



CSA125890

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-119116-00000-0000

Fecha: 2010-09-27 15:39:09

Tra. 11 PATENTEIYII

Act. 411 PRESENTACION

Dep. 2020 DIR.NUEVASCR

Eve: 379 FASENACIONALII

Folios: 123

Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

PCT

INVENTARIO

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

10-119116

21. EXPEDIENTE Nº

54. TÍTULO **COMPOSICIONES, MÉTODOS, Y KITS.**

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL **C07K 14/435**

71. SOLICITANTE **NOVARTIS AG.**

DOMICILIO **Basilea, Suiza**

74. APODERADO **DILIA MARIA RODRIGUEZ D'ALEMAN**

22. BOGOTÁ, D.C.

28-10-2010



No. 10-119116-00000-0000

Fecha: 2010-09-27 15:39:09
Tra. 11 PATENTEIYII
Act. 411 PRESENTACION

Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Eve: 379 FASENACIONALII
Folios: 123

**FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE 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: **NOVARTIS AG.**

Dirección: Lichtstrasse 35, CH-4056 Basilea,
Suiza.

Nacionalidad o Domicilio: Basilea, Suiza

Lugar de Constitución : Suiza

Teléfono:

Fax:

E-mail

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☐

NIT ☐

C.E. ☐

Otro ☐

Número

3

**REPRESENTANTE
O APODERADO
(74)**

Nombre: **DILIA MARÍA RODRÍGUEZ
D'ALEMAN**

Dirección: Cra. 11 No. 86-53 piso 6

Teléfono: 6 181088 Fax: 6350824

E-mail: clarkemodet@clarkemodet.com.co

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☒

NIT ☐

C.E. ☐

Otro ☐

Número 41.654.882

T.P 20824 CSJ

4

**INVENTOR (ES)
(72)**

Nombre: **VER ANEXOS**

Dirección:

Nacionalidad o domicilio:

5

PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/EP2009/053281 Fecha 20 de marzo de 2009

Publicación Internacional No. WO 2009/118273 A1 Fecha 01 de octubre de 2009

6 TÍTULO (54)

COMPOSICIONES, MÉTODOS, Y KITS. (folio 135)

7

Clasificación Internacional (51)

C07K 14/435

A61K 39/102 G01N 33/50
C07K 16/00

8

Prioridad

SI

☒

NO

☐

(33) País de Origen

ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA

(32) Fecha

28 de marzo de 2008

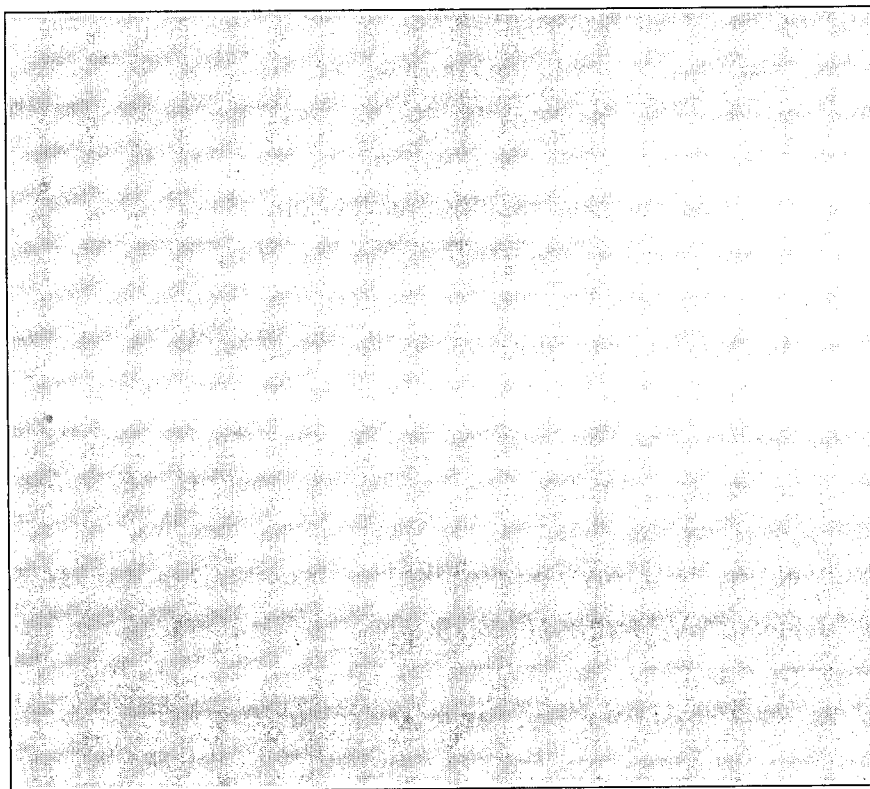
(31) Número de Solicitud

61/040,260

9 Comprobante de pago No. 10-71,110 // 10-71,152 // 10-71,207 Fecha Todas de 27 de agosto de 2010

- ☒ 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
- ☒ 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 de 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 deposito 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 Notificaciones

11 FIGURA CARACTERÍSTICA



12 Solicito la concesión de la patente

NOMBRE : DILIA MARÍA RODRÍGUEZ D'ALEMAN

FIRMA:

C.C. 41.654.882

T.P. 20824

ANEXOS

INVENTORES

1.)

PLOCHER, Thomas

(Novartis Animal Health US, Inc., Larchwood Site, 1447 140th Street, Larchwood, Iowa 51241, Estados Unidos de América);

2.)

CAMPOS, Manuel

(94 Redwood Meadows DR, Redwood Meadows, Alberta, Alberta T3Z 1A3, Canadá);

3.)

HARLAND, Richard

(Novartis Animal Health Canadá Inc., 2000 Argentia Road, Suite 400, Plaza 3, Mississauga, Ontario L5N 1V9, Canadá);

4.)

JOHNSON, Todd

(Novartis Animal Health US, Inc., Larchwood Site, 1447 140th Street, Larchwood, Iowa 51241, Estados Unidos de América);

5.)

HARBISON, Trent

(Novartis Animal Health US, Inc., Larchwood Site, 1447 140th Street, Larchwood, Iowa 51241, Estados Unidos de América);

6.)

KEIL, Dan

(12707 W. 63rd Street, Shawnee, Kansas 66216, Estados Unidos de América).

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 10 - 71,110
FECHA : AGOSTO 27 DE 2010

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-119116-00000-0000

Fecha: 2010-09-27 15:39:09 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 411 PRESENTACION Folios: 123

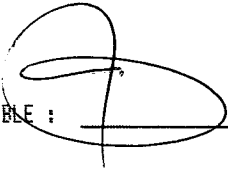
***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CLARKE MODET	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	353156554	26/08/2010	85,505,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01	SOLICITUDES	*** S.DISTINTIVO CAMBIO TITULARIDAD-
		TOTAL :	\$ 350,000.00

SON: TRESCIENTOS CINCUENTA MIL PESOS

RESPONSABLE : 

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

P-2671
3

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

CERTIFICACION DE EXCEDENTE : 10 - 71,152

FECHA : AGOSTO 27 DE 2010

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-119116-00000-0000

Fecha: 2010-09-27 15:39:09

Dep. 2020 DIR.NUEVASCR

Tra. 11 PATENTEIYII

Eve: 379 FASENACIONALII

Act. 411 PRESENTACION

Folios: 123

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	Vr. PAGO
CLARKE MODET	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	353156554	26/08/2010	85,505,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-09	OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD I	
		99 OTROS SERVICIOS ADMINISTRATIVOS	200,000.00
		TOTAL :	\$ 200,000.00

SON: DOSCIENTOS MIL PESOS

RESPONSABLE :

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

ESTA CERTIFICACION DE EXCEDENTE DE PAGO SOLO PODRA SER UTILIZADA
COMO PARTE DE LA CANCELACION DE UNA TARIFA VIGENTE Y NO PODRA SER
SUSTITUIDA POR NINGUN RECIBO.

1. The first part of the document is a letter from the President of the United States to the Congress, dated January 3, 1862. It is a very important document, as it contains the President's annual message to Congress. The letter is written in a formal, dignified style, and it is one of the most important documents in the history of the United States. It is a document that has been read and studied by many generations of Americans, and it is a document that has shaped the course of the nation's history. The letter is a masterpiece of American literature, and it is a document that is as relevant today as it was when it was first written.

2. The second part of the document is a letter from the President of the United States to the Congress, dated January 3, 1862. It is a very important document, as it contains the President's annual message to Congress. The letter is written in a formal, dignified style, and it is one of the most important documents in the history of the United States. It is a document that has been read and studied by many generations of Americans, and it is a document that has shaped the course of the nation's history. The letter is a masterpiece of American literature, and it is a document that is as relevant today as it was when it was first written.

3. The third part of the document is a letter from the President of the United States to the Congress, dated January 3, 1862. It is a very important document, as it contains the President's annual message to Congress. The letter is written in a formal, dignified style, and it is one of the most important documents in the history of the United States. It is a document that has been read and studied by many generations of Americans, and it is a document that has shaped the course of the nation's history. The letter is a masterpiece of American literature, and it is a document that is as relevant today as it was when it was first written.

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 10 - 71,207
FECHA : AGOSTO 27 DE 2010

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-119116-00000-0000

Fecha: 2010-09-27 15:39:09 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 411 PRESENTACION Folios: 123

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	Vr. PAGO
CLARKE MODET	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	353156554	26/08/2010	85,505,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-08	PRORROGA DE TERMINOS	83,000.00
		*** N.CREACION PRORROGA DE TERMINOS D	
		TOTAL :	\$ 83,000.00

SON: OCHENTA Y TRES MIL PESOS

RESPONSABLE :

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

5

3

4

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

50054-CG-PCT

COLOMBIA

Carrera 11 N° 86-53 Piso 6 Bogotá Colombia Tel: (57 1) 6181088 Fax: (57 1) 6350824 Email: info@clarkemodet.com.co

PODER

Yo (nosotros), abajo firmante(s)

Steve Braithwaite y Bernd Liphardt

en mi (nuestro) carácter de representante(s) legales de

Novartis AG.

una sociedad organizada y existente de acuerdo con las leyes de

Suiza

y en actual cumplimiento de su objeto social, con domicilio en

Lichtstrasse 35, 4052 Basel, Suiza

por el presente instrumento confiero (conferimos) poder especial a favor de DILIA MARIA RODRIGUEZ D'ALEMAN, con Cédula de Ciudadanía No. 41.654.882 de Bogotá, y tp. 20824 y CLAUDIA LUCIA CARO RAMIREZ, con Cédula de Ciudadanía No. 40.017.374 de Tunja, y tp. 36448, con domicilio en Bogotá, Colombia, para que actuando en su orden en nombre del (de la) otorgante le (la) representen ante cualquier entidad, autoridad y/o persona, especialmente ante las del orden Administrativo, Contencioso Administrativo, Judicial, Tribunales de Arbitramento y/o cualquier otro en lo referente a los siguientes asuntos:

- 1) Solicitar, tramitar, obtener y/o registrar cualquiera de las modalidades de Propiedad Industrial, tales como: patentes de invención, modelos de utilidad, diseños industriales, variedades vegetales; marcas, lemas, nombres y enseñanzas comerciales y denominaciones de origen; así como sus renovaciones, prórrogas, transferencias, cambios de nombre y/o domicilio, contratos y licencias.
- 2) Solicitar, tramitar, obtener y/o registrar derechos de autor, en cualquiera de sus presentaciones así como la protección de secretos industriales y know-how.
- 3) Solicitar, tramitar, obtener y/o registrar registros sanitarios, permisos y/o licencias de funcionamiento; así como sus renovaciones o prórrogas, transferencias, cambios de nombre y/o domicilio, contratos y licencias.
- 4) Ejercer acciones de oposición, observación, reclamos, reconsideración, reposición, apelación, cancelación administrativa o judicial, nulidad, protección al consumidor, concesión de licencias, protección de secretos industriales y demás acciones y recursos relacionados con derechos derivados de los asuntos arriba indicados y en contra de la competencia desleal, acciones derivadas de la obtención o explotación de licencias, acciones de indemnización de perjuicios. También podrá(n) intervenir en juicios civiles, comerciales, penales, contencioso-administrativos, tutelas y de policía; en acciones o juicios promovidos por el (la) mandante o en contra el (ella).
- 5) Registrar nombres de dominio ante la entidad competente.
- 6) En el ejercicio de este mandato los mandatarios arriba mencionados quedan facultados para: conciliar, cancelar, transigir, comprometer en árbitros, desistir, recibir y tomar posesión de la cosa objeto de litigio y renunciar o desistir a derechos concedidos o en curso de concesión, admitir los hechos del proceso.
- 7) Ratificar o no la agencia oficiosa.
- 8) Así mismo faculto (facultamos) a los mencionados apoderados para recibir notificaciones y designar apoderados judiciales o extrajudiciales, sustituir el presente poder y revocar las sustituciones que hicieren.

Dado y firmado en Basilea, Suiza

a los 1 días de Octubre de 2008

Firma / signature

POWER OF ATTORNEY

I (we), the undersigned

STEVE BRAITHWAITE and BERND LIPHARDT

legal representative(s) of

NOVARTIS AG

an organization existing under the laws of

SWITZERLAND

and in present execution of its business activity, domiciled at

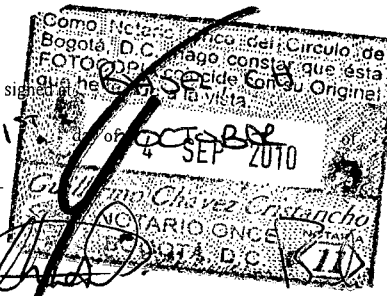
LICHTSTRASSE 35, 4052 BASEL, CH

do hereby grant POWER OF ATTORNEY to DILIA MARIA RODRIGUEZ D'ALEMAN, identification card No. 41.654.882 of Bogotá, and tp. 20824 and CLAUDIA LUCIA CARO RAMIREZ, tp. 36448, identification card No. 40.017.374 of Tunja, residing in Bogotá, Colombia, to act in the order of their appointment in behalf of grantor before any entity, authority and/or natural or juridical person, specially before those Administrative, Administrative-Contentious, Judicial, arbitration courts, and/or any other, in all matters concerning the following:

- 1) To apply, process, obtain and/or register any of the modalities of Industrial Property, such as: Patents of Invention, Utility Models; Designs, plant varieties; Marks, Slogans, Trade Names and emblems and appellations of Origin; as well as their renewals, assignments, changes of name and/or domicile, agreements and licenses.
- 2) To apply, process, obtain and/or register copyrights of any kind as well as protection of industrial secrets or know-how.
- 3) To apply, process, obtain and/or register sanitary registrations, operating authorizations and/or licenses; as well as their renewals or assignments, changes of name and/or domicile, agreements and licenses.
- 4) To bring actions of opposition, observations, claims, reconsideration, appeal or legal remedies, cancellations, nullity, protection to the consumer, granting of licenses, protection of trade secrets and other actions related with rights derived from the above-mentioned matters and against the unfair competition, actions resulting from the obtaining or exploitation of licenses, recovering damages actions. They can also intervene or participate in Civil, Commercial, Criminal or Contentious-Administrative Trials; the actions for writ mandamus, police actions; in actions, lawsuits or litigations instituted by the grantor or against him.
- 5) To register domain names before the competent entity.
- 6) To the effect of this mandate the above-named proxy are empowered to: conciliate, cancel, settle, submit to arbitration, withdraw and to receive and take possession of the litigation related object and waive or renounce the rights granted or in process of granting, admit the facts of the case.
- 7) To ratify or not the officious agency.
- 8) I (we) hereby appoint the afore mentioned attorneys with powers to receive notifications and to designate judicial and extrajudicial attorneys, substitute this Power of Attorney and to revoke such substitutions.

Granted and signed

on this 01 of OCTOBER of 2008



Novartis AG
Steve Braithwaite
Head of Patent Administration
Novartis Animal Health

B. Liphardt

6

NOTARIAL CERTIFICATION

On this 10th (tenth) day of October 2008 (two thousand and eight), the undersigned Notary Public at Basel, Switzerland, Dr. Thomas Gelzer,

CERTIFIES

1. That Mr. Steve Braithwaite, British citizen, residing in Basel, Switzerland, and Mr. Bodo Liphardt, German citizen, residing in Reinach/BL, Switzerland, (the "grantors"), both of legal age, set their hand on the foregoing document.

2. That the authenticity of the signatures of the grantors has been established by means of comparison and that they have the legal capacity to execute the instrument.

3. That the grantors have executed the foregoing document as proxy holders on behalf of Novartis AG, in Basel, Switzerland ("the corporate person"), with joint signature at two.

4. That the corporate person, having its home office in Basel, Switzerland, is duly organized, has present legal existence and that the purposes for which the power of attorney is granted are within the scope of its corporate purposes.

5. That the grantors have in fact the referred to authority and that their representation is legal.

6. That I have based certifications 3 (three), 4 (four) and 5 (five) above on the following authentic documents for such purpose exhibited to me and which I mention specifically, giving their dates and their origin of source:

- Online Extract from the Register of Commerce of the Canton Basel-City/Switzerland, for Novartis AG of today.

- Power of Attorney dated December 20 (twenty), 2007 (two thousand and seven).

BASEL, Switzerland, this 10th (tenth) day of October 2008 (two thousand and eight)

Leg.Prot.Nr. 913/2008

CERTIFICACIÓN NOTARIAL

Al 10 (diez) del mes de octubre de 2008 (dos mil y ocho), el suscrito Notario Publico de Basilea, Suiza, Dr. Thomas Gelzer,

DA FE

1. Que los Señores Steve Braithwaite, de Gran Bretaña, en Basilea, Suiza, y Bodo Liphardt, de Alemania, en Reinach/BL, Suiza (los "otorgantes"), mayor de edad, firmen de su puño y letra el documento que antecede.

2. Que la autenticidad de las firmas de los otorgantes fué verificada por comparación y que ellos tienen capacidad legal para el otorgamiento.

3. Que los otorgantes han suscrito el referido documento en su carácter de mandatarios de Novartis AG (la "persona jurídica"), facultados para hacer uso conjuntamente de la firma social.

4. Que la persona jurídica con sede en Basilea, Suiza, está legalmente constituida, que tiene existencia legal actual y que el acto para el cual se otorga el poder está comprendido entre los que constituyen su objeto social.

5. Que los otorgantes tienen efectivamente la representación que ostenta y que ésta es legítima.

6. Que he basado las certificaciones 3 (tres), 4 (cuatro) y 5 (cinco) anteriores en los siguientes documentos auténticos que al efecto se me exhibieron y que menciono específicamente con expresión de sus fechas y de su origen o procedencia:

- Online Extracto del registro mercantil de Basilea-Ciudad/Suiza, para Novartis AG de hoy.

- Poder del 20 (veinte) de diciembre de 2007 (dos mil y siete).



APOSTILLE

(Convention de la Haye du 5 octobre 1961)

1. Land: Schweiz (Suisse)

Diese öffentliche Urkunde

2. ist unterschrieben von *St. iur. H. Gelzer*

3. in seiner Eigenschaft als *off. Notar*

4. sie ist versehen mit dem Siegel/Stempel des (der) *Gemeinden*

Bestätigt

10. Okt. 2008

5. in Basel (Bâle)

6. am

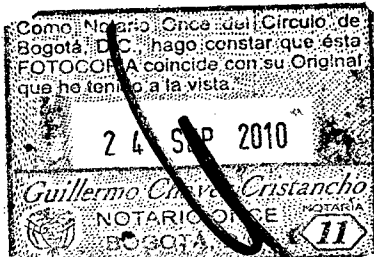
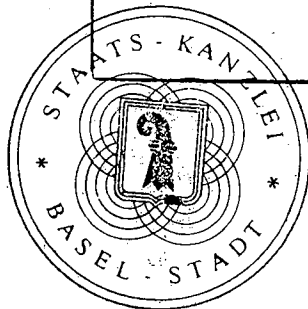
7. durch die Staatskanzlei des Kantons Basel-Stadt

8. unter Nr. *8925/15089*

9. Siegel/Stempel:

10. Unterschrift:

Helena Schaffner



APOSTILLA

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

1. País: Republica Federal de Alemania

Este documento publico

2. está firmado por el Dr. Ins. M. Gelzer

3. en su calidad de Notario publico

4. está provisto con el timbre del notario nombrado

confirmado

5. en Basilea

6. el 10 de octubre de 2008

7. por la cancillería estatal del cantón de ciudad Basilea

8. bajo el numero 8925 - 15089

9. Sello

10. Firma

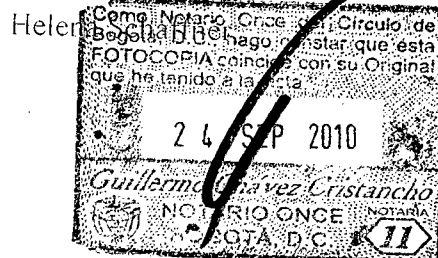
cancillería estatal del cantón

Firma

de ciudad Basilea

MINISTERIO DE
RELACIONES EXTERIORES
2010 FEB 29 A 10:59
JEFE DE LEGALIZACIONES
BOGOTA D.C.

NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD
DEL TEXTO
006805
Adolf Watzke



8
Adolf Watzke
Traductor oficial

Case No. 52674

1

ASSIGNMENT

For good and valuable consideration, the receipt and adequacy of which is hereby acknowledged, we

(1) Manuel CAMPOS, (2) Trent HARBISON, (3) Richard HARLAND, (4) Todd JOHNSON, (5) Dan KIEL and
(6) Thomas Barton PLOCHER,

respectively residing at

(1) 94 Redwood Meadows Dr., Redwood Meadows, Alberta, T3Z 1A3, Canada,

(2) Novartis Animal Health US, Inc., Larchwood Site, 1447 140th Street, Larchwood, IA 51241, USA,

(3) Novartis Animal Health Canada Inc., 2000 ARGENTIA Rd., Suite 400 P132A 3, MISSISSAUGA, ONT, L5N 1V9
2420 Palliswood Rd SW, Calgary, Alberta T2V 3P8, Canada,

(4) Novartis Animal Health US, Inc., Larchwood Site, 1447 140th Street, Larchwood, IA 51241, USA,,
RW

(5) 12707 W. 63rd Street, Shawnee, KS 66216, USA and

(6) Novartis Animal Health US, Inc., Larchwood Site, 1447 140th Street, Larchwood, IA 51241, USA,

do hereby sell, assign and transfer to **Novartis AG**, a company organized under the laws of the Swiss Confederation, of Lichtstrasse 35, 4056 Basel, Switzerland, and its successors, assigns and legal representatives, all our right, title and interest for all countries of the world, (Novartis AG hereinafter referred to as the "**ASSIGNEE**") in and to (1) all of our inventions and discoveries described in the patent application(s) entitled

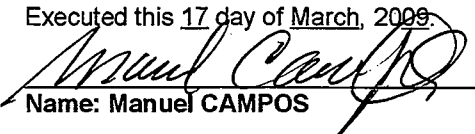
COMPOSITIONS, METHODS AND KITS

filed* in the RO/EPO on 20 March, 2009, and accorded International Patent Application Number PCT/EP03/653281 (2) said patent application(s), (3) (3) all national stages of said international patent application, (4) all other patent applications in all countries and regions claiming the priority of the US, patent application filed on 28.03.2008 and accorded Application Number 61/040260, (5) all continuations and divisions of all of said patent applications (including further continuations and divisions such as, but not limited to, continuations of continuations and continuations of divisions), ((2)-(5) hereinafter referred to collectively as "patent applications"), (6) all patents that are granted on any of said patent applications, (7) all registrations and confirmations of, and importation certificates based on, one or more of said patents and (8) all reissues, renewals and extensions of said patents, reexamination certificates issued for said patents and supplementary protection certificates based on said patents (including the right to file patent applications on said inventions and discoveries in the names of **ASSIGNEE**, their designees or in any or all of our names, at their election and in accordance with applicable law in all countries and regions and all rights of priority in all countries and regions for all of said patent applications under the International Convention for the Protection of Industrial Property, and all other applicable similar international agreements), the same to be held and enjoyed by said **ASSIGNEE**, their successors, assigns and legal representatives, to the full ends of the terms for which all patents therefor may be granted, as fully and entirely as the same would have been held and enjoyed by us if this sale, assignment and transfer had not been made.

*We hereby authorize **ASSIGNEE** and their representatives to insert in this instrument the Application Number and the filing date of said patent application when notified thereof.

And we hereby covenant and agree that we will, at any time, upon the request and at the expense of **ASSIGNEE**, execute and deliver all documents that may be necessary or desirable to perfect the title to the foregoing inventions and discoveries, patent applications, patents, registrations, confirmations, importation certificates, reissues, renewals, extensions, reexamination certificates and supplementary protection certificates in **ASSIGNEE**, their successors, assigns or other legal representatives, including the execution and procurement of all further documents evidencing this sale, assignment and transfer as may be necessary or desirable for recording the same in the patent office or other intellectual property office, agency or the like of any country or region, that we will, at any time, upon the request and at the expense of **ASSIGNEE**, execute all additional patent applications, applications for registration and/or confirmation of one or more of said patents, applications for certificates of importation based on one or more of said patents, applications for reissues, renewals and extensions of one or more of said patents and supplemental protection certificates based upon one or more of said patents, and that we will make all rightful oaths and declarations and do all lawful acts requisite for procuring the same or for aiding therein, without further compensation, but at the expense of **ASSIGNEE**, the successors, assigns or other legal representatives.

Executed this 17 day of March, 2009.


Name: Manuel CAMPOS

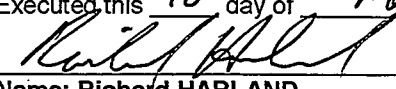
L.S.

Executed this ____ day of _____, 20____.

Name: Trent HARBISON

L.S.

Executed this 18th day of March, 2009.


Name: Richard HARLAND

L.S.

10

*We hereby authorize **ASSIGNEE** and their representatives to insert in this instrument the Application Number and the filing date of said patent application when notified thereof.

And we hereby covenant and agree that we will, at any time, upon the request and at the expense of **ASSIGNEE**, execute and deliver all documents that may be necessary or desirable to perfect the title to the foregoing inventions and discoveries, patent applications, patents, registrations, confirmations, importation certificates, reissues, renewals, extensions, reexamination certificates and supplementary protection certificates in **ASSIGNEE**, their successors, assigns or other legal representatives, including the execution and procurement of all further documents evidencing this sale, assignment and transfer as may be necessary or desirable for recording the same in the patent office or other intellectual property office, agency or the like of any country or region, that we will, at any time, upon the request and at the expense of **ASSIGNEE**, execute all additional patent applications, applications for registration and/or confirmation of one or more of said patents, applications for certificates of importation based on one or more of said patents, applications for reissues, renewals and extensions of one or more of said patents and supplemental protection certificates based upon one or more of said patents, and that we will make all rightful oaths and declarations and do all lawful acts requisite for procuring the same or for aiding therein, without further compensation, but at the expense of **ASSIGNEE**, the successors, assigns or other legal representatives.

Executed this _____ day of _____, 20____.

_____. L.S.

Name: Manuel CAMPOS

Executed this 17 day of March, 2009.

Trent HARBISON

_____. L.S.

Name: Trent HARBISON

Executed this _____ day of _____, 20____.

_____. L.S.

Name: Richard HARLAND

Case No. 52674

3

Executed this 17 day of March, 20 09.

Todd Johnson L.S.
Name: Todd JOHNSON

Executed this _____ day of _____, 20 _____.

Name: Dan KIEL L.S.

Executed this 16 day of March, 20 09.

T. Barton Plocher L.S.
Name: Thomas Barton PLOCHER

12

Case No. 52674

3

Executed this _____ day of _____, 20____.

Name: Todd JOHNSON L.S.

Executed this 09 day of MARCH, 2009.

Dan Keil
Name: Dan KEIL L.S.

Executed this _____ day of _____, 20____.

Name: Thomas Barton PLOCHER L.S.

13

ACCEPTANCE OF ASSIGNMENT

With reference to the Assignment to NOVARTIS AG of an invention entitled
" COMPOSITIONS, METHODS AND KITS "

signed by (1) Manuel CAMPOS, (2) Trent HARBISON, (3) Richard HARLAND, (4) Todd JOHNSON, (5) Dan KIEL, (6) Thomas Barton PLOCHER; this will certify that NOVARTIS AG accepts such Assignment.

NOVARTIS AG

By :

Bernd Liphardt

Steve Braithwaite

Name :

Bernd Liphardt

Steve Braithwaite

Function :

Patent Attorney

Patent Admin

Date:

01/04/09

14

Attestation

I, the undersigned Civil Law Notary of Basel, Switzerland, Dr. Mark Eichner, certify herewith the authenticity of the signatures attached heretofore of **Mr. Manuel Campos**, Canadian citizen, residing in Redwood Meadows, Alberta, Canada, of **Mr. Trent Harbison**, born on 6 (six) September 1977 (nineteen hundred seventy-seven), citizen of the United States of America, with business address in Larchwood, Iowa, United States of America, of **Mr. Richard Harland**, born on 22 (twenty-two) June 1952 (nineteen hundred fifty-two), Canadian citizen, with business address in Calgary, Alberta, Canada, of **Mr. Todd Johnson**, born on 12 (twelve) February 1969 (nineteen hundred sixty-nine), citizen of the United States of America, with business address in Larchwood, Iowa, United States of America, of **Mr. Dan Keil**, citizen of the United States of America, residing in Spring Hill, Kansas, United States of America, and of **Mr. Thomas Barton Plocher**, born on 6 (six) April 1983 (nineteen hundred eighty-three), citizen of the United States of America, with business address in Larchwood, Iowa, United States of America.

I further certify that the signatures attached heretofore are the genuine signatures of **Dr. Bernd Liphardt**, German citizen, residing in Lörrach, Germany, and of **Mr. Steve Braithwaite**, British citizen, residing in Basel, Switzerland, both acting for **Novartis AG**, in Basel, Switzerland, both as proxy holders, both with joint signature.

The authenticity of the signatures was established by means of comparison.

BASEL, Switzerland, this 17th (seventeenth) day of April 2009 (two thousand and nine)



Mark Eichner

Attestation

I, the undersigned Civil Law Notary in Basel, Switzerland, Dr. Matthias Staehelin, certify herewith that the signatures attached heretofore are the genuine signatures of **Mr. Manuel Campos**, Canadian citizen, residing in Redwood Meadows, Alberta, Canada, of **Mr. Trent Harbison**, born on 6 (six) September 1977 (nineteen hundred seventy-seven), citizen of the United States of America, with business address in Larchwood, Iowa, United States of America, of **Mr. Richard Harland**, born on 22 (twenty-two) June 1952 (nineteen hundred fifty-two), Canadian citizen, with business address in Mississauga, Ontario, United States of America, of **Mr. Todd Johnson**, born on 12 (twelve) February 1969 (nineteen hundred sixty-nine), citizen of the United States of America, with business address in Larchwood, Iowa, United States of America, of **Mr. Dan Keil**, citizen of the United States of America, residing in Spring Hill, Kansas, United States of America, and of **Mr. Thomas Barton Plocher**, born on 6 (six) April 1983 (nineteen hundred eighty-three), citizen of the United States of America, with business address in Larchwood, Iowa, United States of America.

I further certify that the signatures attached heretofore are the genuine signatures of **Dr. Bernd Liphardt**, German citizen, residing in Lörrach, Germany, and **Mr. Steve Braithwaite**, British citizen, residing in Basel, Switzerland, both acting for **Novartis AG**, in Basel, Switzerland, both as proxy holders, both with joint signature.

The authenticity of the signatures was established by comparison.

BASEL, Switzerland, this 14th (fourteenth) day of December 2009 (two thousand and nine)

M. Staehelin, Notar

Dr. M. Staehelin
Notar

FOR CERTIFIED COPY

I, the undersigned Civil Law Notary in Basel, Switzerland, Dr. Thomas Gelzer, hereby certify that the document attached heretofore is a true and authentic photocopy of the original.

BASEL, Switzerland, this 6th (sixth) day of August 2010 (two thousand and ten)

T. Gelzer

Dr. Th. Gelzer
Notar

Leg.Prot.Nr. 174 /2010

APOSTILLE

(Hague Convention of October 5th, 1961)

1. Country: Switzerland (Schweiz / Suisse)

This official document

2. is signed by *Dr. Th. Gelzer*

3. in his/her function as *notary public*

4. and certified by the seal of the *above mentioned*

Certified *- 6. Aug. 2010*

5. in Basel (Bâle) 6. on

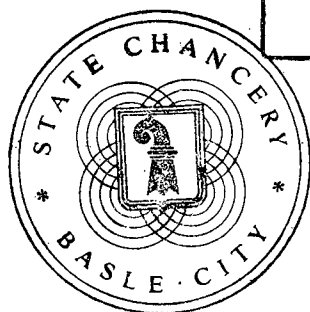
7. by the State Chancery of the Canton of Basel-Stadt

8. no. *5287/11004*

9. Seal /stamp:

10. Signature:

Helena Schaffner



RESUMEN DE LA INVENCION

Se proporcionan composiciones y métodos para determinar moléculas reactivas cruzadas inmunológicamente que comprenden una determinante antigénica de reactividad cruzada, en particular para determinar proteínas que comprenden determinantes antigénicas de reactividad cruzada, en particular para determinar proteínas que tienen reactividad cruzada con base en selecciones serológicas usando pruebas inmunológicas secuenciales para un animal, incluyendo determinar las proteína de *H. parasuis* de reactividad cruzada. También se proporcionan composiciones, vacunas, y kits que usan las moléculas para diagnósticos y métodos para prevenir o tratar una enfermedad, trastorno, afección, o síntomas de la misma asociado con agentes infecciosos, en particular microorganismos infecciosos, en particular para prevenir o tratar una enfermedad, trastorno, afección, o síntoma de la misma asociado con infección por *H. parasuis*.

COMPOSICIONES, MÉTODOS, Y KITS

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a composiciones y
5 métodos para determinar moléculas inmunológicamente reactivas
cruzadas que comprenden una determinante antigénica de
reactividad cruzada, en particular para determinar proteínas
que comprenden determinantes antigénicas de reactividad
cruzada, en particular para determinar proteínas que tienen
10 reactividad cruzada con base en pantallas serológicas usando
pruebas inmunológicas secuenciales para un animal, incluyendo
determinar proteínas *H. parasuis* reactivas cruzadas. También
se proporcionan composiciones, vacunas, y kits usando las
moléculas para diagnósticos y métodos para prevenir o tratar
15 una enfermedad, trastorno, afección, o síntomas de la misma
asociados con agentes infecciosos, en particular
microorganismos infecciosos, en particular para prevenir y
tratar una enfermedad, trastorno, afección, o síntoma de la
misma asociado con infección por *H. parasuis*.

20

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

El principio de la vacunación es esencialmente con base
en dos elementos clave de inmunidad, a saber especificidad y
memoria. La activación y diferenciación de células B en

respuesta a más antígenos requiere varias señales que llevan a las células B a formar ya sea células de plasma que secretan anticuerpos o células B de memoria preparadas para mediar una respuesta más rápida durante la exposición
5 secundaria al antígeno. Las células de memoria permiten que el sistema inmunitario soporte una respuesta mucho más fuerte en el segundo encuentro con los antígenos. Esta respuesta secundaria es tanto más rápida para aparecer como más efectiva que la respuesta primaria. Sin embargo, debido a que
10 los anticuerpos por naturaleza son muy específicos, y en vista de la diversidad de agentes infecciosos, todavía ha permanecido un problema importante en desarrollar anticuerpos que muestren reactividad cruzada a través de o dentro de los numerosos tipos diferentes de patógenos.

15 Un ejemplo de un agente infeccioso para el cual permanece un desafío importante para desarrollar anticuerpos que muestren reactividad cruzada es *Haemophilus parasuis* (*H. parasuis*), el agente etiológico de poliserositis y artritis de porcino (enfermedad de Glasser). El *H. parasuis* es una
20 bacteria pleomórfica, sin motilidad, ocasionalmente encapsulada, Gram negativa, aislada de exudados serosos de cerdo afectada por pleuritis serofibrinosa, pericarditis, peritonitis, artritis, y meningitis. Este organismo, que se describió inicialmente por Glässer en 1910, se aisló

probablemente por primera vez por Schermer y Ehrlich en 1922, aunque el organismo sospechoso se refirió originalmente como *Haemophilus suis*. En 1969, sin embargo, Biberstein y White muestran que el agente causante de Glässers requiere solamente dinucleótido de nicotinamida adenina (NAD, por sus siglas en inglés). El *Haemophilus suis*, un organismo que requiere tanto porfirina de hierro como dinucleótido de nicotinamida adenina (NAD), no fue por lo tanto el carácter insidioso en esta enfermedad y el nuevo organismo se renombró, por la adición del prefijo "para", a *H. parasuis*.

La caracterización de *H. parasuis* ha evolucionado significativamente con el paso de cinco décadas. Bakos, et al., usaron una prueba de precipitación para identificar cuatro serotipos, que se designan A-D (*Nordic Veterinary Medicine*, 4:241-255 (1952)). Estos cuatro crecieron a siete en 1986 (*J Clin Microbiol*, 23:1022-1025 (1986)). Kielstein et al., *Zentralbl Veterinarmed B*, 38:315-320 (1991) agrega seis más, trabaja con Rapp-Gabrielson, *Am J Vet Res*, 53:659-664 (1992), aún otros cinco. Eventualmente, esta clasificación se refinó. Todos los serotipos, incluyendo los pocos con designaciones múltiples, se caracterizaron con base en una prueba de inmunodifusión realizada con sueros de conejo específicos. El resultado fue una lista de al menos quince serotipos que han sido aceptados a nivel mundial.

Desafortunadamente, también existe un número importante de aislados no tipificables. Adicionalmente, diversas publicaciones han descrito los perfiles de serotipo de *H. parasuis* en países específicos. Se ha propuesto que en los
5 EUA, Alemania, Japón, España, Canadá, y China, los serotipos 4 y 5 son completamente comunes. Los serotipos 5 y 13 se han reportado para ser prevalentes en Australia y Dinamarca.

Los factores de virulencia de *H. parasuis* no se han definido. La mayoría de las asociaciones para virulencia se
10 hacen de acuerdo con el serotipo, ya que algunas corresponden a tasas de morbilidad y mortalidad superiores. Durante la infección intraperitoneal, los serotipos 1, 5, 10, 12, 13, y 14 se han reportado para provocar tasas de morbilidad y mortalidad altas dentro de 4 días. Como tal, estas cepas se
15 consideran altamente virulentas. Tres serotipos (esto es, 2, 4, y 15) presentaron niveles intermedios de virulencia al provocar poliserositis sin mortalidad. Los serotipos restantes se consideran avirulentos ya que afectan cerdos sin manifestar la enfermedad clínica.

20 Se han hecho intentos por determinar factores de virulencia específicos de *H. parasuis*. Siendo un miembro de la familia *Pasteurellaceae*, se pensó que algunos candidatos deben incluir cápsulas, fimbrias, lipopolisacáridos (LPS, por sus siglas en inglés), y proteínas de membrana exteriores

(OMP, por sus siglas en inglés). En la actualidad, sin embargo, pocas correlaciones pueden establecerse entre estos rasgos en *H. parasuis* y virulencia. Las cepas encapsuladas son comunes tanto en las cavidades nasales de cerdos saludables como de animales manifestados clínicamente. La importancia de los LPS fue un tanto desacreditada por reportes que sugieren diferencia no importante en la producción de LPS entre serotipos virulentos y avirulentos y muestran que las presentaciones que contienen tanto LPS como OMP produjeron respuestas exclusivamente en las OMP.

Las OMP han demostrado generar una respuesta humoral fuerte y se han propuesto candidatos para inmunógenos protectores de esta categoría. Dos perfiles generales de OMP se presentan y pueden asociarse con virulencia. La mayoría de los serotipos virulentos se caracterizan por el segundo perfil, que está dominado por una proteína de 37 kDa. Los serotipos avirulentos muestran bandas múltiples, con banda fuerte entre 23-40 kDa, así como una proteína de aproximadamente 68 kDa.

Diversas otras proteínas asociadas con la infección por *H. parasuis* se han sugerido. Dos proteínas de colonización se han reportado, designadas P2 y P5, que son ambas inmunogénicas. P2, de manera sorprendente, aparece para diferir dependiendo de la virulencia de serotipo. Se presenta

dominantemente como una proteína de 55 kDa en serotipos avirulentos y 48 kDa en serotipos virulentos. Esta proteína muestra homología a la proteína P2 de *Haemophilus influenzae*. Otros han identificado y descrito la sobre regulación de la
5 región TonB del genoma de *H. parasuis*. Esta región contiene diversos genes que responden a ambientes agotados de hierro. Específicamente, una proteína enlazada a transferrina se identificó y mostró para estar sobrerregulada cuando el hierro se restringe. Ya que el hierro está secuestrado en el
10 hospedero, se ha propuesto que tales genes puedan ser importantes para la sobrevivencia del patógeno dentro del hospedero.

Adicionalmente, una proteína de membrana exterior principal de 42 kDa (MOMP, por sus siglas en inglés) se
15 detectó usando un anticuerpo policlonal dirigido contra la MOMP de 35 kDa de *Pasturella multocida*. El análisis de una proteína de 42 kDa potencialmente similar de *Haemophilus ducreyi*, una especie cercanamente relacionada, caracteriza la proteína como antigénicamente similar a OmpA. Esta clase de
20 proteína de membrana modificable al calor se investigó además a través del desarrollo de anticuerpos monoclonales contra preparaciones de membrana de *H. parasuis*. Dos anticuerpos monoclonales se usaron en este experimento, uno contra una OMP de 35 kDa y un segundo contra LPS. Estos anticuerpos

monoclonales se reportaron para reaccionar específicamente con los serotipos comunes y se sugirió su valor potencial como herramientas de diagnóstico u objetivos de vacuna potenciales.

5 La neuraminidasa es otro factor de virulencia potencial. Más de 90% de los aislados de campo parecen producir neuraminidasa. Esta enzima se expresa después en la fase de crecimiento de *H. parasuis* y se correlaciona con tanto la exposición de receptores de colonización necesarios como el
10 rompimiento de mucina dentro del hospedero.

El *H. parasuis* puede infectar sitios múltiples del hospedero. Como un resultado, los signos clínicos se manifiestan diferentemente con base en el sitio de infección. Las cuatro formas primarias de infección son enfermedad de
15 Glässer (poliserositis fibrinosa), septicemia (sin poliserositis), miositis aguda (músculo masetero), y enfermedad respiratoria. Con respecto al sitio de infección o tipo de infección, los síntomas de infección por *H. parasuis* se han reportado para ser un tanto generales. La temperatura
20 incrementada, apatía, y pérdida de apetito se reportan comúnmente. Otros síntomas clínicos comunes se han reportado para incluir tos, disnea (falta de aliento), pérdida de peso, cojera, carencia de coordinación, cianosis, y agotamiento.

El *H. parasuis* se ha convertido en un tema principal

después de que las manadas libres de patógeno específico (SPF, por sus siglas en inglés) se vuelven prevalentes. En parte debido a la evolución del negocio de producción porcina, que incluye el establecimiento de manadas libres de patógenos específicos, *H. parasuis* ha aparecido como un patógeno económicamente importante. Típicamente, la infección se dirige a animales nativos, aquellos alojados con higiene inadecuada, o aquellos alimentados pobremente. Además, el transporte inseguro y la mezcla de cerdos de edades diferentes han contribuido significativamente a brotes. La combinación de las concentraciones superiores de animales y la ignorancia relativa de la población de cerdos en estas manadas protegidas se han reportado para llevar a un incremento en la incidencia de enfermedad inducida por *H. parasuis*. Para complicar más las cosas es el hecho de que *H. parasuis* existe en diversos serotipos regionalmente específicos diferentes. Se reportó que la exposición o vacunación a un serotipo no se protege necesariamente contra la infección por otros. Como tal, se propuso el desarrollo de vacuna autógena como un control contra la propagación del serotipo desconocido. Debido en parte a tales problemas y el retardo entre la generación y exposición de bacterina autógena a cerdos, surge una necesidad para una vacuna protectora cruzada que pueda administrarse con confianza con

respecto a la prevalencia del serotipo regional.

Se ha propuesto tratar la infección por *H. parasuis* con antibióticos para aplicación inmediata durante el desarrollo de signos clínicos. Desafortunadamente, la naturaleza con
5 penetración del patógeno requiere dosis altas de antibióticos para ser efectivas y a menudo es de prohibitivo en costo.

El control por medio de vacunación se ha intentado con tanto vacunas comerciales como autógenas. La diversidad de serotipos por *H. parasuis* ha complicado los regímenes de
10 vacunación, ya que la protección cruzada es rara. Combinado con las cepas no tipificables, esta plétora de perfiles antigénicos hace difícil el desarrollo de la vacuna.

La protección por vacunación contra estimulación homóloga también se ha propuesto. Un trío de estudios
15 sugieren que un producto de bacterina exterminada puede protegerse contra estimulación homóloga cuando se crea con serotipos y aislados de campo no tipificados conocidos. Los estudios arrojan luz en el uso de vacunas autógenas para controlar brotes para reducir las tasas de mortalidad.

20 Algunos habían propuesto usar cepas virulentas para proteger contra la estimulación heteróloga de otras cepas virulentas. Un estudio reporta una vacuna bivalente que contiene serotipos 4 y 5 protegidos contra serotipos 13 y 14. Otros, sin embargo, fallaron en mostrar protección cruzada

entre los serotipos 2 y 5.

Todavía otros han propuesto la exposición controlada de lechones a dosis bajas de *H. parasuis* virulento, vivo. Sin embargo, debido en parte a las co-infecciones que dañan con otros patógenos, tales como virus del síndrome respiratorio y reproductivo de porcino (PRRSV, por sus siglas en inglés), este enfoque no se ha recomendado como un método de control funcional.

Ya que los métodos actualmente disponibles para controlar varias infecciones que provocan la enfermedad se limitan en efectividad, en parte debido a la diversidad de agentes que provocan la enfermedad tal como *H. parasuis*, se necesitan métodos y composiciones efectivos para el tratamiento y prevención, particularmente una necesidad de identificar proteínas que tengan reactividad cruzada que pueda permitir el desarrollo de vacunas efectivas, en particular para tratamiento y prevención de la infección por *H. parasuis*.

20

SUMARIO DE LA INVENCION

En un aspecto, la presente invención proporciona un método para determinar una molécula que comprende una determinante antigénica de reactividad cruzada. El método comprende poner en contacto al menos un anticuerpo con una

28

primera determinante antigénica y una segunda determinante antigénica. El al menos un anticuerpo se obtiene de un animal secuencialmente expuesto a una primera estimulación inmunológica producida por una primera composición inmunogénica que comprende una primera determinante antigénica seguido por una segunda estimulación inmunológica producida por una segunda composición inmunogénica que comprende una segunda determinante antigénica. El enlace de al menos un anticuerpo a la primera y la segunda determinante antigénica es indicativo de reactividad cruzada por ello determina la molécula.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un método para determinar una molécula que comprende una determinante antigénica de reactividad cruzada, el método comprende:

a) activar una célula B de memoria en un animal para producir al menos un anticuerpo, en donde activar comprende estimular inmunológicamente al animal con la molécula para producir una respuesta inmunológica que activa la célula B de memoria; y

b) poner en contacto al menos un anticuerpo con una segunda molécula, en donde el enlace de al menos un anticuerpo a la molécula y la segunda molécula determina la molécula.

En otros aspectos, la presente invención proporciona un polipéptido aislado. El polipéptido comprende una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consiste de:

5 ELANAI (SEQ ID NO: 1);
TVLAEKQEII (SEQ ID NO: 2);
APAKGSTIEAGIAYPIST (SEQ ID NO: 3);
MKNLISI (SEQ ID NO: 4); y
SPSDKTFKISAIPDYNAEMT (SEQ ID NO: 5).

10 El polipéptido aislado comprende además una determinante antigénica de reactividad cruzada presente en una proteína expresada por al menos dos serotipos de *H. parasuis*.

En algunos aspectos, la presente invención proporciona un polipéptido aislado que comprende una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consiste de:

15 ELANAI (SEQ ID NO: 1);
TVLAEKQEII (SEQ ID NO: 2);
APAKGSTIEAGIAYPIST (SEQ ID NO: 3);
MKNLISI (SEQ ID NO: 4); y
SPSDKTFKISAIPDYNAEMT (SEQ ID NO: 5),

20 en donde el polipéptido aislado comprende además una determinante antigénica de reactividad cruzada y se expresa por serotipo 5 de *H. parasuis*.

En un aspecto, la presente invención proporciona una vacuna que comprende una cantidad profilácticamente o

terapéuticamente efectiva de un polipéptido aislado, y un vehículo, portador, o excipiente farmacéuticamente aceptable. El polipéptido comprende una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consiste de:

5	ELANAI	(SEQ ID NO: 1);
	TVLAEKQEII	(SEQ ID NO: 2);
	APAKGSTIEAGIAYPIST	(SEQ ID NO: 3);
	MKNLISI	(SEQ ID NO: 4); y
	SPSDKTFKISAIPDYNAAEMT	(SEQ ID NO: 5).

10 El polipéptido aislado comprende además una determinante antigénica de reactividad cruzada presente en una proteína expresada por al menos dos serotipos de *H. parasuis*.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un método para tratar o prevenir una enfermedad, afección, o síntoma de la misma asociado con la infección por *H. parasuis* de un animal. El método comprende administrar una cantidad efectiva de una vacuna que comprende una cantidad profilácticamente o terapéuticamente efectiva de un polipéptido aislado, y un vehículo, portador, o excipiente farmacéuticamente aceptable. El polipéptido comprende una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consiste de:

ELANAI (SEQ ID NO: 1);

TVLAEKQEI (SEQ ID NO: 2);

APAKGSTIEAGIAYPIST (SEQ ID NO: 3);
 MKNLISI (SEQ ID NO: 4); y
 SPSDKTFKISAIPDYNAEAMT (SEQ ID NO: 5).

El polipéptido aislado comprende además una determinante
 5 antigénica de reactividad cruzada presente en una proteína
 expresada por al menos dos serotipos de *H. parasuis*.

En otros aspectos, se proporcionan composiciones,
 métodos, y kits para diagnósticos de acuerdo con la presente
 invención.

10 Las ventajas y beneficios de la presente invención serán
 aparentes para alguien experimentado en la técnica que lee
 ésta especificación.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

15 La Figura 1 muestra un Western Blot para Selección
 Inicial de Fluidos de la Glándula Bronquial (BL, por sus
 siglas en inglés). Las muestras se corrieron por duplicado
 con la excepción de la muestra 12. Las muestras 1-4 y 8-11
 son pruebas contra serotipo 5 *H. parasuis* y las muestras 5-6
 20 y 12-15 son pruebas contra serotipo 13 *H. parasuis*. 1: Suero
 CDCD negativo, 2: BL46, 3: BL47, 4: BL50, 5: BL46, 6: BL47,
 7: BL50, 8: BL96, 9: BL98, 10: BL99, 11: BL142, 12: BL96, 13:
 BL98, 14: BL99, 15: BL142.

La Figura 2 muestra el Western Blot de serotipos 5, 13,

y 4 *H. parasuis* con BL47. Pistas 1,7-marcadores MW (de la parte superior: 200, 150, 100, 75, 50, 37, 25, y 20 kDa); Pista 3-serotipo 5 *H. parasuis*; Pista 5-serotipo 13 *H. parasuis*; Pista 9-serotipo 4 *H. parasuis*. Pistas 2, 4, 6, 8, 10-Vacía. Las flechas indican bandas prominentes de interés.

La Figura 3 muestra el Western Blot y SDS-PAGE de *H. parasuis* de célula completa serotipo 5, y *H. parasuis* serotipo 5 Extraído con Tween-20. Inmunotransferencia: Pista 1, 5-marcador MW (de la parte superior: 200, 150, 100, 75, 50, 37, 25, y 20 kDa); Pista 3-serotipo 5 de célula completa; Pista 7-extracto Tween-20 de serotipo 5, Pista 2, 4, 6-Vacía. SDS-PAGE: Pista 1, 5-marcador MW; Pista 3-serotipo 5 de célula completa; Pista 7-11-extracto Tween-20 de serotipo 5; Pista 2, 4, 6, 12 -Vacía.

Las Figuras 4A-4D muestra espectrometría de masa (EM/EM MALDI) de bandas que eliminan el gel correspondientes a Fig. 4A, ~76 kDa; Fig. 4B, ~63 kDa; Fig. 4C, ~56 kDa; y Fig. 4D, ~28 kDa.

20

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Los diversos aspectos y modalidades se proporcionan en virtud de la presente invención que comprenden la identificación de moléculas que pueden proporcionar anticuerpos de reactividad cruzada que reconocen moléculas

antigénicamente relacionadas, y que pueden de esta manera emplearse en vacunas, aplicaciones de diagnóstico, y métodos para tratar o prevenir un intervalo amplio de afecciones o enfermedad incluyendo aquellas asociadas con agentes
5 infecciosos tales como, pero no limitadas a, bacterias, virus, etc. El enfoque novedoso descrito en la presente utiliza el hospedero para identificar moléculas reactivas cruzadas usando un modelo de estimulación inmunológica pasmado en el cual un hospedero se estimula secuencialmente,
10 por ejemplo con un serotipo de *H. parasuis*, que permite recuperar, entonces la estimulación con un serotipo diferente.

I. Definiciones

15 El término "molécula," a menos que se establezca específicamente de otra manera, incluye polipéptidos y proteínas que incluyen por ejemplo, glicoproteínas y lipoproteínas, polisacáridos incluyendo por ejemplo, lipopolisacáridos, ácidos nucleicos, y fragmentos de los
20 mismos.

El término "inmunógeno" o "inmunogénico" se refiere a una molécula que induce una respuesta inmunitaria específica.

El término "determinante antigénico," como se usa en la presente, se refiere a la estructura primaria, secundaria,

terciaria, o cuaternaria de una molécula (por ejemplo, un polipéptido) reconocido por células B (esto es, linfocitos B) y los anticuerpos secretados por células B.

El término "determinante antigénica reactiva cruzada," como se usa en la presente, se refiere a la capacidad de una determinante antigénica presente en dos o más moléculas (por ejemplo, variantes de proteína bacterianas) para enlazarse por el mismo anticuerpo. Adicionalmente, se entiende que las dos o más moléculas que comprenden la determinante antigénica capaz de enlazarse por el mismo anticuerpo puede ser: la misma molécula o fragmentos de la misma, variantes de otras moléculas, o diferentes moléculas. A manera de ejemplo con referencia a proteínas (por ejemplo, variantes de proteína bacterianas) que comprenden una determinante antigénica capaz de enlazarse por el mismo anticuerpo, las proteínas pueden tener la misma o una secuencia de aminoácido primaria diferente, sin embargo, las proteínas cada una comprende una determinante antigénica (esto es, "de reactividad cruzada") que puede enlazarse por el mismo anticuerpo.

El término "anticuerpo de reactividad cruzada," como se usa en la presente, se refiere a un anticuerpo capaz de enlazarse a una determinante antigénica de reactividad cruzada.

El término "tratar," como se usa en la presente, se

refiere a aliviar, mejorar o remediar una enfermedad, trastorno, afección o síntoma de una enfermedad, trastorno, o afección.

El término "prevenir" significa detener o dificultar una
5 enfermedad, trastorno, afección, o síntoma de una enfermedad, trastorno, o afección.

II. Determinación de la Reactividad Cruzada

En un aspecto, la presente invención proporciona un
10 método para determinar una molécula que comprende una determinante antigénica de reactividad cruzada. El método comprende poner en contacto al menos un anticuerpo con una primera determinante antigénica y una segunda determinante antigénica, en donde al menos un anticuerpo se obtiene de un
15 animal secuencialmente expuesto a una primera estimulación inmunológica producida por una primera composición inmunogénica que comprende la primera determinante antigénica seguido por una segunda estimulación inmunológica producida por una segunda composición inmunogénica que comprende la
20 segunda determinante antigénica, en donde el enlace de al menos un anticuerpo a la primera y la segunda determinante antigénica es indicativo de reactividad cruzada por ello se determina la molécula.

En una modalidad, la primera composición inmunogénica

comprende además un primer polipéptido que comprende la primera determinante antigénica, en donde la segunda composición inmunogénica comprende además un segundo polipéptido que comprende la segunda determinante antigénica, en donde el primer polipéptido se expresa por un primer microorganismo y el segundo polipéptido se expresa por un segundo microorganismo, en donde el primer y el segundo microorganismo se caracterizan en que son diferente serotipos de la misma especie. En otra modalidad, el primer y el segundo microorganismo es una bacteria. En algunas modalidades, la bacteria es *H. parasuis*.

Generalmente, el método involucra dos o más pruebas inmunológicas secuenciales para el animal incluyendo un tiempo de recuperación entre las estimulaciones. Luego, en un tiempo posterior a la última estimulación, al menos un anticuerpo se obtiene del animal, por ejemplo, al cosechar los ganglios linfáticos del animal y/u otro tejido rico en célula de memoria que comprende al menos un anticuerpo. Sin sujetarse a ninguna teoría particular, se considera que al cosechar ganglios linfáticos y/u otro tejido rico en célula de memoria, las células B de memoria generadas para la primera estimulación pueden recolectarse después de su activación en respuesta a una estimulación posterior. Las células B de memoria activadas son responsables para la

compensación de la primera determinante antigénica que produce la primera estimulación, y los anticuerpos producidos en respuesta a una estimulación posterior producida por la segunda determinante antigénica puede probarse para
5 determinar su reactividad cruzada con la primera y la segunda determinante antigénica por ello determina sus moléculas reactivas cruzadas respectivas.

Los animales adecuados para uso en el método incluyen, pero no se limitan a, cerdos (por ejemplo, puercos), bovinos,
10 ovinos, conejillos de indias, conejos, ratones, ratas, cabras, y caballos. En una modalidad, el animal es un animal privado de calostro derivado de la cesárea. En otra modalidad, el animal es un puerco. En algunas modalidades, el animal privado de calostro derivado de la cesárea es un
15 puerco privado de calostro derivado de la cesárea. En otras modalidades, el animal tiene al menos alrededor de 1 semana de edad, ilustrativamente, al menos alrededor de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, y 10 semanas de edad.

El animal puede exponerse a la primera y la segunda
20 estimulación inmunológica en cualquier número de formas de manera que las células B de memoria se generan a la primera estimulación y se activan durante la estimulación posterior del animal con la segunda determinante antigénica. Preferiblemente, el antígeno está contenido en una

composición de estimulación. Por ejemplo, una primera composición de estimulación que comprende la primera determinante antigénica y una segunda composición de estimulación que comprende la segunda determinante antigénica
5 puede administrarse al animal por cualquier ruta adecuada de administración conocida en la técnica incluyendo, pero no limitada a, intravenosa, intra-arterial, intramuscular, subcutánea, intradérmica, transdérmica, oral, y intranasal.

Otras maneras de exponerse a una estimulación también
10 dentro del alcance de la invención incluyen vacunaciones y exposición natural a un inmunógeno (por ejemplo, agente infeccioso). De esta manera, una estimulación inmunológica también puede incluir una estimulación producida por exposición natural del animal a una determinante antigénica,
15 tal como a través de la exposición del animal a un agente infectado (por ejemplo, bacterias, virus, parásito). De esta manera, por ejemplo, una primera estimulación inmunológica puede ser una estimulación producida por una infección natural del animal por una cepa de bacterias que pertenece a
20 un primer serotipo, que luego es seguido por una segunda estimulación que comprende administración intranasal de una segunda composición de estimulación que tiene un segundo serotipo (esto es, la segunda determinante antigénica) de la cepa.

Una composición de estimulación que comprende un antígeno, opcionalmente, puede comprender además una solución amortiguadora y/o comprender además otros componentes que ayudan a alcanzar la potencia de estimulación deseada y/o minimizan afectaciones adversas para el animal que recibe la estimulación.

En una modalidad, la primera y la segunda composición de estimulación comprenden una solución amortiguadora de peptona o solución amortiguadora salina normal. En otra modalidad, la primera y la segunda composición de estimulación comprenden una solución amortiguadora de peptona, en donde la primera composición de estimulación comprende además una primera bacteria, en donde la segunda composición de estimulación comprende una segunda bacteria, en donde la primera y la segunda bacteria pertenecen a diferente serotipos de la misma especie.

En una modalidad, la segunda estimulación se administra al animal al menos alrededor de 1 semana después de que la primera estimulación se administra al animal, ilustrativamente, alrededor de 1 semana hasta alrededor de 1 año, alrededor de 2 semanas hasta alrededor de 10 meses, alrededor de 3 semanas hasta alrededor de 8 meses, alrededor de 1 mes hasta alrededor de 6 meses, y alrededor de 2 meses hasta alrededor de 4 meses después de la primera

estimulación.

De esta manera, la memoria inmunológica proporciona la base para la presente invención. En consecuencia, el método comprende además proporciona una muestra biológica del animal
5 después de la segunda estimulación inmunológica, en donde la muestra biológica comprende células de memoria que producen anticuerpo. La muestra biológica puede ser de cualquier tipo adecuado. La muestra biológica puede ser de los tejidos, órganos, sangre, linfa, o ganglios linfáticos del animal. La
10 muestra biológica también puede tomarse de un sitio infectado o un área de una lesión que puede formarse o un área cercana a un sitio infectado o lesión tal como en los ganglios linfáticos. Preferiblemente, la muestra biológica se obtiene al cosechar los ganglios linfáticos del animal y/u otro
15 tejido rico en células de memoria que proporcione células B de memoria.

Generalmente, la muestra biológica se toma del animal en un tiempo posterior a la segunda estimulación. Al momento que la muestra se toma puede variar dependiendo de un número de
20 factores incluyendo el animal, la composición de estimulación, cualquiera de las etapas contempladas posteriores a la muestra que se toma (por ejemplo, afecciones de cultivo posteriores), etc., y puede determinarse por experimentación de rutina. Preferiblemente, la muestra

biológica se toma del animal después de la segunda estimulación al momento cuando ha ocurrido la activación de la célula de memoria suficiente. En una modalidad, la muestra biológica se toma del animal a alrededor de 24 hrs después de la segunda estimulación, ilustrativamente, a alrededor de 1 día hasta alrededor de 14 días, alrededor de 2 días hasta alrededor de 12 días, alrededor de 4 días hasta alrededor de 10 días, y alrededor de 6 días hasta alrededor de 8 días después de la última estimulación.

Después de la eliminación de la muestra biológica del animal, las células de memoria que producen anticuerpo que están presentes en la muestra biológica pueden procesarse además para obtener al menos un anticuerpo. En una modalidad, después de la eliminación de la muestra biológica del animal, las células de memoria que producen anticuerpo que están presentes en la muestra biológica se cultivan in vitro. El cultivo in vitro de las células de memoria que producen anticuerpo puede realizarse con o sin etapas previas para separar sub-poblaciones de células. Las técnicas de cultivo se conocen en la técnica.

El sobrenadante del cultivo puede comprender anticuerpos secretados por las células de memoria durante el cultivo in vitro, por lo tanto, la cosecha de al menos un anticuerpo puede realizarse al cosechar el sobrenadante del medio de

cultivo. Los anticuerpos producidos por las células cultivadas también pueden liberarse de las células cultivadas, por ejemplo por lisis de las células B de memoria para liberar al menos un anticuerpo.

5 La producción y/o secreción *in vitro* de al menos un anticuerpo en el medio de cultivo por células de memoria activadas puede potenciarse al agregar reactivos al cultivo celular para promover la proliferación celular, y/o potenciar la producción y/o secreción del anticuerpo. Tales reactivos,
,10 solos o en combinación, incluyen citoquinas tales como, pero no limitadas a, interleucinas, por ejemplo, IL-1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8, factores que estimulan la colonia, interferones, y cualquiera de otros factores que pueden mostrarse para tener un efecto potenciador en la activación de la célula B,
15 proliferación, y/o producción y/o secreción de anticuerpo. Por ejemplo, la activación celular puede incluir agregar un agente activado al medio de cultivo incluyendo, pero no limitado a, mitógenos y factores producidos por leucocitos, o sus equivalentes sintéticos o combinaciones de los mismos.
20 Opcionalmente, los agentes antimicrobianos se incluyen en el medio de cultivo.

El sobrenadante del cultivo celular que comprende al menos un anticuerpo puede usarse directamente para determinar el enlace de al menos un anticuerpo a la primera y la segunda

determinante antigénica. En otras palabras, al menos un anticuerpo puede utilizarse simplemente en la forma del sobrenadante cosechado del medio de cultivo.

En otras modalidades, la muestra biológica puede
5 cosecharse del animal y los linfocitos B contenidos en el
inmortalizados y/o clonados. Los compañeros de fusión se
conocen en la técnica, que son capaces de inmortalizar
linfocitos B. Los métodos empleados para la fusión incluyen
combinar los linfocitos B con un compañero de fusión en la
10 presencia de un fusógeno, por ejemplo, un detergente no
iónico, durante tiempo suficiente para que la fusión ocurra,
seguido por selección de los hibridomas resultantes por medio
de los marcadores presentes en el compañero de fusión. Las
células luego pueden someterse a dilución limitada para
15 proporcionar los clones libres de células contaminantes, por
ello se proporcionan para una composición de anticuerpo
homogénea. Los hibridomas luego pueden proliferarse en el
cultivo o introducirse en un animal hospedero, por ejemplo,
un ratón o una rata, para producir fluido de ascitos rico en
20 anticuerpos.

Si se desea, el al menos un anticuerpo puede someterse a
esquemas de purificación y/o fraccionamiento. Por ejemplo,
las técnicas pueden utilizarse tales como aquellas usadas
para purificar inmunoglobulinas de suero o plasma, por

ejemplo absorción, precipitación con sulfato de amonio, fraccionamiento con ácido caprílico, cromatografía de intercambio de iones, o por enlace y elución de proteína G o proteína A inmovilizada. También, dependiendo del sistema o aplicación particular, al menos un anticuerpo también puede acoplarse a un soporte adecuado, por ejemplo, un soporte de cromatografía de afinidad.

De esta manera, por ejemplo, una solución que comprende al menos un anticuerpo también puede contener al menos un anticuerpo no específico no buscado, que puede ser no deseado durante la etapa de poner en contacto al menos un anticuerpo con la primera determinante antigénica y la segunda determinante antigénica. De esta manera, si se desea, el anticuerpo no buscado puede removerse de la solución por absorción de la solución que comprende al menos un anticuerpo con varios reactivos incluyendo, por ejemplo, yema de huevo, polvo de tejido, suspensiones de microorganismos, etc. El suero pre-inmune recolectado del animal también puede usarse para absorción. Ilustrativamente, a manera de otro ejemplo, una solución que comprende al menos un anticuerpo producido en respuesta a una estimulación con una especie de bacterias puede incubarse con, por ejemplo una suspensión celular bacteriana extraída del detergente de otra especie, luego centrifugar y recolectar el sobrenadante que comprende al

menos un anticuerpo. La absorción puede preformarse más de una vez para minimizar el enlace no específico debido a anticuerpos irrelevantes.

De acuerdo con la presente invención, el método para
5 determinar una molécula que comprende una determinante
antigénica de reactividad cruzada comprende poner en contacto
al menos un anticuerpo con una primera determinante
antigénica y una segunda determinante antigénica. El enlace
de al menos un anticuerpo a la primera y la segunda
10 determinante antigénica determina la molécula. Poner en
contacto puede realizarse utilizando una técnica, o
combinación de técnicas, conocidas en el arte. En una
modalidad, el método comprende además determinar si o no al
menos un anticuerpo enlaza a la primera determinante
15 antigénica y a la segunda determinante antigénica. Las
técnicas ejemplares que pueden utilizarse, solas o en
combinación, incluyen, sin limitación, técnica Western blot,
inmunoprecipitación, radioinmunoensayo, inmunoensayo ligado a
la enzima (ELISA, por sus siglas en inglés), y ensayo
20 fluorescente inmunitario. Tales técnicas se prefieren
particularmente donde la molécula que comprende la
determinante antigénica es una proteína. En una modalidad,
poner en contacto comprende utilizar una técnica Western blot
para determinar el enlace de al menos un anticuerpo a la

primera determinante antigénica y a la segunda determinante antigénica, en donde una primera y una segunda proteína comprende la primera y la segunda determinante antigénica, respectivamente.

5 Por ejemplo, en donde la molécula a determinarse es una proteína, una primera composición que comprende una primera proteína que tiene la primera determinante antigénica y una segunda composición que comprende una segunda proteína que tiene la segunda determinante antigénica puede cada una
10 mezclarse separadamente con una solución amortiguadora estándar y someterse a electroforesis en gel de poliacrilamida-sulfato de dodecil sodio (SDS/PAGE, por sus siglas en inglés), luego transferirse a nitro-celulosa, nylon, u otras membranas antes de poner en contacto al menos
15 un anticuerpo con la primera determinante antigénica y la segunda determinante antigénica. El enlace de al menos un anticuerpo a la primera determinante antigénica y a la segunda determinante antigénica luego puede visualizarse, por ejemplo al agregar un anticuerpo secundario, que puede
20 etiquetarse y seleccionarse de acuerdo con la fuente (esto es, el animal) de al menos un anticuerpo. Luego, el análisis comparativo de bandas detectables que corresponde a la primera y la segunda proteína puede realizarse para detectar el enlace de al menos un anticuerpo a la primera determinante

antigénica y a la segunda determinante antigénica, en donde el enlace de al menos un anticuerpo a la primera determinante antigénica y la segunda determinante antigénica indica que al menos un anticuerpo es de reactividad cruzada con la primera y la segunda determinante antigénica. En consecuencia, las primeras y las segundas determinantes antigénicas son de reactividad cruzada por ello determinan las moléculas (esto es, las proteínas), que pueden caracterizarse además utilizando técnicas conocidas en el arte.

A manera de ejemplo, donde la determinante antigénica de reactividad cruzada se crea por una proteína, un número de técnicas se conocen en el arte para caracterización adicional de la proteína determinada que comprende la determinante antigénica de reactividad cruzada. Por ejemplo, después de SDS/PAGE o transferencia de gel a una membrana, una región del gel o la membrana correspondiente a la proteína puede eliminarse o eluirse del gel o membrana, y al menos parcialmente purificarse por análisis adicional usando técnicas conocidas incluyendo espectroscopia de masa y procesamiento por secuencia de aminoácido de terminal N (por ejemplo, degradación Edman). Adicionalmente, la información de la secuencia de aminoácido puede compararse con cualquiera de las secuencias de aminoácido conocidas (por ejemplo, por comparación de homología) para determinar y/o caracterizar

además la identidad de la proteína. Adicionalmente, la información de la secuencia de aminoácido puede utilizarse para deducir una información de la secuencia de ácido nucleico correspondiente, que puede proporcionar, entre otras
5 cosas, cebadores y sondas para propósitos de clonación y/o amplificación de ácido nucleico específicos. De esta manera, en otras modalidades, el método comprende además determinar la secuencia de aminoácido de al menos una porción de la molécula, en donde la molécula es una proteína.

10 En consecuencia, en algunas modalidades, la presente invención proporciona un método para determinar una proteína que comprende una determinante antigénica de reactividad cruzada. El método comprende poner en contacto al menos un anticuerpo con una primera determinante antigénica y una
15 segunda determinante antigénica, en donde al menos un anticuerpo se obtiene de un animal secuencialmente expuesto a una primera estimulación inmunológica producida por una primera composición inmunogénica que comprende la primera determinante antigénica seguido por una segunda estimulación
20 inmunológica producida por una segunda composición inmunogénica que comprende la segunda determinante antigénica, en donde el enlace de al menos un anticuerpo a la primera y la segunda determinante antigénica es indicativo de reactividad cruzada por ello se determina la proteína. Poner

en contacto es como se describe arriba.

En una modalidad, la proteína se expresa por *H. parasuis*. En otra modalidad, la primera composición inmunogénica comprende además bacterias *H. parasuis* de un primer serotipo, en donde la
5 segunda composición inmunogénica comprende además *H. parasuis* de un segundo serotipo. En algunas modalidades, el primer serotipo es el serotipo 5 de *H. parasuis* y el segundo serotipo es el serotipo 13 de *H. parasuis*.

En consecuencia, en otras modalidades, la presente
10 invención proporciona un método para determinar una molécula que comprende una determinante antigénica de reactividad cruzada, el método comprende:

a) activar una célula B de memoria en un animal para producir al menos un anticuerpo, en donde activar comprende
15 estimular inmunológicamente el animal con una segunda molécula para producir una respuesta inmunológica que activa la célula B de memoria; y

b) poner en contacto al menos un anticuerpo con la molécula y la segunda molécula, en donde el enlace de al
20 menos un anticuerpo a la molécula y la segunda molécula determina la molécula.

III. Molécula Aislada

En otros aspectos, la presente invención proporciona una

molécula aislada, o un fragmento de la misma, que comprende una determinante antigénica de reactividad cruzada. En una modalidad, la molécula aislada es una proteína. En otra modalidad, la determinante antigénica de reactividad cruzada
5 está presente en una proteína expresada en al menos dos serotipos de *H. parasuis*.

En una modalidad, la presente invención proporciona un polipéptido aislado que comprende una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consiste de:

10	ELANAI	(SEQ ID NO: 1);
	TVLAEKQEII	(SEQ ID NO: 2);
	APAKGSTIEAGIAYPIST	(SEQ ID NO: 3);
	MKNLISI	(SEQ ID NO: 4); y
	SPSDKTFKISAIPDYNAEMT	(SEQ ID NO: 5),

15 en donde el polipéptido aislado comprende además una determinante antigénica de reactividad cruzada presente en una proteína expresada por al menos dos serotipos de *H. parasuis*.

En otra modalidad, la presente invención proporciona un
20 polipéptido aislado que comprende una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consiste de:

ELANAI	(SEQ ID NO: 1);
TVLAEKQEII	(SEQ ID NO: 2);
APAKGSTIEAGIAYPIST	(SEQ ID NO: 3);

MKNLISI (SEQ ID NO: 4); y

SPSDKTFKISAIPDYNAEMT (SEQ ID NO: 5),

en donde el polipéptido aislado comprende además una determinante antigénica de reactividad cruzada y se expresa
5 por el serotipo 5 de *H. parasuis*.

Las comparación de las secuencias de aminoácido de las SEQ ID NO: 1-5 con varios segmentos de secuencias de aminoácido *H. parasuis* sometidos a GENBANK revela al menos las siguientes homologías: SEQ ID NO: 1 y No. de Acceso:
10 ZP_02478744; SEQ ID NO: 2 y No. de Acceso: ZP_02477919; SEQ ID NO: 3 y No. de Acceso: ZP_02478157; SEQ ID NO: 4 y No. de Acceso: ZP_02478801; y SEQ ID NO: 5 y No. de Acceso: ZP_02477404. Nos. de Acceso: ZP_02478744, ZP_02477919, ZP_02478157, ZP_02478801, y ZP 02477404 se incorporan en la
15 presente con referencia en su totalidad.

IV. Composiciones, Vacunas, Diagnósticos, y Kits

En varios otros aspectos de la presente invención existen métodos, composiciones, y kits proporcionados con
20 base en la molécula determinada que comprende la determinante antigénica de reactividad cruzada. Preferiblemente, la molécula determinada es una proteína expresada por un patógeno que provoca la enfermedad. El patógeno que provoca la enfermedad es preferiblemente una bacteria,

preferiblemente, *H. parasuis*, sin embargo, la invención no se restringe a ella y la descripción siguiente se ilustra meramente con referencia a *H. parasuis* y las proteínas y polipéptidos *H. parasuis* de la presente invención.

5

Vacunas para Inmunización Activa

En un aspecto, la presente invención proporciona vacunas para inmunización activa diseñadas para tratar o proteger contra la infección por *H. parasuis*, y estas vacunas pueden prepararse de la proteína *H. parasuis*, o un fragmento de las mismas, que comprenden la determinante antigénica de reactividad cruzada como se establecen arriba usando métodos de preparación de vacuna convencional bien conocidos en este campo. Típicamente, una cantidad inmunogénica de la proteína, o un fragmento de la misma, que comprende la determinante antigénica de reactividad cruzada se combina con un vehículo, portador o excipiente farmacéuticamente aceptable adecuado, y una cantidad de esta vacuna efectiva para inmunizar un humano o animal puede administrarse como sea apropiado. Por cantidad inmunogénica debe entenderse por alguien de experiencia ordinaria en esta técnica que esto se refiere a una cantidad de la proteína, o un fragmento de la misma, que comprende la determinante antigénica de reactividad cruzada que es suficiente para alcanzar una respuesta inmunogénica en el

humano o animal.

Los polipéptidos deseados que comprenden la determinante antigénica de reactividad cruzada que sirven como los ingredientes activos de las vacunas de la invención pueden prepararse, dependiendo de su tamaño, por cualquiera de un número de enfoques conocidos en la técnica.

Por ejemplo, si la secuencia de polipéptido deseada es relativamente corta, por ejemplo, que corresponde a la secuencia de aminoácido consiste esencialmente de la determinante antigénica de reactividad cruzada, es posible la síntesis química, usando métodos ahora estándares en la técnica. En un procedimiento típico, el aminoácido de terminal C puede enlazarse a un soporte sólido, y hacerse reaccionar con el siguiente aminoácido en la secuencia que se ha protegido al grupo amino para prevenir la auto-condensación. Después del acoplamiento inicial, el grupo protector NH_2 puede removerse, y el proceso de acoplamiento repetido con el aminoácido sigue en orden.

O, por ejemplo, los polipéptidos de la presente invención pueden prepararse por purificación de la proteína nativa de, por ejemplo cultivos fermentadores, seguido por la generación del fragmento deseado por varias técnicas, y purificación del fragmento deseado. La metodología del ADN recombinante proporciona otra forma de sintetizar los

péptidos deseados. La secuencia que codifica el ADN (por ejemplo, cADN, digestión genómica) para que el péptido o proteína deseada pueda ligarse en un vector de expresión adecuado para transformar una cepa receptor para expresar el gen y producir el polipéptido.

Si se deriva de una colección genómica o cADN, o por síntesis de oligonucleótidos usando métodos químicos, la secuencia de codificación puede colocarse bajo el control de secuencias promotoras compatibles con hospederos bacterianos en plásmidos que contienen sitios de restricción convenientes para la inserción de la secuencia de codificación deseada. Los vectores de expresión resultantes pueden transformarse en hospederos bacterianos adecuados usando el método conocido en la técnica. Los transformantes exitosos pueden producir los fragmentos de polipéptido deseados en niveles superiores que aquellos encontrados en cepas recombinantes o nativos. Alternativamente, estos péptidos pueden producirse en hospederos recombinantes no bacterianos usando secuencias de control apropiadas, vectores y técnicas de transformación.

Donde las secuencias de péptido que comprenden la determinante antigénica de reactividad cruzada se determinan para ser demasiado pequeñas para ser inmunogénicas, pueden ligarse a sustancias portadoras con objeto de conferir una propiedad inmunogénica a ellas. Cualquier método para crear

tales ligaduras conocidas en la técnica puede usarse. Por ejemplo, existen un gran número de agentes heterobifuncionales que generan una ligadura de disulfuro en un extremo del grupo funcional y una ligadura de péptido al otro, y estos se han usado extensivamente. El más popular de estos es N-succidimidil-3-(2-piridilditio)propionato (SPDP, por sus siglas en inglés). Este reactivo crea una ligadura de disulfuro entre sí mismo y un residuo de cisteína en una proteína y una ligadura de amida a través del amino en una lisina, u otro grupo amino libre en la otra. Una variedad de tales agentes que forman el disulfuro/amida se conocen. Otros agentes de acoplamiento bifuncionales forman un tioéter en vez de una ligadura de disulfuro. Muchos de estos agentes que forman tioéter están comercialmente disponibles e incluyen ésteres reactivos de ácido 6-maleimidocaproico, ácido 2-bromoacético, ácido 2-yodoacético, ácido 4-(N-maleimido-metil)ciclohexan-1-carboxílico y los similares. Los grupos carboxilo pueden activarse al combinarlos con succinimida o ácido 1-hidroxi-2-nitro-4-sulfónico, sal de sodio. Si el péptido no contiene cisteína conveniente, un residuo de cisteína adicional en cualquier terminal puede agregarse cuando el péptido se prepara. Ya que típicamente solo péptidos más cortos requieren conjugación para el portador, estos residuos pueden incluirse convencionalmente durante

síntesis química.

La preparación de vacunas que contienen secuencias de péptido como ingredientes activos se entienden bien en la técnica. Típicamente, tales vacunas se preparan como

5 inyectables, ya sea como soluciones o suspensiones líquidas; formas sólidas adecuadas para solución o suspensión en líquido antes de la inyección también pueden prepararse. La preparación también puede emulsificarse. El ingrediente inmunogénico activo a menudo se mezcla con excipientes que

10 son farmacéuticamente aceptables y compatibles con el ingrediente activo. Los excipientes adecuados son, por ejemplo, agua, solución amortiguadora salina, dextrosa, glicerol, etanol, o los similares y combinaciones de los mismos. Además, si se desea, la vacuna puede contener

15 cantidades menores de sustancias auxiliares tales como agentes humectantes o emulsificantes, agente amortiguadores del pH, o adyuvantes que potencian la efectividad de la vacuna. Las vacunas convencionalmente se administran parenteralmente, por inyección, por ejemplo, ya sea

20 subcutáneamente o intramuscularmente. Las formulaciones adicionales que son adecuadas para otros modos de administración incluyen supositorios y, en algunos casos, formulaciones orales. Para supositorios, los aglutinantes y portadores tradicionales pueden incluir, por ejemplo,

polialcalen glicoles o triglicéridos; tales supositorios pueden formarse de mezclas que contienen el ingrediente activo en el intervalo de 0.5% hasta 10%, preferiblemente 1-2%. Las formulaciones orales incluyen tales excipientes
5 normalmente empleadas como, por ejemplo, grados farmacéuticos de manitol, lactosa, almidón, esterato de magnesio, sacarina de sodio, celulosa, carbonato de magnesio y los similares. Estas composiciones toman la forma de soluciones, suspensiones, comprimidos, píldoras, cápsulas, formulaciones
10 de liberación sostenida o polvos y contienen 10%-95% de ingrediente activo, preferiblemente 25-70%.

Las secuencias de aminoácidos de la invención incluyen sus sales farmacéuticamente aceptables, incluyendo las sales de adición ácida (formadas con los grupos amino libres del
15 péptido) y que se forman con ácidos inorgánicos tales como, por ejemplo, ácidos clorhídrico o fosfórico, o tales ácidos orgánicos como acético, oxálico, tartárico, mandélico, y los similares. Las sales formadas con los grupos carboxilo libres también pueden derivarse de bases inorgánicas tales como, por
20 ejemplo, sodio, potasio, amonio, calcio, o hidróxidos férricos, y tales bases orgánicas como isopropilamina, trimetilamina, 2-etilamino etanol, histidina, procaína, y los similares.

Las vacunas pueden administrarse en una manera

compatible con la formulación de dosificación, y en tal cantidad como será profilácticamente o terapéuticamente efectiva e inmunogénica. La cantidad a administrarse puede depender del sujeto a tratarse, capacidad del sistema inmunitario del sujeto para sintetizar anticuerpos, y el grado de protección deseado. Las cantidades precisas de ingrediente activo requeridas para administrarse pueden depender del juicio del cuidador/médico. Los intervalos de dosificación adecuados para inyección subcutánea o muscular pueden ser alrededor de 1 μ g hasta alrededor de 10 mg de ingrediente activo por sujeto, por ejemplo. Para preparación oral, supositorio rectal, uretral o vaginal, las dosificaciones pueden estar en el intervalo, ilustrativamente, desde alrededor de 10 μ g hasta alrededor de 100 mg. Los regímenes adecuados para administración inicial y refuerzos también son variables, pero se tipifican por una administración inicial seguida en alrededor de una hasta alrededor de dos intervalos de semana por una inyección posterior u otra administración.

20

Anticuerpos

En otro aspecto, la presente invención proporciona anticuerpos aislados que pueden generarse de una proteína, o un fragmento de los mismos, que comprenden la determinante

antigénica de reactividad cruzada para ser capaces de reconocer la determinante antigénica de reactividad cruzada, en donde la proteína se expresa por *H. parasuis*. Estos anticuerpos pueden ser ya sea monoclonales o policlonales. Si
5 los anticuerpos policlonales se desean, estos pueden generarse en cualquiera de un número de formas convencionales conocidas en la técnica. Típicamente, la proteína, o un fragmento de la misma, que comprende la determinante antigénica de reactividad cruzada puede inyectarse en un
10 animal hospedero adecuado, por ejemplo, un ratón o conejo, y después de un periodo de tiempo adecuado, los anticuerpos pueden aislarse y recuperarse del animal hospedero. Con respecto a los anticuerpos monoclonales, de acuerdo con la presente invención, estos pueden producirse en cualquier
15 número de formas incluyendo, por ejemplo, por el método bien conocido de Kohler y Milstein, Nature 256:495497 (1975), o tales como aquellos métodos descritos en la Patente de E.U.A. Nos. 6,331,415, 5,981,216, 5,807,715, y 4,816,567, que se incorporan en la presente como referencia por su enseñanza de
20 anticuerpos monoclonales. Tales métodos se conocen en la técnica e incluyen preparar anticuerpos quiméricos, humanizados, y monoclonales humanos. Los anticuerpos monoclonales también pueden prepararse de una cadena sencilla, tal como las cadenas ligera o pesada, y además

también pueden prepararse de fragmentos activos de un anticuerpo que mantiene las características enlazadas (por ejemplo, reactividad cruzada, especificidad, y/o afinidad) del anticuerpo completo. Por fragmentos activos significa un
5 fragmento de anticuerpo que tiene la misma especificidad de enlace como un anticuerpo completo que enlaza a la determinante antigénica de reactividad cruzada particular de los diferentes serotipos de *H. parasuis*, y el término "anticuerpo" como se usa en la presente significa incluir los
10 fragmentos. Adicionalmente, el antisuero preparado usando anticuerpos monoclonales o policlonales de acuerdo con la invención también se contempla y puede prepararse en un número de formas adecuadas como deberá reconocerse por alguien experimentado en la técnica.

15 Aunque la producción de anticuerpos usando formas recombinantes de la proteína, o un fragmento de los mismos, que comprende la determinante antigénica de reactividad cruzada se prefiere, los anticuerpos pueden generarse de versiones purificadas y aisladas naturales de la proteína, o
20 un fragmento de los mismos, que comprende la determinante antigénica de reactividad cruzada, y los anticuerpos monoclonales o policlonales pueden generarse usando la proteína, o un fragmento de los mismos, que comprenden la determinante antigénica de reactividad cruzada en la misma

manera como se describe arriba para obtener tales anticuerpos.

Inmunización Pasiva

5 Además de activar vacunas en donde los anticuerpos se generan en el paciente en virtud de administración de una cantidad inmunogénica de la proteína, o un fragmento de los mismos, que comprende la determinante antigénica de reactividad cruzada, los anticuerpos aislados de la presente
10 invención, o fragmentos activos de los mismos, también pueden utilizarse en el desarrollo de composiciones farmacéuticas y/o vacunas para inmunización pasiva contra infección por *H. parasuis*.

 Alguien experimentado en la técnica reconocerá que los
15 anticuerpos de la presente invención (esto es, anticuerpos capaces de reconocer la determinante antigénica de reactividad cruzada) también pueden formarse en composiciones farmacéuticas adecuadas para administración a un humano o animal con objeto de tratar o prevenir una infección
20 provocada por bacterias de *H. parasuis*. Las composiciones farmacéuticas que contienen los anticuerpos de la presente invención, o fragmentos efectivos de los mismos, pueden formularse en combinación con cualquier vehículo, excipiente o portador farmacéuticamente adecuado que deberá comúnmente

usarse en esta técnica, incluyendo solución amortiguadora salina, dextrosa, agua, glicerol, etanol, otros compuestos terapéuticos, y combinaciones de los mismos. Como un experimentado en esta técnica deberá reconocer, el vehículo, excipiente o portador particular usado variará dependiendo del receptor pretendido y la afección del receptor, y una variedad de modos de administración deberá ser adecuada para las composiciones de la invención, como deberá reconocerse por alguien de experiencia ordinaria en esta técnica. Los métodos adecuados para administrar una composición farmacéutica incluyen, pero no se limitan a, administración tópica, oral, anal, vaginal, intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, subcutánea, intranasal y intradérmica.

Para administración tópica, la composición puede formularse en la forma de un ungüento, crema, gel, loción, gotas (tales como gotas de ojos y gotas de oídos), o solución (tal como lavado bucal). Las vendas para heridas o quirúrgicas, suturas y aerosoles pueden impregnarse con la composición. La composición puede contener aditivos convencionales, tales como conservadores, solventes para promover la penetración, y emolientes. Las formulaciones tópicas también pueden contener portadores convencionales tales como bases de crema o ungüento, etanol, o alcohol oléico.

Las composiciones de anticuerpo de la presente invención también pueden administrarse con un adyuvante apropiado en una cantidad efectiva para aumentar la respuesta inmunogénica. Por ejemplo, los adyuvantes apropiados pueden
5 incluir alumbre (fosfato de aluminio o hidróxido de aluminio), que se usa ampliamente en humanos, y otros adyuvantes tales como saponina y su componente purificado Quil A, adyuvante completo de Freund, adyuvante RIBBI, y otros adyuvantes usados en investigación y aplicaciones
10 veterinarias. Los ejemplos de otras preparaciones químicamente definidas incluyen dipéptido de muramilo, lípido A monofosforilo, conjugados de fosfolípido, encapsulación del conjugado con una proteoliposoma, y encapsulación de la proteína en vesículas de lípido.

15 Las composiciones de anticuerpo de la presente invención que reconocen la determinante antigénica de reactividad cruzada como se establece arriba será útil en métodos para prevenir o tratar infección por *H. parasuis*. En una modalidad, la presente invención proporciona un método para
20 prevenir o tratar una infección por *H. parasuis*, el método comprende administrar una cantidad efectiva de un anticuerpo para la determinante antigénica de reactividad cruzada como se establece en la presente de manera que se trata o previene una infección por *H. parasuis*.

Generalmente, la dosis preferida para administración de una composición de anticuerpo de acuerdo con la presente invención es tal cantidad que será efectiva para prevenir o tratar una infección por *H. parasuis*, y fácilmente se reconocería que esta cantidad puede variar dependiente de la naturaleza de la infección y la afección del sujeto. Una "cantidad efectiva" de anticuerpo o agente farmacéutico para usarse de acuerdo con la invención se pretende que signifique una cantidad suficiente pero no tóxica del agente, de tal manera que se produce el efecto profiláctico o terapéutico deseado. La cantidad exacta del anticuerpo o un agente particular que se requiere variará de sujeto a sujeto, dependiendo de la especie, edad, y afección general del sujeto, la severidad de la afección a tratarse, el portador o adyuvante particular a usarse y su modo de administración, y similares. En consecuencia, la "cantidad efectiva" de cualquier composición de anticuerpo particular variará con base en las circunstancias particulares, y una cantidad efectiva apropiada puede determinarse en cada caso de aplicación por alguien de experiencia ordinaria en la técnica usando experimentación de rutina. La dosis puede ajustarse para adaptarse al sujeto individual al cual la composición se administra y variará con la edad, peso y metabolismo del individuo. Las composiciones también pueden contener

estabilizadores o conservadores farmacéuticamente aceptables.

En consecuencia, los anticuerpos de la presente invención de esta manera proporcionarán métodos para tratar o prevenir infección por *H. parasuis* en un humano o animal
5 cuando se administra una cantidad efectiva de la composición de anticuerpo al humano o al animal, en donde la cantidad efectiva es suficiente para ya sea prevenir o tratar infección por la bacteria. Como se reconocería por alguien de experiencia ordinaria en la técnica, el nivel de titulación
10 del anticuerpo necesario para ser efectivo para tratar o prevenir la infección variará dependiendo de la naturaleza y afección del sujeto, y/o la severidad de cualquier infección previamente existente.

Adicionalmente, los anticuerpos de la presente invención
15 pueden modificarse para ser menos inmunogénico cuando se administra. A manera de ejemplo con referencia a un receptor humano del anticuerpo, el anticuerpo puede ser "humanizado" al trasplantar las regiones complementariamente determinantes del anticuerpo derivado de hibridoma en un anticuerpo
20 monoclonal humano o "venerado" al cambiar la superficie expuesta de residuos de estructura de murino en las regiones variables de inmunoglobulina para imitar una contraparte de estructura humana homóloga. Aún además, cuando así se desea, los anticuerpos monoclonales de la presente invención pueden

administrarse en conjunto con un antibiótico apropiado para aumentar además la capacidad de las composiciones para combatir infecciones bacterianas como sea necesario.

De esta manera, de acuerdo con la presente invención, la
5 proteína, o fragmento de la misma, que comprende la
determinante antigénica de reactividad cruzada puede
utilizarse como vacunas activas, y los anticuerpos de la
invención pueden ser usados como vacunas pasivas útiles para
proporcionar anticuerpos apropiados para tratar o prevenir
10 una infección por *H. parasuis*. Como se reconocería por
alguien experto en la técnica, una vacuna puede empacarse
para administración en un número de formas apropiadas, tales
como por administración parenteral (por ejemplo,
intramuscular, intradérmica o subcutánea) o administración
15 por nasofaringe (por ejemplo, intranasal). La vacuna puede
liofilizarse para resuspensión al momento de administración o
en solución.

Diagnóstico

En otros aspectos, los anticuerpos de la invención
20 también pueden usarse para la detección específica de
proteínas de *H. Parasuis*, o como herramientas de
investigación. Los anticuerpos arriba descritos pueden ser
etiquetados directamente con una etiqueta detectable para
identificación y cuantificación de bacteria de *H. Parasuis*.

Las etiquetas para uso en inmunoensayos se conocen por aquellos expertos en la técnica e incluyen enzimas, radioisótopos (por ejemplo, ^{32}P , ^3H , ^{14}C , ^{35}S , ^{125}I), y sustancias fluorescentes (fluoresceína y derivados, 5 ficoeritrina, alo-ficocianina, ficocianina, rodamina, y Rojo de Texas), luminiscentes (por ejemplo, luciferina de luciérnaga) y cromogénicas, incluyendo partículas de color tales como perlas de oro coloidal o látex. Los inmunoensayos apropiados incluyen ensayos inmunosorbentes ligadas por 10 enzima (ELISA). Si se desea, el anticuerpo puede ser etiquetado indirectamente por la reacción con sustancias etiquetadas que tienen una afinidad para inmunoglobulina. El anticuerpo puede conjugarse con una segunda sustancia y detectarse con una tercera sustancia etiquetada que tiene una 15 afinidad para la segunda sustancia conjugada al anticuerpo. Por ejemplo, el anticuerpo puede conjugarse a biotina y el conjugado anticuerpo-biotina detectado usando avidina o estreptavidina etiquetada. El anticuerpo también puede conjugarse a un hapteno y el conjugado anticuerpo-hapteno 20 detectado usando anticuerpo etiquetado con anti-hapteno. Estos y otros métodos para etiquetar anticuerpos y conjugados de ensayo son bien conocidos por aquellos expertos en la técnica. La detección de una etiqueta puede realizarse por varios métodos que incluyen conteo por escintilación,

espectrometría de rayos gamma, autoradiografía, y detección de fluorescencia.

En consecuencia, cuando se usa con etiquetas apropiadas u otra biomolécula o químicos detectables apropiados, los anticuerpos descritos en la presente son útiles para propósitos tales como diagnóstico in vivo e in vitro de infecciones por *H. parasuis* o detección de bacterias de *H. parasuis*.

Kits

En otro aspecto, la presente invención proporciona un kit para aislar y determinar bacterias e infección por *H. parasuis*. En una modalidad, el kit comprende los anticuerpos de reacción cruzada aislados de la presente invención en una forma apropiada, tales como liofilizado en un recipiente sencillo que puede activarse por la adición de una muestra acuosa que se sospecha que contiene la bacteria *H. parasuis*. Tal kit incluirá típicamente un recipiente apropiado para alojar los anticuerpos en una forma apropiada junto con un reactivo de inmunodetección apropiado. Generalmente, estos kits pueden contener un anticuerpo de acuerdo con la presente invención e instrucciones para determinar el enlace del tal anticuerpo cuando se introduce una muestra de un sujeto al anticuerpo. Por ejemplo, un reactivo de inmunodetección apropiado puede comprender una señal o etiqueta detectable

apropiada, tal como biotina o enzima que produce un color detectable, etc., que puede ligarse al anticuerpo o utilizarse en otras maneras apropiadas de manera que se proporciona un resultado detectable cuando el anticuerpo se
5 enlaza al antígeno. En otra modalidad, el kit comprende una proteína de *H. parasuis*, o fragmento de la misma, que comprende una determinante antigénica reactiva cruzada.

Los siguientes ejemplos se proporcionan sólo para ilustración.

10

EJEMPLOS

Ejemplo 1

Estimulación Secuencial

Todos los animales experimentales se sometieron a los
15 procedimientos establecidos por la Política de Servicio de Salud Pública en Cuidado Humano y Uso de Animales de Laboratorio, la Provisión del Acta de Bienestar Animal, y otras leyes y regulaciones aplicables.

La composición de estimulación se preparó como sigue: un
20 hisopo de algodón estéril se remojó en solución madre de *H. parasuis* descongelada a aproximadamente 5×10^8 Unidades de formación de colonia (CFU)/ml y humedece suavemente para cubrir la superficie de una placa de agar y chocolate. El cultivo se incubó a 37°C por 48 h en una atmósfera con CO₂ al

5 %. Tres ml de solución amortiguadora de peptona se usó entonces para lavar la placa, usando un raspador celular y se pasa a través de estopilla para remover cualquier residuo de agar. El fluido capturado se normalizó entonces hasta 1 OD con solución amortiguadora de peptona. Este nivel se alcanzó a aproximadamente una dilución 1:11. El material se almacenó at 4°C por aproximadamente 1 h antes de usar.

Se obtuvieron dieciocho lechones derivados por cesárea, que carecen de calostro (CDCD) a 5 semanas de edad de Struve Labs, Inc. Los animales se colocaron aleatoriamente en uno de tres grupos: 9 lechones se colocaron en el grupo experimental, 4 lechones en el grupo de control, y 5 lechones en el grupo indicador (Tabla 1). Todos los animales se les dieron cánulas intranasales para proporcionar acceso directo al sistema respiratorio superior y se alojan en cuartos de acceso controlado de acuerdo al grupo.

Tabla 1: Agrupado y Estimulación Animal

Grupo experimental	Estimulación con H. Parasuis Serotipo 5	Estimulación con H. Parasuis Serotipo 5
Experimental (9 animales)	X	X
Control (4 animales)		
Indicador (5 animales)		X

A las 7 semanas de edad, los animales en el grupo experimental se estimularon intranasalmente con 1 ml de serotipo 5 diluido hasta 0.001 de densidad óptica (OD) a 530 nm en solución amortiguadora de peptona. Los lechones de control e indicadores se estimularon con solución amortiguadora de peptona. Después de la estimulación, los lechones se permitieron que se recuperaran. Se administraron antibióticos de espectro amplio como sea necesario.

Nueve semanas después de la primera estimulación, los animales en el grupo grupos experimentales e indicadores se estimularon intranasalmente con 1 ml del serotipo 13 diluido hasta a 0.001 OD a 530 nm en solución amortiguadora de peptona.

Se les aplicó la necropsia a tres animales aleatoriamente seleccionados 24 horas después de la segunda estimulación. Se cosecharon los tejidos respiratorio y linfático de estos animales, se maceraron con un escalpelo estéril, y se colocaron en placas de 24 pozos que contienen medio de cultivo celular con agentes antibacterianos para permitir que las células activadas proliferen. Este sobrenadante del medio se usó para pruebas adicionales. Los animales restantes se observaron por 2 semanas más y se les aplicó la necropsia.

Ejemplo 2

SDS/PAGE y Western Blot

Se colocó en placa de forma expandida un ml de solución madre congelada de *H. parasuis* a 5×10^8 CFU/ml en la placa de agar y chocolates. El cultivo se incubó a 37°C por 48 h en una atmósfera con CO₂ al 5 %. Cuatro ml de solución salina amortiguada en fosfato (PBS) se usó entonces para lavar la placa, usando flujo inducido por pipeta para suspender las células. Las células resuspendidas se almacenaron a 4°C y usaron dentro de 1 semana. Dos ml de la suspensión se centrifugó (9,000 g, 1 hr) y las células peletizadas se volvieron a suspender en 200 µl de PBS, lavaron dos veces con PBS, y rompieron al pasar por una aguja de calibre 18. La suspensión celular de lavado se mezcló 1:1 con PBS que contiene Tween-20 al 2 % y el incubado en un tubo giratorio de prueba por 90 min a 37°C. Después de la incubación, las células se removieron por centrifugación (48,000 g, 1 hr). El sobrenadante de cultivo se mantuvo y almacenó a 4°C y usó dentro de 1 semana.

El SDS-PAGE se realizó usando el sistema Criterion™ con geles de acrilamida al 12.5 % (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). La suspensión de célula *H. parasuis* se corrió en geles a una dilución de 1:3 en PBS. El extracto de Tween-20 se corrió sin diluir. Los geles se tiñeron con reactivo de

tinción azul GelCode (Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL), un tinte en gel basado en Coomassie. Se corrieron Western blots usando el kit detector de proteína (KPL, Inc., Gaithersburg, Maryland). Se realizó una prueba primaria
5 usando fluidos inmunitarios generados del cerdo estimulado. Se usó ant-cerdo-HRP de cabra como el anticuerpo de detección. Se alcanzó la visualización con 1 Componente de Sustrato de Peroxidasa de Membrana TMB (KPL, Inc., Gaithersburg, Maryland).

10 El sobrenadante cosechado de las células activadas aisladas de varios tejidos de 9 animales se seleccionaron contra células de serotipo 5 de *H. parasuis* enteras. Se usaron altas concentraciones de estos sobrenadantes para visualización por técnica Western blot. La concentración alta
15 y específica de anticuerpo se obtuvo a partir de los ganglios linfáticos bronquiales del cerdo 47 (BL47) (Fig. 1). El patrón en banda crudo presentado en este Western blot fue indicativo de proteínas presentes en *H. parasuis* reconocido por el animal estimulado. BL47 se eligió para análisis
20 comparativo adicional.

Las proteínas reconocidas entre serotipos se caracterizaron además a través de un segundo conjunto de Western blots. Los serotipos 5 y 13 se seleccionaron primero. El serotipo 5 muestra bandas prominentes a aproximadamente

28, 33, 45, 56, 63, y 76 kDa. El patrón de banda del serotipo 13 fue similar al serotipo 5 y contiene bandas prominentes a 28, 45, 55, 62, y 75 kDa. Al probar con BL47 contra el serotipo 4, un serotipo no involucrado en las estimulaciones de cerdos, también genera bandas prominentes a 28, 34, 41, 47, 57, 62, y 77 kDa. Una comparación directa de los tres serotipos se muestra en la Figura 2. Las proteínas de aproximadamente 28, 45, 55, 62, y 75 kDa, que parecen que se presentan en todos los serotipos probados, se examinaron adicionalmente.

Las proteínas presente en serotipos múltiples se identificaron usando fluidos generados de una estimulación secuencial. Para incrementar las concentraciones relativas de proteínas asociadas en la membrana en las muestras, un cultivo de serotipo 5 se procesó por medio de un proceso de extracción de tween-20. Este método se ha mostrado previamente para aislar las membranas exteriores de bacterias. Al realizar este procedimiento se producen muchas diferencias en el perfil SDS-PAGE de las células no tratadas (Fig. 3; SDS-PAGE). La formación de banda fue similar en Western blot, también, lo que demuestra que las proteínas inicialmente dirigidas se presentaron.

El material procesado de tween-20 se usó para procesamiento de secuencias. Este material contiene las

proteínas de reactividad cruzada y tiene la mayoría de los residuos celulares removidos durante el curso del procesamiento. De esta manera, esta preparación tween-20 se corrió en varios carriles adyacentes en una membrana PVDF para corte de banda y procesamiento de secuencias. (Fig. 3; Blot). Las bandas seleccionadas para procesamiento de secuencias del serotipo 5 incluyen aquellas a ~28, ~45, ~56, ~63, y ~76 kDa.

10

Ejemplo 3

Resultados del Procesamiento de Secuencias

Las muestras para procesamiento de secuencias se corrieron primero en un SDS-PAGE, luego se transfirieron a una membrana PVDF. Esta membrana se tiñó y las bandas se extirparon usando una navaja de afeitar. La espectrometría de masa se realizó en tapones de gel extirpados con una navaja de afeitar. La solución amortiguadora de transferencia fue solución amortiguadora Tris/Glicina estándar con MeOH 20%. La membrana se tiñó con reactivo de tinción azul GelCode (Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL) y se destiñó con isopropanol al ~25% en agua. Los fragmentos de membrana se enjuagaron copiosamente con agua desionizada, purificada.

20

Las muestras (esto es, bandas de ~28, ~45, ~56, ~63, y ~76 kDa) se caracterizaron además usando espectrometría de

masa (Fig. 4A-D) y procesamiento de secuencias por terminal N (degradación Edman). Los resultados de procesamiento de secuencias por terminal N proporciona la información de secuencia parcial, que se muestra en la Tabla 2.

5 Tabla 2: Resultado de procesamiento de secuencias de terminal N.

	SPAKGSTIEAGIAYPISRA
	SEPQATX ¹ DAK
	MKNLISIAKG
10	GEIEELALGI
	MEKDVKFGNDARVGMLKGVNXXKADA
	SEIXELANAITFLSMGVG
	GKVPETTVLAXKQEIIX
	APAKGSTIEAGIAYPISTAXDDMMS
15	SPSDKTFKISAIPDYNAAEMTS

¹X representa un aminoácido indeterminado.

La información de secuencia para los fragmentos de proteína fueron entonces BLASTp 'd contra el *H. influenzae* y *H. ducreyi* en la base de datos Swiss-Prot. Las proteínas con
20 más de 10 aminoácidos (aa) o algunas más de 3 posiciones con posibilidades de aminoácidos múltiples se analizaron además. Los resultados se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3: Resultados de Procesamiento de secuencias de Proteína.

5

10

15

No.	PM (kDa)	PM est. (kDa)	Valor E	Swiss-Prot ID	Nombre de Proteína/Descripción
1	28	22	0.76	Q4QM69	Peptidoglican transglucosilasa biosintética monofuncional
2	28	34	2.5	Q4QK43	Pseudouridina sintasa B de tARN
3	28	32	3.4	Q4QJL4	Eonil-[acil-portador-proteína] reductasa
4	28	68	8	Q4QLZ8	Sistema glutational-potasio regulado-efluente
5	56	60	8.00E-08	Q4QM48	Proteína A ligada a heme
6 ^a	56	58	0.041	Q7VL18	Proteína de ligada al transportador ABC putativo periplásmico
7	63	61	0.33	Q4QLH0	Proteína unida al oligopéptido periplásmico
8	63	28	1.9	Q4ANT7	TonB (transportador de hierro)
9	76	68	4.00E-09	Q4QJW4	Proteína dnaK chaperona (HSP70)
10	76	24	0.59	Q4QP42	N-acetilmanosamina-6fosfato 2-epimerasa putativa
11	76	17	1.1	Q4AQMR6	Fosfoapanteteína adenililtransferasa
12	76	74	2	Q4QJR2	HMW1C, glicosiltransferasa putativa involucrada en la glicosilación de HMW1A y HMW2A

a = Éxito de secuencia de proteína contra *H. ducreyi*. Todas las otras secuencias se obtienen a través de la comparación *H. influenzae*.

La Tabla 3 incluye al menos dos proteínas que parecen igualmente exponerse en la superficie de la célula (proteínas 6 y 7) y al menos un que parece ser capaz de unir el hierro

(proteína 5).

Ejemplo 4

PCR y Clonación

Las proteínas 5 y 6 mostradas en la Tabla 3 fueron
5 inmunogénicas en que ambas se reconocieron por los fluidos
inmunitarios de los cerdos. Estas proteínas se han asociado
con adquisición de hierro. Los transportadores tipo ABC
tienen una amplia variedad de funciones reportadas y se han
conectado con absorción de hierro en *Cyanobacteria*. La
10 proteína unida a heme es vital para sobrevivencia de *H.*
influenzae en el torrente sanguíneo como se cosecha unida a
hierro a los grupos heme. Además, la proteína unida a heme es
altamente conservadora dentro del género.

Usando la información del genoma de *H. influenzae* y *H.*
15 *ducreyi* publicado, los cebadores PCR se diseñaron para
amplificar las dos proteínas seleccionadas (esto es, proteínas 5
y 6) de una preparación cromosomal de *H. parasuis*. Los cebadores
PCR usados se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4: Cebadores PCR.

Nombre	Sequence (5' a 3')	T _M
Proteína 5		
FHpsHemeBam (delantero)	TATAGGATCCATGCTTATGAAACTAAAAGCAACATTA ACT	60°C
RHpsHemeXho (inverso)	TATACTCGAGTTATTTACCATCAACACTCACACCATAAAA	61°C
Proteína 6		
FHpsABCBam (delantero)	TATAGGATCCATGACTTCTCATTTTGAATACAATCAATCT	60°C
RHpsABCXho (inverso)	TATACTCGAGTTATGTACGACCTACACCAAGGAAAGACAA	64°C

Para amplificación de una secuencia de nucleótido correspondiente a la proteína 5, se realizó la PCR usando los cebadores mostrados en la Tabla 4 y polimerasa PFU Turbo, y preparación cromosomal de *H. parasuis* como plantilla. Se apreciaron dos bandas sólidas en la reacción heme (~1.8kb y ~800bp) y la banda correspondiente al producto de amplificación ~1.8kb se purificó en gel.

Para amplificación de una secuencia de nucleótido correspondiente a la proteína 6, se realizó la PCR usando los cebadores mostrados en la Tabla 4 y polimerasa PFU Turbo y preparación cromosomal de *H. parasuis* como plantilla. Se apreció un doblete en esta reacción (~1.5kb y ~1.3kb) y la banda superior (esto es, ~1.5 kb) del doblete fue purificado en gel usando un kit de elución en gel.

Los fluidos purificados en gel que contienen los productos amplificados se confeccionaron en A y ligaron a pGEM-T. Esta ligación se transformó en células competentes

80

TOP10 (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA). Los transformantes se seleccionaron e hicieron crecer a 37°C durante la noche. Los insertos se confirmaron posteriormente y se subclonan en el vector de expresión pTRCHis-A 5 (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA) expresión de proteínas recombinantes que contienen etiquetas 6xHis de terminal N.

NOVEDAD DE LA INVENCION

Habiendo descrito la presente invención, se considera como novedad, y por lo tanto se reclama como propiedad lo contenido en las siguientes:

5

REIVINDICACIONES

1. Un método para determinar una molécula que comprende una determinante antigénica de reactividad cruzada, el método caracterizado porque comprende poner en contacto al menos un anticuerpo con una primera determinante antigénica y una segunda determinante antigénica, en donde al menos un anticuerpo se obtiene de un animal secuencialmente expuesto a una primera estimulación inmunológica producida por una primera composición inmunogénica que comprende una primera determinante antigénica, seguido por una segunda estimulación inmunológica producida por una segunda composición inmunogénica que comprende una segunda determinante antigénica, en donde el enlace de al menos un anticuerpo a la primera y la segunda determinante antigénica es indicativo de reactividad cruzada por ello determinando la molécula.

2. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque la primera composición inmunogénica comprende además un primer polipéptido que comprende la

primera determinante antigénica, en donde la segunda composición inmunogénica comprende además un segundo polipéptido que comprende la segunda determinante antigénica, en donde el primer polipéptido se expresa por un primer
5 microorganismo y el segundo polipéptido se expresa por un segundo microorganismo, en donde el primero y segundo microorganismos se caracterizan como que son serotipos diferentes de la misma especie.

3. El método de conformidad con la reivindicación 2,
10 caracterizado porque el primero y el segundo microorganismo es una bacteria.

4. El método de conformidad con la reivindicación 3, caracterizado porque la bacteria es *H. parasuis*.

5. El método de conformidad con la reivindicación 4,
15 caracterizado porque el primer microorganismo es serotipo 5, en donde el segundo microorganismo es serotipo 13.

6. El método de conformidad con la reivindicación 4, caracterizado porque el primer y el segundo polipéptido cada uno es una proteína ligada a heme o un transportador tipo ABC.

20 7. Un método para determinar una molécula que comprende una determinante antigénica de reactividad cruzada, el método caracterizado porque comprende:

a) activar una célula B de memoria en un animal para producir al menos un anticuerpo, en donde la activación

comprende estimular inmunológicamente el animal con la molécula para producir una respuesta inmunológica que activa la célula B de memoria; y

b) poner en contacto al menos un anticuerpo con una
5 segunda molécula, en donde el enlace de al menos un anticuerpo a la molécula y la segunda molécula determina la molécula.

8. El método de conformidad con la reivindicación 7, caracterizado porque la segunda molécula comprende la
10 determinante antigénica de reactividad cruzada.

9. El método de conformidad con la reivindicación 7 caracterizado además porque comprende cultivar in vitro la célula B de memoria después de su activación.

10. Un polipéptido aislado, caracterizado porque
15 comprende una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consiste de:

ELANAI (SEQ ID NO: 1);

TVLAEKQEII (SEQ ID NO: 2);

APAKGSTIEAGIAYPIST (SEQ ID NO: 3);

20 MKNLISI (SEQ ID NO: 4); y

SPSDKTEFKISAIPDYNAEMT (SEQ ID NO: 5),

en donde el polipéptido aislado comprende además una determinante antigénica de reactividad cruzada presente en una proteína expresada por al menos dos serotipos de *H.*

84

parasuis.

11. Un polipéptido aislado, caracterizado porque comprende una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consiste de:

- | | | |
|---|----------------------|-------------------|
| 5 | ELANAI | (SEQ ID NO: 1); |
| | TVLAEKQEII | (SEQ ID NO: 2); |
| | APAKGSTIEAGIAYPIST | (SEQ ID NO: 3); |
| | MKNLISI | (SEQ ID NO: 4); y |
| | SPSDKTFKISAIPDYNAEMT | (SEQ ID NO: 5), |

10 en donde el polipéptido aislado comprende además una determinante antigénica de reactividad cruzada y se expresa por el serotipo 5 de *H. parasuis*.

12. Una vacuna, caracterizada porque comprende una cantidad profilácticamente o terapéuticamente efectiva del
 15 polipéptido aislado de conformidad con la reivindicación 10, y un vehículo, portador, o excipiente farmacéuticamente aceptable.

13. Un método para tratar o prevenir una enfermedad, afección, o síntoma de la misma asociado con infección por *H.*
 20 *parasuis* de un animal, el método caracterizado porque comprende administrar una cantidad efectiva de la vacuna de conformidad con la reivindicación 11 al animal, en donde la cantidad efectiva es suficiente para tratar o prevenir la enfermedad o afección.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Novartis Animal Health, Inc.
Plocher, Thomas

<120> Composiciones, Métodos, y Kits

<130> N079 1290.1

<160> 5

<170> PatentInversión 3.4

<210> 1
<211> 11
<212> PRT
<213> Haemophilus parasuis

<400> 1

Glu Leu Ala Asn Ala Ile Thr Phe Leu Ser Met
1 5 10

<210> 2
<211> 10
<212> PRT
<213> Haemophilus parasuis

<400> 2

Thr Val Leu Ala Glu Lys Gln Glu Ile Ile
1 5 10

<210> 3
<211> 18
<212> PRT
<213> Haemophilus parasuis

<400> 3

Ala Pro Ala Lys Gly Ser Thr Ile Glu Ala Gly Ile Ala Tyr Pro Il
1 5 10 15

Ser Thr

<210> 4
<211> 7
<212> PRT
<213> Haemophilus parasuis

<400> 4

Met Lys Asn Leu Ile Ser Ile
1 5

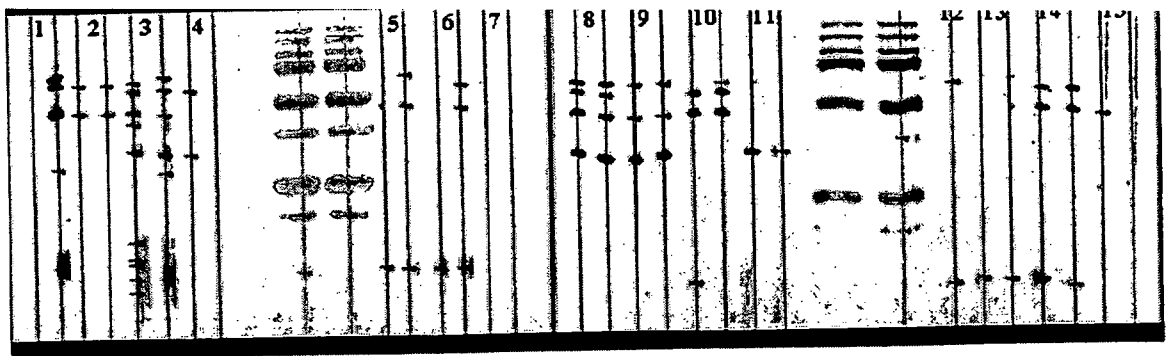


FIGURA 1

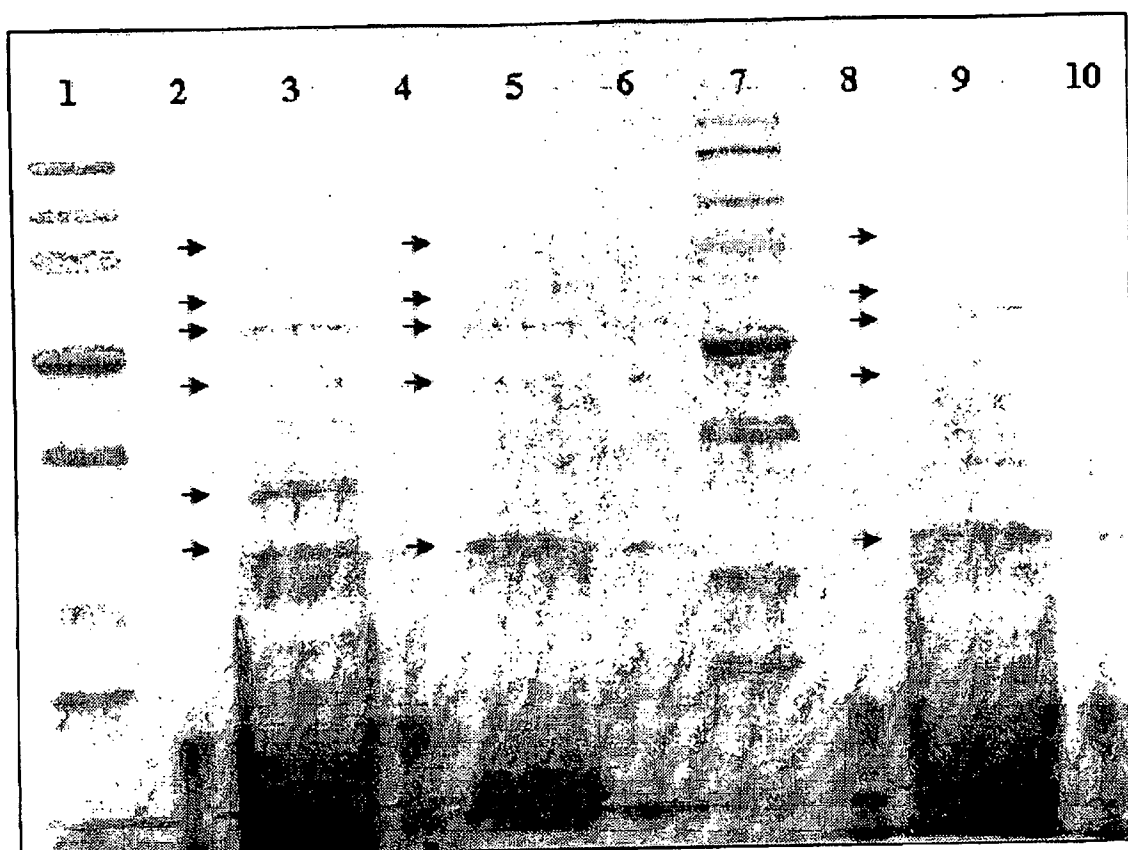


FIGURA 2

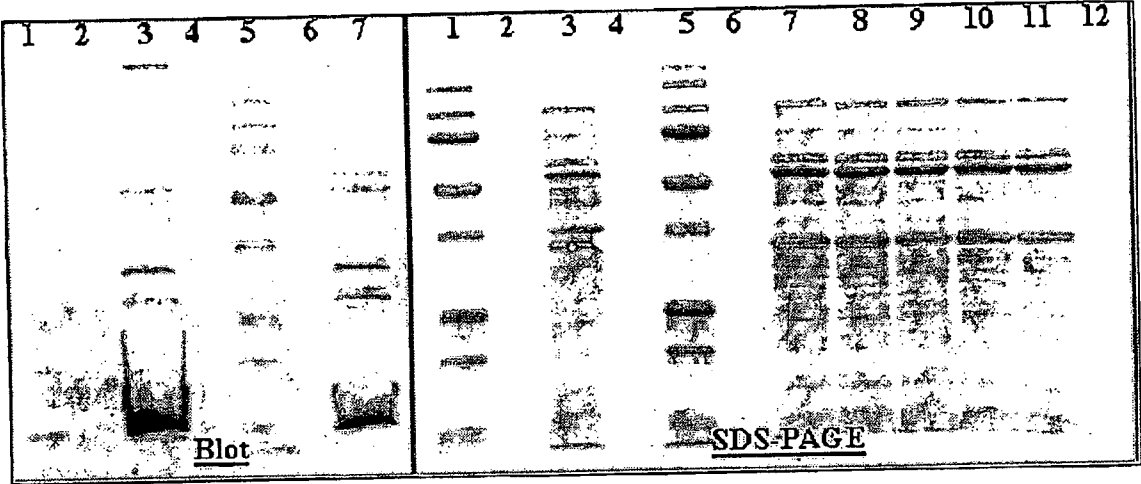
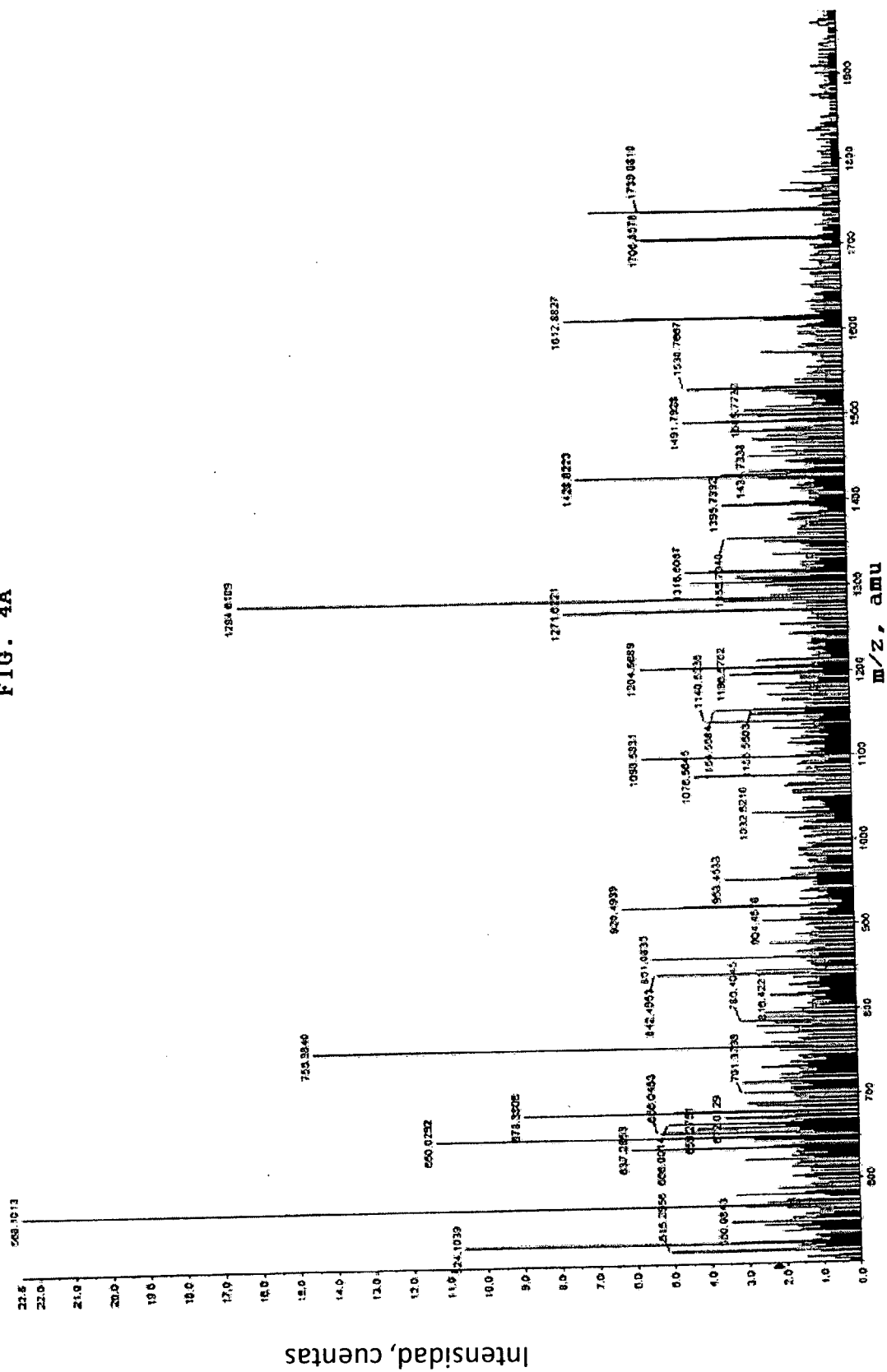


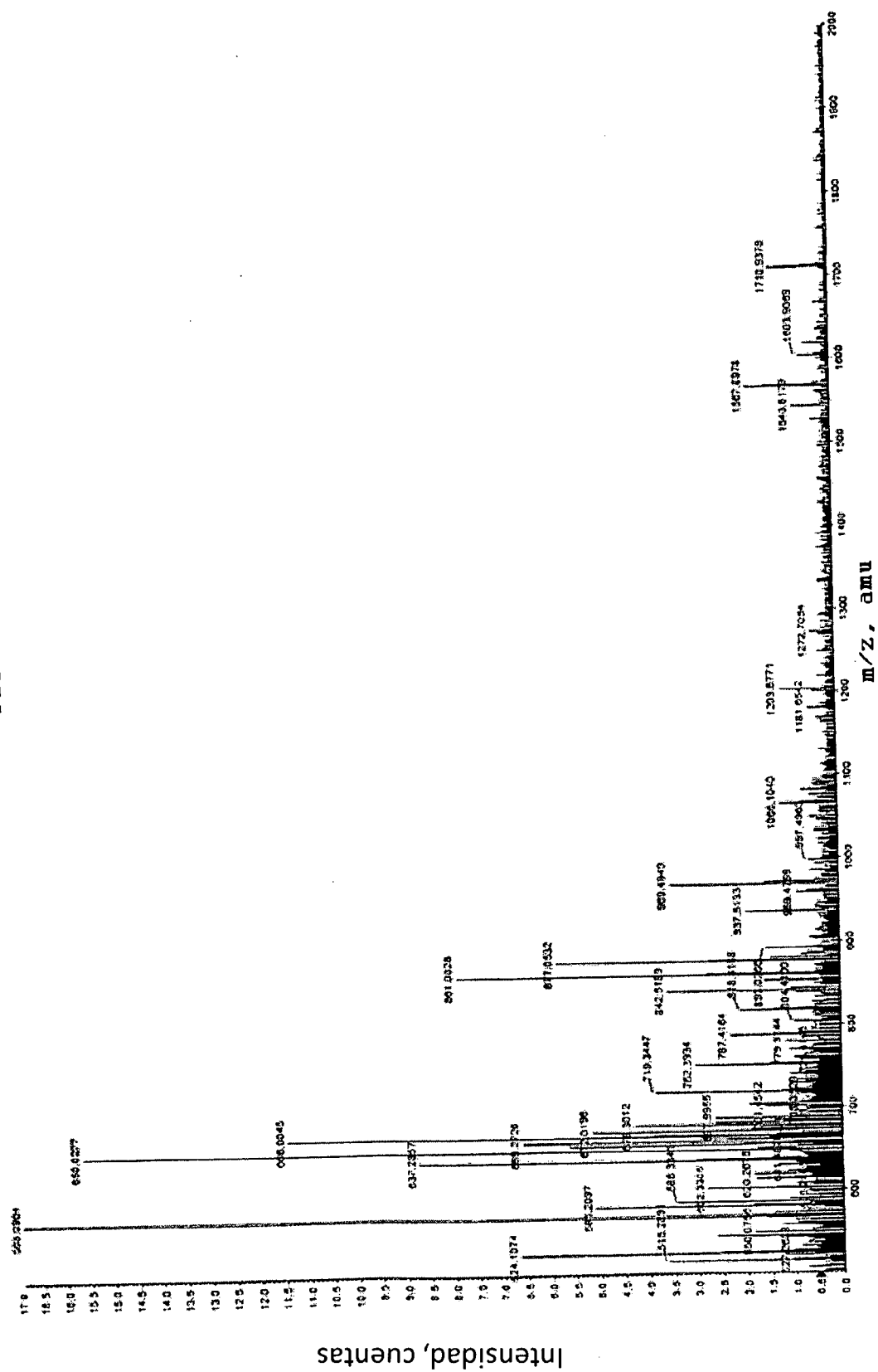
FIGURA 3

FIG. 4A



91

FIG. 4B



92

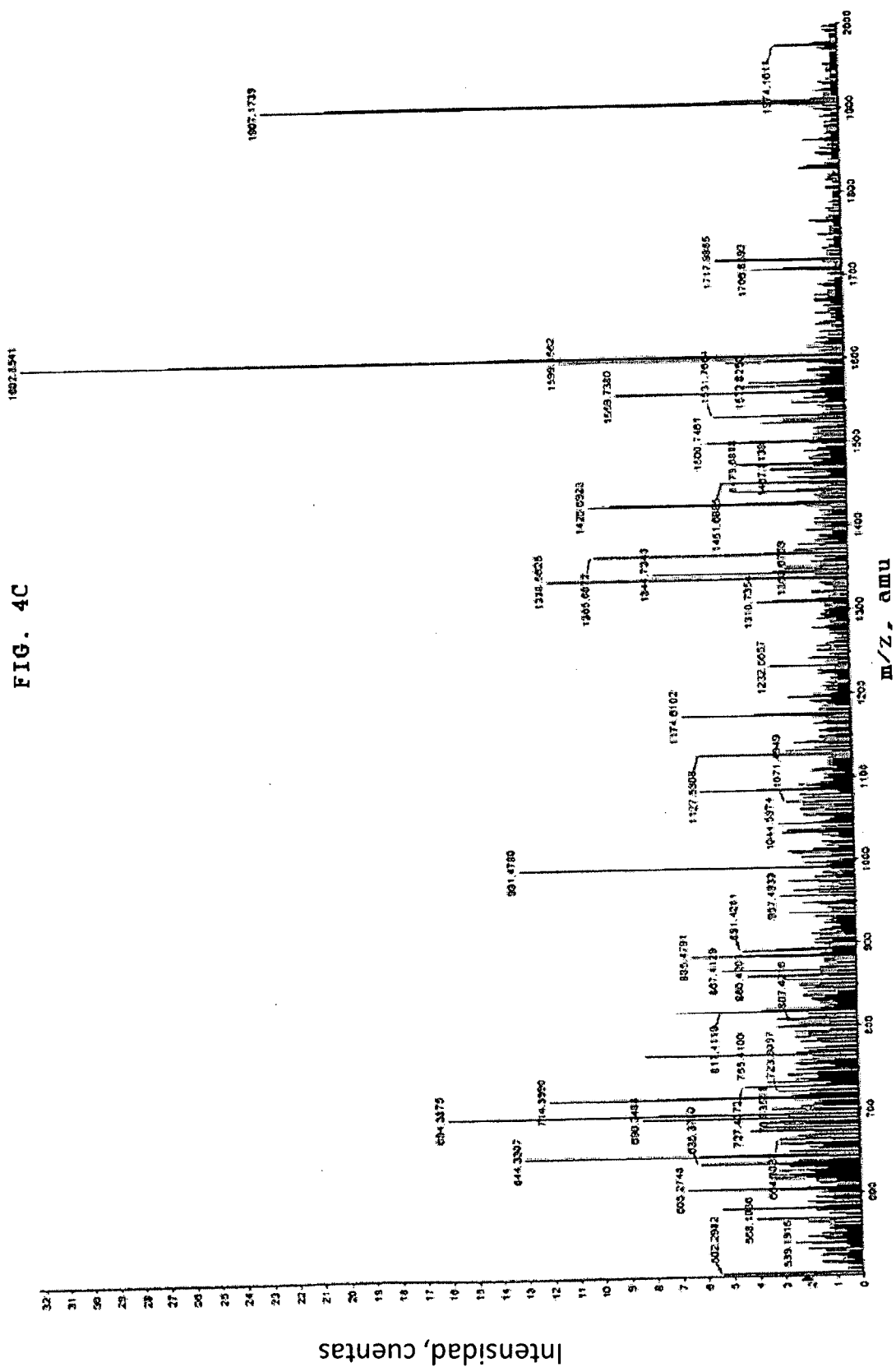
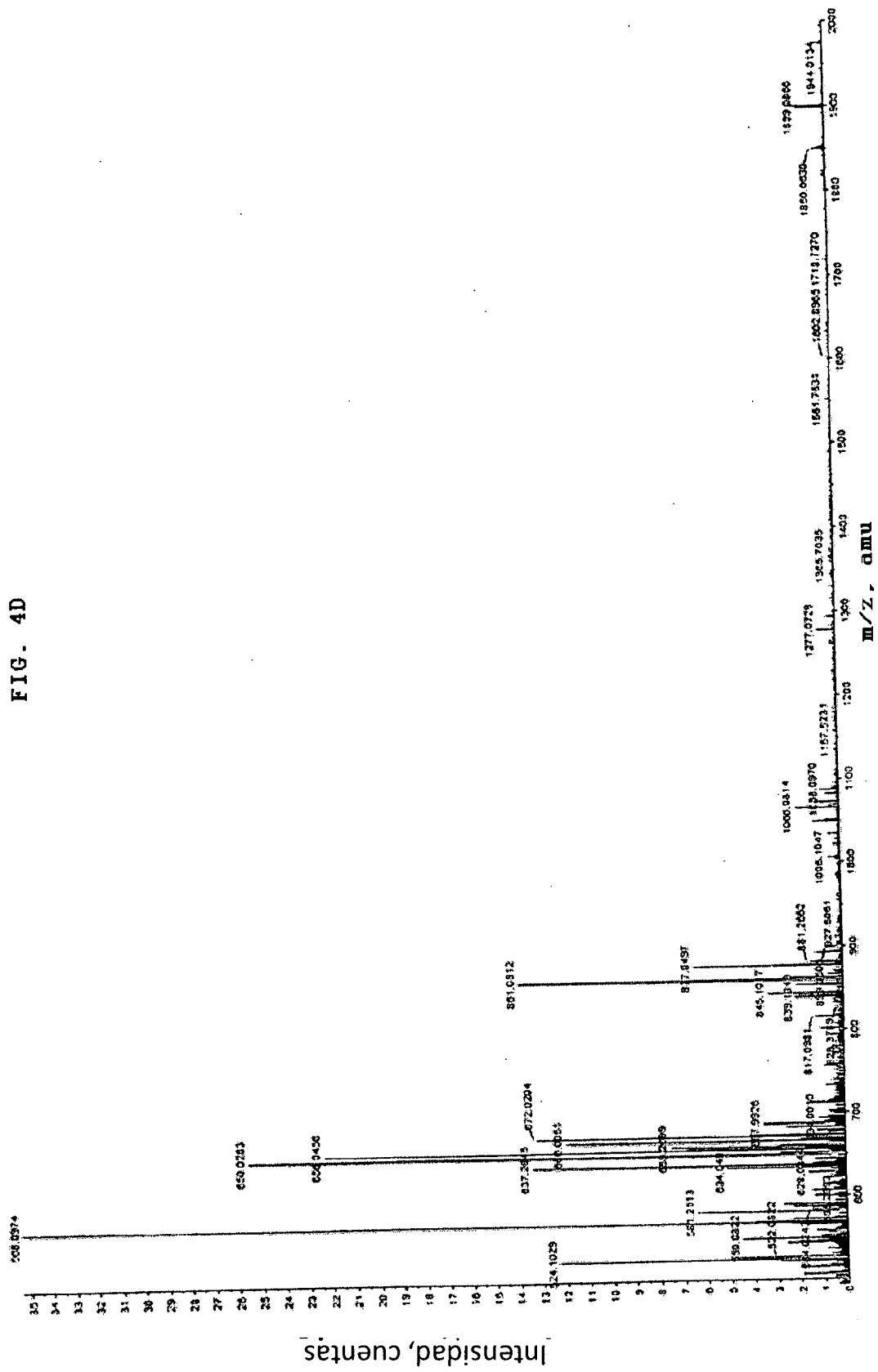


FIG. 4D



0/4

PCT REQUEST

Print Out (Original in Electronic Form)

0	For receiving Office use only	
0-1	International Application No.	PCT/EP2009/053281
0-2	International Filing Date	20 MAR 2009 (20.03.2009)
0-3	Name of receiving Office and "PCT International Application"	RO/EP
0-4	Form PCT/RO/101 PCT Request	
0-4-1	Prepared Using	PCT Online Filing Version 3.5.000.193 MT/FOP 20020701/0.20.5.9
0-5	Petition The undersigned requests that the present international application be processed according to the Patent Cooperation Treaty	
0-6	Receiving Office (specified by the applicant)	European Patent Office (EPO) (RO/EP)
0-7	Applicant's or agent's file reference	52674-WO-PCT
I	Title of Invention	Compositions, Methods and Kits
II	Applicant	
II-1	This person is	applicant only
II-2	Applicant for	all designated States except US
II-4	Name	Novartis AG
II-5	Address	Lichtstrasse 35 4056 Basel Switzerland
II-6	State of nationality	CH
II-7	State of residence	CH
II-8	Telephone No.	+416132448206
II-9	Facsimile No.	+41613247502
II-11	Applicant's registration No. with the Office	2240423.0

PCT REQUEST

Print Out (Original in Electronic Form)

III-1	Applicant and/or inventor	
III-1-1	This person is	applicant and inventor
III-1-2	Applicant for	US only
III-1-4	Name (LAST, First)	PLOCHER, Thomas
III-1-5	Address	Novartis Animal Health US, Inc. Larchwood Site 1447 140th Street Larchwood, Iowa 51241 United States of America
III-1-6	State of nationality	US
III-1-7	State of residence	US
III-2	Applicant and/or inventor	
III-2-1	This person is	applicant and inventor
III-2-2	Applicant for	US only
III-2-4	Name (LAST, First)	CAMPOS, Manuel
III-2-5	Address	94 Redwood Meadows DR Redwood Meadows Alberta, Alberta T3Z 1A3 Canada
III-2-6	State of nationality	MX
III-2-7	State of residence	CA
III-3	Applicant and/or inventor	
III-3-1	This person is	applicant and inventor
III-3-2	Applicant for	US only
III-3-4	Name (LAST, First)	HARLAND, Richard
III-3-5	Address	Novartis Animal Health Canada Inc. 2000 Argentia Road Suite 400, Plaza 3 Mississauga, Ontario L5N 1V9 Canada
III-3-6	State of nationality	CA
III-3-7	State of residence	CA

96

PCT REQUEST

Print Out (Original in Electronic Form)

III-4	Applicant and/or inventor	
III-4-1	This person is	applicant and inventor
III-4-2	Applicant for	US only
III-4-4	Name (LAST, First)	JOHNSON, Todd
III-4-5	Address	Novartis Animal Health US, Inc. Larchwood Site 1447 140th Street Larchwood, Iowa 51241 United States of America
III-4-6	State of nationality	US
III-4-7	State of residence	US
III-5	Applicant and/or inventor	
III-5-1	This person is	applicant and inventor
III-5-2	Applicant for	US only
III-5-4	Name (LAST, First)	HARBISON, Trent
III-5-5	Address	Novartis Animal Health US, Inc. Larchwood Site 1447 140th Street Larchwood, Iowa 51241 United States of America
III-5-6	State of nationality	US
III-5-7	State of residence	US
III-6	Applicant and/or inventor	
III-6-1	This person is	applicant and inventor
III-6-2	Applicant for	US only
III-6-4	Name (LAST, First)	KEIL, Dan
III-6-5	Address	12707 W. 63rd Street Shawnee, Kansas 66216 United States of America
III-6-6	State of nationality	US
III-6-7	State of residence	US

PCT REQUEST

Print Out (Original in Electronic Form)

IV-1	Agent or common representative; or address for correspondence The person identified below is hereby/ has been appointed to act on behalf of the applicant(s) before the competent International Authorities as:	agent
IV-1-1	Name (LAST, First)	KAMIBAYASHI, Lynne
IV-1-2	Address	Novartis Animal Health, Inc. Patent and Trademark Group, Werk Rosental 4002 Basel Switzerland
IV-1-3	Telephone No.	+41613248206
IV-1-4	Facsimile No.	+41613247502
V	DESIGNATIONS	
V-1	The filing of this request constitutes under Rule 4.9(a), the designation of all Contracting States bound by the PCT on the international filing date, for the grant of every kind of protection available and, where applicable, for the grant of both regional and national patents.	
VI-1	Priority claim of earlier national application	
VI-1-1	Filing date	28 March 2008 (28.03.2008)
VI-1-2	Number	61/040,260
VI-1-3	Country	US
VI-2	Incorporation by reference : where an element of the international application referred to in Article 11(1)(iii)(d) or (e) or a part of the description, claims or drawings referred to in Rule 20.5(a) is not otherwise contained in this international application but is completely contained in an earlier application whose priority is claimed on the date on which one or more elements referred to in Article 11(1)(iii) were first received by the receiving Office, that element or part is, subject to confirmation under Rule 20.6, incorporated by reference in this international application for the purposes of Rule 20.6.	
VII-1	International Searching Authority Chosen	European Patent Office (EPO) (ISA/EP)

PCT REQUEST

Print Out (Original in Electronic Form)

VIII	Declarations	Number of declarations	
VIII-1	Declaration as to the identity of the inventor	—	
VIII-2	Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to apply for and be granted a patent	—	
VIII-3	Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to claim the priority of the earlier application	—	
VIII-4	Declaration of inventorship (only for the purposes of the designation of the United States of America)	—	
VIII-5	Declaration as to non-prejudicial disclosures or exceptions to lack of novelty	—	
IX	Check list	number of sheets	electronic file(s) attached
IX-1	Request (including declaration sheets)	6	✓
IX-2	Description (excluding sequence listing part)	30	✓
IX-3	Claims	3	✓
IX-4	Abstract	1	✓
IX-5	Drawings	7	✓
IX-7a	Sub-total number of sheets	47	
IX-6a	Sequence listing part of description	2	✓
IX-7	TOTAL	49	
	Accompanying items	paper document(s) attached	electronic file(s) attached
IX-8	Fee calculation sheet	—	✓
IX-11	Copy of general power of attorney	—	reference no. 36671
IX-16(A)	Sequence listing submitted for the purposes of international search under Rule 13ter	—	✓
IX-18	PCT-SAFE physical media	—	—
IX-20	Figure of the drawings which should accompany the abstract		
IX-21	Language of filing of the international application	English	
X-1	Signature of applicant, agent or common representative	/Lynne Kamibayashi/	
X-1-1	Name (LAST, First)	KAMIBAYASHI, Lynne	
X-1-2	Name of signatory	KAMIBAYASHI, Lynne	
X-1-3	Capacity	(Representative)	

PCT REQUEST

Print Out (Original in Electronic Form)

FOR RECEIVING OFFICE USE ONLY

10-1	Date of actual receipt of the purported international application	20 MAR 2009 (20.03.2009)
10-2	Drawings:	✓
10-2-1	Received	
10-2-2	Not received	
10-3	Corrected date of actual receipt due to later but timely received papers or drawings completing the purported international application	
10-4	Date of timely receipt of the required corrections under PCT Article 11(2)	
10-5	International Searching Authority	ISA/EP
10-6	Transmittal of search copy delayed until search fee is paid	

FOR INTERNATIONAL BUREAU USE ONLY

11-1	Date of receipt of the record copy by the International Bureau	
------	--	--

100

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

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
1 October 2009 (01.10.2009)

(10) International Publication Number
WO 2009/118273 A1

- (51) **International Patent Classification:**
C07K 14/435 (2006.01) *A61K 39/102* (2006.01)
G01N 33/50 (2006.01) *C07K 16/00* (2006.01)
- (21) **International Application Number:**
PCT/EP2009/053281
- (22) **International Filing Date:**
20 March 2009 (20.03.2009)
- (25) **Filing Language:** English
- (26) **Publication Language:** English
- (30) **Priority Data:**
61/040,260 28 March 2008 (28.03.2008) US
- (71) **Applicant (for all designated States except US):** NO-VARTIS AG [CH/CH]; Lichtstrasse 35, CH-4056 Basel (CH).
- (72) **Inventors; and**
- (75) **Inventors/Applicants (for US only):** PLOCHER, Thomas [US/US]; Novartis Animal Health US, Inc., Larchwood Site, 1447 140th Street, Larchwood, Iowa 51241 (US). CAMPOS, Manuel [MX/CA]; 94 Redwood Meadows DR, Redwood Meadows, Alberta, Alberta T3Z 1A3 (CA). HARLAND, Richard [CA/CA]; Novartis Animal Health Canada Inc., 2000 Argentia Road, Suite 400, Plaza 3, Mississauga, Ontario L5N 1V9 (CA). JOHN-SON, Todd [US/US]; Novartis Animal Health US, Inc., Larchwood Site, 1447 140th Street, Larchwood, Iowa 51241 (US). HARBISON, Trent [US/US]; Novartis Animal Health US, Inc., Larchwood Site, 1447 140th Street, Larchwood, Iowa 51241 (US). KEIL, Dan [US/US]; 12707 W. 63rd Street, Shawnee, Kansas 66216 (US).
- (74) **Agent:** KAMIBAYASHI, Lynne; Novartis Animal Health, Inc., Patent and Trademark Group, Werk Rosental, CH-4002 Basel (CH).
- (81) **Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available):** AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) **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, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Declarations under Rule 4.17:**
- as to applicant's entitlement to apply for and be granted a patent (Rule 4.17(ii)) —
- Published:**
- with international search report (Art. 21(3))
- with sequence listing part of description (Rule 5.2(a))

(54) **Title:** COMPOSITIONS, METHODS AND KITS

(57) **Abstract:** Compositions and methods for determining immunologically cross-reactive molecules comprising a cross-reactive antigenic determinant are provided, in particular for determining proteins comprising cross-reactive antigenic determinants, in particular for determining proteins that are cross-reactive based on serological screens using sequential immunological challenges to an animal, including determining cross-reactive *H. parasuis* proteins. Also provided are compositions, vaccines, and kits using the molecules for diagnostics and methods for preventing or treating a disease, disorder, condition, or symptoms thereof associated with infectious agents, in particular infectious microorganisms, in particular for preventing or treating a disease, disorder, condition, or symptom thereof associated with *H. parasuis* infection.

101

Box No. VIII (ii) DECLARATION: ENTITLEMENT TO APPLY FOR AND BE GRANTED A PATENT

The declaration must conform to the standardized wording provided for in Section 212; see Notes to Boxes Nos. VIII, VIII (i) to (v) (in general) and the specific Notes to Box No. VIII (ii). If this Box is not used, this sheet should not be included in the request.

Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to apply for and be granted a patent (Rules 4.17(ii) and 51bis.1(a)(ii)), in a case where the declaration under Rule 4.17(iv) is not appropriate:

in relation to the international application PCT/EP2009/053281

Novartis AG, is entitled to apply for and be granted a patent by virtue of the following:

an assignment from:

CAMPOS Manuel
94 Redwood Meadows Dr.
Redwood Meadows
Alberta, T3Z 1A3
Canada

HARBISON Trent
Novartis Animal Health US, Inc.
Larchwood Site
1447 140th Street
Larchwood, IA 51241
USA

HARLAND Richard
Novartis Animal Health Canada Inc.
2420 Palliswood Rd SW
Calgary, Alberta T2V 3P8
Canada

to be continued on page 2

☐ This declaration is continued on the following sheet, "Continuation of Box No. VIII (ii)".

Box No. VIII (ii) DECLARATION: ENTITLEMENT TO APPLY FOR AND BE GRANTED A PATENT

The declaration must conform to the standardized wording provided for in Section 212; see Notes to Boxes Nos. VIII, VIII (i) to (v) (in general) and the specific Notes to Box No. VIII (ii). If this Box is not used, this sheet should not be included in the request.

Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to apply for and be granted a patent (Rules 4.17(ii) and 51bis.1(a)(ii)), in a case where the declaration under Rule 4.17(iv) is not appropriate:

JOHNSON Todd
Novartis Animal Health US, Inc.
Larchwood Site
1447 140th Street
Larchwood, IA 51241
USA

KEIL Dan
30837 W 231st Street
Spring Hill,
KS 66083, USA

PLOCHER Thomas Barton
Novartis Animal Health US, Inc.
Larchwood Site
1447 140th Street
Larchwood, IA 51241
USA

to Novartis AG,

Manuel CAMPOS, dated 17 March 2009,
Trent HARBISON, dated 17 March 2009,
Richard HARLAND, dated 18 March 2009,
Todd JOHNSON, dated 17 March 2009,
Dan KEIL, dated 09 March 2009, and
Thomas Barton PLOCHER, dated 16 March 2009.

☐ This declaration is continued on the following sheet, "Continuation of Box No. VIII (ii)".

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference 52674-WO-PCT	FOR FURTHER ACTION see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below.	
International application No. PCT/EP2009/053281	International filing date (day/month/year) 20/03/2009	(Earliest) Priority Date (day/month/year) 28/03/2008
Applicant NOVARTIS AG		

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

This international search report consists of a total of 5 sheets.

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

1. Basis of the report

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

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

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

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

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

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

4. With regard to the title,

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

5. With regard to the abstract,

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

6. With regard to the drawings,

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP2009/053281

Box No. I 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
PCT/EP2009/053281

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. C07K14/435 G01N33/50 A61K39/102 C07K16/00

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)

C07K G01N A61K

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

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

EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	SUN YAN ET AL: "Avidity, potency, and cross-reactivity of monoclonal antibodies to pneumococcal capsular polysaccharide serotype 6B"	7-8
A	INFECTION AND IMMUNITY, vol. 69, no. 1, January 2001 (2001-01), pages 336-344, XP002534595 ISSN: 0019-9567 page 337 - page 338	1-6,9-13
	----- -/--	



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

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

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

Date of the actual completion of the international search

1 July 2009

Date of mailing of the international search report

13/07/2009

Name and mailing address of the ISA/

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

Authorized officer

Hohwy, Morten

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2009/053281

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	BEAL ET AL: "Cross-reactive cellular and humoral immune responses to Salmonella enterica serovars Typhimurium and Enteritidis are associated with protection to heterologous re-challenge" VETERINARY IMMUNOLOGY AND IMMUNOPATHOLOGY, AMSTERDAM, NL, vol. 114, no. 1-2, 15 November 2006 (2006-11-15), pages 84-93, XP005664774 ISSN: 0165-2427 paragraph [02.6] - paragraph [02.7] page 89 - page 90	1-13
A	TAKAHASHI K ET AL: "A cross-protection experiment in pigs vaccinated with Haemophilus parasuis serovars 2 and 5 bacterins, and evaluation of a bivalent vaccine under laboratory and field conditions." THE JOURNAL OF VETERINARY MEDICAL SCIENCE / THE JAPANESE SOCIETY OF VETERINARY SCIENCE MAY 2001, vol. 63, no. 5, May 2001 (2001-05), pages 487-491, XP002534596 ISSN: 0916-7250 abstract tables 1-2	1-13
X	DATABASE NCBI GenBank 14 February 2008 (2008-02-14), Phillips et al: "transketolase 2 [Haemophilus parasuis 29755]" XP002534597 Database accession no. ZP_02478744 the whole document	10-11
X	DATABASE NCBI GenBan 14 February 2008 (2008-02-14), Phillips et al: "Holliday junction DNA helicase B [Haemophilus parasuis 29755]" XP002534627 Database accession no. ZP_02477919 the whole document	10-11
X	DATABASE NCBI GenBank 14 February 2008 (2008-02-14), Phillips et al: "ABC transporter, periplasmic binding protein [Haemophilus parasuis 29755]" XP002534628 Database accession no. ZP_02478157 the whole document	10-11

-/--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2009/053281

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DATABASE NCBI GenBank 14 February 2008 (2008-02-14), Phillips et al: "pyridoxine kinase [Haemophilus parasuis 29755]" XP002534629 Database accession no. ZP_02478801 the whole document	10-11
X	DATABASE NCBI GenBank 14 February 2008 (2008-02-14), Phillips et al: "ABC-type phosphate/phosphonate transport system periplasmic component [Haemophilus parasuis 29755]" XP002534630 Database accession no. ZP_02477404 the whole document	10-11

PATENT COOPERATION TREATY

WO 2009/118273
PCT/EP2009/053281

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION CONCERNING AVAILABILITY OF THE PUBLICATION OF THE INTERNATIONAL APPLICATION

To:

KAMIBAYASHI, Lynne
Novartis Animal Health, Inc.
Patent and Trademark Group,
Werk Rosental
CH-4002 Basel
SUISSE

Date of mailing (*day/month/year*)
01 October 2009 (01.10.2009)

Applicant's or agent's file reference
52674-WO-PCT

IMPORTANT NOTICE

International application No.
PCT/EP2009/053281

International filing date (*day/month/year*)
20 March 2009 (20.03.2009)

Priority date (*day/month/year*)
28 March 2008 (28.03.2008)

Applicant
NOVARTIS AG et al

The applicant is hereby **notified** that the International Bureau:

☒ has **published** the above-indicated international application on 01 October 2009 (01.10.2009) under
No. WO 2009/118273

☐ has **republished** the above-indicated international application on under
No. WO
For an explanation as to the reason for this republication of the international application, reference is made to INID codes (15), (48)
or (88) (*as the case may be*) on the front page of the published international application.

A copy of the international application is available for viewing and downloading on WIPO's website at the following address:
www.wipo.int/pctdb (in the appropriate field of the structured search, enter the PCT or WO number).

The applicant may also obtain a paper copy of the published international application from the International Bureau by sending an e-mail to
patentscope@wipo.int or by submitting a written request to the contact details provided below.

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Authorized officer

Agnes Wittmann-Regis

Facsimile No. +41 22 338 82 70

e-mail: pt06.pct@wipo.int

109

PATENT COOPERATION TREATY

From the RECEIVING OFFICE

PCT

To:

Kamibayashi, Lynne
NOVARTIS ANIMAL HEALTH, INC.
Patent and Trademark Group
Werk Rosental
CH-4002 Basel
SUISSE

INVITATION TO CORRECT DEFECTS IN
THE INTERNATIONAL APPLICATION

(PCT Articles 3(4)(i) and 14(1) and Rule 26)

Date of mailing (day/month/year) 09-04-2009	
Applicant's or agent's file reference 52674-WO-PCT	REPLY DUE within two months from the above date of mailing
International application No. PCT/EP2009/053281	International filing date (day/month/year) 20 March 2009 (20-03-2009)
Applicant NOVARTIS AG	

1. ☒ The applicant is hereby **invited**, within the time limit indicated above, to correct, **in the international application as filed**, the defects specified on the attached

☐ Annex A

☐ Annex B1 (*text matter of the international application as filed*)

☒ Annex C1 (*drawings of the international application as filed*)

Additional observations (if necessary): _____

HOW TO CORRECT THE DEFECTS ?

Correction must be submitted by filing a replacement sheet embodying the correction and a letter accompanying the replacement sheet, which shall draw attention to the difference between the replaced sheet and the replacement sheet. A correction may be stated in a letter only if it is of such a nature that it can be transferred from the letter to the record copy without adversely affecting the clarity and direct reproducibility of the sheet onto which the correction is to be transferred (Rule 26.4).

ATTENTION
Failure to correct the defects will result in the international application being considered withdrawn by this receiving Office (see Rule 26.5 for further details).

A copy of this invitation and any attachments has been sent to the International Bureau

☐ and the International Searching Authority.

Name and mailing address of the Receiving Office  European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL-2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040 Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Song, Yvonne Tel: (+31-70)340-9267
---	---

110

This receiving Office has found that, with regard to the presentation of the **drawings of the international application as filed**, the physical requirements are not complied with to the extent that compliance therewith is necessary for:

- ☒ reasonably uniform international publication (Rules 11 and 26.3(a)(i)) (*defects to be specified*):

Sheets containing drawings:

- a. ☐ the sheets do not admit of direct reproduction.
- b. ☐ the sheets are not free from creases, cracks, folds.
- c. ☐ **one side of the sheets is not left unused.**
- d. ☐ the paper of the sheets is not flexible/strong/white/smooth/non-shiny/durable.
- e. ☐ the drawings do not commence on a new sheet.
- f. ☐ the sheets are not connected as prescribed (Rule 11.4(b)).
- g. ☐ **the sheets are not A4 size (29.7cm x 21cm).**
- h. ☐ the minimum margins on the sheets are not as prescribed (top: 2.5cm; left side: 2.5cm; right side: 1.5cm; bottom: 1cm).
- i. ☐ the file reference number indicated on the sheets does not appear in the left-hand corner of the sheets, within 1.5cm of the top of the sheets.
- j. ☐ the file reference number exceeds the maximum of 12 characters.
- k. ☐ the sheets are not free from frames around usable or used surfaces.
- l. ☐ the sheets are not numbered in consecutive Arabic numerals (e.g. 1/3, 2/3, 3/3).
- m. ☐ the sheet numbers are not centered at the top or bottom of the sheets.
- n. ☐ the sheet numbers are in the margin (see h. above for the size of the margins).
- o. ☐ **the sheets contain alterations/overwritings/interlineations/too many erasures.**
- p. ☐ the sheets contain photocopy marks.

Drawings (Rule 11.13):

- a. ☒ do not admit of direct reproduction.
- b. ☐ contain unnecessary text matter.
- c. ☐ contain words so placed as to prevent translation without interference with lines thereof.
- d. ☒ **are not executed in durable black color; the lines are not uniformly thick and well-defined.**
- e. ☒ contain cross-sections not properly hatched.
- f. ☒ would not be properly distinguishable in reduced reproduction.
- g. ☐ contain scales not represented graphically.
- h. ☒ contain numbers, letters and reference lines lacking simplicity and clarity.
- i. ☐ contain lines drafted without the aid of drafting instruments.
- j. ☐ contain disproportionate elements of a figure not necessary for clarity.
- k. ☐ contain numbers and letters of height less than 0.32 cm.
- l. ☐ contain letters not conforming to the Latin, and where customary, Greek alphabets.
- m. ☐ contain figures on two or more sheets which form a single complete figure but which are not able to be assembled without concealing parts thereof.
- n. ☐ contain figures which are not properly arranged and clearly separated.
- o. ☐ **contain different figures not numbered in consecutive Arabic numerals.**
- p. ☐ **contain different figures not numbered independently of the numbering of the sheets.**
- q. ☐ are not restricted to reference signs mentioned in the description.
- r. ☐ do not contain reference signs that are mentioned in the description.
- s. ☐ contain the same feature denoted by different reference signs.
- t. ☐ are not arranged in an upright position, clearly separated from one another.
- u. ☐ are not presented sideways with the top of the figures at the left side of the sheets.

Further observations (if necessary):

PCT

13-2-1	Validation messages Request	Green? The title of the invention should preferably be entered in capital letters. Please verify.
13-2-3	Validation messages Names	Green? Applicant 1: Name should preferably be entered in capital letters. Please verify.
	Validation messages Names	Green? Applicant 1: Street address missing
13-2-7	Validation messages Contents	Yellow At least one of the attached PDF files is not Annex F compliant ! The receiving Office or the International Bureau may therefore request a resubmission of the international application. eolf-othd-000001.pdf - Not embedded fonts: Symbol TrueType (all fonts must be embedded) ; eolf-poat-I000001.pdf - Not embedded fonts: Helvetica Type1, ZapfDingbats Type1 (all fonts must be embedded) ;
	Validation messages Contents	Yellow Images are not in black and white format only
	Validation messages Contents	Green? Figure of the drawings which should accompany the abstract not specified. Please verify.
	Validation messages Contents	Green? Please consider attaching the sequence listing in ST25/PatentIn format (instead of PDF) as this may be required by the ISA.
13-2-8	Validation messages Fees	Green? Please make sure that the fee schedule utilized is the latest available.
13-2-9	Validation messages Payment	Green? Please ensure that you have a valid deposit account with the receiving Office selected.

1 ALLGEMEINE VOLLMACHT
GENERAL AUTHORISATION
POUVOIR GENERAL

Kopie für den Bevollmächtigten
To be returned to authorised
Copie destinée au mandataire

AV Nr. (bitte bei jeder Korrespondenz angeben)
GA No. (please quote in all correspondence)
PG n° (préciser de mentionner dans toute correspondance)

3667A

2 Ich (Wir) / I (We) / Je (Nous)

Novartis AG
Lichtstrasse 35
CH - 4056 Basel
SCHWEIZ

3 bevollmächtige(n) hiermit / do hereby authorize / autorise (autorisons) par la présente

Petrus G.W. de Weerd
c/o Novartis AG
Geistiges Eigentum Konzern CH
CH-4002 Basel
Schweiz

4 mich (uns) in den durch das Europäische Patentübereinkommen geschaffenen Verfahren in allen meinen (unseren) Patentangelegenheiten zu vertreten, alle Handlungen für mich (uns) vorzunehmen und Zahlungen für mich (uns) in Empfang zu nehmen.
to represent me (us) in all proceedings established by the European Patent Convention and to act for me (us) in all patent transactions and to receive payments on my (our) behalf.
à me (nous) représenter pour ce qui concerne toutes mes (nos) affaires de brevet dans toute procédure instituée par la Convention sur le brevet européen et, à ce titre, à agir en mon (notre) nom et à recevoir des paiements pour mon (notre) compte.

☒ Die Vollmacht gilt auch für Verfahren nach dem Vertrag über die internationale Zusammenarbeit auf dem Gebiet des Patentrechts.
This authorisation shall also apply to the same extent to any proceedings established by the Patent Cooperation Treaty.
Ce pouvoir s'applique également à toute procédure instituée par le Traité de coopération en matière de brevets.

☒ Weitere Vertreter sind auf einem gesonderten Blatt angegeben. / Additional representatives indicated on supplementary sheet.
Les autres mandataires sont mentionnés sur une feuille supplémentaire.

5 ☒ Untervollmacht kann erteilt werden. / Sub-authorisation may be given. / Le pouvoir pourra être délégué.

6 ☒ Bitte die gelbe Kopie, ergänzt um die Nr. der allgemeinen Vollmacht, an den Vollmachtgeber zurücksenden.
Please return the yellow copy, supplemented by the General Authorisation No., to the authoriser.
Prière de renvoyer la copie jaune au mandant, munie du n° du pouvoir général.

Ort/Place/Lieu

Unterschrift(en) / Signature(s)

Datum / Date

Basel
November 24, 2006

7 Das Formblatt muß vom (von den) / Vollmachtgeber(n) (bei juristischen Personen vom Unterschriftsberechtigten) eigenhändig unterschrieben sein. Nach der Unterschrift bitte den (die) Namen des (der) / Vollmachtgebers mit Schreibmaschine wiedergeben (bei juristischen Personen die Stellung des Unterschriftsberechtigten innerhalb der Gesellschaft angeben).
The form must bear the personal signature(s) of the authoriser(s). (In the case of legal persons, that of the officer empowered to sign). After the signature, please type the name(s) of the signatory(ies) adding, in the case of legal persons, his (their) position within the company.
Le formulaire doit être signé de la propre main du (des) mandant(s) (dans le cas de personnes morales, de la personne ayant qualité pour signer). Veuillez ajouter à la machine, après la signature, le (les) nom(s) du (des) signataire(s) en mentionnant, dans le cas de personnes morales, ses (leurs) fonctions au sein de la société.

18. September 2007

<i>Name</i>	EPI No.
Florian Bielefeldt	144170
Patrick E. Crawley	50140
Jörg R. Dietz	60600
Anja Dietel	97420
Alan Graff	127710
Florent Gros	87080
Dirk Hillebrand	55300
Clive Sydney Morris	34110
Peter de Weerd	92220
Jürgen Dressel	94960
Isolde Lettenbichler	92020
Thomas J. Lehmeier	95550
Bernd Liphardt	77990
Johann Ott	89540
Richard A.M. Ross	35470
Peter R. Roth	95680
Isabelle Schubert Santana	79620
Peter Graham Stuart	94270
Georg von Sprecher	92880
Hans Schaller	84890
Ingrid Kelly	99780
Christine Bohmann	99790
Hubert Leger	128290
Susanna Iris Leon	125670
Waltraud Fauss-Berghus	134490
Craig McLean	136930
Peter Thomsen	142770
Regina Vögeli-Lange	128210
Denis Barbier	134560
Adrian Spillmann	142060
Jean-Marc Ligibel	145220
Denis Bourgarel	144510
Lynne Kamibayashi	9206120
Charles Jeffries	9203830
Robin Ellis	9204330
Alenka Kosak	129420
Marija Demsar	129440
Marko Opresnik	129430
Primož Skulj	133200
Damjan Hodzar	133210
Barbara Kunic	133220
Franziska Preissinger	9203480
Markus Gruber	9210240
Céline Rouquayrol	9210990
Johannes H.B. Masselink	9210380
Guy Nash	128040
James Dyer	9203800

PATENT COOPERATION TREATY

PCT/EP2009/053281

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCTNOTIFICATION OF RECEIPT OF
RECORD COPY

(PCT Rule 24.2(a))

To:

KAMIBAYASHI, Lynne
Novartis Animal Health, Inc.
Patent and Trademark Group,
Werk Rosental
CH-4002 Basel
SUISSE

Date of mailing (day/month/year)

14 April 2009 (14.04.2009)

IMPORTANT NOTIFICATION

Applicant's or agent's file reference

52674-WO-PCT

International application No.

PCT/EP2009/053281

The applicant is hereby **notified** that the International Bureau has received the record copy of the international application as detailed below.

Name(s) of the applicant(s) and State(s) for which they are applicants:

NOVARTIS AG (for all designated States except US)
PLOCHER, Thomas et al (for US)

International filing date:

20 March 2009 (20.03.2009)

Priority date(s) claimed:

28 March 2008 (28.03.2008)

Date of receipt of the record copy by the International Bureau:

08 April 2009 (08.04.2009)

List of designated Offices:

AP: BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW**EA:** AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM**EP:** AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR**OA:** BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG**National:** AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

ATTENTION: The applicant should carefully check the data appearing in this notification. In case of any discrepancy between these data and the indications in the international application, the applicant should immediately inform the International Bureau. **In addition, the applicant's attention is drawn to the information contained in the Annex**, relating to:

- time limits for entry into the national phase - **see updated important information (as of April 2002)**
- requirements regarding priority documents (if applicable)

A copy of this notification is being sent to the receiving Office and to the International Searching Authority.

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Authorized officer

Nyberg Henrik

e-mail pt06.pct@wipo.int

Telephone No. +41 22 338 74 06

Facsimile No. +41 22 338 89 70

Form PCT/IB/301 (October 2005)

I/DOWN4FBJ0

J15

INFORMATION ON ENTERING THE NATIONAL PHASE

The applicant is reminded that the **"national phase" must be entered** before each of the designated Offices indicated on the cover sheet of this notification by paying national fees and furnishing translations, as prescribed by Articles 22 and 39 and the applicable national laws. In addition, the applicant may also have to comply with **other special requirements** applicable in certain Offices. It is the **applicant's responsibility** to ensure that the necessary steps to enter the national phase are taken in a timely fashion. Most Offices do not issue reminders to applicants in connection with the entry into the national phase.

The **applicable time limit** for entering the national phase will, **subject to what is said in the following paragraph**, be **30 MONTHS** from the priority date, not only in respect of any elected Office if a demand for international preliminary examination is filed before the expiration of 19 months from the priority date (see Article 39(1)), but also in respect of any designated Office, in the absence of filing of such demand, where Article 22(1) as modified with effect from 1 April 2002 applies in respect of that designated Office. For further details, see *PCT Gazette* No. 44/2001 of 1 November 2001, pages 19926, 19932 and 19934, as well as the *PCT Newsletter*, October and November 2001 and February 2002 issues.

In practice, **time limits other than the 30-month time limit will continue to apply, for various periods of time**, in respect of certain designated or elected Offices. For **regular updates on the applicable time limits (20, 21, 30 or 31 months, or other time limit)**, Office by Office, refer to the *PCT Gazette* ("Section IV" part published on a weekly basis), to the *PCT Newsletter* (on a monthly basis) and to the relevant National Chapters in Volume II of the *PCT Applicant's Guide* (the paper version of which is updated usually twice a year and the Internet version of which is updated usually on a weekly basis). Finally, a cumulative table of all applicable time limits for entering the national phase is available from WIPO's Internet site, via links from various pages of the site, including those of the *Gazette*, *Newsletter* and *Guide*, at <http://www.wipo.int/pct/en/index.html>.

Information about the requirements for **filing a demand for international preliminary examination** is set out in the *PCT Applicant's Guide*, Volume I/A, Chapter IX. Note that only an applicant who is a national or resident of a PCT Contracting State which is bound by Chapter II has the right to file a demand for international preliminary examination (at present, all PCT Contracting States are bound by Chapter II).

REQUIREMENTS REGARDING PRIORITY DOCUMENTS

For applicants who have not yet complied with the requirements regarding priority documents, the following is recalled.

Where the priority of an earlier national, regional or international application is claimed, the applicant must submit a copy of the said earlier application, certified by the authority with which it was filed ("the priority document") to the receiving Office (which will transmit it to the International Bureau) or directly to the International Bureau, before the expiration of 16 months from the priority date, provided that any such priority document may still be submitted to the International Bureau before the date of international publication of the international application, in which case that document will be considered to have been received by the International Bureau on the last day of the 16-month time limit (Rule 17.1(a)).

Where the priority document is issued by the receiving Office, the applicant may, instead of submitting the priority document, request the receiving Office to prepare and transmit the priority document to the International Bureau. Such request must be made before the expiration of the 16-month time limit and may be subjected by the receiving Office to the payment of a fee (Rule 17.1(b)).

If the priority document concerned is not submitted to the International Bureau and if the request to the receiving Office to prepare and transmit the priority document has not been made (and the corresponding fee, if any, paid) within the applicable time limit indicated under the preceding paragraphs, any designated State may disregard the priority claim, provided that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances (Rule 17.1(c)).

Where several priorities are claimed, the priority date to be considered for the purposes of computing the 16-month time limit (and all other PCT time limits) is the filing date of the earliest application whose priority is claimed (Article 2(xi)(b)).

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION CONCERNING
SUBMISSION OR TRANSMITTAL
OF PRIORITY DOCUMENT

(PCT Administrative Instructions, Section 411)

To:

KAMIBAYASHI, Lynne
Novartis Animal Health, Inc.
Patent and Trademark Group,
Werk Rosental
CH-4002 Basel
SUISSE

Date of mailing (day/month/year) 15 April 2009 (15.04.2009)	
Applicant's or agent's file reference 52674-WO-PCT	IMPORTANT NOTIFICATION
International application No. PCT/EP2009/053281	International filing date (day/month/year) 20 March 2009 (20.03.2009)
International publication date (day/month/year) Not yet published	Priority date (day/month/year) 28 March 2008 (28.03.2008)
Applicant NOVARTIS AG et al	

1. By means of this Form, which replaces any previously issued notification concerning submission or transmittal of priority documents, the applicant is hereby notified of the date of receipt by the International Bureau of the priority document(s) relating to all earlier application(s) whose priority is claimed. Unless otherwise indicated by the letters "NR", in the right-hand column or by an asterisk appearing next to a date of receipt, the priority document concerned was submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b).
2. (If applicable) The letters "NR" appearing in the right-hand column denote a priority document which, on the date of mailing of this Form, had not yet been received by the International Bureau under Rule 17.1(a) or (b). Where, under Rule 17.1(a), the priority document must be submitted by the applicant to the receiving Office or the International Bureau, but the applicant fails to submit the priority document within the applicable time limit under that Rule, the attention of the applicant is directed to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.
3. (If applicable) An asterisk (*) appearing next to a date of receipt, in the right-hand column, denotes a priority document submitted or transmitted to the International Bureau but not in compliance with Rule 17.1(a) or (b) (the priority document was received after the time limit prescribed in Rule 17.1(a) or the request to prepare and transmit the priority document was submitted to the receiving Office after the applicable time limit under Rule 17.1(b)). Even though the priority document was not furnished in compliance with Rule 17.1(a) or (b), the International Bureau will nevertheless transmit a copy of the document to the designated Offices, for their consideration. In case such a copy is not accepted by the designated Office as the priority document, Rule 17.1(c) provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

<u>Priority date</u>	<u>Priority application No.</u>	<u>Country or regional Office or PCT receiving Office</u>	<u>Date of receipt of priority document</u>
28 March 2008 (28.03.2008)	61/040,260	US	08 April 2009 (08.04.2009)

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No. +41 22 338 82 70

Form PCT/IB/304 (October 2005)

Authorized officer

Agnes Wittmann-Regis

e-mail PT06.PCT@WIPO.INT

Telephone No. +41 22 338 74 06

1/D0XPR2950

J17

PATENT COOPERATION TREATY

PCT/EP2009/053281

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

INVITATION TO CORRECT
DECLARATIONS MADE IN THE REQUEST
UNDER PCT RULE 4.17

(PCT Rules 4.17 and 26ter.2(a))

To:

KAMIBAYASHI, Lynne
Novartis Animal Health, Inc.
Patent and Trademark Group,
Werk Rosental
CH-4002 Basel
SUISSE

Date of mailing (day/month/year) 27 April 2009 (27.04.2009)	
Applicant's or agent's file reference 52674-WO-PCT	REPLY DUE See below
International application No. PCT/EP2009/053281	International filing date (day/month/year) 20 March 2009 (20.03.2009)
Applicant NOVARTIS AG et al	

- The applicant is hereby invited to submit to the International Bureau a corrected declaration within the time limit indicated below and as explained in the Annex. The applicant's attention is drawn to the fact that the declaration has **not been examined** for compliance with national law requirements of the designated State(s) for which that declaration is made.
When? Within 16 months from the priority date, provided that any corrected declaration which is received by the International Bureau after the expiration of that time limit shall be considered to have been received on the last day of that time limit if it reaches it before the technical preparations for international publication have been completed (Rule 26ter.1).
How? By submitting a replacement sheet containing a corrected declaration accompanied by a letter explaining the correction (see Section 216). See Sections 211 to 215 for the applicable standardized wording.
Where? Directly to the International Bureau at the address indicated below.
If the corrected declaration is submitted to the receiving Office, that Office shall mark the date of receipt on it and transmit it promptly to the International Bureau. The declaration shall be considered to have been submitted to the International Bureau on the date marked (see Section 317).
- Failure to correct the declaration within the time limit** will result in the declaration, as **originally filed**, being published as part of the international application (Rule 48.2(a)(x)).
Any declaration received after the expiration of the time limit under Rule 26ter.1 will have to be submitted by the applicant directly to the designated Offices concerned; it is only in the case of a signed declaration of inventorship for the purposes of the designation of the United States of America (Rule 4.17(iv)) that the original declaration will be returned to the applicant (see Section 419(d)).
- In respect of national phase processing**, the applicant's attention is drawn to Rule 51bis.2 which provides that the designated Office shall not, unless it may reasonably doubt the veracity of the declaration concerned, require any document or evidence relating to the subject matter of any declaration complying with Rule 4.17(i) to (iv) which is contained in the request or submitted to the International Bureau or directly to the designated Office. Note, however, that Rule 51bis.2 may not apply in respect of certain States. For further information, see Notes to the request form, Box No. VIII.
- A copy of this Invitation is being sent to the receiving Office.

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer Chahine Leila e-mail pt06.pct@wipo.int Telephone No. +41 22 338 74 06
Facsimile No. +41 22 338 89 70	

The International Bureau has found the following defect(s) in the declaration(s) listed below:

1. ☐ declaration as to the identity of the inventor (Rules 4.17(i) and 51bis.1(a)(i) and Section 211), in respect of:
2. ☒ declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to apply for or be granted a patent (Rules 4.17(ii) and 51bis.1(a)(ii) and Section 212), in respect of:
 - a. (name(s) included in the declaration): NOVARTIS AG
 - ☒ is not in the prescribed wording
 - ☒ other (specify): The designations for which this declaration is made should not be indicated.
3. ☐ declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to claim priority of the earlier application (Rules 4.17(iii) and 51bis.1(a)(iii) and Section 213), in respect of:
4. ☐ declaration of inventorship (only for the purposes of the designation of the United States of America) (Rules 4.17(iv) and 51bis.1(a)(iv) and Section 214), in respect of:
5. ☐ declaration as to non-prejudicial disclosures or exceptions to lack of novelty (Rules 4.17(v) and 51bis.1(a)(v) and Section 215), in respect of:

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCTNOTIFICATION RELATING TO
DECLARATION MADE UNDER PCT RULE 4.17(PCT Rules 26ter and 48.2(a)(x)
and Administrative Instructions, Section 419)

To:

KAMIBAYASHI, Lynne
Novartis Animal Health, Inc.
Patent and Trademark Group,
Werk Rosental
CH-4002 Basel
SUISSE

Date of mailing (day/month/year) 06 July 2009 (06.07.2009)	
Applicant's or agent's file reference 52674-WO-PCT	IMPORTANT NOTIFICATION
International application No. PCT/EP2009/053281	International filing date (day/month/year) 20 March 2009 (20.03.2009)
Applicant NOVARTIS AG et al	

- The applicant is hereby **notified** of the following regarding the declaration indicated below in respect of **NOVARTIS AG** :
 - ☐ declaration as to the identity of the inventor (Rules 4.17(i) and 51bis.1(a)(i) and Section 211)
 - ☒ declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to apply for or be granted a patent (Rules 4.17(ii) and 51bis.1(a)(ii) and Section 212)
 - ☐ declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to claim priority of the earlier application (Rules 4.17(iii) and 51bis.1(a)(iii) and Section 213)
 - ☐ declaration of inventorship (for the purposes of the designation of the United States of America) (Rules 4.17(iv) and 51bis.1(a)(iv) and Section 214)
 - ☐ declaration as to non-prejudicial disclosures or exceptions to lack of novelty (Rules 4.17(v) and 51bis.1(a)(v) and Section 215)
- ☒ **Addition or correction of the declaration within the time limit under Rule 26ter.1.**

The added or corrected declaration was received on **16 July 2009 (16.07.2009)** , which was within the time limit under Rule 26ter.1.

Any declaration referred to under items 1(i) to (v), whether or not the declaration complies with Rule 4.17, will be published as part of the international application pursuant to Rule 48.2(a)(x).
- ☐ **Failure to add or correct the declaration within the time limit under Rule 26ter.1.**

The declaration was received on which was **after** the expiration of the time limit under Rule 26ter.1; therefore, that declaration, as added or corrected, referred to under items 1(i) to (v) will **not** be published as part of the international application, and any signed declaration referred to under item 1(iv) is attached. **Such declaration should be submitted by the applicant directly to the designated Office(s) concerned.**
- The applicant's attention is drawn to Rule 51bis.2 which provides that the designated Office shall not, unless it may reasonably doubt the veracity of the declaration concerned, require any document or evidence relating to the subject matter of any declaration complying with Rule 4.17(i) to (iv) which is contained in the request or submitted to the International Bureau or directly to the designated Office. Note, however, that Rule 51bis.2 may not apply in respect of certain States. For further information, see Notes to the request form, Box No. VIII.
- A copy of this notification is being sent to the receiving Office and the International Searching Authority.

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer Mondon Catherine e-mail pt06.pct@wipo.int Telephone No. +41 22 338 74 06
Facsimile No. +41 22 338 89 70	

CORRECTED VERSION

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION RELATING TO
DECLARATION MADE UNDER PCT RULE 4.17(PCT Rules 26ter and 48.2(a)(x)
and Administrative Instructions, Section 419)

To:

KAMIBAYASHI, Lynne
Novartis Animal Health, Inc.
Patent and Trademark Group,
Werk Rosental
CH-4002 Basel
SUISSE

Date of mailing (day/month/year) 06 July 2009 (06.07.2009)	
Applicant's or agent's file reference 52674-WO-PCT	IMPORTANT NOTIFICATION
International application No. PCT/EP2009/053281	International filing date (day/month/year) 20 March 2009 (20.03.2009)
Applicant NOVARTIS AG et al	

- The applicant is hereby **notified** of the following regarding the declaration indicated below in respect of **NOVARTIS AG** :
 - ☐ declaration as to the identity of the inventor (Rules 4.17(i) and 51bis.1(a)(i) and Section 211)
 - ☒ declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to apply for or be granted a patent (Rules 4.17(ii) and 51bis.1(a)(ii) and Section 212)
 - ☐ declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to claim priority of the earlier application (Rules 4.17(iii) and 51bis.1(a)(iii) and Section 213)
 - ☐ declaration of inventorship (for the purposes of the designation of the United States of America) (Rules 4.17(iv) and 51bis.1(a)(iv) and Section 214)
 - ☐ declaration as to non-prejudicial disclosures or exceptions to lack of novelty (Rules 4.17(v) and 51bis.1(a)(v) and Section 215)
- ☒ **Addition or correction of the declaration within the time limit under Rule 26ter.1.**

The added or corrected declaration was received on **16 June 2009 (16.06.2009)** , which was within the time limit under Rule 26ter.1.

Any declaration referred to under items 1(i) to (v), whether or not the declaration complies with Rule 4.17, will be published as part of the international application pursuant to Rule 48.2(a)(x).
- ☐ **Failure to add or correct the declaration within the time limit under Rule 26ter.1.**

The declaration was received on which was **after** the expiration of the time limit under Rule 26ter.1; therefore, that declaration, as added or corrected, referred to under items 1(i) to (v) will **not** be published as part of the international application, and any signed declaration referred to under item 1(iv) is attached. **Such declaration should be submitted by the applicant directly to the designated Office(s) concerned.**
- The applicant's attention is drawn to Rule 51bis.2 which provides that the designated Office shall not, unless it may reasonably doubt the veracity of the declaration concerned, require any document or evidence relating to the subject matter of any declaration complying with Rule 4.17(i) to (iv) which is contained in the request or submitted to the International Bureau or directly to the designated Office. Note, however, that Rule 51bis.2 may not apply in respect of certain States. For further information, see Notes to the request form, Box No. VIII.
- A copy of this notification is being sent to the receiving Office and the International Searching Authority.

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer Mondon Catherine e-mail pt06.pct@wipo.int Telephone No. +41 22 338 74 06
Facsimile No. +41 22 338 89 70	

PATENT COOPERATION TREATY

WO 2009/118273
PCT/EP2009/053281

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

SECOND AND SUPPLEMENTARY NOTICE
INFORMING THE APPLICANT OF THE
COMMUNICATION OF THE INTERNATIONAL
APPLICATION (TO DESIGNATED OFFICES
WHICH APPLY THE 30 MONTH TIME
LIMIT UNDER ARTICLE 22(1))

(PCT Rule 47.1(c))

To:

KAMIBAYASHI, Lynne
Novartis Animal Health, Inc.
Patent and Trademark Group,
Werk Rosental
CH-4002 Basel
SUISSE

Date of mailing (day/month/year) 29 July 2010 (29.07.2010)		
Applicant's or agent's file reference 52674-WO-PCT		IMPORTANT NOTICE
International application No. PCT/EP2009/053281	International filing date (day/month/year) 20 March 2009 (20.03.2009)	Priority date (day/month/year) 28 March 2008 (28.03.2008)
Applicant NOVARTIS AG et al		

- ATTENTION:** For any designated Office(s), for which the time limit under Article 22(1), as in force from 1 April 2002 (30 months from the priority date), **does not apply**, please see Form PCT/IB/308(First Notice) issued previously.
- Notice is hereby given that the following designated Office(s), for which the time limit under Article 22(1), as in force from 1 April 2002, **does apply**, has/have requested that the communication of the international application, as provided for in Article 20, be effected under Rule 93bis.1. The International Bureau has effected that communication on the date indicated below:
01 October 2009 (01.10.2009)

AU, AZ, BY, CN, CO, DZ, EP, HU, KG, KP, KR, MD, MK, MY, MZ, NA, NG, PG, RU, SY, TM, US

In accordance with Rule 47.1(c-bis)(i), those Offices will accept the present notice as conclusive evidence that the communication of the international application has duly taken place on the date of mailing indicated above and no copy of the international application is required to be furnished by the applicant to the designated Office(s).

- The following designated Offices, for which the time limit under Article 22(1), as in force from 1 April 2002, **does apply**, have not requested, as at the time of mailing of the present notice, that the communication of the international application be effected under Rule 93bis.1 :

AE, AG, AL, AM, AO, AP, AT, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BZ, CA, CH, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, EA, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KM, KN, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LY, MA, ME, MG, MN, MW, MX, NI, NO, NZ, OA, OM, PH, PL, PT, RO, RS, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, TJ, TN, TR, TT, UA, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

In accordance with Rule 47.1(c-bis)(ii), those Offices accept the present notice as conclusive evidence that the Contracting State for which that Office acts as a designated Office does not require the furnishing, under Article 22, by the applicant of a copy of the international application.

4. TIME LIMITS for entry into the national phase

For the designated or elected Office(s) listed above, the applicable time limit for entering the national phase will, **subject to what is said in the following paragraph**, be **30 MONTHS** from the priority date.

In practice, **time limits other than the 30-month time limit** will continue to apply, for various periods of time, in respect of certain of the designated or elected Office(s) listed above. For **regular updates on the applicable time limits** (30 or 31 months, or other time limit), Office by Office, refer to the *PCT Gazette*, the *PCT Newsletter* and the *PCT Applicant's Guide*, Volume II, National Chapters, all available from WIPO's Internet site, at <http://www.wipo.int/pct/en/index.html>.

It is the applicant's **sole responsibility** to monitor all these time limits.

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer Agnes Wittmann-Regis
Facsimile No. +41 22 338 82 70	e-mail: pt06.pct@wipo.int

PATENT COOPERATION TREATY

WO 2009/118273
PCT/EP2009/053281

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

FIRST NOTICE INFORMING THE APPLICANT OF
THE COMMUNICATION OF THE INTERNATIONAL
APPLICATION (TO DESIGNATED OFFICES WHICH
DO NOT APPLY THE 30 MONTH TIME LIMIT
UNDER ARTICLE 22(1))

(PCT Rule 47.1(c))

To:

KAMIBAYASHI, Lynne
Novartis Animal Health, Inc.
Patent and Trademark Group,
Werk Rosental
CH-4002 Basel
SUISSE

Date of mailing (day/month/year)
29 October 2009 (29.10.2009)

Applicant's or agent's file reference
52674-WO-PCT

IMPORTANT NOTICE

International application No.
PCT/EP2009/053281

International filing date (day/month/year)
20 March 2009 (20.03.2009)

Priority date (day/month/year)
28 March 2008 (28.03.2008)

Applicant

NOVARTIS AG et al

- ATTENTION:** For any designated Office(s), for which the time limit under Article 22(1), as in force from 1 April 2002 (30 months from the priority date), **does apply**, please see Form PCT/IB/308(Second and Supplementary Notice) (to be issued promptly after the expiration of 28 months from the priority date).
- Notice is hereby given that the following designated Office(s), for which the time limit under Article 22(1), as in force from 1 April 2002, **does not apply**, has/have requested that the communication of the international application, as provided for in Article 20, be effected under Rule 93bis.1. The International Bureau has effected that communication on the date indicated below:
01 October 2009 (01.10.2009)

None

In accordance with Rule 47.1(c-bis)(i), those Offices will accept the present notice as conclusive evidence that the communication of the international application has duly taken place on the date of mailing indicated above and no copy of the international application is required to be furnished by the applicant to the designated Office(s).

- The following designated Offices, for which the time limit under Article 22(1), as in force from 1 April 2002, **does not apply**, have not requested, as at the time of mailing of the present notice, that the communication of the international application be effected under Rule 93bis.1:

LU, TZ, UG

In accordance with Rule 47.1(c-bis)(ii), those Offices accept the present notice as conclusive evidence that the Contracting State for which that Office acts as a designated Office does not require the furnishing, under Article 22, by the applicant of a copy of the international application.

4. TIME LIMITS for entry into the national phase

For the designated Office(s) listed above, and unless a demand for international preliminary examination has been filed before the expiration of **19 months** from the priority date (see Article 39(1)), the applicable time limit for entering the national phase will, **subject to what is said in the following paragraph**, be **20 MONTHS** from the priority date.

In practice, **time limits other than the 20-month time limit** will continue to apply, for various periods of time, in respect of certain of the designated Offices listed above. For **regular updates on the applicable time limits** (20 or 21 months, or other time limit), Office by Office, refer to the *PCT Gazette*, the *PCT Newsletter* and the *PCT Applicant's Guide*, Volume II, National Chapters, all available from WIPO's Internet site, at <http://www.wipo.int/pct/en/index.html>.

It is the applicant's **sole responsibility** to monitor all these time limits.

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Authorized officer

Agnes Wittmann-Regis

Facsimile No. +41 22 338 82 70

e-mail: pt06.pct@wipo.int



No. 10-119116-00000-0000

Fecha: 2010-09-27 15:39:09

Dep. 2020 DIR.NUEVASCR

Tra. 11 PATENTEIYII

Eve: 379 FASENACIONALII

Act. 411 PRESENTACION

Folios: 123

PATENTE DE INVENCION ☐

MODELO DE UTILIDAD ☐

Art. 33 Decisión 486/00

☐

Indicación que se solicita una patente.

☐

Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud

☐

Descripción de la invención

☐

Dibujos de ser estos pertinentes

☐

Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)

Completa ☐

Incompleta ☐

PATENTE DE INVENCION PCT ☒

MODELO DE UTILIDAD PCT ☐

Art.33 Decisión 486/00, Circular Única

☒

Indicación que se solicita una PCT.

☒

Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)

☒

Dibujos de ser estos pertinentes

☒

Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)

Completa ☒

Incompleta ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

(Art. 119 Decisión 486/00)

☐

Indicación que se solicita Diseño industrial

☐

Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud

☐

Representación gráfica y fotográfica del Diseño industrial o muestra del material que incorpora el diseño

☐

Comprobante de pago de las tasas establecidas

Completa ☐

Incompleta ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐

(Art. 92 Decisión 486/00)

☐

Indicación que se solicita un esquema de trazado

☐

Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud

☐

Representación gráfica de un esquema de trazado

☐

Comprobante de pago de las tasas establecidas

Completa ☐

Incompleta ☐