudio, por lo demás estos contrastes entre grupos de tratamiento se basaron en la media de mínimos cuadrados del efecto principal del tratamiento. El nivel del 5% de significación se usó para todas las comparaciones.

15 **Procedimiento de estudio**

Procedimientos de animales detallados

Antes de la llegada de las premisas de estudio y antes de la primera vacunación, a los cachorros se les tomó una muestra traqueal con un hisopo para cultivo de *B. bronchiseptica* y se recogió sangre para titulaciones de
20 aglutinación. Todos los animales eran negativos mediante hisopo traqueal y serológicamente negativos a *Bordetella* y se consideraron aceptables para el estudio. Cuarenta y ocho cachorros se asignaron al azar a uno de los seis grupos de tratamiento para el grupo I. El procedimiento se repitió usando cuarenta y dos perros para el grupo II. Los animales se aclimataron al sitio de
25 estudio durante al menos cinco días.

Los grupos y tratamientos se detallan en la sección 7.4.A. Debido a las restricciones de la instalación y para potenciar la precisión de observaciones de

tos después de la exposición, la vacunación y los períodos de exposición respectivos se escalonaron en 15 días para generar los dos grupos de perros. El día 0 se refiere al día de vacunación nº 1 para tanto el grupo 1 como el II. La vacunación nº 2 se produjo 20 días más tarde. Los tratamientos T01, T03, y T05 se administraron mediante la vía subcutánea. Los tratamientos T02, T04, y T06 se administraron mediante la vía intramuscular. Se administraron inyecciones subcutáneas en la parte dorsolateral del cuello. Para la vacunación nº 1, se usó el lado derecho del cuello y para la vacunación nº 2, se usó el lado izquierdo del cuello. Las inyecciones intramusculares se administraron en el músculo semimembranoso derecho e izquierdo para la vacunación nº 1 y nº 2, respectivamente. Todos los sitios de inyección se midieron en tres dimensiones durante siete días después de cada vacunación con una medición de seguimiento llevada a cabo 14 días después de la vacunación. Se controlaron las temperaturas rectales el día de la vacunación (antes de la vacunación) y durante tres días después de cada vacunación. Se recogió sangre antes de cada vacunación (el día -1 y día 19) y el día 50 para determinación de titulación de ELISA de p68.

Cada mes, a todos los perros se les tomó una muestra traqueal con hisopo para cultivo de *B. bronchiseptica* bajo sedación para confirmar el estado negativo para *B. bronchiseptica*. También se recogió sangre para titulaciones de aglutinación y ELISA. El procedimiento se repitió 7 días antes de la exposición para cada grupo. La evidencia de un cultivo de hisopo traqueal positivo o de un incremento de titulación de aglutinación excluía al animal del estudio.

La exposición se administró a perros 181 días después de la vacunación

nº 2. Los perros sedados se expusieron usando un cono nasal desechable, que se ajustó de manera ceñida al hocico del perro sedado. El cono nariz se unió a un nebulizador que estaba unido a una bomba de presión de vacío fijada a 5,5 a 6,0 psi (37,921 a 41,369 KPa). Un ml de material de exposición se colocó en el nebulizador y el material de exposición en aerosol se administró a cada perro durante 4 minutos.

Las observaciones de tos después de la exposición se enmendaron antes de la exposición para cumplir con las recomendaciones de USDA. Después de exposición, cada grupo de perros se observó entre el tercer y décimo día después de la exposición, durante un total de 8 días. Los animales se observaron dos veces al día para tos durante aproximadamente 45 minutos en cada período de observación. El intervalo entre períodos de observación era aproximadamente 12 horas. Personal sin conocimiento de los grupos de tratamiento asignados registraron las observaciones de tos.

15

Recogida de sangre

Se recogió sangre para titulaciones de aglutinación antes de la primera vacunación, mensualmente y antes de la exposición para cada grupo.

Se recogió sangre para evaluación ELISA anti-p68 el día antes de la vacunación nº 1 y nº 2, el día 50 y aproximadamente a intervalos de 30 días después de eso para cada grupo. También se recogió sangre el día de exposición y el día final de la observación después de la exposición.

Se recogió sangre para ensayo de amiloide A sérico (SAA) el día de la exposición (antes de la exposición) y los días 1, 3, 5, 7, y 9 después de la exposición para cada grupo.

25

Ensayos realizados sobre las muestras

Se evaluaron hisopos traqueales para la presencia de *B. bronchiseptica* mediante cultivo. Cada hisopo traqueal se sembró por estría sobre una placa de agar selectivo de Bordetella. Se incluyen controles positivos y negativos. Las placas se incubaron a $37,5 \pm 2,5$ °C durante 48 ± 4 horas. Las colonias resultantes en cada placa se compararon con el control positivo y cualquier colonia que parecía idéntica al control positivo se ensayó posteriormente para confirmar la presencia de *B. bronchiseptica*. Los ensayos de confirmación incluyeron el uso de TSI, Citrato y urea agar y medio de rojo nitrato.

Se evaluaron los sueros para titulaciones de aglutinación, análisis de ELISA de p68 o análisis de SAA que usa los siguientes procedimientos:

Titulaciones de aglutinación - Se diluyeron en serie los sueros en placas de microvaloración usando solución salina de Bordetella. Los controles positivos y negativos se incluyeron en cada placa, la cepa 87 de *B. bronchiseptica* (crecida en agar de Bordet Genou, recogida, inactivada y diluida hasta 20% de T a 630 nm) se usó como el antígeno de aglutinación y se añadió a cada pocillo. Las placas se agitaron y se incubaron a $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 2 horas. Las placas se leyeron después de una segunda incubación a temperatura ambiente durante 22 horas. La titulación del punto final se determinó usando el último pocillo que mostraba 50% de aglutinación.

Titulaciones de ELISA de p68 - El antígeno p68 recombinante se capturó en una placa de microvaloración de 96 pocillos revestida con un antisuero policlonal específico para el antígeno p68 de Bordetella. Se añadieron diluciones en serie 2x del suero canino a la placa y se incubaron. Se incluyeron

en cada placa controles positivos y negativos a una dilución 1:1000. Se usó un conjugado indicador de IgG anti - perro de cabra purificado por afinidad marcado con peroxidasa para detectar anticuerpos específicos para el antígeno rp68. Después se añadió un sustrato cromogénico ABTS y la placa se leyó cuando los pocillos de control positivo tenían una D. O. de $1,2 \pm 0,2$. La titulación de una muestra dada se calculó como el recíproco de la última dilución con una densidad óptica mayor que la media de la dilución de suero de control negativo más cinco desviaciones típicas.

Titulaciones SAA - El amiloide A sérico canino se capturó en una placa de microvaloración de 96 pocillos revestida con un anticuerpo monoclonal SAA anti - canino. Muestras diluidas del suero canino se añadieron a la placa y se incubaron. Se añadió un patrón de referencia para obtener una curva patrón de 0,31 ng/ml a 20 ng/ml. Se añadió un conjugado de anticuerpo anti - canino marcado con biotina. Después de la incubación del anticuerpo anti - canino marcado con biotina, se añadió estreptavidina conjugada con peroxidasa. E añadió un sustrato cromogénico TMB y la placa se leyó después de 30 minutos. La concentración de amiloide A sérico se determinó por comparación de la muestra con la curva patrón y multiplicación por el factor de dilución apropiado

20

Resultados

Salvo que se indique otra cosa, los resultados son los datos combinados del grupo I y II.

25

Cultivo de hisopo traqueal y titulaciones de aglutinación

Se demostraron cultivos de hisopo traqueal positivos y/o incrementos de

las titulaciones de aglutinación en once perros durante el curso del estudio. Estos perros y cualquier perro alojado con los perros positivos se retiraron del estudio, dando como resultado la pérdida de 20 perros. El número de perros retirados de cada grupo era: T01 - 4 perros, T02 - 2 perros, T03 - 3 perros, T04
5 - 1 perro, T05 - 5 perros, T06 - 5 perros.

Observaciones en el sitio de inyección

Las reacciones en el sitio de inyección se resumen en las tablas 22 - 25. La información sobre el sitio de inyección no se recogió para el perro 81595 el
10 día 21 para el grupo 1 debido a un descuido técnico. El protocolo se enmendó de manera que los datos de reacción en los sitios de inyección no se recogieron para los perros en el grupo II el día 22 por lo tanto, el sumario de los datos del día 22 contiene solamente información de los ocho perros por grupo de tratamiento en el grupo I. Las reacciones en el sitio de inyección no se
15 observaron para ningún perro que recibía un tratamiento IM. Las mediciones en el sitio de inyección eran mínimas para ambos grupos de tratamiento vacunados SC (T03 y T05).

**Tabla 22. Media de mínimos cuadrados (cm cúbicos) de reacciones
20 en los sitios de inyección en perros después de vacunación con solución salina o p68 de Bordetella (después de la primera vacunación ^a)**

	Tamaño medio (cm cúbicos) ^b
	Día de estudio

193
~~194~~

Tratamiento	1	2	3	4	5	6	7	14
T01 solución salina SC	0	0	0	0	0	0	0	0
T02 solución salina IM	0	0	0	0	0	0	0	0
T03 60 µg SC	5,8	6,4	7,3	6,3	5,0	4,9	2,7	0
T04 60 µg IM	0	0	0	0	0	0	0	0
T05 15 µg SC	4,4	4,6	3,1	2,1	1,2	0,9	0,7	0
T06 15 µg IM	0	0	0	0	0	0	0	0

^a Vacunación nº 1 administrada el día 0
^b Error típico para todas las medias = 0,64

5 **Tabla 23. Media de mínimos cuadrados (cm cúbicos) de reacciones en los sitios de inyección en perros después de vacunación con solución salina o p68 de Bordetella (después de la segunda vacunación ^a)**

Tratamiento	Tamaño medio (cm cúbicos)							
	Día de estudio							
	21 ^b	22 ^c	23 ^b	24 ^b	25 ^b	26 ^b	27 ^b	34 ^b
T01 solución salina SC	0	0	0	0	0	0	0	0
T02 solución salina IM	0	0	0	0	0	0	0	0
T03 60 µg SC	5,0	3,2	4,2	5,8	5,9	5,8	4,3	0,1

194
195

T04 60 µg IM	0	0	0	0	0	0	0	0
T05 15 µg SC	3,7	2,4	2,2	2,6	2,1	2,0	1,6	0
T06 15 µg IM	0 ^d	0	0	0	0	0	0	0

^a Vacunación nº 2 administrada el día 20

^b Error típico para las medias en este día= 0,55

^c Error típico para las medias en este día = 0,70

5 ^d Error típico para T06 el día 21 = 0,57

10 **Tabla 24. Porcentaje de perros que tienen una reacción en el siti de inyección medible después de la vacunación con solución salina o p68 de Bordetella (después de la primera vacunación ^a)**

Tratamiento	Porcentaje de reacción medible								
	n	1	2	3	4	5	6	7	14
T01 solución salina SC	15	0	0	0	0	0	0	0	0
T02 solución salina IM	15	0	0	0	0	0	0	0	0
T03 60 µg SC	15	66,7	73,3	73,3	73,3	73,3	73,3	66,7	0
T04 60 µg IM	15	0	0	0	0	0	0	0	0
T05 15 µg SC	15	73,3	73,3	60,0	60,0	53,3	46,7	46,7	0
T06 15 µg IM	15	0	0	0	0	0	0	0	0

^a Vacunación nº 1 administrada el día 0

Tabla 25. Porcentaje de perros que tienen una reacción en el sitio de inyección medible después de la vacunación con solución salina o p68 de Bordetella (después de la segunda vacunación ^a)

5

Tratamiento	Día de estudio								
	n	21	22 ^b	23	24	25	26	27	34
T01 solución salina SC	15	0	0	0	0	0	0	0	0
T02 solución salina IM	15	0	0	0	0	0	0	0	0
T03 60 µg SC	15	80,0	50,0	66,7	66,7	80,0	80,0	80,0	6,7
T04 60 µg IM	15	0	0	0	0	0	0	0	0
T05 15 µg SC	15	73,3	50,0	73,3	73,3	73,3	73,3	66,7	0
T06 15 µg IM	15	0 ^c	0	0	0	0	0	0	0

^a Vacunación n° 2 administrada el día 0

^b n = 8 para el día 22

^c n = 14 para T06 el día 21

10

Las diferencias significativas en las mediciones de los sitios de inyección se resumen en la tabla 26. Se observó una diferencia significativa en las mediciones de los sitios de inyección entre T01 (solución salina SC) contra T03 (60 µg SC) durante siete días después de la primera vacunación. Se observó una diferencia significativa entre T01 (solución salina SC) y T05 (15 µg SC) durante solamente los primeros cuatro días después de la primera vacunación. Se encontró una diferencia significativa entre T03 (60 µg SC) y T05 (15 µg

SC) los días 3 hasta el 7.En el día 14 (la observación de reevaluación de dos semanas), no se observó diferencia entre ninguno de los grupos.

Se observó una diferencia significativa ($P = 0,0138$) en las mediciones de los sitios de inyección entre T01 (solución salina SC) contra T03 (60 μg SC) y T05 (15 μg SC) durante siete días después de la segunda vacunación. Se observó una diferencia significativa entre T03 (60 μg SC) y T05 (15 μg SC) los días 23 a 27. El día 34 (la observación de reevaluación de dos semanas), no se observó diferencia entre ninguno de los grupos.

Tabla 26. Valores de significación para contrastes *a priori* entre media de mínimos cuadrados de mediciones de reacción en el sitio de inyección.

Día de estudio	Contrastes (tratamiento contra tratamiento)	valor de p
1	T01 contra T03	0,0001
	T01 contra T05	0,0001
2	T01 contra T03	0,0001
	T01 contra T05	0,0001
3	T01 contra T03	0,0001

	T01 contra T05	0,0006
	T03 contra T05	0,0001
4	T01 contra T03	0,0001
	T01 contra T05	0,0214
	T03 contra T05	0,0001
5	T01 contra T03	0,0001
	T03 contra T05	0,0001
6	T01 contra T03	0,0001
	T03 contra T05	0,0001
7	T01 contra T03	0,0031
	T03 contra T05	0,0258
21	T01 contra T03	0,0001
	T01 contra T05	0,0001
22	T01 contra T03	0,0010

	T01 contra T05	0,0166
23	T01 contra T03	0,0001
	T01 contra T05	0,0055
	T03 contra T05	0,0113
24	T01 contra T03	0,0001
	T01 contra T05	0,0008
	T03 contra T05	0,0001
25	T01 contra T03	0,0001
	T01 contra T05	0,0067
	T03 contra T05	0,0001
26	T01 contra T03	0,0001
	T01 contra T05	0,0104
	T03 contra T05	0,0001
27	T01 contra T03	0,0001
	T01 contra T05	0,0475

T03 contra T05	0,0004
----------------	--------

Solamente se presentan contrastes significativos ($p < 0,05$)

Temperatura rectal

Las mediciones de temperaturas rectales se sumarizan en las tablas 27 y 28. El protocolo se enmendó de manera que los datos de temperatura rectal no se recogieran para los perros del grupo II el día 22, por lo tanto, el sumario de los datos del día 22 contiene solamente información de los perros por grupo de tratamiento en el grupo I.

Tabla 27. Media de mínimos cuadrados de temperatura rectal (°C) en perros después de vacunación con solución salina o p68 de Bordetella (después de la primera vacunación *)

Tratamiento	Temperatura rectal (°C) ^b			
	Día de estudio			
	0	1	2	3
T01 solución salina SC	38,5	38,4	38,3	38,2
T02 solución salina IM	38,4	38,2	38,4	38,2
T03 60 µg SC	38,4	38,5	38,2	38,3
T04 60 µg IM	38,4	38,5	38,4	38,4
T05 15 µg SC	38,5	38,5	38,2	38,2

200 204

T06 15 µg IM	38,5	38,4	38,3	38,4
--------------	------	------	------	------

^a Vacunación nº 1 administrada el día 20

^b Error típico = 0,09

5 **Tabla 28. Media de mínimos cuadrados de temperatura rectal (°C) en perros después de vacunación con solución salina o p68 de Bordetella (después de la segunda vacunación ^a)**

Tratamiento	Temperatura rectal (°C)			
	Día de estudio			
	20 ^b	21 ^b	22 ^c	23 ^b
T01 solución salina SC	38,6	38,5	38,3	38,4
T02 solución salina IM	38,6	38,6	38,3	38,4
T03 60 µg SC	38,7	38,6	38,6	38,4
T04 60 µg IM	38,8	38,7	38,5	38,5
T05 15 µg SC	38,6	38,6	38,5	38,4
T06 15 µg IM	38,7	38,7	38,4	38,5

^a Vacunación nº 1 administrada el día 20

10 ^b Error típico = 0,08

^c Error típico = 0,11

Se observó una diferencia significativa en las temperaturas rectales entre T02 (solución salina IM) y T04 (60 µg IM) el día 1 después de la primera

vacunación. No se observó ninguna diferencia significativa en la temperatura rectal entre ningún grupo ningún día después de la segunda vacunación.

Titulaciones ELISA de p68

5 Los datos de ELISA de p68 antes de la exposición se resumen en la tabla 29. Debido a la respuesta de perros del grupo I en T06 el día 19, se observó un defecto debido al grupo en el análisis de datos de las titulaciones de ELISA de p68. El efecto era pequeño y no influenció ningún otro momento analizado. Por lo tanto, los datos del grupo I y II se combinan con el propósito
10 de reseñarlos.

Debido a la considerable respuesta de titulación a p68 en los perros vacunados, se usaron diversos mínimos de titulación en momentos diferentes en el estudio. Las titulaciones para los días -1 y 19 se comenzaron en 50. Para los días 50 a 195, las titulaciones se comenzaron en 200. Las titulaciones para
15 las muestras recogidas el día 201 y 211 se comenzaron en 1000. Cualquier valor reseñado como "menor que" se dividió por 2 antes de análisis. El aumento incremental observado en los valores de ELISA de p68 para los grupos de control (T01 y T02) durante el curso del estudio se debe a estos valores de titulación mínimos. Las titulaciones de aglutinación, excepto como se ha
20 indicado previamente, permanecían < 4 .

Todos los perros vacunados con placebo tenían titulaciones de p68 < 200 el día 50. Todos los perros vacunados con p68 mostraron al menos un incremento de 4 veces en las titulaciones después de la segunda vacunación (día 0 contra el día 50) cuando se compara con los animales vacunados con
25 placebo.

Tabla 29. Media geométrica y errores típicos de las titulaciones de punto final de ELISA de p68 en perros después de vacunación con p68 de Bordetella el día 0 y día 20.

5

Tratamiento	Día de estudio					
	- 1 ^a		19 ^a		50 ^b	
	Media	Error típico	Media	Error típico	Media	Error típico
T01 solución salina SC	31,4	5,08	30,5	4,92	100,0	16,14
T02 solución salina IM	27,7	4,47	25,0	4,03	100,0	16,14
T03 60 µg SC de p68	29,8	4,80	507,8	81,92	10633,5	1715,9
T04 60 µg IM de p68	26,7	4,31	249,7	40,29	4722,2	762,02
T05 15 µg SC de p68	25,0	4,03	268,7	43,36	5622,8	907,35
T06 15 µg IM de p68	33,4	5,40	91,8	14,81	3528,9	569,48

^a titulaciones para los días -1 y 19 se comenzaron en 50. Cualquier valor reseñado como "menor que" se dividía por 2 antes del análisis.

^b titulaciones para el día 50 se comenzaron en 200. Cualquier valor
10 reseñado como "menor que" se dividía por 2 antes del análisis.

203 204

Las diferencias significativas para media de mínimos cuadrados de las titulaciones de ELISA después de la vacunación se enumeran en la tabla 30. No se observó diferencia significativa en las titulaciones de ELISA de p68 entre controles SC y vacunados SC o controles IM o vacunados IM antes de la
5 vacunación (día -1).

Tabla 30. Valores de significación para contrastes a priori entre media de mínimos cuadrados de titulaciones de punto final de ELISA de p68 después de la vacunación.

Día de estudio	Contraste	valor de p
19	T01 contra T03	0,0001
	T01 contra T05	0,0001
	T02 contra T04	0,0001
	T02 contra T06	0,0001
	T03 contra T05	0,0061
	T04 contra T06	0,0001
50	T01 contra T03	0,0001
	T01 contra T05	0,0001
	T02 contra T04	0,0001
	T02 contra T06	0,0001

204 205

	T03 contra T05	0,0059
--	----------------	--------

Solamente se presentan contrastes significativos ($p < 0,05$)

Las titulaciones de ELISA de p68 medidas durante el curso del estudio se resumen en la tabla 31 y se ilustran en la figura 3.

5 Durante el curso del estudio, se hizo todo intento para coordinar las actividades entre los grupos I y II. Para los momentos de recogida de datos centrales (es decir, episodios que rodean la vacunación y exposición), se llevó a cabo esto. En tres casos durante el intervalo del estudio, la recogida de sangre e hisopo traqueal variaba en 1 ó 2 días entre grupos. Con el fin de
10 resumir y reseñar los datos de ELISA de p68 durante este período de intervalo, se combinaron los datos de estos días. Por lo tanto, el día 79 contiene datos combinados del día 79 (grupo I) y día 81 (grupo II), día 111 corresponde al día 110 (grupo II) y día 111 (grupo I) y día 169 corresponde al día 169 (grupo II) y día 170 (grupo I). Por protocolo, el análisis de datos no se realizó sobre los
15 datos de ELISA de p68 más allá del día 50.

Tabla 31. Sumario de la media geométrica de las titulaciones de punto final de ELISA de p68 en perros no vacunados y vacunados c n p68 de Bordetella después de la vacunación y exposición en aerosol con *Bordetella bronchiseptica*

20

Tratamiento	Media geométrica de titulaciones de punto final de ELISA de p68 ^a							
	Día de estudio ^{b,c}							
		79	110	140	169	195	201	211

205
206

T01 solución salina SC	100,00	154,92	106,00	108,59	117,18	109,14	500,0
T02 solución salina IM	112,85	145,33	130,61	115,51	113,43	112,37	500,0
T03 60 µg SC	3434,24	2884,97	1881,64	1895,58	3097,24	2408,61	81584,79
T04 60 µg IM	1508,60	1164,81	933,12	987,64	1142,01	1547,87	58940,47
T05 15 µg SC	1699,20	1511,80	1229,35	1312,62	2248,63	2244,47	29869,29
T06 15 µg IM	974,18	916,21	573,51	876,15	1505,01	1458,16	11503,28

^a Las titulaciones de los días 50 a 195 se comenzaron en 200. Las titulaciones para muestras recogidas el día 201 y 211 se comenzaron en 1000. Cualquier valor reseñado como "menor que" se dividía por 2 antes del análisis.

5 ^b Las vacunaciones nº 1 y nº 2 se administraron el día 0 y 20, respectivamente. La exposición se administró el día 201.

10 ^c Durante el curso del estudio, se realizó todo intento para coordinar las actividades entre los grupos I y II. En tres casos, la recogida de sangre para los grupos variaba en 1 ó 2 días. Los datos de estos días se combinaron para el sumario de datos. El análisis no se hizo sobre los valores de titulación de ELISA de p68 recogidos después del día 50. El día 79 corresponde a los días 79 y 81, el día 110 corresponde al día 110 y 111, el día 169 corresponde al día 169 y 170.

Observaciones de tos

15 La exposición de aerosol para ambos grupos se produjo 181 días después de la segunda vacunación. Para cumplir con las recomendaciones de USDA, los criterios de tos se enmendaron hasta observaciones de aproximadamente 45 minutos, aproximadamente con una separación de doce

horas del tercer al octavo día después de la exposición. Las observaciones de tos se resumen en las tablas 32 y 33.

Tabla 32. Porcentaje medio de momentos de tos en perros n 5 vacunados y vacunados con p68 de Bordetella después de la exposición de aerosol con *Bordetella bronchiseptica*

Tratamiento	Número de perros	Media	Error típico
T01 solución salina SC	11	75,44%	7,73
T02 solución salina IM	13	80,50%	6,64
T03 60 µg de p68 SC	12	67,30%	8,12
T04 60 µg de p68 IM	14	71,81%	7,32
T05 15 µg de p68 SC	10	36,30%	9,19
T06 15 µg de p68 IM	10	39,55%	9,18

Tabla 33. Porcentaje medio de momentos de tos por tratamiento en 10 perros no vacunados y vacunados con p68 de Bordetella después de la exposición de aerosol con *Bordetella bronchiseptica*

Parámetro	Estimación	Error típico
Media de solución salina (T01 y T02)	78,26%	5,28

207208

Media de 60 µg/dosis (T03 y T04)	69,58%	5,68
Media de 15 µg/dosis (T05 y T06)	37,92%	6,70

El porcentaje de reducción en la tos cuando se compara con el control de solución salina era 51,55% para los grupos de 15 µg/dosis y 11,09% para los grupos de 60 µg/dosis. Las diferencias significativas estadísticas se resumen en la Tabla 34.

Tabla 34. Valores de significación para contrastes a priori entre media de mínimos cuadrados para el porcentaje de momentos de tos

Contraste	Valor de p
T01 contra T05	0,0041
T03 contra T05	0,0199
T02 contra T06	0,0019
T04 contra T06	0,0119
T01 y T02 contra T05 y T06	0,0001

10

Solamente se presentan contrastes significativos (p < 0,05)

Amiloide A sérico

Los valores de SAA se determinaron los días 0, 1, 3, 5, 7 y 9 después de la exposición. Los valores de amiloide A sérico se presentan en la tabla 35 y se representan en la figura 4.

5 **Tabla 35. Media geométrica y errores típicos de las titulaciones de amiloide A sérico en perros no vacunados y vacunados con p68 de *Bordetella* después de exposición de aerosol con *Bordetella bronchiseptica*.**

10

Media geométrica y errores típicos de amiloide A sérico												
Día de estudio												
TRT	201		202		204		206		208		210	
	Media	Error típico	Media	Error típico	Media	Error típico	Media	Error típico	Media	Error típico	Media	Error típico
T01	1,1	0,33	257,3	84,61	371,6	116,44	548,7	171,93	68,0	21,31	9,4	2,95
T02	1,0	0,28	114,0	32,83	111,9	32,21	108,9	31,36	15,6	4,48	1,7	0,49
T03	0,8	0,25	135,7	40,55	119,7	35,75	74,5	22,25	10,9	3,38	1,0	0,30
T04	0,8	0,23	134,7	39,20	158,0	43,59	174,8	48,86	34,6	9,67	1,9	0,54
T05	0,8	0,28	68,4	22,85	88,3	29,50	9,3	3,12	1,9	0,64	2,0	0,68
T06	0,8	0,27	45,7	14,94	54,0	17,67	9,4	3,07	1,9	0,63	0,8	0,27

^a La exposición se administró el día 201.

Las diferencias significativas en las titulaciones de SAA se resumen en la tabla 36.

15

209
~~210~~

Tabla 36. Valores de significación para contrastes a priori entre media de mínimos cuadrados de las titulaciones de amiloide A sérico después de la exposición

Día de estudio	Contrastes	valor de p
	(tratamiento contra tratamiento)	
202	T01 contra T05	0,0054
	T02 contra T06	0,0393
	T04 contra T06	0,0154
204	T01 contra T03	0,0097
	T01 contra T05	0,0020
	T04 contra T06	0,0154
206	T01 contra T03	0,0001
	T01 contra T05	0,0001
	T02 contra T06	0,0001
	T03 contra T05	0,0001
	T04 contra T06	0,0001
208	T01 contra T03	0,0001

210
211

	T01 contra T05	0,0001
	T02 contra T06	0,0001
	T03 contra T05	0,0023
	T04 contra T06	0,0001
210	T01 contra T03	0,0002
	T01 contra T05	0,0068

Solamente se presentan contrastes significativos (p < 0,05)

Discusión

- 5
- El estudio se diseñó para demostrar la seguridad y eficacia de seis meses de una vacuna de p68 de Bordetella recombinante en perros. Se demostró la seguridad de tanto la vacuna de 15 µg/dosis como la de 60 µg/dosis. La eficacia y duración de inmunidad de 6 meses de la vacuna de 15 µg/dosis se apoyó bien en el estudio.
- 10
- Se examinó la seguridad usando observaciones de sitios de inyección y temperatura rectal. El análisis de las mediciones de reacción en los sitios de inyección no demostró ninguna reacción en los grupos vacunados IM y reacciones mínimas tanto en los grupos vacunados SC con 15 µg /dosis como con 60 µg/dosis. Las reacciones que se observaron tendían a ser más
- 15
- pequeñas en los perros vacunados 15 µg/dosis SC. Tales reacciones que se habían observado eran transitorias, resolviéndose en general en 14 días o menos. El tamaño de estas reacciones sería lo más probable inadvertido en

perros donde los sitios de inyección estaban sin afeitar. Las temperaturas rectales después de la vacunación eran insignificantes y estaban dentro de los límites normales para todos los perros en todos los grupos.

La eficacia y la duración de la inmunidad se examinaron 181 días desde la vacunación usando observaciones de tos y medición de las titulaciones de punto final de ELISA de p68. El porcentaje de tos en los controles de solución salina (78,26%) indicaba que la exposición administrada a los animales de estudio era aceptable. El porcentaje de los momentos de tos para el grupo de 15 µg/dosis (37,92%) demostró una reducción del 51,55% en la tos cuando se compara con los controles, satisfaciendo los requerimientos de eficacia mandados por la USDA. No se demostró ninguna protección en el grupo de 60 µg/dosis (69,58%) demostrando los perros una reducción mínima en la tos cuando se comparan con los controles.

Aunque no se compara estadísticamente, se puede observar a partir de las tablas 29 y 31 que las vacunas SC tienden a tener respuestas de anticuerpos más altas cuando se comparan con las vacunas IM. Para los propósitos de la discusión, comentarios adicionales con relación a los grupos de dosis diferentes combinan los resultados de las vías IM y SC de administración.

Independientemente de la vía de administración, se demostró una excelente respuesta de anticuerpo de p68 en ambos grupos vacunados el día 50 y se mantuvo en los vacunados a lo largo del curso del estudio. Se observó una buena respuesta de anamnesia en los vacunados después de la exposición.

La comparación de las titulaciones de ELISA de p68 de 15 µg/dosis y 60

µg/dosis durante el curso del estudio indicaba que el grupo de 60 µg/dosis mostraba una respuesta de titulación ligeramente mayor (Figura 3). Esta respuesta, aunque excelente, no se correlacionaba con la protección después de la exposición de aerosol. Las respuestas de la titulación de ELISA de p68
5 eran variables en los perros retirados del estudio con hisopos traqueales positivos o incremento de las titulaciones de aglutinación. Tres de los seis controles que se retiraron del estudio con cultivos de hisopos traqueales positivos y/o incremento de títulos de aglutinación mantenían las titulaciones de ELISA de p68 < 200. Parece que no existe correlación de las titulaciones de
10 ELISA de p68 con el hisopo traqueal o el estado de la titulación de aglutinación de los perros retirados del estudio.

El examen de la respuesta SAA en perros vacunados y no vacunados con p68 de *Bordetella* después de la exposición indicaban un incremento mucho más pequeño en los valores de SAA en los grupos de 15 µg/dosis
15 especialmente los días 5 y 7 después de la exposición.

Conclusiones

En este estudio, se examinó la eficacia de 15 µg/dosis y 60 µg/dosis de una vacuna de p68 de *Bordetella* canina usando un modelo de exposición
20 canino 6 meses después de la vacunación. Ambas vacunas eran seguras como se demuestra por las temperaturas rectales normales y reacciones mínimas en el sitio de inyección. Aunque tanto los perros vacunados con 15 µg/dosis y 60 µg/dosis mostraron buena respuesta sexológica a la vacunación como se mide por las titulaciones de ELISA de p68, la respuesta no se correlacionó con la
25 protección clínica en los perros vacunados con 60 µg/dosis. Los perros

vacunados con 60 µg/dosis no demostraron diferencia significativa en la tos cuando se comparan con los controles no vacunados. Se demostró una buena eficacia de la vacuna de 15 µg/dosis mediante una reducción mayor que 50% en la tos cuando se compara con los controles. Se postula que los niveles incrementados de SDS en la vacuna de 60 µg/dosis puede dar como resultado la diferencia demostrada en protección. La comparación de los valores de SAA demostró una diferencia entre vacunas y controles.

EJEMPLO 4

Seguridad y eficacia de VANGUARD ® más 5/CV-L

VANGUARD ® más 5/CV-L es una preparación secada por congelación de cepas atenuadas de virus CD, CAV-2, virus CPI, CPV, y cultivos enteros inactivados de *L. canicola* y *L. icterohaemorrhagiae*, más una preparación líquida de CCV inactivado con un adyuvante. Todos los virus se propagaron sobre líneas celulares establecidas. La fracción de CPV se atenuó mediante un subcultivo bajo sobre la línea celular canina que le proporcionó las propiedades inmunogénicas capaces de anular la interferencia de anticuerpo materno a los niveles indicados en la tabla 38. El componente líquido se usó para rehidratar el componente secado por congelación, que se había envasado con gas inerte en lugar de vacío.

La evaluación de laboratorio demostró que VANGUARD ® más 5/CV-L inmunizaba a los perros contra enfermedad respiratoria por CD, ICH, CAV-2 y CPI, enteritis provocada por CCV y CPV, y leptospirosis provocada por *L. canicola* y *L. icterohaemorrhagiae*, y que no existía ninguna interferencia

inmunológica entre las fracciones de vacuna. Los ensayos de seguridad del campo extensivo mostró que era seguro y esencialmente sin reacción en perros tan jóvenes como 6 semanas de edad en condiciones de uso normales.

También se demostró que la vacuna CAV-2 protege de manera cruzada
5 contra ICH provocado por CAV-1. Los estudios demostraban que CAV-2 no solamente protegía contra ICH, sino contra enfermedad respiratoria de CAV-2 también. El virus de exposición adenovirus canino de tipo 2 no se recuperó de los perros vacunados con CAV-2 en los ensayos llevados a cabo.

La fracción CPV en VANGUARD @ más 5/CV-L se sometió a ensayo de
10 eficacia y seguridad exhaustivas. Se mostró que era seguro y esencialmente sin reacción en ensayos de laboratorio y en ensayos clínicos en condiciones de campo. Además la seguridad del producto se demostró por un estudio de retrossubcultivo que incluía la administración oral de dosis múltiples de la cepa de vacuna a perros susceptibles, todos los cuales permanecían normales.

15 La investigación demostró que 3 dosis de la vacuna con titulación de virus de CPV aumentada puede superar las titulaciones de neutralización sérica (SN) asociadas al anticuerpo maternal. Se mostró por otras que titulaciones de neutralización de suero tan bajas como 1:4 interferían con la inmunización activa usando vacunas vivas modificadas convencionales. Un
20 ensayo clínico se llevó a cabo con cincuenta cachorros de 6 semanas de edad [25 vacunados (intervalo de titulación SN -256) y 25 controles no vacunados (intervalo de titulación SN 4 - 1024)] (tabla 37). El grupo de vacunados recibía 3 dosis, con las vacunaciones administradas con 3 semanas de separación comenzando a las 6 semanas de edad. Después de la primera vacunación,
25 13/25 cachorros mostraban un incremento de 4 veces o más en la titulación SN

de CPV (seroconversión) (tabla 38). Doce de estos 13 cachorros tenían titulaciones SN maternas $\leq 1:16$ en el momento de la primera vacunación teniendo el cachorro restante una titulación SN de 1:64. Otros 9 cachorros con las titulaciones SN iniciales entre 1:16 y 1:256 fueron seroconvertidos después de la segunda vacunación. Sus titulaciones SN de anticuerpos maternos hablan disminuido hasta $\leq 1:64$ en el momento de la segunda vacunación. De manera similar, los 3 últimos vacunados, con titulaciones SN iniciales de 1:128, fueron seroconvertidos después de la tercera vacunación, después de que su titulación CPV de anticuerpo materno cayó $\leq 1:64$. Por lo tanto, en este estudio, cuando se proporcionaron 3 dosis de vacuna comenzando a las 6 semanas de edad, los 25 vacunados, incluso aquellos con los niveles de anticuerpo maternos más altos, se llegaban a inmunizar de manera activa (GM = 1:1176; intervalo de titulaciones SN 128 - 4096). Los 50 perros se expusieron 3 semanas después de la tercera vacunación con un virus de exposición de CPV heterólogo. Catorce de los 25 perros de control no vacunados murieron o mostraron enfermedad lo suficientemente grave para justificar la eutanasia, mientras que los 25 vacunados permanecían esencialmente sanos. El virus de la vacuna de subcultivo bajo y alta titulación en VANGUARD ® más 5/CV-L era por lo tanto altamente inmunogénica y capaz de estimular la inmunidad activa en presencia de anticuerpos maternos.

La eficacia de la fracción de CCV de VANGUARD ® más 5/CV-L se demostró en un estudio de exposición de vacunación extensivo. Se vacunaron dieciséis cachorros de 7 a 8 semanas de edad con VANGUARD ® más 5/CV-L (vacunados) y 17 con VANGUARD ® más 5/L (controles). Todos los cachorros

277
216

recibieron tres dosis de 1 ml a intervalos de 3 semanas. Tres semanas después de la tercera vacunación, los cachorros se expusieron con una cepa virulenta de CCV (CV-6). Las observaciones clínicas, temperaturas, pesos, y parámetros sanguíneos se controlaron durante 21 días después de la infección. Los
5 vacunados con CCV demostraron una reducción en la aparición de diarrea y en la cantidad de liberación de CCV virulento cuando se compara con los controles. A los 21 días después de la exposición, la tinción con anticuerpo fluorescente para CCV virulento de secciones de intestino delgado demostró una reducción significativa (P) en el antígeno de CCV detectable entre
10 vacunados con CCV y controles (tabla 39).

Tabla 37 Titulaciones de neutralización de suero inicial (SN) de vacunados y controles

Titulaciones SN	Nº de vacunados incluidos	Nº de controles incluidos
< 1:2	3	0
1:4	4	3
1:8	1	3
1:16	4	1
1:32	2	5
1:64	3	1
1:128	6	3

218
217

1:256	2	3
1:512	0	5
1:1024	0	1

Tabla 38. Media geométrica de la titulaciones de neutralización de suero (SN) después de la vacunación (Intervalo) ^a

Grupos	N	Antes de la vacunación	Después de vacunación		
			1	2	3 ^b
Todos los perros vacunados	25	1:24 (< 2 - 256)	1:108 (8 - 1024)	1:605 (8 - 4096)	1:1176 (128 - > 4096)
Respondedores después de la 1ª vacunación	13	1:6 (< 2 - 64)	1:460 (64 - 1024)	1:1745 (256 - 4096)	1:1410 (256 - 4096)
Respondedores después de la 2ª vacunación	9	1:87 (16 - 256)	1:20 (8 - 64)	1:376 (256 - 1024)	1:1625 (256 - 4096)
Respondedores después de la 3ª vacunación	3	1:128 (128)	1:32 (16 - 64)	1:25 (8 - 64)	1:203 (128 - 256)
Perros de control no vacunados	25	1:64 (4 - 1024)	1:9 (< 2 - 64)	1:3 (< 2 - 64)	< 1:2 (< 2 - 4)

5

^a Los perros se vacunaron a las 6, 9 y 12 semanas de edad.

218

^b Titulaciones SN antes de la exposición

Tabla 39. Tinción con anticuerpo fluorescente de secciones de intestino delgado 21 días después de la exposición

5

	Sección del intestino	% de perros positivos para el anticuerpo fluorescente	
		Vacunados	Controles
Duodeno	1	0	89
	2	0	100
	3	0	100
Yeyuno	4	0	89
	5	0	100
	6	12,5	56
Íleon	7	0	78
	8	12,5	78
	9	0	67
	10	12,5	56

Conclusiones

En este estudio, una vacuna de combinación potenciada con adyuvantes

que contiene virus CD, CAV-2, virus CPI, CPV y cultivos enteros inactivados de *L. canicola* y *L. icterohaemorrhagiae* y CCV, se mostró que era tanto segura como eficaz como una vacuna cuando se usa en cachorros. La vacuna de combinación también se mostró que supera las titulaciones de neutralización de suero (SN) asociadas al anticuerpo maternal.

EJEMPLO 5

ESTUDIO DE INMUNOGENICIDAD DE p68 NATIVO DE BORDETELLA **CANINA**

10

Animales

El estudio incluía dos camadas de perros sabuesos SPF y dos camadas de perros de origen aleatorio. Los perros se asignaron al azar a grupos vacunados o no vacunados. El estudio incluía un total de 10 perros vacunados y 11 no vacunados.

Preparación de vacuna experimental

B. bronchiseptica (cepa 110 H) se recogió de placas de extensión de agar sangre Bordet - Gengou de 48 horas lavando la superficie de placa con 5 a 10 ml de tampón de extracción por calor. Como alternativa, las células crecidas en ambos cultivos (Medio definido de Charlotte Parker) se recogieron mediante centrifugación desechando la fracción sobrenadante. Las células recogidas se suspendieron en Tris - HCl 25 mM, pH 8,8 y se incubaron a 60°C durante 1 hora. El desecho celular se separó del extracto por calor mediante centrifugación a 20.000 x g a 4°C durante 30 minutos. Se añadió azida sódica

(0,01%) a la fracción sobrenadante extraída por calor que se clarificó adicionalmente después mediante filtración microporosa.

La resina de afinidad de anticuerpo monoclonal se preparó mediante conjugación de anticuerpo monoclonal (designado Bord 2 - 7) a Sefarosa 4B
5 activada por CNBr usando procedimientos convencionales. Aproximadamente 30,35 mg de anticuerpo monoclonal se conjugó a 1 gramo de resina de afinidad. La fracción sobrenadante extraída por calor clarificada (anterior) y resina de afinidad de Bord 2 - 7 se combinó a una relación aproximada de 1 litro de extracto a 20 ml de resina.

10 La unión del p68 nativo a la resina se facilitó mediante la incubación de la mezcla a temperatura ambiente, con agitación suave, durante toda una noche, seguido de sedimentación de la resina y aspiración de la fracción sobrenadante. Después la resina se empaquetó en una columna de 2,6 cm de diámetro y la columna se lavó secuencialmente con PBS, pH 7,5 y tampón
15 fosfato 10 mM pH 8,0 a una velocidad de flujo de 5 ml/min. Cuando la absorbancia a 280 nm alcanzó un nivel de estado inicial, el material unido se eluyó usando trietilamina 100 mM y las fracciones bajo el único pico grande de absorbancia a 280 nm se recogieron y se ensayaron para evaluar la presencia de p68 por ELISA. Las fracciones que contenían p68 se reunieron y se
20 dializaron contra PBS para retirar la trietilamina.

Una vacuna experimental formulada en serie se formuló para que contuviera aproximadamente 100 microgramos de p68 purificado y 1% de gel de hidróxido de aluminio. Se usó formalina (0,01%) como conservante en un volumen de dosis de vacuna final de 1 ml.

222
221

Inóculo de exposición

El material de exposición se preparó esencialmente como se ha descrito en los ejemplos anteriores.

Procedimiento de estudio

5 Veintiuno (21) cachorros seronegativos y negativos para el cultivo se asignaron al azar a uno de 2 grupos de tratamiento. Once perros se asignaron al grupo no vacunado, de control, y diez perros al grupo vacunado. El día 0 se diseñó como el día de primera vacunación. Un ml de vacuna se administró por vía subcutánea el día 0 y se repitió 21 días después. Se recogió la sangre para
10 ELISA de p68 serológica antes de la primera y segunda vacunación.

El día 35, catorce días después de la segunda vacunación, se administró exposición de aerosol de *B. bronchiseptica* a todos los perros como se ha descrito anteriormente. Los animales se controlaron para evaluar la tos durante 14 días después de la exposición como se ha descrito en los ejemplos
15 previos.

Resultados

El sumario de observaciones clínicas y respuestas serológicas a p68 se presentan en la tabla 40.

20 **Tabla 40. Sumario de observaciones clínicas y respuestas serológicas**

Grupo	N	Número de tos en dos días	Normal/total	Titulación (GMT) antes de la	Titulación (GMT) antes de	Titulación (GMT) después
-------	---	---------------------------------	--------------	------------------------------------	---------------------------------	--------------------------------

223
222

		consecutivos		vacunación	exposición	de exposición
Vacuna	10	0	10/10	5,08	348,15	391,30
Control	11	11	0/11	6,10	6,45	18,81

Discusión

En este estudio, 10 de 10 perros de control tosieron al menos dos días consecutivos. Un perro se considera clínicamente enfermo si tose dos días consecutivos. Mediante este criterio, 100% de los perros de control no vacunados estaban enfermos. En el grupo vacunado, un perro tosió el día 4 después de la exposición y un perro tosió los días 4 y 6 después de la exposición. Dos perros tosieron el día 14. Ninguno de los perros vacunados tosieron durante dos días consecutivos. Por lo tanto, el 100% de los perros en el grupo vacunado con p68 nativo se juzgaron que permanecían normales después de la exposición.

Conclusiones

Este ensayo demuestra la capacidad de una vacuna de p68 nativa para proteger contra enfermedad de *B. bronchiseptica*.

EJEMPLO 6

Eficacia de vacunas caninas multivalentes contra exposición a *Leptospira bratislava*

El propósito de este estudio era demostrar la eficacia de vacunas que contienen fracciones para *Leptospira* serovars bratislava, canicola,

224
223

grippytyphosa, icterohaemorrhagiae y pomona contra exposición a *L. bratislava* en perros.

MATERIALES

Vacunas: Las vacunas usadas eran las siguientes:

- 5 1. Se usó una vacuna liofilizada que comprende antígenos de virus de moquillo canino, adenovirus de tipo 2, parainfluenza y parvovirus. VANGUARD ® PLUS 5). La vacuna contenía niveles de antígeno de liberación. Código de producto 13D1.22.
- 10 2. Se usó una vacuna de coronavirus canino en una formulación de diluyente líquida (FIRSTDOSE ® CV). La vacuna contenía niveles de antígeno de liberación. Código de producto 14P5.20.
- 15 3. Se usó una vacuna liofilizada que comprende antígenos de virus de moquillo canino, adenovirus de tipo 2, parainfluenza, parvovirus, bratislava, canicola, grippytyphosa, icterohaemorrhagiae y pomona. La vacuna contenía aproximadamente 600 neflos de cada *Leptospira* serovar, y niveles de antígeno de liberación de las fracciones de virus vivo modificado (adenovirus canino, virus moquillo canino, virus de parainfluenza, parvovirus). Código de producto 4637.2A.

Animales de estudio: se usaron cachorros sabuesos de aproximadamente 5 - 20 6 semanas de edad de cualquier sexo. Eran seronegativos (< 1:8) a *Leptospira* serovars bratislava, canicola, grippytyphosa, icterohaemorrhagiae y pomona en la vacunación. Se les dejó pienso comercial y agua corriente del sistema de la ciudad a voluntad.

Organismo de exposición: A cada animal se le administró una dosis de 25 aproximadamente 2 ml (dilución 10^{-1} de tejido de hígado de hámster infectado)

225
224

de *Leptospira bratislava* como una inyección intraperitoneal.

Diseño del estudio

Nº de tratamiento	Descripción de vacuna	Vía	Nº de perros	Día de vacunación	Exposición de <i>Leptospira</i> **			Días de recogida de muestra de sangre
					Día	Dosis	Dilución	
T1	Control	SQ	10	0 y 21	49	2 ml	10 ⁻¹	0, 21, 35, 48, 50, 52, 55, 58, 61, 64, 67, 70,
T2	Control	IM	10	0 y 21	49	2 ml	10 ⁻¹	0, 21, 35, 48, 50, 52, 55, 58, 61, 64, 67, 70,
T3	<i>Leptospira</i>	SQ	10	0 y 21	49	2 ml	10 ⁻¹	0, 21, 35, 48, 50, 52, 55, 58, 61, 64, 67, 70,
T4	<i>Leptospira</i>	IM	10	0 y 21	49	2 ml	10 ⁻¹	0, 21, 35, 48, 50, 52, 55, 58, 61, 64, 67, 70,

Procedimientos

5 Fase de vacunación: Los días del estudio 0 y 21, a 40 perros en 4 grupos vacunados (10 animales/grupo) se les proporcionó una inyección de control o de las vacunas de ensayo como se indica más adelante:

10 T1: 1 ml de vacuna control que contenía vacuna de moquillo canino, adenovirus de tipo 2, parainfluenza, parvovirus reconstituida con diluyente de coronavirus canino y proporcionada por inyección subcutánea (SQ). (Código de producto 13D1.22 reconstituido con código de producto 14P5.20).

T2: 1 ml de vacuna control que contenía vacuna de moquillo canino, adenovirus de tipo 2, parainfluenza, parvovirus reconstituida con diluyente de

coronavirus canino y proporcionada por inyección intramuscular (IM). (Código de producto 13D1.22 reconstituido con código de producto 14P5.20).

5 T3: 1 ml de vacuna de *Leptospira* que contenía vacuna de moquillo canino, adenovirus de tipo 2, parainfluenza, parvovirus, bratislava, canicola, grippotyphosa, icterohaemorrhagiae y pomona reconstituida con diluyente de coronavirus canino y proporcionada por inyección SQ. (Código de producto 46J7.2A; una combinación de códigos de productos 4637.2A y 14P5.20)

10 T4: 1 ml de vacuna de *Leptospira* que contenía vacuna de moquillo canino, adenovirus de tipo 2, parainfluenza, parvovirus, bratislava, canicola, grippotyphosa, icterohaemorrhagiae y pomona reconstituida con diluyente de coronavirus canino y proporcionada por inyección IM. (Código de producto 46J7.2A; una combinación de códigos de productos 4637.2A y 14P5.20)

15 Las observaciones después de la vacunación para reacciones sistémicas adversas se realizaron a aproximadamente 1 hora y 5 horas después de la vacunación.

Exposición de *Leptospira*: En los días de estudio 49, los animales de estudio se expusieron mediante una dosis aproximada de 2 ml de *L. bratislava* mediante inyección intraperitoneal.

20 **Recogida de muestras de sangre:** Se recogieron muestras de sangre de animales disponibles en los días de estudio 0, 21, 35, 48, 50, 52, 55, 58, 61, 64, 67 y 70. De manera similar, muestras de plasma se recogieron los días de estudio 48, 50, 52, 55, 58, 61, 64, 67 y 70.

25 **Serología bacteriana:** Muestras de suero obtenidas los días de estudio 0, 21, 35, 48, 58 y 70 se ensayaron mediante un ensayo de microaglutinación para evaluar los anticuerpos en circulación contra *L. bratislava*.

Espiroquetemia: Muestras de plasma obtenidas los días de estudio 48, 50, 52, 55, 58, 61, 64, 67 y 70 se examinaron mediante microscopía de campo oscuro para espiroquetas y se cultivaron para volver a aislar *Leptospira*.

Recuento de sangre completo / Panel de química de suero: Muestras de plasma obtenidas los días de estudio 48, 50, 52, 55, 58, 61, 64, 67 y 70 se ensayaron para, pero sin limitación, recuento de plaquetas y velocidad de sedimentación. Se ensayaron muestras de suero, obtenidas a esos mismos intervalos para evaluar, pero sin limitación, amilasa, alanina aminotransferasa (ALT), aspartato aminotransaminasa (AST) y creatinina. Una CBC biometría hemática completa y velocidad de sedimentación no se completó para dos animales (números QPH3, RVG3) el día de estudio 55, para un animal (Nº RBH3) el día de estudio 58, para 3 animales (Números OLH3, OUH3, PTG3) el día de estudio 61, ni para un animal (Nº OWG3) el día de estudio 70 debido a que la muestra de plasma recogida se coaguló antes de ensayo. El día de estudio 67, no se completó una velocidad de sedimentación para 2 animales (números OUH3, SAG3) debido a que la cantidad de la muestra de plasma era insuficiente para ensayar. Esos resultados no tuvieron impacto en estos parámetros de estudio.

Temperaturas corporales rectales: Las temperaturas corporales rectales se registraron los días de estudio 47 - 70. Después de la exposición (día de estudio 50), una temperatura corporal elevada de $\geq 39,2^{\circ}\text{C}$ se consideró indicadora de leptospirosis.

Cultivos de orina: Muestras de orina obtenidas los días de estudio 48, 55 y 70 se cultivaron para *Leptospira*, y se sometieron a análisis de orina. El día del estudio 48, no se completó un análisis de orina para un animal (Nº

CBC3) ya que la cantidad de orina disponible en la recogida era insuficiente para ensayo. El día de estudio 55, no se completó un análisis de orina para 2 animales (Nº OPH3, RXG3) ya que la cantidad de orina disponible en la recogida era insuficiente para ensayo. El día de estudio 70, no se completó un análisis de orina para 10 animales (Números OYG3, PIG3, PUG3, QHG3, QQH3, QSG3, RDG3, RUG3, RVG3, RYG3) ya que las cantidades de orina disponibles en la recogida eran insuficientes para ensayo. Esos resultados no tuvieron impacto en estos parámetro de estudio.

Necropsia y aislamiento de Leptospira: Los animales sacrificados durante o a la finalización del período después de la exposición se sometieron a necropsia. Los fluidos corporales y tejido (es decir, hígado, riñón y orina) se recogieron y se sometieron a BCL para volver a aislar Leptospira . El día de estudio 55, no se completó el re-aislamiento bacteriano para 2 animales (Nº OPH3, RXG3) ya que la cantidad de orina disponible en la recogida era insuficiente para ensayo. El día de estudio 70, el re - aislamiento de bacterias no se completó para 4 animales (Números OYG3, PUG3, QSG3, RUG3) ya que las cantidades de orina disponibles en la recogida eran insuficientes para ensayo. Esos resultados no tenían impacto en este parámetro de estudio.

Observación de salud: Los animales se controlaron diariamente para evaluar el estado de salud general

SUMARIO DE DATOS Y ANÁLISIS

Se analizaron datos con un modelo mixto o procedimiento de categoría (Cambios y Mejoras de Software SAS/STAT mediante la edición 6.12, SAS Institute, Cary, North Carolina).

Se usó un modelo mixto de mediciones repetidas lineales generales (los

términos de modelo de efecto fijo son tratamiento, día de estudio, y tratamiento por día de estudio) para analizar temperatura, titulaciones de anticuerpo de suero, recuento de plaquetas en sangre, velocidad de sedimentación, amilasa, alanina aminotransferasa (ALT), aspartato aminotransaminasa (AST) y creatinina. Se realizaron contrastes de interés después de la detección de un tratamiento significativo ($P \leq 0,05$) o efecto de interacción de tratamiento por día de estudio. Las titulaciones se transformaron logarítmicamente según se requirió para análisis, y cuando estaban transformadas, las medias de mínimos cuadrados se volvieron a transformar en medias geométricas para presentación. Las observaciones no analizadas (es decir, resultados de necropsia y observaciones después de la vacunación) no se introdujeron en la base de datos para el sumario.

Las distribuciones de frecuencia de animales con recuentos de plaquetas < 200 al menos una vez y los animales con temperaturas rectales mayores que o iguales que $39,2^{\circ}\text{C}$ se calcularon para cada tratamiento.

Los animales se clasificaron como normales o enfermos en cada día después de la exposición durante el estudio. La presencia de cualquiera de los signos siguientes dió como resultado una clasificación de enfermedad: conjuntivitis, depresión, inapetencia, temblores musculares, descarga nasal, pirexia ($\geq 39,2^{\circ}\text{C}$) u ojos llorosos.

Se usó un modelo mixto lineal general (término de modelo de efecto fijo es tratamiento) para analizar el número de días después de la exposición que un animal se clasificó como enfermo. La variable binomial muerto o sacrificado se analizó con el ensayo Exacto de Fisher. Espiroquetemia, y re - aislamiento de bacterias en la orina, riñón e hígado se analizaron usando ensayo exacto de

Fisher para comparar grupos de tratamiento.

En la ausencia de una diferencia significativa entre las vías de administración y la interacción de vía por tratamiento ($P \leq 0,05$ de dos colas), se usaron los contrastes para comparar la media de tratamientos T1 y T2 con el promedio de tratamientos T3 y T4 ($P \leq 0,05$ de una cola). Si el análisis era un análisis de mediciones repetidas, entonces se recogía la comparación que se hacía en cada momento. De lo contrario, se usaron contrastes para comparar T1 con T3 y T2 con T4 ($P \leq 0,05$ de una cola). Estas comparaciones se realizaron en cada momento si el análisis era una repetición de medidas.

La eficacia de la vacuna de *Leptospira* contra *L. bratislava* se demostró mediante una incidencia inferior ($P \leq 0,05$, de una cola) de enfermedad en los animales vacunados. Las siguientes variables apoyan la eficacia de la vacuna de *Leptospira*: (1) El recuento de plaquetas medio era significativamente ($P \leq 0,05$, de una cola) mayor para los vacunados; (2) La velocidad de sedimentación media era significativamente ($P \leq 0,05$, de una cola) menor para los vacunados; (3) La incidencia de espiroquetemia se reducía significativamente ($P \leq 0,05$, de una cola) para los vacunados.

RESULTADOS

Signos clínicos después de la exposición: El número medio de días que los animales de ensayo mostraban signos clínicos indicativos de leptospirosis (por ejemplo, conjuntivitis, depresión, diarrea, hematuria, ictericia, inapetencia, moribundo, temblores musculares, pirexia, vómitos) se presenta en la Tabla 1. Después de la exposición (días de estudio 50 - 70), el número medio de días que los controles T1 y T2 estaban enfermos era 4,3 y 3,3 respectivamente. Recíprocamente, las medias para los vacunados T3 y T4

eran 0,7 y 0,5, y esos resultados estaban significativamente mejorados ($P < 0,05$) cuando se comparan con los controles T1 - T2. El porcentaje de animales que presentan signos clínicos después de la exposición también se proporciona en la tabla 1. Signos de Leptospirosis fueron mostrados por el 75% de los
5 controles T1 - T2, mientras que signos similares se observaron en solamente 30% de los vacunados T3 - T4. El número de animales infectados que requieren eutanasia durante la fase de exposición del estudio también se presenta en la tabla 1. Cinco animales (25%) en los grupos de control T1 - T2 mostraron graves signos de leptospirosis y se sacrificaron. Recíprocamente, los
10 vacunados T3 - T4 permanecían por otra parte sanos durante el mismo intervalo, y esa comparación (T1 T2 contra T3 - T4) se mejoraba significativamente ($P < 0,05$) para los vacunados. Una representación de temperaturas medias corporales después de la exposición se presenta en la tabla 2. Durante los 9 días iniciales después de la exposición (días de estudio
15 50 - 58), las temperaturas medias para los controles T1 - T2 variaban entre 37,8 y 39,4°C. Durante el mismo intervalo, las temperaturas medias para los vacunados T3 - T4 variaban entre 38,2 y 38,7°C. De manera notable, las temperaturas medias para los vacunados T3 - T4 eran significativamente menores ($P < 0,05$) los días 2, 3 y 5 después de la exposición cuando se
20 compara con las temperaturas medias T1 - T2. La frecuencia de animales con al menos una temperatura $\geq 39,2^{\circ}\text{C}$ también se presenta en la tabla 2. Una temperatura corporal elevada de $\geq 39,2^{\circ}\text{C}$ se consideró indicativo de infección por Leptospira. Durante el curso del período de observación después de la exposición, 60 - 70% de los controles T1 - T2 presentaban una temperatura de
25 $\geq 39,2$. Recíprocamente, solamente el 30% de los vacunados T3 - T4

presentaban ese signo clínico.

Espiroquetemia después de la exposición: La frecuencia de espiroquetemia se presenta en la tabla 3. La presencia de espiroquetas en la sangre (detectada mediante cultivo bacteriano) es un resultado clínico que demuestra leptospirosis. Un día después de la exposición (día de estudio 50), se estableció espiroquetemia en el 90% de los controles T1, el 60% de los controles T2, el 60% de los vacunados T3 y el 70% de los vacunados T4. Se esperaba el re - aislamiento bacteriano de la sangre a las 24 horas después de las inyecciones intraperitoneales independientemente del estado de la vacunación. Por lo tanto, se estableció espiroquetemia para los controles T1 como sigue: 100% el día 3 después de la exposición (día de estudio 52), 56% el día 6 (día de estudio 55) y 33% el día 9 (día de estudio 58). De manera similar, se estableció espiroquetemia para los controles T2 como sigue: 60% el día 3 después de la exposición, 50% el día 6 y 29% el día 9 . Recíprocamente, no se estableció en los vacunados T3 - T4 durante el mismo período después de la exposición ni durante el resto del período después de la exposición (es decir, días de estudio 50 - 70).

En conjunto, el porcentaje de animales que eran positivos para espiroquetemia incluyendo un día después de exposición (días de estudio 50 - 70) era de 60% - 100% para los controles T1 - T2 y 60 - 70% para los vacunados T3 - T4. Por el contrario, el porcentaje de animales que eran positivos excluyendo un día después de la exposición (días de estudio 52 - 70) era de 60% - 100% para los controles T1 - T2 y 0% para los vacunados T3 - T4.

Re - aislamiento de Leptospira a partir de fluidos corporales y

tejidos después de la exposición:

El re – aislamiento de *Leptospira* a partir de muestras de sangre, orina, riñón e hígado se presenta en la tabla 4. Un resumen de los resultados de re - aislamiento de *Leptospira* a partir de sangre se proporciona en la sección 5 precedente. Comenzando 3 días después de la exposición (es decir, excluyendo el día 1 después de la exposición), se estableció espiroquetemia en el 60 - 100% de los controles T1 - T2, y no se estableció en los vacunados T3 - T4 durante el mismo período. De manera notable, esa comparación (T1 - T2 contra T3 - T4) se mejoraba significativamente ($P < 0,05$) para los vacunados.

10 Se recogieron muestras de riñón en la necropsia. Se volvió a aislar *Leptospira* del 50% de las muestras de riñón obtenidas de los controles T1 y T2 respectivamente. No se volvió a aislar a partir de las muestras derivadas de los vacunados T3 - T4. Esa comparación (T1 - T2 contra T3 - T4) se mejoraba significativamente ($P < 0,05$) para los vacunados.

15 Se recogieron muestras de hígado en la necropsia. Se volvió a aislar *Leptospira* del 10% y 20% de las muestras de hígado obtenidas de los controles T1 y T2. No se volvió a aislar a partir de las muestras derivadas de los vacunados T3 - T4. Esa comparación (T1 - T2 contra T3 - T4) se mejoraba significativamente ($P < 0,05$) para los vacunados

20 Se recogieron muestras de orina en 2 intervalos después de la exposición y en la necropsia. Se volvió a aislar *Leptospira* a partir de 2 controles T1 6 días después de la exposición (día de estudio 55). No se volvió a aislar *leptospira* a partir de ninguna muestra para los controles T2 ni para los vacunados T3 - T4.

25 **Recuentos de plaquetas después de la exposición:** Los recuentos

medios de plaquetas se presentan en la tabla 5. Una disminución en el número de plaquetas en sangre (trombocitopenia) es un resultado clínico indicativo de la leptospirosis. Las concentraciones medias para los controles T1 - T2 variaban entre 61 y 937. Durante el mismo intervalo, los recuentos medios para los vacunados T3 - T4 variaban entre 400 y 566. De manera notable, los recuentos de plaquetas para los vacunados T3 - T4 se mejoraban significativamente ($P < 0,05$) los días 3, 6 y 9 después de la exposición cuando se compara con los controles T1 - T2.

La frecuencia de animales con al menos un recuento de plaquetas < 200 también se presenta en la tabla 5. Durante el curso del período después de la exposición, el 90% de los controles T1 y el 60% de los controles T2 se determinaron que eran trombocitopénicos (recuento de plaquetas < 200). Recíprocamente, solamente el 10% de los vacunados T3 y ninguno de los vacunados T4 eran trombocitopénicos después de la infección.

Velocidades de sedimentación después de exposición: Las velocidades medias de sedimentación se presentan en la tabla 6. Un incremento en la velocidad de sedimentación es un resultado clínico indicativo de leptospirosis.

Las velocidades medias para los controles T1 - T2 variaban entre 2,4 y 16,0. Durante el mismo intervalo, las velocidades medias para los vacunados T3 - T4 variaban entre 1,5 y 6,3. De manera notable, las velocidades para los vacunados T3 - T4 eran significativamente menores ($P < 0,05$) los días 3, 6, 9, 12, 15, 18 y 21 después de la exposición cuando se compara con los controles T1 - T2.

Concentraciones ALT después de la exposición: Las

- concentraciones medias de alanina aminotransferasa (ALT) se presentan en la tabla 7. Un incremento en ALT es un resultado clínico indicativo de la infección bacteriana (es decir, a medida que la función del hígado se deteriora, los niveles de ALT aumentan). Las concentraciones medias para los controles T1 -
- 5 T2 variaban entre 22 y 79. Durante el mismo intervalo, las concentraciones medias para los vacunados T3 - T4 variaban entre 21 y 61. De manera notable, las concentraciones para los vacunados T3 - T4 eran significativamente menores ($P < 0,05$) los días 3, 6, 9 y 12 después de la exposición cuando se compara con los controles T1 - T2.
- 10 **Concentraciones de creatinina después de la exposición:** Las concentraciones medias de creatinina se presentan en la tabla 8. Un incremento en las concentraciones de creatinina es un resultado clínico indicativo de la infección bacteriana (es decir, a medida que la función del riñón se deteriora debido a la leptospirosis, los niveles de creatinina aumentan). Las
- 15 concentraciones medias para los controles T1 (es decir, administración SQ) variaban entre 0,30 y 0,99. Durante el mismo intervalo, las concentraciones medias para los vacunados T3 (es decir administración SQ) variaba entre 0,26 y 0,40. De manera notable, las concentraciones para los vacunados T3 eran significativamente menores ($P < 0,05$) los días 1, 6, 9, 12, 15 18 y 21 después
- 20 de la exposición cuando se compara con los controles T1. Las concentraciones medias para los controles T2 (es decir, administración IM) variaban entre 0,30 y 1,31. Durante el mismo intervalo, las concentraciones medias para los vacunados T4 (es decir, administración IM) variaba entre 0,32 y 0,46. No existían diferencias significativas entre los valores T2 y T4 después de la
- 25 exposición.

~~225~~
235

Amilasa, AST y análisis de orina después de la exposición: No había diferencias significativas en las concentraciones medias para los vacunados T3 - T4 cuando se compara con los controles T1 - T2. Sin embargo, en general las concentraciones después de la exposición se incrementaron más drásticamente para los controles T1 - T2. En general no se observaron cambios después de la exposición en AST (aspartato aminotransaminasa) ni en los resultados de orina para los animales de ensayo T1 - T4. Los resultados para estos 3 parámetros no se tabulan por otra parte en esta memoria descriptiva.

10 **Titulaciones de anticuerpos en suero:** Las titulaciones medias de anticuerpos de L. bratislava en suero se presentan en la tabla 9. Durante la fase de vacunación de la investigación (días de estudio 0 - 48), las titulaciones medias para los controles T1 - T2 eran aproximadamente 2 (es decir, seronegativos). De manera correspondiente, las medias para los vacunados T3 - T4 variaban entre 2 (antes de la vacunación) y 1181 (después de la vacunación). De manera notable, las titulaciones medias para los vacunados T3 - T4 eran significativamente mayores ($P < 0,05$) los días 21, 35 y 48 después de la vacunación cuando se compara con las titulaciones medias T1 - T2.

20 Durante la fase de exposición de la investigación (días de estudio 58 y 70), las titulaciones medias para los controles T1 - T2 variaban entre 2135 y 41160. De manera correspondiente, las titulaciones medias para los vacunados T3 y T4 variaban entre 727 y 10891, y eran significativamente menores ($P < 0,05$) los días del estudio 58 (es decir, 9 días después de la exposición) y 70 días después de la vacunación (es decir, día 21 PC) cuando se compara con

25

los controles T1 - T2. Como resultado, los controles demostraron una respuesta primaria notable a *L. bratislava* después de la exposición (es decir, infección establecida), mientras que la respuesta para los vacunados T3 - T4 era menos fuerte (es decir, respuesta de anamnesia típica).

- 5 **Reacciones sistémicas después de la vacunación:** No se observaron reacciones sistémicas después de la vacuna en los animales de ensayo T1 - T4 cuando se evalúa a aproximadamente 1 y 5 horas después de las vacunaciones primaria y de recuerdo. Ese resultado no está tabulado en esta memoria descriptiva.

10

CONCLUSIÓN

- La eficacia de una vacuna de *Leptospira* multivalente proporcionada por inyección SQ o IM contra *L. bratislava* se demostró después de la exposición por, entre otros: (1) una incidencia significativamente menor de enfermedad asociada a *Leptospira*, (2) una incidencia significativamente inferior de espiroquetemia, (3) recuentos de plaquetas significativamente mayores, y (4) velocidades de sedimentación medias significativamente menores, cuando se compara con los controles.

20

42
TABLA 41 Sumari de signos clínicos después de la exposición con L bratislava para perros inmunizados con un control o vacuna de Leptospira multivalente

Tratamiento (grupo vacunado)		N° de animales expuestos	Número de días que muestran signos clínicos de Leptospirosis después de exposición			Porcentaje de animales con signos clínicos después de exposición †	Porcentaje de animales infectados que requieren eutanasia †
			Media †	Mínimo	Máximo		
T1	Control (SQ)	10	4.3	0	9	90% N = 9/10	10% N = 1/10
T2	Control (IM)	10	3.3	0	10	60% N = 6/10	40% N = 4/10
T3	Lepto vacuna (SQ)	10	0.7	0	4	30% N = 3/10	0% N = 0/10
T4	Lepto vacuna (IM)	10	0.5	0	3	30% N = 3/10	0% N = 0/10

† Porcentaje o medias de mínimos cuadrados de tratamiento. La media de los controles (T1 T2) es significativamente diferente ($P \leq 0.05$) del promedio de los vacunados (T3 T4)

237

TABLA 42 Media de temperaturas corporales después de la exposición con L. bratislava para perros inmunizados con un control o vacuna de Leptospira multivalente

Tratamiento (grupo vacunado)		Temperaturas medias por día de estudio ** (día después de exposición)										Frecuencia (%) con una temperatura ≥ 39.2°C
		49 (0)	50 (1)	51 (2) †	52 (3) †	53 (4)	54 (5) †	55 (6)	56 (7)	57 (8)	58 (9)	
T1	Control (SQ)	38.1 N = 10	38.6 N = 10	39.4 N = 10	38.9 N = 10	38.5 N = 10	38.8 N = 9	38.6 N = 9	38.2 N = 9	38.2 N = 9	38.3 N = 9	70 N = 7/10
T2	Control (IM)	38.3 N = 10	38.5 N = 10	39.4 N = 10	38.9 N = 10	38.7 N = 10	38.6 N = 8	38.3 N = 8	37.8 N = 8	38.2 N = 7	38.1 N = 7	60 N = 6/10
T3	Lepto vacuna (SQ)	38.2 N = 10	38.4 N = 10	38.5 N = 10	38.3 N = 10	38.7 N = 10	38.5 N = 10	38.5 N = 10	38.2 N = 10	38.5 N = 10	38.4 N = 10	30 N = 3/10
T4	Lepto vacuna (IM)	38.2 N = 10	38.5 N = 10	38.5 N = 10	38.3 N = 10	38.5 N = 10	38.5 N = 10	38.3 N = 10	38.3 N = 10	38.4 N = 10	38.6 N = 10	30 N = 3/10

5 ** Medias de mínimos cuadrados de tratamiento N = numero de animales o numero con una temperatura después de exposición ≥ 39.2°C / numero de animales

 † El promedio de los controles (T1 T2) es significativamente diferente ($P \leq 0.05$) del promedio de los vacunados (T3 T4)

238

TABLA 43 Frecuencia de espiroquetemia después de la exposición con L. bratislava para perros inmunizados con un control o vacuna de Leptospira multivalente

Tratamiento (grupo vacunado)		Frecuencia (%) de espiroquetemia por día de estudio ** (día después de exposición)								
		48 (- 1)	50 (1)	52 (3)	55 (6)	58 (9)	61 (12)	64 (15)	67 (18)	70 (21)
T1	Control (SQ)	0 N = 0/10	90 N = 9/10	100 N = 10/10	56 N = 5/9	33 N = 3/9	0 N = 0/9	0 N = 0/9	0 N = 0/9	0 N = 0/9
T2	Control (IM)	0 N = 0/10	60 N = 6/10	60 N = 6/10	50 N = 4/8	29 N = 2/7	0 N = 0/6	0 N = 0/6	0 N = 0/6	0 N = 0/6
T3	Lepto vacuna (SQ)	0 N = 0/10	60 N = 6/10	0 N = 0/10	0 N = 0/10	0 N = 0/10	0 N = 0/10	0 N = 0/10	0 N = 0/10	0 N = 0/10
T4	Lepto vacuna (IM)	0 N = 0/10	70 N = 7/10	0 N = 0/10	0 N = 0/10	0 N = 0/10	0 N = 0/10	0 N = 0/10	0 N = 0/10	0 N = 0/10

5

** N = numero de positivos para espiroquetemia / numero de animales

239

TABLA 44 Frecuencia de re – aislamiento de Leptospira a partir de fluidos corporales y tejidos después de la exposición con L bratislava para perros inmunizados con un control o vacuna de Leptospira multivalente

Tratamiento (grupo vacunado)		Frecuencia (%) de re aislamiento de Leptospira a partir de fluidos corporales y tejidos **				
		Sangre †		Orina	Riñón ††	Hígado ††
		Incluyendo el día + 1 después de exposición	Excluyendo el día + 1 después de exposición ††			
T1	Control (SQ)	100 N = 10/10	100 N = 10/10	22 N = 2/9	50 N = 5/10	10 N = 1/10
T2	Control (IM)	60 N = 6/10	60 N = 6/10	0 N = 0/7	50 N = 5/10	20 N = 2/10
T3	Lepto vacuna (SQ)	60 N = 6/10	0 N = 0/10	0 N = 0/10	0 N = 0/10	0 N = 0/10
T4	Lepto vacuna (IM)	70 N = 7/10	0 N = 0/10	0 N = 0/10	0 N = 0/10	0 N = 0/10

5 ** N = número de positivos para espiroquetemia / número de animales
 † Bacterias esperadas en el torrente sanguíneo 24 horas después de la inyección intrapentoneal Independientemente del estado de la vacunación Por lo tanto los datos de re aislamiento también se resumen excluyendo los resultados obtenidos el día 1 después de la exposición (día de estudio 50)
 †† El promedio de los controles (T1 T2) es significativamente diferente ($P \leq 0.05$) del promedio de los vacunados (T3 T4)

241

TABLA 45 recuentos medios de plaquetas después de la exposición con L. bratislava para perros inmunizados con un control o vacuna de Leptospira multivalente

Tratamiento (grupo vacunado)		Recuentos medios de plaquetas por día de estudio ** (día después de exposición)									Frecuencia (%) con un recuento de plaquetas < 200
		48 (1)	50 (1)	52 (3) †	55 (6) †	58 (9) †	61 (12)	64 (15)	67 (18)	70 (21)	
T1	Control (SQ)	534 N = 10	426 N = 10	61 N = 10	128 N = 8	499 N = 8	937 N = 9	724 N = 9	586 N = 9	490 N = 8	90 N = 9/10
T2	Control (IM)	549 N = 10	451 N = 10	174 N = 10	204 N = 8	480 N = 7	738 N = 5	735 N = 6	604 N = 6	498 N = 6	60 N = 6/10
T3	Lepto vacuna (SQ)	557 N = 10	450 N = 10	463 N = 10	560 N = 10	538 N = 10	506 N = 9	490 N = 10	458 N = 10	465 N = 10	10 N = 1/10
T4	Lepto vacuna (IM)	521 N = 10	442 N = 10	400 N = 10	552 N = 9	566 N = 10	483 N = 9	478 N = 10	472 N = 10	472 N = 10	0 N = 0/10

5 ** Medias de mínimos cuadrados de tratamiento N = número de animales o número con un recuento de plaquetas después de exposición < 200 / número de animales
 † El promedio de los controles (T1 T2) es significativamente diferente ($P \leq 0.05$) del promedio de los vacunados (T3 T4)

242

TABLA 48 Velocidades medias de sedimentación después de la exposición con L. bratislava para perros inmunizados con un control o vacuna de Leptospira multivalente

Tratamiento (grupo vacunado)		Velocidades medias de sedimentación por día de estudio ** (día después de exposición)								
		48 (1)	50 (1)	52 (3) †	55 (6) †	58 (9) †	61 (12) †	64 (15) †	67 (18) †	70 (21) †
T1	Control (SQ)	1 3 N = 10	6 7 N = 10	10 4 N = 10	9 0 N = 8	6 8 N = 8	4 5 N = 9	4 6 N = 9	3 0 N = 9	2 4 N = 8
T2	Control (IM)	1 2 N = 10	5 7 N = 10	10 2 N = 10	9 7 N = 8	16 0 N = 7	5 9 N = 5	5 1 N = 6	3 6 N = 6	3 3 N = 6
T3	Lepto vacuna (SQ)	1 1 N = 10	5 3 N = 10	2 9 N = 10	3 0 N = 10	3 3 N = 10	2 3 N = 9	2 1 N = 10	1 9 N = 9	1 5 N = 10
T4	Lepto vacuna (IM)	1 3 N = 9	6 3 N = 10	3 8 N = 10	4 3 N = 9	3 9 N = 10	2 0 N = 9	2 4 N = 10	2 5 N = 9	2 1 N = 10

5

** Medias de mínimos cuadrados de tratamiento N = número de animales
† El promedio de los controles (T1 T2) es significativamente diferente ($P \leq 0.05$) del promedio de los vacunados (T3 T4)

10

242

TABLA 47 Concentraciones medias de ALT (alanina aminotransferasa) después de la exposición con L. bratislava para perros inmunizados con un control o vacuna de Leptospira multivalente

Tratamiento (grupo vacunado)		Concentraciones de ALT por día de estudio ** (día después de exposición)								
		48 (1)	50 (1)	52 [†] (3)	55 [†] (6)	58 [†] (9)	61 [†] (12)	64 (15)	67 (18)	70 (21)
T1	Control (SQ)	33 N = 10	66 N = 10	79 N = 10	32 N = 9	34 N = 9	28 N = 9	24 N = 9	22 N = 9	24 N = 9
T2	Control (IM)	35 N = 10	60 N = 10	63 N = 10	30 N = 8	32 N = 7	34 N = 6	26 N = 6	24 N = 6	24 N = 6
T3	Lepto vacuna (SQ)	30 N = 10	57 N = 10	27 N = 10	22 N = 10	23 N = 10	22 N = 10	23 N = 10	21 N = 10	22 N = 10
T4	Lepto vacuna (IM)	32 N = 10	61 N = 10	30 N = 10	22 N = 10	25 N = 10	26 N = 10	26 N = 10	24 N = 10	25 N = 10

5

** Medias de mínimos cuadrados de tratamiento N = número de animales
[†] El promedio de los controles (T1 T2) es significativamente diferente ($P \leq 0.05$) del promedio de los vacunados (T3 T4)

DA

TABLA 48 Concentraciones medias de creatinina después de la exposición con L. bratislava para perros inmunizados con un control o vacuna de Leptospira multivalente

Tratamiento (grupo vacunado)		Concentraciones medias de creatinina por día de estudio ** (día después de exposición)								
		48 (1)	50 (1)	52 (3)	55 (6)	58 (9)	61 (12)	64 (15)	67 (18)	70 (21)
T1	Control (SQ)	0.32 ^a N = 10	0.33 ^a N = 10	0.30 ^a N = 10	0.80 ^a N = 9	0.99 ^a N = 9	0.70 ^a N = 9	0.63 ^a N = 9	0.52 ^a N = 9	0.39 ^a N = 9
T3	Lepto vacuna (SQ)	0.31 ^a N = 10	0.26 ^b N = 10	0.32 ^a N = 10	0.37 ^b N = 10	0.39 ^b N = 10	0.33 ^b N = 10	0.40 ^b N = 10	0.36 ^b N = 10	0.27 ^b N = 10
T3	Control (IM)	0.31 ^a N = 10	0.33 ^a N = 10	0.30 ^a N = 10	1.31 ^a N = 8	1.08 ^a N = 7	0.51 ^a N = 6	0.51 ^a N = 6	0.42 ^a N = 6	0.30 ^a N = 6
T4	Lepto vacuna (IM)	0.33 ^a N = 10	0.32 ^a N = 10	0.33 ^a N = 10	0.41 ^a N = 10	0.43 ^a N = 10	0.36 ^a N = 10	0.46 ^a N = 10	0.39 ^a N = 10	0.32 ^a N = 10

5

** Medias de mínimos cuadrados de tratamiento N = número de animales

^{a, b} Los valores en columnas (para T1 contra T3 y T2 contra T4) con diferentes superíndices son significativamente diferentes (P ≤ 0.05)

28

TABLA 49 Titulaciones medias en suero de anticuerpos de L. bratislava para perros inmunizados con un control o vacuna de Leptospira multivalente

Tratamiento (grupo vacunado)		Titulaciones medias de anticuerpos de L. bratislava ** (día de estudio después de vacunación)					
		0	21 [†]	35 [†]	48 [†]	58 [†]	70 [†]
T1	Control (SQ)	2 N = 10	3 N = 10	2 N = 10	2 N = 10	41160 N = 9	4770 N = 9
T2	Control (IM)	2 N = 10	2 N = 10	2 N = 10	3 N = 10	22571 N = 7	2135 N = 6
T3	Lepto vacuna (SQ)	2 N = 10	58 N = 10	1032 N = 10	159 N = 10	10891 N = 10	1108 N = 10
T4	Lepto vacuna (IM)	2 N = 10	97 N = 10	1181 N = 10	257 N = 10	8819 N = 10	727 N = 10

5

** Medias geométricas de tratamiento N = número de animales
[†] El promedio de los controles (T1 T2) es significativamente diferente ($P \leq 0.05$) del promedio de los vacunados (T3 T4)

245

Habiendo descrito la invención como antecede se declara como propiedad lo contenido en las siguientes reivindicaciones:

1. Una composición de vacuna que comprende una preparación de células
5 *Leptospira* de *Leptospira bratislava* y un vehículo.
2. La composición de vacuna de la reivindicación 1 en la que la cantidad de *Leptospira bratislava* está en el intervalo de aproximadamente 100 - 3500 unidades nefelométricas por dosis de vacuna.
3. La composición de vacuna de la reivindicación 1 en la que la cantidad de
10 *Leptospira bratislava* está en el intervalo de aproximadamente 200 - 2000 unidades nefelométricas por dosis de vacuna.
4. La composición de vacuna de la reivindicación 1 en la que el vehículo comprende saponina y un tensioactivo.
5. La composición de vacuna de la reivindicación 4 en la que la saponina
15 es Quil A y el tensioactivo es colesterol.
6. La composición de vacuna de la reivindicación 5 en la que la cantidad de Quil A está en el intervalo de 1 a 1000 µg por dosis, y la cantidad de colesterol está en el intervalo de 1 a 1000 µg por dosis.
7. La composición de vacuna de la reivindicación 1 en la que el vehículo
20 comprende hidróxido de aluminio.
8. La composición de vacuna de la reivindicación 1 en la que el vehículo comprende Quil A y colesterol, y en la que la *Leptospira bratislava* y el vehículo están en una cantidad eficaz para proteger perros contra *Leptospira bratislava*.
9. Un procedimiento de protección de perros contra *Leptospira bratislava*
25 que comprende la administración a un perro de la composición de vacuna de la

reivindicación 1 en una cantidad terapéuticamente eficaz.

10. El procedimiento de la reivindicación 9, en el que dicha composición de vacuna se administra por una vía intravenosa, intranasal, oral, intramuscular o subcutánea.

5 11. El procedimiento de la reivindicación 9, en el que dicho perro recibe dicha composición de vacuna dos o tres veces con un intervalo de aproximadamente 2 - 4 semanas entre las administraciones.

12. La composición de vacuna de la reivindicación 1, en la que dicha preparación de células *Leptospira* comprende además una preparación de
10 células de al menos una de *Leptospira canicola*, *Leptospira grippotyphosa*, *Leptospira icterohaemorrhagiae* o *Leptospira pomona*.

13. La composición de vacuna de la reivindicación 1, en la que dicha preparación de células *Leptospira* comprende además una preparación de células de *Leptospira canicola*, *Leptospira grippotyphosa*, *Leptospira*
15 *icterohaemorrhagiae* y *Leptospira pomona*.

14. La composición de vacuna de la reivindicación 13 en la que la cantidad de cada cepa de *Leptospira* en la vacuna está en el intervalo de aproximadamente 100 - 3500 unidades nefelométricas por dosis de vacuna.

15. La composición de vacuna de la reivindicación 13 en la que la cantidad
20 de cada cepa de *Leptospira* en la vacuna está en el intervalo de aproximadamente 200 - 2000 unidades nefelométricas por dosis de vacuna.

16. Una vacuna de composición para inmunizar perros contra patógenos caninos que comprende la composición de la reivindicación 13, y que comprende además una cepa atenuada de virus de moquillo canino (CD), una
25 cepa atenuada de adenovirus canino de tipo 2 (CAV-2), una cepa atenuada de

virus de la parainfluenza canina (CPI), una cepa atenuada de parvovirus canino (CPV), y un vehículo.

17. La vacuna de combinación de la reivindicación 16, en la que la cantidad de cada cepa de *Leptospira* en la vacuna está en el intervalo de aproximadamente 100 - 3500 unidades nefelométricas por dosis de vacuna.
18. La vacuna de combinación de la reivindicación 16, en la que la cantidad de cada cepa de *Leptospira* en la vacuna está en el intervalo de aproximadamente 200 - 2000 unidades nefelométricas por dosis.
19. La vacuna de combinación de la reivindicación 16, en la que la cantidad de dicha cepa atenuada de virus CD en dicha vacuna está en el intervalo de 10^2 a 10^9 de TCID₅₀ por dosis.
20. La vacuna de combinación de la reivindicación 16, en la que la cantidad de dicha cepa atenuada de virus CAV-2 en dicha vacuna está en el intervalo de 10^2 a 10^9 de TCID₅₀ por dosis.
21. La vacuna de combinación de la reivindicación 16, en la que la cantidad de dicha cepa atenuada de virus CPI en dicha vacuna está en el intervalo de 10^2 a 10^9 de TCID₅₀ por dosis.
22. La vacuna de combinación de la reivindicación 16, en la que la cantidad de dicha cepa atenuada de virus CPV en dicha vacuna está en el intervalo de 10^2 a 10^9 de TCID₅₀ por dosis.
23. La vacuna de combinación de la reivindicación 16 en la que el vehículo comprende saponina y un tensioactivo.
24. La vacuna de combinación de la reivindicación 23 en la que la saponina es Quil A y el tensioactivo es colesterol.
25. La vacuna de combinación de la reivindicación 24 en la que la cantidad

de Quil A está en el intervalo de 1 a 1000 µg por dosis, y la cantidad de colesterol está en el intervalo de 1 a 1000 µg por dosis.

26. La composición de vacuna de la reivindicación 16 en la que el vehículo comprende hidróxido de aluminio.

5 27. Un procedimiento de protección de perros contra patógenos caninos que comprende la administración a un perro de la vacuna de combinación de la reivindicación 16 en una cantidad terapéuticamente eficaz.

28. El procedimiento de la reivindicación 27, en la que dicha vacuna de combinación se administra por una vía intravenosa, intranasal, oral,
10 intramuscular o subcutánea.

29. El procedimiento de la reivindicación 27, en la que dicho perro recibe dicha vacuna de combinación dos o tres veces con un intervalo de aproximadamente 2 - 4 semanas entre las administraciones.

30. La vacuna de combinación de la reivindicación 16 que comprende
15 además una preparación de células enteras o parciales inactivada de una cepa de coronavirus canino (CCV).

31. La vacuna de combinación de la reivindicación 30 en la que la cantidad de cada cepa de *Leptospira* en la vacuna está en el intervalo de aproximadamente 100 - 3500 unidades nefelométricas por dosis de vacuna.

20 32. La vacuna de combinación de la reivindicación 30 en la que la cantidad de cada cepa de *Leptospira* en la vacuna está en el intervalo de aproximadamente 200 - 2000 unidades nefelométricas por dosis.

33. La vacuna de combinación de la reivindicación 30, en la que la cantidad de dicha cepa atenuada de virus CD en dicha vacuna está en el intervalo de
25 10^2 a 10^8 de TCID₅₀ por dosis.

34. La vacuna de combinación de la reivindicación 30, en la que la cantidad de dicha cepa atenuada de virus CAV-2 en dicha vacuna está en el intervalo de 10^2 a 10^9 de TCID₅₀ por dosis.
35. La vacuna de combinación de la reivindicación 30, en la que la cantidad de dicha cepa atenuada de virus CPI en dicha vacuna está en el intervalo de 10^2 a 10^9 de TCID₅₀ por dosis.
36. La vacuna de combinación de la reivindicación 30, en la que la cantidad de dicha cepa atenuada de virus CPV en dicha vacuna está en el intervalo de 10^2 a 10^9 de TCID₅₀ por dosis.
37. La vacuna de combinación de la reivindicación 30, en la que la cantidad de la preparación celular de dicha cepa de CCV en dicha vacuna es al menos aproximadamente 100 unidades relativas por dosis.
38. La vacuna de combinación de la reivindicación 30 en la que el vehículo comprende saponina y un tensioactivo.
39. La vacuna de combinación de la reivindicación 38 en la que dicha saponina es Quil A y dicho tensioactivo es colesterol.
40. La vacuna de combinación de la reivindicación 39 en la que la cantidad de Quil A está en el intervalo de 1 a 1000 µg por dosis, y la cantidad de colesterol está en el intervalo de 1 a 1000 µg por dosis.
41. La composición de vacuna de la reivindicación 30 en la que el vehículo comprende hidróxido de aluminio.
42. Un procedimiento para inmunizar perros contra patógenos caninos que comprende la administración a un perro de la vacuna de combinación de la reivindicación 30.
43. El procedimiento de la reivindicación 42, en la que dicha vacuna de

combinación se administra por una vía intravenosa, intranasal, oral, intramuscular o subcutánea.

44. El procedimiento de la reivindicación 42, en la que dicho perro recibe dicha vacuna de combinación dos o tres veces con un intervalo de
5 aproximadamente 2 - 3 semanas entre las administraciones.

45. Una vacuna de combinación para inmunizar perros contra patógenos caninos que comprende una preparación de células *Leptospira* de *Leptospira canicola*, *Leptospira grippotyphosa*, *Leptospira icterohaemorrhagiae* y *Leptospira pomona*, que comprende además una cepa atenuada de virus de
10 moquillo canino (CD), una cepa atenuada de adenovirus canino de tipo 2 (CAV-2), una cepa atenuada de virus de la parainfluenza canina (CPI), una cepa atenuada de parvovirus canino (CPV), y un vehículo.

46. La vacuna de combinación de la reivindicación 45, en la que la cantidad de cada cepa de *Leptospira* en la vacuna está en el intervalo de
15 aproximadamente 100 - 3500 unidades nefelométricas por dosis de vacuna.

47. La vacuna de combinación de la reivindicación 45, en la que la cantidad de cada cepa de *Leptospira* en la vacuna está en el intervalo de aproximadamente 200 - 2000 unidades nefelométricas por dosis.

48. La vacuna de combinación de la reivindicación 45, en la que la cantidad de dicha cepa atenuada de virus CD en dicha vacuna está en el intervalo de
20 10^2 a 10^9 de TCID₅₀ por dosis.

49. La vacuna de combinación de la reivindicación 45, en la que la cantidad de dicha cepa atenuada de virus CAV-2 en dicha vacuna está en el intervalo de 10^2 a 10^9 de TCID₅₀ por dosis.

25 50. La vacuna de combinación de la reivindicación 45, en la que la cantidad

de dicha cepa atenuada de virus CPI en dicha vacuna está en el intervalo de 10^2 a 10^9 de TCID₅₀ por dosis.

51. La vacuna de combinación de la reivindicación 45, en la que la cantidad de dicha cepa atenuada de virus CPV en dicha vacuna está en el intervalo de 10^2 a 10^9 de TCID₅₀ por dosis.

52. La vacuna de combinación de la reivindicación 45 en la que el vehículo comprende saponina y un tensioactivo.

53. La vacuna de combinación de la reivindicación 52 en la que la saponina es Quil A y dicho tensioactivo es colesterol.

54. La vacuna de combinación de la reivindicación 53 en la que la cantidad de Quil A está en el intervalo de 1 a 1000 µg por dosis, y la cantidad de colesterol está en el intervalo de 1 a 1000 µg por dosis.

55. La composición de vacuna de la reivindicación 45 en la que el vehículo comprende hidróxido de aluminio.

56. Un procedimiento para inmunizar perros contra patógenos caninos que comprende la administración a un perro de la vacuna de combinación de la reivindicación 45.

57. El procedimiento de la reivindicación 56, en la que dicha vacuna de combinación se administra por una vía intravenosa, intranasal, oral, intramuscular o subcutánea.

58. El procedimiento de la reivindicación 56, en la que dicho perro recibe dicha vacuna de combinación dos o tres veces con un intervalo de aproximadamente 2 - 3 semanas entre las administraciones.

59. La vacuna de combinación de la reivindicación 45, que comprende además una preparación de células enteras o parciales inactivada de una cepa

de coronavirus canino (CCV).

60. La vacuna de combinación de la reivindicación 59 en la que la cantidad de cada cepa de *Leptospira* en la vacuna está en el intervalo de aproximadamente 100 - 3500 unidades nefelométricas por dosis de vacuna.
- 5 61. La vacuna de combinación de la reivindicación 59 en la que la cantidad de cada cepa de *Leptospira* en la vacuna está en el intervalo de aproximadamente 200 - 2000 unidades nefelométricas por dosis.
62. La vacuna de combinación de la reivindicación 59, en la que la cantidad de dicha cepa atenuada de virus CD en dicha vacuna está en el intervalo de
10 10^2 a 10^9 de TCID₅₀ por dosis.
63. La vacuna de combinación de la reivindicación 59, en la que la cantidad de dicha cepa atenuada de virus CAV-2 en dicha vacuna está en el intervalo de 10^2 a 10^9 de TCID₅₀ por dosis.
64. La vacuna de combinación de la reivindicación 59, en la que la cantidad
15 de dicha cepa atenuada de virus CPI en dicha vacuna está en el intervalo de 10^2 a 10^9 de TCID₅₀ por dosis.
65. La vacuna de combinación de la reivindicación 59, en la que la cantidad de dicha cepa atenuada de virus CPV en dicha vacuna está en el intervalo de 10^2 a 10^9 de TCID₅₀ por dosis.
- 20 66. La vacuna de combinación de la reivindicación 59, en la que la cantidad de la preparación celular de dicha cepa de CCV en dicha vacuna es al menos aproximadamente 100 unidades relativas por dosis.
67. La vacuna de combinación de la reivindicación 59 en la que el vehículo comprende saponina y un tensioactivo.
- 25 68. La vacuna de combinación de la reivindicación 67 en la que dicha

saponina es Quil A y dicho tensioactivo es colesterol.

69. La vacuna de combinación de la reivindicación 68 en la que la cantidad de Quil A está en el intervalo de 1 a 1000 µg por dosis, y la cantidad de colesterol está en el intervalo de 1 a 1000 µg por dosis.

5 70. La composición de vacuna de la reivindicación 59 en la que el vehículo comprende hidróxido de aluminio.

71. Un procedimiento para inmunizar perros contra patógenos caninos que comprende la administración a un perro de la vacuna de combinación de la reivindicación 59.

10 72. El procedimiento de la reivindicación 71, en la que dicha vacuna de combinación se administra por una vía intravenosa, intranasal, oral, intramuscular o subcutánea.

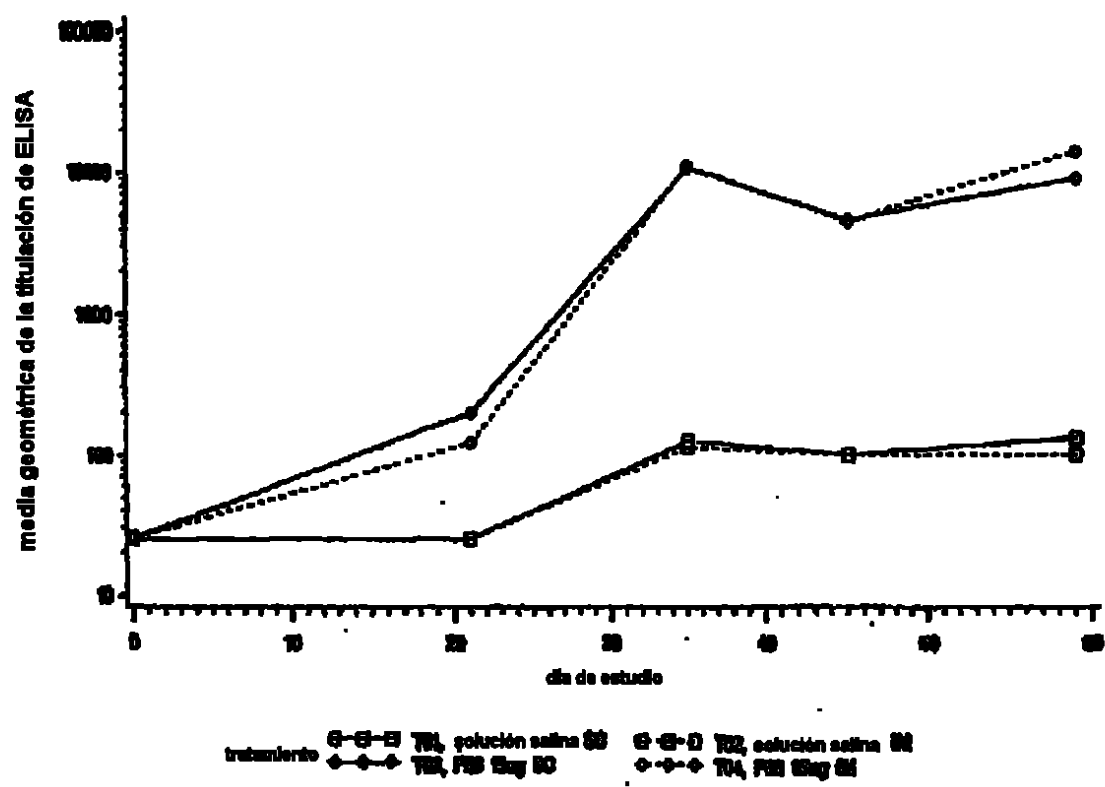
73. El procedimiento de la reivindicación 71, en la que dicho perro recibe dicha vacuna de combinación dos o tres veces con un intervalo de
15 aproximadamente 2 - 3 semanas entre las administraciones.

256
255

Figura 1: Sumario de la media geométrica de las titulaciones de punto final de ELISA de p68 en perros no vacunados y vacunados con p68 de Bordetella (15 µg/dosis) -exposición de aerosol con *Bordetella Bronchiseptica*.

5

ESTUDIO BIOLÓGICO - PERROS
SUMARIO DE LAS TITULACIONES DE ELISA DE p68
MEDIAS GEOMÉTRICAS POR DÍA DE ESTUDIO



10

257
256

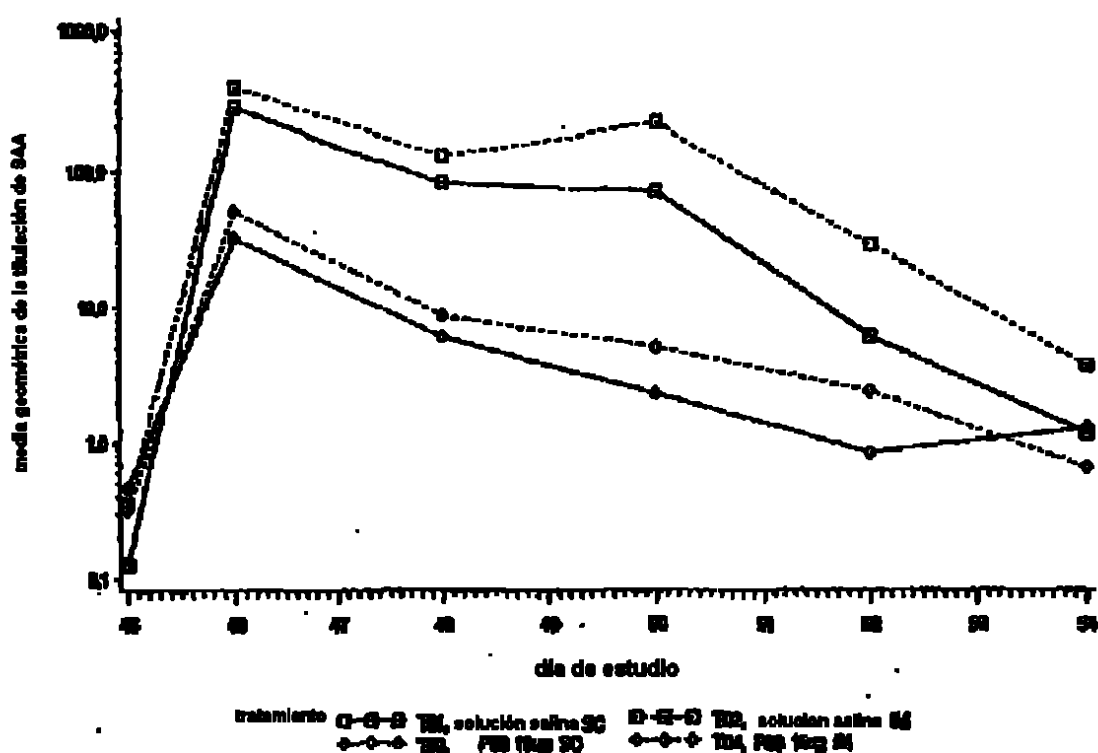
Figura 2. Sumario de las titulaciones de Amiloide A sérico en perros después de la exposición de aerosol con *Bordetella Bronchiseptica*

5

ESTUDIO BIOLÓGICO - PERROS

ANÁLISIS DE MEDICIONES REPETIDAS DE LAS TITULACIONES DE AMILOIDE A SÉRICO (SAA)

MEDIAS GEOMÉTRICAS POR DÍA DE ESTUDIO



10

258
257

Figura 3 Sumario de la media geométrica de las titulaciones de punto final de ELISA de p68 en perros no vacunados y vacunados con p68 de Bordetella después de vacunación y la exposición de aerosol con *Bordetella*

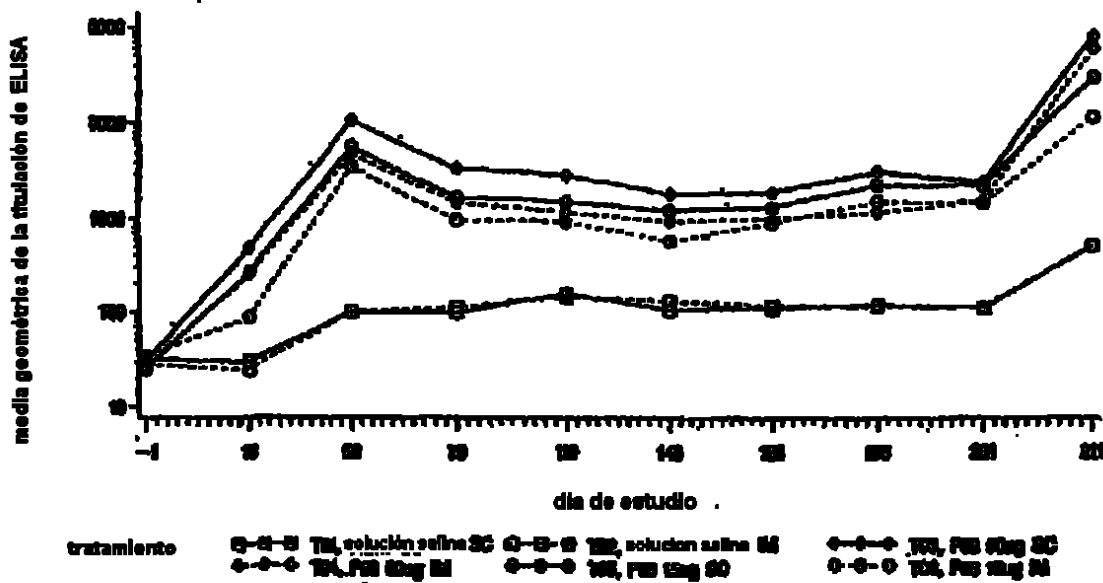
Bronchiseptica

ESTUDIO BIOLÓGICO - PERROS

SUMARIO DE LAS TITULACIONES DE ELISA DE p68

MEDIAS GEOMÉTRICAS POR DÍA DE ESTUDIO

10



El día 79 corresponde a los datos combinados de los días 79 y 81, el día 110
15 corresponde a 110 y 111, y el día 169 corresponde a 169 y 170.

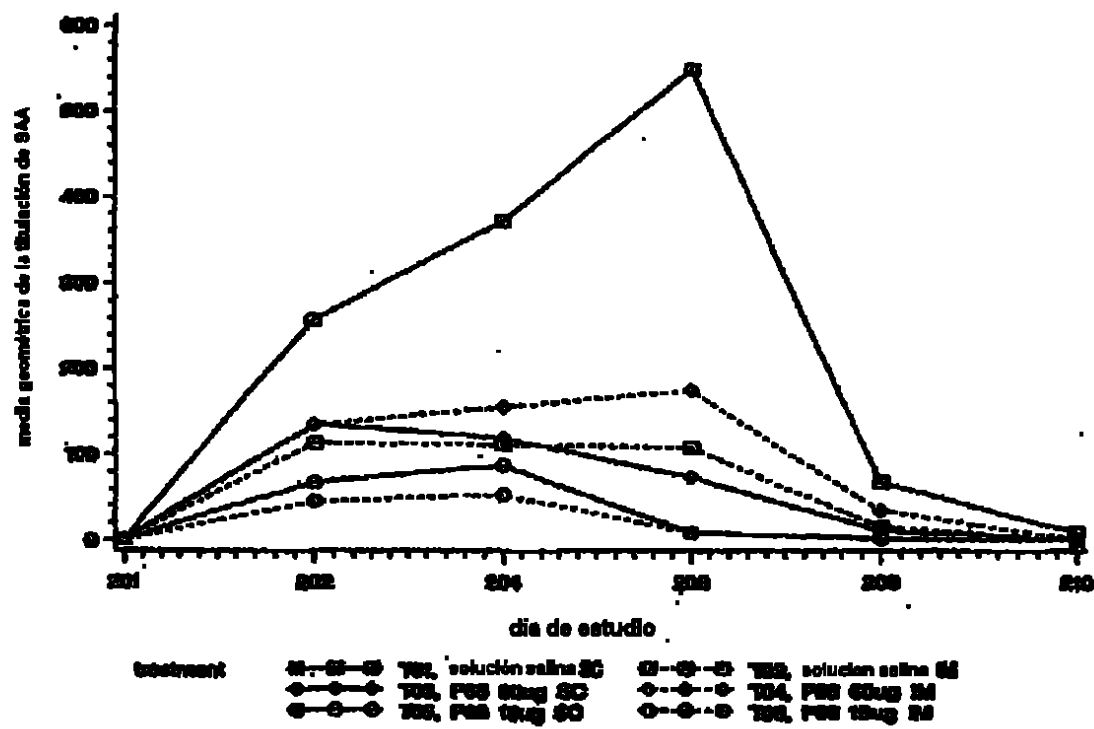
Figura 4. Sumario de las titulaciones de Amiloide A sérico en perros después de la exposición de aerosol con *Bordetella Bronchiseptica*

5

ESTUDIO BIOLÓGICO - PERROS

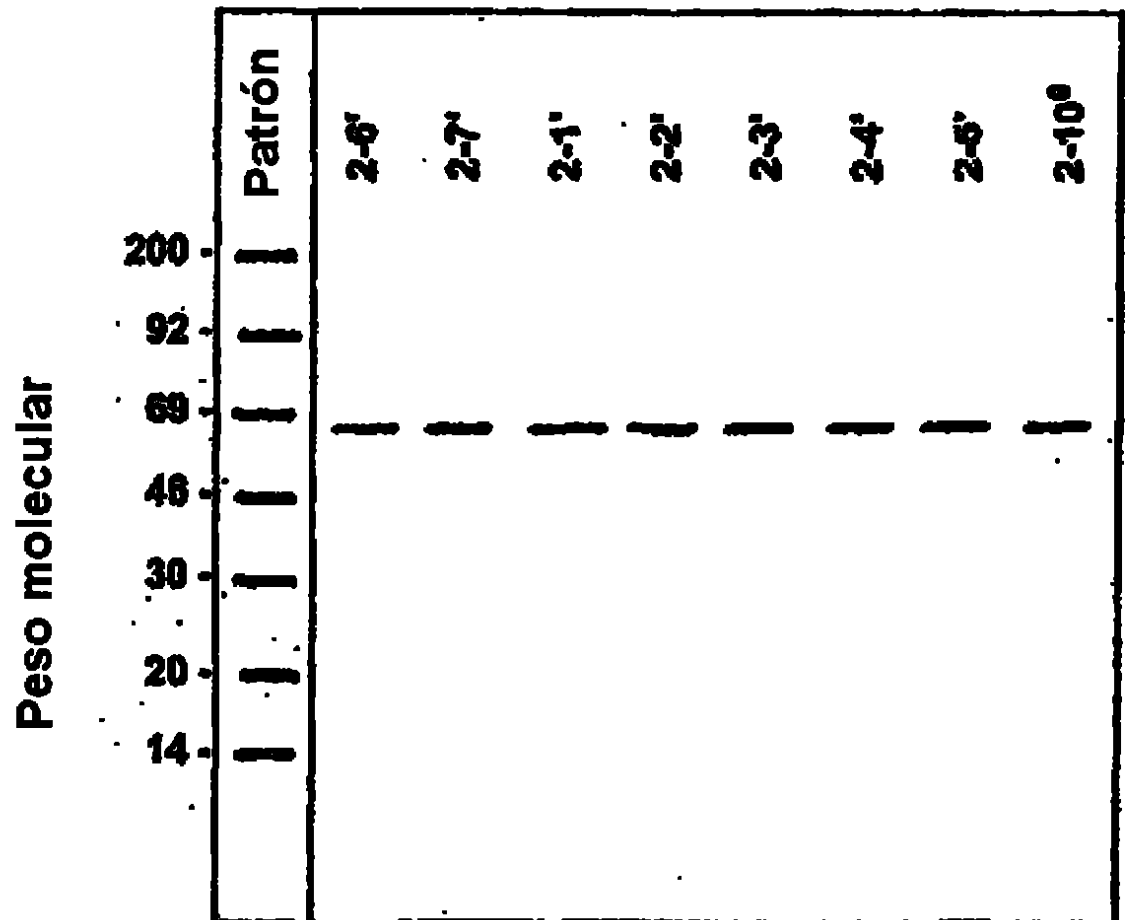
ANÁLISIS DE MEDICIONES REPETIDAS DE LAS TITULACIONES DE AMILOIDE A SÉRICO (SAA)

10 MEDIAS GEOMÉTRICAS POR DÍA DE ESTUDIO



15

Figura 5



5

10

LISTADO DE SECUENCIAS

SEQ ID NO: 1

DPTVSEIKAGERQSEIMIKSDGAGVTDATGTTIKVSGRQAQGVLLSEFPAELRFQNGSVTSSGQLFDSGVKFL
 GTVT
 VIKGLVADENATLANVEDTRDDDLALYVAGEQAQASLADSTLQAGSVTVREGANVTVQSTIVDGGLEIGTLQF
 LQFE
 DLFPSEVVLGDTSEVTAVPASGAPAAVSVFGANELTVDOGHITGGHAGVAMOGAIVELQRATIRGDAFAGGAVP
 GGRV
 FGGFGLDGHITGVVDVEDSTVDLAQSTIVEAPQLGAAIEMRGARVTVSGSILAPKENVITGGERNEFFPPASPL
 SITL
 EAGARMQGRALLYKVLPEPVKLFLAGAQQQMDIVATELPPIFGASSGFLDVALASQAEITGATRAVDLSIDNAT
 WVMF
 DMSVGALELASDGSVDPPQFAMAGRFKVIWVDTLASSGLTFEMVTFADLGLSKLVWSDASQQEELNVEDSGSEF
 ASAM
 INLLVQTFPGSAATFTLANEDGKVDIGTTIKZLANWGEQWELVGAKAPFAPKAPQNGPQGPQGPQGPQGPQGP
 PQFP
 QKQPEAREPQFPAGELESAANNAVETGGVGLASTLNYAEN

[illegible]

15

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Frantz, Joseph C.
Tucker, Cassius M.
Newby, Thomas J.

<120> VACUNAS CANINAS CONTRA BORDETELLA BRONCHISEPTICA

<130> PC32220

<140> 60/443,418

<141> 2003-01-29

<160> .3

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1

<211> 602

<212> PRT

<213> Bordetella bronchiseptica

<400> 1

Asp Pro Asn Thr Val Ser Ile Ile Lys Ala Gly Glu Arg Gln His Gly
1 5 10 15

Ile His Ile Lys Gln Ser Asp Gly Ala Gly Val Arg Thr Ala Thr Gly
20 25 30

Thr Thr Ile Lys Val Ser Gly Arg Gln Ala Gln Gly Val Leu Leu Glu
35 40 45

Asn Pro Ala Ala Glu Leu Arg Phe Gln Asn Gly Ser Val Thr Ser Ser
50 55 60

Gly Gln Leu Phe Asp Glu Gly Val Arg Arg Phe Leu Gly Thr Val Thr
65 70 75 80

Val Lys Ala Gly Lys Leu Val Ala Asp His Ala Thr Leu Ala Asn Val
85 90 95

Ser Asp Thr Arg Asp Asp Asp Gly Ile Ala Leu Tyr Val Ala Gly Glu
100 105 110

Gln Ala Gln Ala Ser Ile Ala Asp Ser Thr Leu Gln Gly Ala Gly Gly
115 120 125

Val Arg Val Glu Arg Gly Ala Asn Val Thr Val Gln Arg Ser Thr Ile
130 135 140

Val Asp Gly Gly Leu His Ile Gly Thr Leu Gln Pro Leu Gln Pro Gln

~~265~~
264

145		150		155		160
Asp	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Val
				165		
					Val	Leu
					Gly	Asp
					170	
						Thr
						Ser
						Val
						Thr
						Ala
						175
Val	Pro	Ala	Ser	Gly	Ala	Pro
						Ala
						Val
						Ser
						Val
						Phe
						Gly
						Ala
						Asn
						180
Glu	Leu	Thr	Val	Asp	Gly	Gly
						His
						Ile
						Thr
						Gly
						Gly
						Arg
						Ala
						Ala
						Gly
						195
Val	Ala	Ala	Met	Asp	Gly	Ala
						Ile
						Val
						His
						Leu
						Gln
						Arg
						Ala
						Thr
						Ile
						210
Arg	Arg	Gly	Asp	Ala	Pro	Ala
						Gly
						Gly
						Ala
						Val
						Pro
						Gly
						Gly
						Ala
						Val
						225
Pro	Gly	Gly	Phe	Gly	Pro	Leu
						Leu
						Asp
						Gly
						Trp
						Tyr
						Gly
						Val
						Asp
						Val
						245
Ser	Asp	Ser	Thr	Val	Asp	Leu
						Ala
						Gln
						Ser
						Ile
						Val
						Glu
						Ala
						Pro
						Gln
						260
Leu	Gly	Ala	Ala	Ile	Arg	Ala
						Gly
						Arg
						Gly
						Ala
						Arg
						Val
						Thr
						Val
						Ser
						275
Gly	Gly	Ser	Leu	Ser	Ala	Pro
						His
						Gly
						Asn
						Val
						Ile
						Glu
						Thr
						Gly
						Gly
						290
Gly	Ala	Arg	Arg	Phe	Pro	Pro
						Pro
						Ala
						Ser
						Pro
						Leu
						Ser
						Ile
						Thr
						Leu
						305
Arg	Ala	Gly	Ala	Arg	Ala	Gln
						Gly
						Arg
						Ala
						Leu
						Leu
						Tyr
						Arg
						Val
						Leu
						325
Pro	Gln	Pro	Val	Lys	Leu	Thr
						Leu
						Ala
						Gly
						Gly
						Ala
						Gln
						Gly
						Gln
						Gly
						340
Asp	Ile	Val	Ala	Thr	Glu	Leu
						Pro
						Pro
						Ile
						Pro
						Gly
						Ala
						Ser
						Ser
						Gly
						355
Pro	Leu	Asp	Val	Ala	Leu	Ala
						Ser
						Gln
						Ala
						Arg
						Trp
						Thr
						Gly
						Ala
						Thr
						370
Arg	Ala	Val	Asp	Ser	Leu	Ser
						Ile
						Asp
						Asn
						Ala
						Thr
						Trp
						Val
						Met
						Thr
						385

~~266~~
265

Asp Asn Ser Asn Val Gly Ala Leu Arg Leu Ala Ser Asp Gly Ser Val
405 410 415

Asp Phe Gln Gln Pro Ala Glu Ala Gly Arg Phe Lys Val Leu Met Val
420 425 430

Asp Thr Leu Ala Gly Ser Gly Leu Phe Arg Met Asn Val Phe Ala Asp
435 440 445

Leu Gly Leu Ser Asp Lys Leu Val Val Met Arg Asp Ala Ser Gly Gln
450 455 460

His Arg Leu Trp Val Arg Asn Ser Gly Ser Glu Pro Ala Ser Ala Asn
465 470 475 480

Thr Met Leu Leu Val Gln Thr Pro Arg Gly Ser Ala Ala Thr Phe Thr
485 490 495

Leu Ala Asn Lys Asp Gly Lys Val Asp Ile Gly Thr Tyr Arg Tyr Arg
500 505 510

Leu Ala Ala Asn Gly Asn Gly Gln Trp Ser Leu Val Gly Ala Lys Ala
515 520 525

Pro Pro Ala Pro Lys Pro Ala Pro Gln Pro Gly Pro Gln Pro Gly Pro
530 535 540

Gln Pro Gly Pro Gln Pro Pro Gln Pro Pro Gln Pro Pro Gln Pro Pro
545 550 555 560

Gln Arg Gln Pro Glu Ala Pro Ala Pro Gln Pro Pro Ala Gly Arg Glu
565 570 575

Leu Ser Ala Ala Ala Asn Ala Ala Val Asn Thr Gly Gly Val Gly Leu
580 585 590

Ala Ser Thr Leu Trp Tyr Ala Glu Ser Asn
595 600

<210> 2

<211> 1806

<212> ADN

5 <Bordetella bronchiseptica

<400> 2

gatccaaaca ctgtgtcaat catcaaggcc ggcgagcgcc agcacggcat ccacatcaag

60

267
266

caaagcgatg ggcgcggcgt acggacggcc accggaacga ccatcaaggt aagcggtcgt	120
caggcccaagg gcgtcctgct ggaaaatccc gcggccgagc tgcgggtcca gaacggcagc	180
gtcagtcctt cgggacagct gttcgacgaa ggcgtcggc gctttctggg caccgtcacc	240
gtcaaggccg gcaagctggc cgcgatcac gccacgctgg ccaacgtcag cgacaccogg	300
gacgacgacg gcacgcgcct ctatgtggcc ggccgacagg ccaggccag catcgccgac	360
agcaccctgc agggcgccgg cggcgtcggc gtcgagbgyg gcgccaatgt caccgtccaa	420
cgcagcacca tcgttgacgg gggcttgcat atcggcaccc tgcagccgct gcagccggaa	480
gaoccttcgc ccagccgggt ggtgctgggc gacaccagcg tgaccgcgct gccgcgaagc	540
ggcgcccccg cggcgggtgc tgtattcggg gccaatgagc ttacggttga tggcggggac	600
atcacccggg ggccgggaag cggggctggc gccatggacg gggcgatcgt gcatctgcag	660
cggcgacga taccggcggg ggacgcgcct gccggcggtg cggttccagg cggtcgggtt	720
cccggcggtc tcggccccct ccttgacggc tggtatggcg tggatgtatc ggactccacc	780
gtggacctcg ctacgtcgat cgtcgaggcg ccgcagctgg gcgcgcgat cggggcgggc	840
cgcggcgcca gggtagcggc gtcggggcgc agcttgctcg caccgcacgg caatgtcatc	900
gagaccggcg gcggctgcgc tcgcttcctc cctccggcct cgcctctgtc gatcaccttg	960
cggggcggcg caacggcgca ggggagggcg ctgctgtacc gggtcctgce ggagcccgctg	1020
aagctgacgc tggcggggcg cgcacggggc caggggcaca tcgtcgcgac ggagctgcct	1080
cccattccag gcggtcgag cgggcgcgc gacgtggcgc tggccagcca ggcccgatgg	1140
acgggcgcta ccgcgcggc cgaactgcgc tccatcgaca accgcacctg ggtcatgacg	1200
gacaaactga acgtcggcgc gctgggcctg gccagcgacg gcagcgtcga ttccagcag	1260
cgggcogaag ctgggcgggt caaggctcct atggctgata cgcctggcgg ttccgggctg	1320
ttccgoatga atgtcttcgc ggaoctgggg ctgagcgaca agctggctgt catcggggac	1380
gccagcggcc agcacaggct gtgggtccgc aacagcggca gcgagcggc cagcgccaac	1440
accatgctgc tggctgcagc gccacgaggc agcgcggcga cttttacctc tgccaacaag	1500
gacggcaagg tcgatatcgg taactaccgc tatcgattgg ccgccaacgg caatgggcag	1560
tggagcctgg tgggcgggaa ggcgcgcgc gcgcccaagc ccgcgcgcga gcccggtccc	1620
cagcccggtc ccacgcccgg tccccagcgc ccgcagcgc ccgcagccgc gcagccgccca	1680
cagaggcagc cggaaagcgc ggcgcgcga ccgcggcgcg gcaggaggtt gtcgcgcgc	1740
gccaaacggg cggtdaacac gggcggggcg ggcctggcca gcaagctctg gtacgcgaa	1800
agcaat	1806

268
267

<210> 3

<211> 599

<212> PRT

<213> Bordetella bronchiseptica

<400> 3

Asp Trp Asn Asn Gln Ser Ile Ile Lys Ala Gly Glu Arg Gln His Gly
1 5 10 15

Ile His Ile Lys Gln Ser Asp Gly Ala Gly Val Arg Thr Ala Thr Gly
20 25 30

Thr Thr Ile Lys Val Ser Gly Arg Gln Ala Gln Gly Val Leu Leu Glu
35 40 45

Asn Pro Ala Ala Glu Leu Arg Phe Gln Asn Gly Ser Val Thr Ser Ser
50 55 60

Gly Gln Leu Phe Asp Gln Gly Val Arg Arg Phe Leu Gly Thr Val Thr
65 70 75 80

Val Lys Ala Gly Lys Leu Val Ala Asp His Ala Thr Leu Ala Asn Val
85 90 95

Ser Asp Thr Arg Asp Asp Asp Gly Ile Ala Leu Tyr Val Ala Gly Glu
100 105 110

Gln Ala Gln Ala Ser Ile Ala Asp Ser Thr Leu Gln Gly Ala Gly Gly
115 120 125

Val Arg Val Glu Arg Gly Ala Asn Val Thr Val Gln Arg Ser Thr Ile
130 135 140

Val Asp Gly Gly Leu His Ile Gly Thr Leu Gln Pro Leu Gln Pro Glu
145 150 155 160

Asp Leu Pro Pro Ser Arg Val Val Leu Gly Asp Thr Ser Val Thr Ala
165 170 175

Val Pro Ala Ser Gly Ala Pro Ala Ala Val Ser Val Phe Gly Ala Asn
180 185 190

Glu Leu Thr Val Asp Gly Gly His Ile Thr Gly Gly Arg Ala Ala Gly
195 200 205

Val Ala Ala Met Asp Gly Ala Ile Val His Leu Gln Arg Ala Thr Ile

269
268

210	215	220
Arg Arg Gly Asp Ala Pro Ala Gly Gly Ala Val Pro Gly Gly Ala Val 225 230 235 240		
Pro Gly Gly Phe Gly Pro Leu Leu Asp Gly Trp Tyr Gly Val Asp Val 245 250 255		
Ser Asp Ser Thr Val Asp Leu Ala Gln Ser Ile Val Glu Ala Pro Gln 260 265 270		
Leu Gly Ala Ala Ile Arg Ala Gly Arg Gly Ala Arg Val Thr Val Ser 275 280 285		
Gly Gly Ser Leu Ser Ala Pro His Gly Asn Val Ile Glu Thr Gly Gly 290 295 300		
Gly Ala Arg Arg Phe Pro Pro Pro Ala Ser Pro Leu Ser Ile Thr Leu 305 310 315 320		
Gln Ala Gly Ala Arg Ala Gln Gly Arg Ala Leu Leu Tyr Arg Val Leu 325 330 335		
Pro Glu Pro Val Lys Leu Thr Leu Ala Gly Gly Ala Gln Gly Gln Gly 340 345 350		
Asp Ile Val Ala Thr Glu Leu Pro Pro Ile Pro Gly Ala Ser Ser Gly 355 360 365		
Pro Leu Asp Val Ala Leu Ala Ser Gln Ala Arg Trp Thr Gly Ala Thr 370 375 380		
Arg Ala Val Asp Ser Leu Ser Ile Asp Asn Ala Thr Trp Val Met Thr 385 390 395 400		
Asp Asn Ser Asn Val Gly Ala Leu Arg Leu Ala Ser Asp Gly Ser Val 405 410 415		
Asp Phe Gln Gln Pro Ala Glu Ala Gly Arg Phe Lys Cys Leu Met Val 420 425 430		
Asp Thr Leu Ala Gly Ser Gly Leu Phe Arg Met Asn Val Ala Phe Ala 435 440 445		
Asp Leu Gly Leu Ser Asp Lys Leu Val Val Met Arg Asp Ala Ser Gly 450 455 460		

~~270~~
269

Gln His Arg Leu Leu Val Arg Asn Ser Gly Ser Glu Pro Ala Ser Gly
465 470 475 480

Asn Thr Met Leu Leu Val Gln Thr Pro Arg Gly Ser Ala Ala Thr Phe
485 490 495

Thr Leu Ala Asn Lys Asp Gly Lys Val Asp Ile Gly Thr Tyr Arg Tyr
500 505 510

Arg Leu Ala Ala Asn Gly Asn Gly Gln Trp Ser Leu Val Gly Ala Lys
515 520 525

Ala Pro Pro Ala Pro Lys Pro Ala Pro Gln Pro Gly Pro Gln Pro Gly
530 535 540

Pro Gln Pro Pro Gln Pro Pro Gln Pro Pro Gln Pro Pro Gln Arg Gln
545 550 555 560

Pro Glu Ala Pro Ala Pro Gln Pro Pro Ala Gly Arg Glu Leu Ser Ala
565 570 575

Ala Ala Asn Ala Ala Val Asn Thr Gly Gly Val Gly Leu Ala Ser Thr
580 585 590

Leu Trp Tyr Ala Glu Ser Asn
595

277
270

TRATADO DE COOPERACIÓN DE PATENTES
PCT
NOTIFICACIÓN DE TRANSMISIÓN DEL REPORTE DE EXAMEN
PRELIMINAR INTERNACIONAL
(PCT Regla 71.1)
De: AUTORIDAD DE REVISION PRELIMINAR INTERNACIONAL

Para:
FULLER, Grover, F.
c/o DROUIN, Stephane
European Pharma Patent Department
Pfizer Research and Development
Ramsgate Road
Sandwich, Kent CT 13 9NJ
Gran Bretaña

Sello de recibido de fecha 4 de septiembre de 2006.

Fecha de expedición: 01.09.2006
Referencia del expediente del solicitante o mandatario: PC32220A
Solicitud Internacional No.: PCT/IB2005/003111
Fecha de presentación internacional: 23.09.2005
Fecha de prioridad: 06.10.2004
Solicitante: PFIZER PRODUCTS INC et. al.

1. Se notifica al solicitante que la Administración Encargada del Examen Preliminar Internacional ha emitido el informe de examen preliminar internacional para la solicitud internacional y se lo transmite adjunto, acompañado, si procede, de sus anexos.
2. Se transmite una copia del presente informe y, si procede, de sus anexos, a la Oficina Internacional para comunicación a todas las Oficinas elegidas.
3. Si alguna Oficina elegida lo exige, la Oficina Internacional realizará una traducción en inglés del informe (con exclusión de sus anexos) y la transmitirá a las Oficinas interesadas.

4. RECORDATORIO

Para iniciar la fase nacional ante cada Oficina elegida, el solicitante debe cumplir ciertos actos (presentación de la traducción y pago de las tasas nacionales) en el plazo de 30 meses desde la fecha de prioridad (o más tarde por lo que respecta a ciertas oficinas) (Artículo 39.(1)) (véase también el recordatorio enviado por la Oficina Internacional en el formulario PCT/IB/301).

272
271

Cuando deba entregarse una traducción de la solicitud internacional o una oficina elegida, se incluirá la traducción de cualquier anexo de informe de Examen Preliminar Internacional. Corresponde al solicitante preparar la traducción en cuestión y entregarla directamente a cada Oficina elegida interesada

Para más amplios detalles en lo relativo a los plazos aplicables y las exigencias de las oficinas elegidas, véase el Volumen II de la guía del solicitante PCT.

Se llama la atención del solicitante sobre el Artículo 33(5) que prevé que los criterios de novedad, actividad inventiva y de aplicación industrial definidos en el Artículo 33(2) a (4) sólo servirán a los efectos del examen preliminar internacional, y que "todo Estado contratante puede aplicar criterios adicionales o diferentes al objeto de decidir, en ese Estado, si la invención es patentable o no" (véase también el Artículo 27(5)). Tales criterios adicionales pueden afectar, por ejemplo, a las excepciones de patentabilidad, requisitos específicos relativos a la divulgación, la claridad de las reivindicaciones.

Nombre y dirección postal de la Administración encargada del Examen Preliminar Internacional:

Oficina de Patentes Europea

D-80298 – Munich

Tel: +49-89 2399 - 0, Tx: 523656 epmu d

Fax: +49-89 2399 – 4465.

Funcionario Autorizado: Moreno, R

Tel: + 49 89 2399-2658

273
272

TRATADO DE COOPERACIÓN DE PATENTES
PCT
INFORME PRELIMINAR INTERNACIONAL SOBRE PATENTABILIDAD
(Capítulo II del Tratado de Cooperación en materia de Patentes)
(PCT Artículo 36 y Regla 70)

Referencia del expediente del solicitante o mandatario: PC32220A
Solicitud Internacional No.: PCT/IB2005/003111
Fecha de presentación internacional: 23.09.2005
Fecha de prioridad: 06.10.2004
Clasificación Internacional de Patentes (IPC) o la vez clasificación nacional e IPC: INV. A61K 39/02, A61P 31/04, A61P 31/12
Solicitante: PFIZER PRODUCTS INC et. al.

1. El presente informe preliminar internacional sobre patentabilidad, se establece por esta Administración encargada del examen preliminar internacional según el Artículo 35 y se transmite al solicitante conforme el Artículo 36.
2. Este INFORME consta de un total de 7 hojas, incluida la presente hoja de portada.
3. Este informe también contiene ANEXOS, que comprenden.
 - a. ☐ (remitido al solicitante y a la oficina internacional) un total de hojas, descritas a continuación:
 - ☐ hojas de la descripción, las reivindicaciones y/o los dibujos que han sido modificadas y que sirven de base al presente informe, y/o de hojas que contienen rectificaciones autorizadas por esta Administración (véase la Regla 70.16 y la Instrucción Administrativa 607 del PCT).
 - ☐ hojas que reemplazan a otras hojas anteriores, pero que esta Administración considera que contienen modificaciones que se extienden más allá de la divulgación de la invención tal como fue originalmente presentada, según se indica en el punto 4 del Reglamento I y en el Recuadro Suplementario.
 - b. ☐ (remitido únicamente a la Oficina Internacional) un total de (indicar tipo y soporte(s) electrónico(s)) , que contienen una lista de secuencias y/o tabla(s) relativa(s), solo en formato legible por ordenador, como se indica en el Recuadro Suplementario relativo a Listas de Secuencias (ver Instrucción Administrativa 802).

27A
273

4. El presente informe contiene indicaciones relativas a los siguientes puntos:

- | | | |
|-------------------------------------|---------------|--|
| ☒ | Recuadro I | Base de este informe |
| ☐ | Recuadro II | Prioridad |
| ☒ | Recuadro III | Ninguna formulación de opinión sobre la novedad, la actividad inventiva y la aplicación industrial |
| ☐ | Recuadro IV | Falta de unidad de Invención |
| ☒ | Recuadro V | Declaración motivada según el Artículo 35(2) sobre la novedad, la actividad inventiva y la aplicación industrial, citas y explicaciones en apoyo de esta declaración |
| ☐ | Recuadro VI | Ciertos documentos citados |
| ☐ | Recuadro VII | Defectos en la Solicitud Internacional |
| ☐ | Recuadro VIII | Observaciones relativas a la solicitud internacional |

Fecha de radicación de la demanda: 29.11.2005
Fecha de elaboración de este reporte: 01.09.2006

Nombre y dirección postal de la Administración encargada del Examen Preliminar Internacional:
Oficina de Patentes Europea
D-80298 – Munich
Tel: +49-89 2399 - 0, Tx: 523656 epmu d
Fax: +49-89 2399 – 4465.

Funcionario Autorizado: Rankin, R
Tel: + 49 89 2399-2659

275
274

Recuadro I. Base de este informe

1. Por lo que respecta al idioma, este informe se ha establecido sobre la base de la solicitud internacional en el idioma en el cual se depositó, salvo indicación en contra señalada a continuación.

- ☐ Este informe está basado en una traducción del idioma original al siguiente idioma , que es el de una traducción proporcionada a los fines de:
- ☐ búsqueda internacional (según Reglas 12.3 y 23.1 (b))
 - ☐ publicación de la solicitud internacional (según Regla 12.4)
 - ☐ examen preliminar internacional (según Reglas 55.2 y/o 55.3)

2. Por lo que respecta a los **elementos*** de la solicitud internacional, esta opinión se ha establecido sobre la base de *(las hojas de reemplazo que hayan sido enviadas a la Oficina receptora en respuesta a un requerimiento según el Artículo 14 se las denomina en este informe como "inicialmente presentadas" y no se anexan al informe)*:

Descripción, Páginas

1 - 72 tal como se presentaron inicialmente

Reivindicaciones, Números

1 - 73 tal como se presentaron inicialmente

Dibujos, Figuras

1/5- 5/5 tal como se presentaron inicialmente

☒ una lista de secuencias y/o tabla(s) relativa(s) – ver Recuadro Suplementario relativo a Listas de Secuencias

3. Las modificaciones ha ocasionado la cancelación de:

- ☐ la descripción, páginas
- ☐ las reivindicaciones, Nos.
- ☐ los dibujos, hojas/fig.
- ☐ la lista de secuencias (especificar):
- ☐ tabla(s) relativa(s) a la lista de secuencias (especificar):

4. ☐ El presente informe ha sido establecido como si no se hubiesen presentado (algunas de) las modificaciones anexadas a

este informe y listadas abajo, ya que se ha considerado que iban más allá de la divulgación de la invención tal como fue presentada, como se indica en el Recuadro Suplementario (Regla 70.2(c)).

- ☐ la descripción, páginas
- ☐ las reivindicaciones, Nos.
- ☐ los dibujos, hojas/fig.
- ☐ la lista de secuencias (especificar):
- ☐ tabla(s) relativa(s) a la lista de secuencias (especificar):

* Si se utiliza el punto 4, algunas o todas estas páginas pueden llevar el sello de "sustituida".

Recuadro No. III. Ninguna formulación de opinión sobre la novedad, la actividad inventiva y la aplicación industrial

1. Las preguntas con respecto a si el invento reivindicado parece ser novedoso, implica una actividad inventiva (no ser evidente), o ser susceptible de aplicación industrial, por lo que respecta.

- ☐ al conjunto de la solicitud internacional,
- ☒ a las reivindicaciones Nos. 9-11, 27-29, 42-44, 56-58, 71-73

debido a que:

- ☒ la solicitud internacional, o las reivindicaciones Nos. 9-11, 27-29, 42-44, 56-58, 71-73 en cuestión se refieren al objeto, respecto del cual no requiere examen preliminar internacional (especifique):

ver hoja separada

- ☐ a descripción, reivindicaciones, o los dibujos (indíquese cuales a continuación) o tales reivindicaciones Nos. en cuestión no son claras, de manera que no es posible formular una opinión significativa (especifique):
- ☐ las reivindicaciones, o las reivindicaciones Nos. en cuestión no son claras, de manera que no es posible formular una opinión significativa.
- ☐ no se ha emitido informe de búsqueda internacional para dichas reivindicaciones Nos.

277
276

☐ la lista de de secuencias nucleótidas y/o de aminoácidos no cumplen la norma estándar prevista en el Anexo C de las Instrucciones Administrativas por que:

La lista en papel ☐ no se presentó
☐ no cumple con la norma estándar

La lista en formato legible por ordenador
☐ no se presentó
☐ no cumple con la norma estándar

☐ las tablas relativas a las listas de secuencias de nucleótidas y/o de aminoácidos, si únicamente se han presentado en formato legible por ordenador, no cumplen con los requisitos técnicos previstos en el Anexo C-bis de las Instrucciones Administrativas.

☐ Ver recuadro suplementario para más detalles.

Recuadro No. V Declaración razonada según el Artículo 35(2) con respecto a la novedad, nivel inventivo o aplicación industrial: anterioridades y explicaciones que soportan tal declaración

1. Declaración

Novedad (N)	Si: Reivindicaciones 2, 3, 6, 7, 14, 15, 17-22, 25, 26, 31-41, 46-51, 54, 55, 60-66, 69, 70 No: Reivindicaciones 1, 4, 5, 8-13, 16, 23, 24, 27, 30, 42-45, 52, 53, 56-59, 67, 68, 71-73
Nivel Inventivo (NI)	Si: Reivindicaciones No: Reivindicaciones 1-73
Aplicación Industrial (AI)	Si: Reivindicaciones 1-8, 12-26, 30-41, 45-55, 59-70 No: Reivindicaciones

2. Citas y explicaciones (Regla 70.7)

ver hoja separada.

Recuadro suplementario relativo a listas de secuencias

Continuación del Recuadro 1, punto 2:

1. En lo que se refiere a las secuencias de nucleótidos y/o de aminoácidos divulgadas en la solicitud internacional y necesarias para la invención reivindicada, esta opinión se ha establecido sobre la base de:

a. tipo de material

- ☒ una lista de secuencias
☐ tabla(s) relativa(s) a la lista de secuencias

b. formato del material

- ☒ por escrito
☒ en soporte legible por ordenador

c. fecha de presentación/entrega

- ☒ contenido en la solicitud internacional tal y como se presentó
☒ presentado junto con la solicitud internacional en formato legible por ordenador
☐ presentado posteriormente a esta Administración a los fines de búsqueda y/o examen
☐ recibido como modificación, por esta Administración en fecha _____

2. ☐ Además, en caso de que se haya presentado más de una versión o copia de una lista de secuencias y/o tabla(s) relacionada(s) con ella, se ha entregado la declaración requerida de que la información contenida en las copias subsiguientes o adicionales es idéntica a la de la solicitud tal y como se presentó o no va más allá de lo presentado inicialmente.

3. Comentarios adicionales

Ítem III

No formulación de opinión con respecto a novedad, nivel inventivo, y aplicación industrial

Las reivindicaciones 9-11, 27-29, 42-44, 56-58 y 71-73 se relacionan con materia considerada por esta Autoridad cubierta por las provisiones establecidas en la Regla 67.1 (iv) del PCT. Por lo tanto, no se formulará ninguna opinión con respecto a la aplicación industrial de la materia de estas reivindicaciones (Artículo 34(4)(a)(I) del PCT).

Ítem V

Declaración razonada con respecto a novedad, nivel inventivo, y aplicación industrial; citas y explicaciones soportando cada declaración.

Para la evaluación de las presentes reivindicaciones 9-11, 27-29, 42-44, 56-58 y 71-73 sobre si son industrialmente aplicables, no existen criterios unificados en los Estados pertenecientes al PCT. La patentabilidad también puede depender de la formulación de las reivindicaciones. La EPO, por ejemplo, no reconoce como industrialmente aplicable aquella materia que reivindique el uso de un compuesto en tratamiento médico, pero permite, sin embargo, reivindicar sobre un compuesto conocido para primero uso en tratamiento médico y el uso de tal compuesto en la manufactura de un medicamento para un nuevo tratamiento médico.

Documentos citados

Se hace referencia al siguiente documento:

D1: WO 2004/067031 A (PFIZER PRODUCTS INC; DOMINOWSKI, PAUL, JOSEPH; FRANTZ, JOSEPH, CLAUDE;) 12 de agosto de 2004

Artículo 33(2) del PCT

El documento D1 divulga vacunas multivalentes para uso en canes. Los antígenos empleados en la vacuna incluyen aquellos provenientes del moquillo canino, adenovirus canino 2, parvovirus canino 2, coronavirus canino, virus de la parainfluenza tipo III canino, el antígeno *Bordetella bronchiseptica* p68 como también preparaciones celulares derivadas de la *Leptospira bratislava*, *Leptospira canicola*, *Leptospira grippotyphosa*, *Leptospira icterhaemorrhagiae* y *Leptospira pomona*. El sistema co-adyuvante usado en la vacuna comprende Quil A y colesterol (compare con la página 1, línea 32 a la página 2, línea 38; página 3, líneas 18-38; ejemplo 4; reivindicaciones 8, 9, 12-15).

Como consecuencia de la divulgación del antecedente D1, las reivindicaciones 1, 4, 5, 8-13, 16, 23, 24, 27, 30, 42-45, 52, 53, 56-59, 67, 68 y 71-73 no pueden considerarse novedosas (Artículo 33(2) del PCT).

La materia de las reivindicaciones 2, 3, 6, 7, 14, 15, 17-22, 25, 26, 28, 29, 31-41, 46-51, 54, 55, 60-66, 69 y 70 parece ser novedosa con respecto al antecedente D1.

Artículo 33(3) del PCT

El antecedente D1, descrito anteriormente, representa el estado de la técnica más cercano.

La materia novedosa contenida en las reivindicaciones 2, 3, 6, 7, 14, 15, 17-22, 25, 26, 28, 29, 31-41, 46-51, 54, 55, 60-66, 69 y 70 no pueden considerarse inventivas en el marco de la Artículo 33(3) del PCT puesto que las características técnicas ahí representan materia trivial que son soluciones comunes en el campo de la vacunología. Aquella persona experta podría llegar a estas características sin el uso de habilidades inventivas al buscar resolver el problema de la formulación de vacunas de múltiples componentes y por ende las reivindicaciones 2, 3, 6, 7, 14, 15, 17-22, 25, 26, 28, 29, 31-41, 46-51, 54, 55, 60-66, 69 y 70 no poseen nivel inventivo (Artículo 33(3) del PCT).

PATENT COOPERATION TREATY



From the
INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINING AUTHORITY

To:

FULLER, Grover, F.
c/o DROUIN, Stéphane
European Pharma Patent Department,
Pfizer Research and Development
Rennegate Road
Sandwich, Kent CT13 9NJ
GRANDE BRETAGNE



NOTIFICATION OF TRANSMITTAL OF
THE INTERNATIONAL PRELIMINARY
REPORT ON PATENTABILITY

(PCT Rule 71.1)

Date of mailing
(day/month/year)

01.09.2006

Applicant's or agent's file reference
PC32220A

IMPORTANT NOTIFICATION

International application No.
PCT/IB2005/003111

International filing date (day/month/year)
23.09.2005

Priority date (day/month/year)
08.10.2004

Applicant
PFIZER PRODUCTS INC. et al.

1. The applicant is hereby notified that this International Preliminary Examining Authority transmits herewith the international preliminary report on patentability and its annexes, if any, established on the international application.
2. A copy of the report and its annexes, if any, is being transmitted to the International Bureau for communication to all the elected Offices.
3. Where required by any of the elected Offices, the International Bureau will prepare an English translation of the report (but not of any annexes) and will transmit such translation to those Offices.
4. **REMINDER**

The applicant must enter the national phase before each elected Office by performing certain acts (filing translations and paying national fees) within 30 months from the priority date (or later in some Offices) (Article 39(1)) (see also the reminder sent by the International Bureau with Form PCT/IB/301).

Where a translation of the international application must be furnished to an elected Office, that translation must contain a translation of any annexes to the international preliminary report on patentability. It is the applicant's responsibility to prepare and furnish such translation directly to each elected Office concerned.

For further details on the applicable time limits and requirements of the elected Offices, see Volume II of the PCT Applicant's Guide.

The applicant's attention is drawn to Article 33(5), which provides that the criteria of novelty, inventive step and industrial applicability described in Article 33(2) to (4) merely serve the purposes of international preliminary examination and that "any Contracting State may apply additional or different criteria for the purposes of deciding whether, in that State, the claimed invention is patentable or not" (see also Article 27(5)). Such additional criteria may relate, for example, to exemptions from patentability, requirements for enabling disclosure, clarity and support for the claims.

FILING	☒
DEBIT NOTE	☐
RENEWALS	☐
RECORDABLE	☐

Name and mailing address of the international
preliminary examining authority:

European Patent Office
D-60298 Munich
Tel. +49 89 2369 - 0 Tx: 523694 opru d
Fax: +49 89 2369 - 4465

Authorized Officer

Moreno, R

Tel. +49 89 2369-2058



PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT ON PATENTABILITY

(Chapter II of the Patent Cooperation Treaty)

(PCT Article 36 and Rule 70)

282

281

Applicant's or agent's file reference PC32220A	FOR FURTHER ACTION See Form PCT/PEA/15	
International application No. PCT/B2005/003111	International filing date (day/month/year) 23.09.2005	Priority date (day/month/year) 06.10.2004
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC INV. A61K39/02 A61P31/04 A61P31/12		
Applicant PFIZER PRODUCTS INC. et al.		
1. This report is the international preliminary examination report, established by this International Preliminary Examining Authority under Article 35 and transmitted to the applicant according to Article 36. 2. This REPORT consists of a total of 7 sheets, including this cover sheet. 3. This report is also accompanied by ANNEXES, comprising: a. ☐ sent to the applicant and to the International Bureau a total of sheets, as follows: ☐ sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis of this report and/or sheets containing rectifications authorized by this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions). ☐ sheets which supersede earlier sheets, but which this Authority considers contain an amendment that goes beyond the disclosure in the international application as filed, as indicated in Item 4 of Box No. I and the Supplemental Box. b. ☐ (sent to the International Bureau only) a total of (indicate type and number of electronic carrier(s)) , containing a sequence listing and/or tables related thereto, in electronic form only, as indicated in the Supplemental Box Relating to Sequence Listing (see Section 602 of the Administrative Instructions).		
4. This report contains indications relating to the following items: ☒ Box No. I Basis of the report ☐ Box No. II Priority ☒ Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability ☐ Box No. IV Lack of unity of invention ☒ Box No. V Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement ☐ Box No. VI Certain documents cited ☐ Box No. VII Certain defects in the international application ☐ Box No. VIII Certain observations on the international application		
Date of submission of the demand 29.11.2005	Date of completion of this report 01.09.2006	
Name and mailing address of the international preliminary examining authority:  European Patent Office D-80298 Munich Tel. +49 89 2369 - 0 Tx: 623664 spms d Fax: +49 89 2369 - 4466	Authorized officer Rankin, R Telephone No. +49 89 2369-2654 	

**INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT
ON PATENTABILITY**

International application No.
PCT/IB2005/003111

283
282

Box No. I Basis of the report

1. With regard to the language, this report is based on the international application in the language in which it was filed, unless otherwise indicated under this item.
- ☐ This report is based on translations from the original language into the following language, which is the language of a translation furnished for the purposes of:
- ☐ international search (under Rules 12.3 and 23.1(b))
 - ☐ publication of the international application (under Rule 12.4)
 - ☐ international preliminary examination (under Rules 55.2 and/or 55.3)
2. With regard to the elements* of the international application, this report is based on *(replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report)*:

Description, Pages

1-72 as originally filed

Claims, Numbers

1-73 as originally filed

Drawings, Sheets

1/5-5/5 as originally filed

☒ a sequence listing and/or any related table(s) - see Supplemental Box Relating to Sequence Listing

3. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:
- ☐ the description, pages
 - ☐ the claims, Nos.
 - ☐ the drawings, sheets/figs
 - ☐ the sequence listing (specify):
 - ☐ any table(s) related to sequence listing (specify):
4. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments annexed to this report and listed below had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).
- ☐ the description, pages
 - ☐ the claims, Nos.
 - ☐ the drawings, sheets/figs
 - ☐ the sequence listing (specify):
 - ☐ any table(s) related to sequence listing (specify):

* If item 4 applies, some or all of these sheets may be marked "superseded."

**INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT
ON PATENTABILITY**

International application No.
PCT/IB2005/003111

28A

283

Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

1. The questions whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step (to be non-obvious), or to be industrially applicable have not been examined in respect of:

☐ the entire international application,

☒ claims Nos. 9-11, 27-29, 42-44, 56-58, 71-73

because:

☒ the said international application, or the said claims Nos. 9-11, 27-29, 42-44, 56-58, 71-73 relate to the following subject matter which does not require an international preliminary examination (specify):

see separate sheet

☐ the description, claims or drawings (*indicate particular elements below*) or said claims Nos. are so unclear that no meaningful opinion could be formed (*specify*):

☐ the claims, or said claims Nos. are so inadequately supported by the description that no meaningful opinion could be formed.

☐ no international search report has been established for the said claims Nos.

☐ the nucleotide and/or amino acid sequence listing does not comply with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions in that:

the written form

☐ has not been furnished

☐ does not comply with the standard

the computer readable form

☐ has not been furnished

☐ does not comply with the standard

☒ the tables related to the nucleotide and/or amino acid sequence listing, if in computer readable form only, do not comply with the technical requirements provided for in Annex C-bis of the Administrative Instructions.

☐ See separate sheet for further details

**INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT
ON PATENTABILITY**

International application No.
PCT/IB2005/003111

285
289

Box No. V Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Yes: Claims	2, 3, 6, 7, 14, 15, 17-22, 25, 26, 31-41, 46-51, 54, 55, 60-66, 69, 70
	No: Claims	1, 4, 5, 8-13, 16, 23, 24, 27, 30, 42-45, 52, 53, 56-59, 67, 68, 71-73
Inventive step (IS)	Yes: Claims	
	No: Claims	1-73
Industrial applicability (IA)	Yes: Claims	1-6, 12-26, 30-41, 45-55, 59-70
	No: Claims	

2. Citations and explanations (Rule 70.7):

see separate sheet

**INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT
ON PATENTABILITY**

International application No.
PCT/IB2005/003111

206
285

Supplemental Box relating to Sequence Listing

Continuation of Box I, Item 2:

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, this report has been established on the basis of:

a. type of material:

- ☒ a sequence listing
- ☐ table(s) related to the sequence listing

b. format of material:

- ☒ in written format
- ☒ in computer readable form

c. time of filing/furnishing:

- ☒ contained in the international application as filed
- ☒ filed together with the international application in computer readable form
- ☐ furnished subsequently to this Authority for the purposes of search and/or examination
- ☐ received by this Authority as an amendment on

2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table(s) relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional observations, if necessary:

Re Item III

Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

Claims 9-11, 27-29, 42-44, 56-58 and 71-73 relate to subject matter considered by this Authority to be covered by the provisions of Rule 67.1(iv) PCT. Consequently, no opinion will be formulated with respect to the industrial applicability of the subject matter of these claims (Article 34(4)(a)(i) PCT)

Re Item V

Reasoned statement with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

For the assessment of the present claims 9-11, 27-29, 42-44, 56-58 and 71-73 on the question whether they are industrially applicable, no unified criteria exist within the PCT Contracting States. The patentability can also be dependent upon the formulation of the claims. The EPO, for example, does not recognise as industrially applicable the subject matter of claims to the use of a compound in medical treatment, but may allow, however, the use of such a compound for the manufacture of a medicament for a new medical treatment.

Cited Documents

Reference is made to the following document:

D1: WO 2004/087031 A (PFIZER PRODUCTS INC; DOMINOWSKI, PAUL, JOSEPH; FRANTZ, JOSEPH, CLAUDE;) 12 August 2004 (2004-08-12)

Article 33(2) PCT

Document D1 discloses multivalent vaccines for use in dogs. The antigens employed in the vaccine include those from canine distemper, canine adenovirus 2, canine parvovirus, canine coronavirus, canine parainfluenza type III virus, the *Bordetella bronchiseptica* p68 antigen as well as cell preparations derived from *Leptospira bratislava*, *Leptospira canicola*, *Leptospira grippotyphosa*, *Leptospira icterohaemorrhagiae* and *Leptospira pomona*. The adjuvant system used in the vaccine comprises Quil A and cholesterol (cf page 1, line 32 to page 2, line 38; page 3, lines 18-38; example 4; claims 8, 9, 12-15).

**INTERNATIONAL PRELIMINARY
REPORT ON PATENTABILITY
(SEPARATE SHEET)**

International application No. **287**

PCT/B2005/003111

As a consequence of the disclosure of D1, claims 1, 4, 5, 8-13, 16, 23, 24, 27, 30, 42-45, 52, 53, 56-59, 67, 68 and 71-73 cannot be considered novel (Article 33(2) PCT).

The subject matter of claims 2, 3, 6, 7, 14, 15, 17-22, 25, 26, 28, 29, 31-41, 46-51, 54, 55, 60-66, 69 and 70 appears to be novel over D1.

Article 33(3) PCT

Document D1, described above, represents the closest prior art.

The novel subject matter contained in claims 2, 3, 6, 7, 14, 15, 17-22, 25, 26, 28, 29, 31-41, 46-51, 54, 55, 60-66, 69 and 70 cannot be viewed as being inventive within the meaning of Article 33(3) PCT since the technical features therein represent trivial matter which are commonplace solutions within the field of vaccinology. The skilled person would arrive at these features without the use of inventive skill when seeking to solve the problem of multicomponent vaccine formulation and hence claims 2, 3, 6, 7, 14, 15, 17-22, 25, 26, 28, 29, 31-41, 46-51, 54, 55, 60-66, 69 and 70 do not involve an inventive step (Article 33(3) PCT).

PASS TO
FOREIGN FILING

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION OF THE RECORDING
OF A CHANGE(PCT Rule 92bis.1 and
Administrative Instructions, Section 422)

To:

FULLER, Grover, F.
c/o DROUIN, Stéphane
European Pharma Patent Department
Pfizer Global Research and Development
Ramsgate Road
Sandwich, Kent CT13 9NJ
ROYAUME-UNIEUROPEAN PHARMA
PATENT DEPARTMENT

20 MAR 2007

Date of mailing (day/month/year) 12 March 2007 (12.03.2007)	IMPORTANT NOTIFICATION
Applicant's or agent's file reference PC32220A	
International application No. PCT/IB2005/003111	International filing date (day/month/year) 23 September 2005 (23.09.2005)

1. The following indications appeared on record concerning:		
☒ the applicant	☒ the inventor	☐ the agent
☐ the common representative		
Name and Address TUCKER, Cassius, McAllister c/o Pfizer Global Research and Development 301 Henrietta Street Kalamazoo, MI 49001 United States of America	State of Nationality US	State of Residence US
Telephone No.		
Facsimile No.		
Teleprinter No.		
2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:		
☐ the person	☐ the name	☒ the address
☐ the nationality		
☐ the residence		
Name and Address TUCKER, Cassius, McAllister c/o Pfizer Global Research and Development 7000 Portage Road Kalamazoo, MI 49001-0199 United States of America	State of Nationality US	State of Residence US
Telephone No.		
Facsimile No.		
Teleprinter No.		
3. Further observations, if necessary:		
4. A copy of this notification has been sent to:		
☐ the receiving Office	☐ the designated Offices concerned	
☐ the International Searching Authority	☒ the elected Offices concerned	
☐ the International Preliminary Examining Authority	☐ other:	

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer Pouvreau Pascale
Facsimile No. +41 22 338 82 70	Facsimile No. +41 22 338 70 60
	Telephone No. +41 22 338 95 46

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

F/182005/003111

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K39/02

A61P31/04

A61P31/12

289

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, WPI Data, PAJ, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2004/067031 A (PFIZER PRODUCTS INC; DORINOWSKI, PAUL, JOSEPH; FRANTZ, JOSEPH, CLAUDE;) 12 August 2004 (2004-08-12) page 1, line 32 - page 2, line 38 page 3, line 18 - line 38 claims; examples	1-73
A	US 3 470 294 A (KURT DRAGER ET AL) 30 September 1969 (1969-09-30) column 1, line 20 - line 25 column 6, line 74 - column 7, line 22 claims; examples -/-	1-73

☒ Further documents are listed in the continuation of this C.☒ One patent family group.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *B* earlier document but published on or after the international filing date
- *C* document which may raise doubts on priority, cleavage or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reasons (see explanation)
- *D* document relating to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *E* 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 substantiate 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 considered with one or more other such documents, each combination being obvious to a person skilled in the art
- *Z* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

3 February 2006

Date of mailing of the international search report

15/02/2006

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.O. Box 2911, D-69111 Heidelberg
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2000, Telex 31 091 epo nl,
 Fax: (+31-70) 340-2016

Authorized officer

Rankin, R

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/IB2005/003111

Box No. 1 Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of Item 1.b of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:
 - a. type of material
 - ☒ a sequence listing
 - ☐ table(s) related to the sequence listing
 - b. format of material
 - ☒ on paper
 - ☒ in electronic form
 - c. time of filing/furnishing
 - ☒ contained in the international application as filed
 - ☒ filed together with the international application in electronic form
 - ☐ furnished subsequently to this Authority for the purpose of search
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

T/IB2005/003111

291

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Character of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2004/081666 A1 (DOMINOWSKI PAUL JOSEPH) 29 April 2004 (2004-04-29) paragraph '0014! paragraph '0016! paragraph '0058! examples	1-73
A	WO 94/22475 A (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA) 13 October 1994 (1994-10-13) page 5, line 1 - line 15 page 7, line 9 - line 22 examples	1-73
A	WO 96/33739 A (SMITHKLINE BEECHAM BIOLOGICALS S.A; GARCON, NATHALIE, MARIE-JOSEPHE, C) 31 October 1996 (1996-10-31) examples	1-73

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/IB2005/003111

292

Box II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 2 of first sheet)

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(b) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Although claims 9-11, 27-29, 42-44, 56-58, 71-73 are directed to a method of treatment of the animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this International application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention that mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

...T/182005/003111

293

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2004067031 A	12-08-2004	AU 2004208556 A1	12-08-2004
		BR 0407032 A	17-01-2006
		CA 2513352 A1	12-08-2004
		EP 1592444 A1	09-11-2005
US 3470294 A	30-09-1969	NONE	
US 2004081666 A1	29-04-2004	NONE	
WO 9422475 A	13-10-1994	AT 224202 T	15-10-2002
		AU 686561 B2	12-02-1998
		AU 4100393 A	24-10-1994
		CA 2158540 A1	13-10-1994
		DE 69332312 D1	24-10-2002
		DE 69332312 T2	31-07-2003
		EP 0693936 A1	31-01-1996
		JP 8508980 T	24-09-1996
WO 9633739 A	31-10-1996	AP 771 A	07-10-1999
		AT 186842 T	15-12-1999
		AU 693022 B2	18-06-1998
		AU 5334596 A	18-11-1996
		AU 6987398 A	23-07-1998
		BG 63491 B1	29-03-2002
		BG 101995 A	30-11-1998
		BR 9608199 A	18-06-1999
		CA 2217178 A1	31-10-1996
		CN 1516245 A	28-07-2004
		CN 1480214 A	10-03-2004
		CN 1182370 A	20-05-1998
		CZ 9703379 A3	18-03-1998
		DE 69605296 D1	30-12-1999
		DE 69605296 T2	18-05-2000
		DK 822831 T3	01-05-2000
		DZ 2026 A1	21-07-2002
		EA 839 B1	24-04-2000
		EP 0822831 A1	11-02-1998
		ES 2140076 T3	16-02-2000
		GR 3031912 T3	29-02-2000
		HK 1009086 A1	27-10-2000
		HU 9801560 A2	28-10-1998
		IL 118004 A	30-11-1999
		JP 11504020 T	06-04-1999
		MA 23850 A1	31-12-1996
		NO 974859 A	21-10-1997
		NZ 305365 A	28-05-1999
		QA 10629 A	16-09-2002
		PL 322968 A1	02-03-1998
		RO 119068 B1	30-03-2004
		SK 144297 A3	06-05-1998
		TR 9701252 T1	21-03-1998
		TW 515715 B	01-01-2003

294.

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
Rad: 07-033678- -00000-0000
Fec: 2007-04-03 16:03:24 Dep. 2020 NUECREACIONES
Trá 11 PATENTES Y
Eve: 379 FASENACIONAL II
Act 411 PRESENTACION Folio 294



**REQUISITOS MINIMOS PARA ADMISION A TRAMITE
PCT**

PATENTE DE INVENCION

☒

MODELO DE UTILIDAD []

- ◆ Indicación de que se solicita la concesión de 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 [☒]

COMPLETA []

INCOMPLETA []

DISEÑO INDUSTRIAL []

- ◆ Indicación de que se solicita el registro de 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 []

- ◆ Indicación de que se solicita el registro de un Esquema de Trazado []
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud []
- ◆ Representación gráfica del esquema trazado []
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas []

COMPLETA []

INCOMPLETA []

Firma Responsable

Fecha 3 ABR. 2007

Carrera 13 No. 27-00 Piso 5, 7 y 10
Conmutador: 3 82 08 40
Fax: 350 52 20
E-mail: info@sic.gov.co
www.sic.gov.co
Bogotá, D.C., Colombia

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

295

Bogotá,
2020

Doctor(a)
OLARTE GARCIA CARLOS REINALDO
Apoderado(a) y/o Representante de
PFIZER PRODUCTS INC.

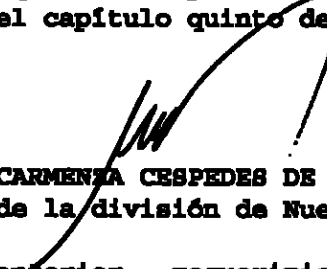
REFERENCIA	Radicación No.	7 33679
	Solicitud internacional	PCT/IB2005/003111
	Fecha inicio fase nacional	06/05/2007
	Trámite	11
	Evento	379
	Actuación	430
	Oficio No.	5042

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

1. La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante. (Art. 26-k) Decisión 486.

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Única No.10 de 2001.


ALIX CARMEN CESPEDES DE VERGEL
Jefe de la división de Nuevas Creaciones

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha 04 MAYO 2007
adpa11