



Industria y Comercio

S U P E R I N T E N D E N C I A

Delegatura de propiedad Industrial

División de Nuevas Creaciones

PCT
SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

21. EXPEDIENTE No.

06-50044

54. TÍTULO

VACUNA PARA ERYSIPELOTHRIX RHUSIOPATHIAE-HAEMOPHILUS

PARASUIS Y METODOS DE USO DE LAS MISMAS

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL

A61K39/085, 39/102, 39/02, 28/00, 39/12, 39/00, A01N63/00, C12N1/00, C07K1/00, A61P37/04

71. SOLICITANTE

BOEHRINGER INGELHEIM VETMEDICA, INC.

DOMICILIO

MISSOURI 64506, ESTADOS UNIDOS DE AMERICA

74. APODERADO

EMILIO FERRERO

C.C. 438.019 de Usaquén

22. BOGOTÁ, D. C.,

Poder, Creación, Anexos
FNI 30-05-2006

**Industria y Comercio**

SUPERINTENDENCIA

PETITORIO

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Rad: 06-050044-00000-0000

Fec: 2006-05-24 17:06:51 Dep. 2020 NUECREACIONE

Tra. 11 PATENTERYII
Em: 376 FASERACIONALI**FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE****PCT****ENTRADA EN FASE NACIONAL** 30-05-06**SOLICITUD DE:**

1

☒ Patente de Invención.☐ Patente de Modelo de Utilidad.☐ Capítulo I.☒ Capítulo II.

2

SOLICITANTE
(71)Nombre: BOEHRINGER INGELHEIM
VETMEDICA, INC.
sociedad constituida y existente bajo las
leyes de Estados Unidos de América.Dirección: 2621 North Belt Highway
St. Joseph
Missouri 64506
Estados Unidos de AméricaDomicilio: Missouri 64506
Estados Unidos de América**IDENTIFICACIÓN**C.C. ☐NIT ☐C.E. ☐Otro ☐

Cual

Número

3

REPRESENTANTE
O APODERADONombre: EMILIO FERRERO
Dirección: Carrera 4ª. No. 72-35
Teléfono: 347 36 11
Fax: 211 86 50
E-mail: clientes@camvp.com
Domicilio: Bogotá, Colombia.**IDENTIFICACIÓN**C.C. ☒NIT ☐C.E. ☐Otro ☐

Cual

Número 438.019 T.P 31.929

4

INVENTOR (ES)
(72)1. John Randall SWART
209 Iowa Avenue, N.W.,
Orange City,
Iowa
Estados Unidos de América3. Karen E. FREKING
112 Country Road North,
Hospers
Iowa 51238
Estados Unidos de América5. Phillip Wayne HAYES
2775 430 Stresse,
Maurice
Iowa 51036
Estados Unidos de América2. Eric Martin VAUGHN
509 Ash Avenue,
Ames
Iowa 50014
Estados Unidos de América4. Michael B. ROOF
3222 Rupelo Circle,
Ames
Iowa 50014
Estados Unidos de América6. Reid C. PHILLIPS
7829 Twilight Place
Parkville
Missouri 64152
Estados Unidos de América

5

PCT (86)Solicitud Internacional No. PCT/US2004/036336Fecha: 29 de octubre de 2004Publicación Internacional No. WO 2005/041890 A3Fecha: 12 de mayo de 2005

6

Título (54)**VACUNA PARA ERYSIPELOTHRIX RHUSIOPATHIAE-HAEMOPHILUS PARASUIS Y**
METODOS DE USO DE LAS MISMAS

7

Clasificación Internacional (51) A61K 39/085, 39/02, 39/01, 37/00, 39/12, 39/03,
A01N 63/00, C12N 1/00, C07K 1/00, A61P 37/04.

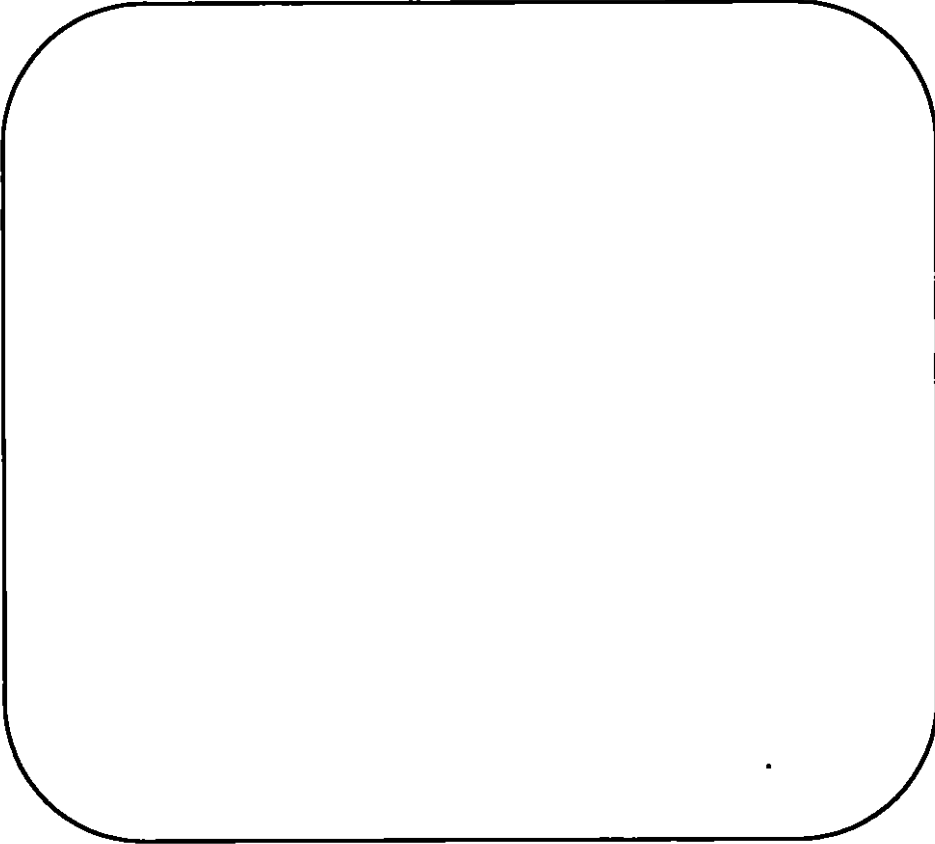
8	Pri ridad	(33) País de Origen	(32) Fecha	(31) Número de Solicitud
	SI ☒ NO ☐	<u>US</u> <u>US</u>	<u>60/515.860</u> <u>10/975.702</u>	<u>30 de octubre de 2003</u> <u>28 de octubre de 2004</u>

9	Comprobante de pago No.: <u>06-36,149</u>	Fecha: <u>15 de mayo de 2006</u>
----------	--	---

10	Anexos:
☒	Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud por \$ 463.000.oo.
☐	Comprobante de pago por reivindicación de prioridad.
☐	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 efectuado por la IPEA.
☐	Traducción del examen preliminar efectuado por la IPEA.
☐	De ser el caso, copia del contrato de acceso.
☐	De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
☐	De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.
☐	Arte final 12x12
☐	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.
☒	Otros: VER HOJA DE DOCUMENTOS ANEXOS

11

FIGURA CARACTERISTICA:



12

NOMBRE: EMILIO FERRERO

FIRMA : 
C.C. 438.019 de Usaquén T.P. 31.929

JDF

DOCUMENTOS ANEXOS

1. ☒ Publicación Internacional WO 2004/087706 A1
2. ☒ Forma PCT/ISA/210. Informe de Búsqueda Internacional.
3. ☒ Forma PCT/IPEA/401 Demand
4. ☒ Modificación Artículo 34
5. ☒ Extracto de publicación.

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

(19) World Intellectual Property
Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
12 May 2005 (12.05.2005)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2005/041890 A3

(51) International Patent Classification: A61K 39/085,
39/102, 39/02, 38/00, 39/12, 39/00, A01N 63/00, C12N
1/00, C07K 1/00

(74) Agent: TRUITT, Tracey E.; HOVEY WILLIAMS LLP,
2405 Grand Boulevard, Suite 400, Kansas City, MO 64108
(US).

(21) International Application Number:
PCT/US2004/036336

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of national protection available): AE, AG, AL, AM,
AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN,
CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI,
GB, GD, GH, GI, GM, GR, GU, HT, IL, IN, IS, JP, KE,
KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD,
MG, MK, MN, MW, MX, MY, NA, NI, NO, NZ, OM, PG,
PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM,
TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM,
ZW.

(22) International Filing Date: 29 October 2004 (29.10.2004)

(23) Filing Language: English

(24) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/515,860 30 October 2003 (30.10.2003) US
10/975,702 28 October 2004 (28.10.2004) US

(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, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI,
SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ,
GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

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

(72) Inventors; and
(75) Inventors/Applicants (for US only): SWART, John,
Randall [US/US]; 209 Iowa Ave. N.W., Omega City,
IA (US). VAUGHN, Eric, Martin [US/US]; 309 Ash
Avenue, Ames, IA 50014 (US). FRECKING, KAREN,
E. [US/US]; 112 County Road North, Hospert, IA 51238
(US). ROOF, Michael, B. [US/US]; 3223 Rapado Circle,
Ames, IA 50014 (US). HAYES, Phillip, Wayne [US/US];
2775 430 St., Maurice, IA 51036 (US). PHILLIPS, Reid,
C. [US/US]; 7839 Twilight Place, Parkville, MO 64152
(US).

Published
— with international search report

(85) Date of publication of the international search report:
10 November 2005

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

WO 2005/041890 A3

(54) Title: ERYSIPELOTHRIX RHUSIOPATHIAE-HAEMOPHILUS PARASUIS VACCINE AND METHODS OF USING THE
SAME

(57) Abstract: The present invention provides a composition and an improved single dose vaccine against *E. rhusiopathiae* and an improved single dose vaccine against *E. rhusiopathiae* and *H. parasuis* which provides one or more of the following: 1) confers effective immunity against *E. rhusiopathiae* and/or *H. parasuis*; 2) decreases the risk of developing clinical signs of *E. rhusiopathiae* and/or *H. parasuis* infection; 3) induces an immune response against *E. rhusiopathiae* and/or *H. parasuis*; and 4) has a DOI against *E. rhusiopathiae* and/or *H. parasuis* of at least four months. The composition or *E. rhusiopathiae* vaccine as well as the combined *E. rhusiopathiae*-*H. parasuis* composition or vaccine each includes a bacterial component of inactivated *E. rhusiopathiae* bacteria and a suitable adjuvant. The combined *E. rhusiopathiae*-*H. parasuis* composition or vaccine further includes an amount of *H. parasuis* antigen. The vaccines can be administered to animals in any conventional manner. The amount of the dose for intramuscular administration is preferably less than 5 ml. The amount of *E. rhusiopathiae* and/or *H. parasuis* antigen in each dose should be enough to induce an immune response in the animal receiving the vaccine or composition and will preferably confer effective immunity against and decrease the risk of developing clinical signs resulting from *E. rhusiopathiae* and/or *H. parasuis* infection for a suitable duration of immunity.

ERYSIPELOTHRIX RHUSIOPATHIAE-HAEMOPHILUS
PARASUIS VACCINE AND METHODS OF USING THE SAME

BACKGROUND OF THE INVENTION

Field of the Invention

The present invention is concerned with a vaccine for *Erysipelothrix Rhusiopathiae* (*E. rhusiopathiae*) and a vaccine for *Haemophilus Parasuis* (*H. parasuis*). More particularly, the present invention is concerned with a vaccine for conferring effective immunity against *E. rhusiopathiae* and *H. parasuis* and methods of making the same. Still more particularly, the present invention is concerned with a vaccine which can be administered in a single dose and provide a duration of immunity (DOI) of a desired length. Even more particularly, the present invention is concerned with a single dose vaccine which provides a DOI equivalent to the average life span of an animal receiving the vaccine.

Description of the Prior Art

E. rhusiopathiae is a gram-positive bacteria that is pathogenic to over 50 species of vertebrate and invertebrate animals including swine, sheep, lambs, cattle, ducks, turkeys, and humans. *H. parasuis* is a gram-negative bacteria that is pathogenic to many animals, most notably swine. Vaccines against *E. rhusiopathiae* and *H. parasuis* are typically separate and consist of multiple doses given over the life span of an animal in order to confer effective immunity against *E. rhusiopathiae* and *H. parasuis*. There currently exists a vaccine against *H. parasuis* which can be administered in a single dose but a separate vaccination against *E. rhusiopathiae* must still be given. As is well known in the art, problems with vaccines that require more than one dose include the time and expense needed to track which animals have received first and/or second or subsequent doses, to track when the first dose was given, to do the actual vaccination, the increased size of the animals between first and subsequent doses, the increased risk of injury to the animal and to the person giving the subsequent doses of vaccine, and the expense associated with providing multiple doses.

What is needed in the art is a 1-dose regimen which confers effective immunity to an animal receiving the vaccination wherein the vaccine provides an extended DOI longer than is presently available through vaccines. What is further needed is a vaccine against *E. rhusiopathiae* that is administered in a single dose and provides a DOI of about six months. What is still further needed is a vaccine against *E. rhusiopathiae* and *H. parasuis* that provides a DOI of about six months after just a single dose of the vaccine.

SUMMARY OF THE INVENTION

The present invention overcomes the deficiencies of the prior art and provides a distinct advance in the state of the art. In particular, the present invention provides a vaccine which can be administered in a single dose and which provides one or more of the following: 1) confers effective immunity against *E. rhusiopathiae*; 2) decreases the risk of developing clinical signs of *E. rhusiopathiae* infection; 3) induces an immune response against *E. rhusiopathiae*; and 4) has a DOI of at least four months, more preferably at least about five months, and most preferably at least about six months. The present invention also provides a combination vaccine that provides one or more of the following: 1) confers effective immunity against *E. rhusiopathiae* and/or *H. parasuis*; 2) decreases the risk of developing clinical signs of *E. rhusiopathiae* and/or *H. parasuis* through a single dose of vaccine; 3) induces an immune response against *E. rhusiopathiae* and/or *H. parasuis*; and 4) provides a DOI against *E. rhusiopathiae* and/or *H. parasuis* of at least about four months, more preferably at least about 132 days, more preferably at least about 5 months, and most preferably at least about six months or at least about 162 days. Preferably, the combination vaccine can also be given as a single dose.

The *E. rhusiopathiae* vaccine includes a bacterial component of inactivated *E. rhusiopathiae* bacteria and a suitable adjuvant. The adjuvant can be selected based on the method of administration and may include mineral oil-based adjuvants such as Freund's complete and incomplete adjuvant, Montanide incomplete Seppic adjuvant such as ISA, oil in water emulsion adjuvants such as the Ribi adjuvant system, syntax adjuvant formulation containing muramyl dipeptide, or aluminum salt adjuvants. Preferably, the adjuvant is a mineral oil-based adjuvant, most preferably ISA206 (SEPPIC, Paris, France). The composition may also include any one or combination of pharmaceutically acceptable carriers or excipients including, but not limited to,

buffers, stabilizers, diluents, preservatives, and solubilizers. The vaccine is administered to animals susceptible to infection by *E. Rhusiopathiae*, preferably mammals, and still more preferably pigs, in any conventional manner, including oral, intranasal, intramuscular, intra-lymph node, intradermal, intraperitoneal, subcutaneous, and combinations thereof, but most preferably through intramuscular (IM) injection. The amount of the dose for intramuscular administration is preferably up to about 5 ml, still more preferably between 1 ml and 3 ml, and most preferably about 2 ml.

The combined *E. rhusiopathiae*-*H. parasuis* vaccine includes inactivated bacterial components of both *E. rhusiopathiae* and *H. parasuis*, together with a suitable adjuvant. Preferably, the adjuvant is mineral-oil based, most preferably ISA206. The vaccine is administered to animals susceptible to infection by *E. rhusiopathiae* and/or *H. parasuis*, preferably mammals, and still more preferably pigs, in any conventional manner, including oral, intranasal, intramuscular, intra-lymph node, intradermal, intraperitoneal, subcutaneous, and combinations thereof, most preferably through intramuscular (IM) injection. The amount of the dose when IM injection is the selected administration route is preferably up to about 5 ml, still more preferably between 1 ml and 3 ml, and most preferably about 2 ml. The amount of *E. rhusiopathiae* antigen in each dose should be enough to confer effective immunity against and decrease the risk of developing clinical signs resulting from *E. rhusiopathiae* infection to an animal receiving a vaccination therewith. Preferably the amount of *E. rhusiopathiae* antigen should be up to about 5 ml, more preferably between about 0.2 to 3 ml, still more preferably between about 0.3 to 1.5 ml, more preferably between about 0.4 to 0.8 ml, and still more preferably about 0.6 ml. The amount of *H. parasuis* antigen in each dose should be up to about 5 ml, more preferably between about 0.1 to 3 ml, still more preferably between about 0.15 to 1.5 ml, more preferably between about 0.2 to 0.6 ml, and still more preferably about 0.4 ml. In a different form of measurement, the amount of *H. parasuis* antigen in each dose should contain at least 1.5×10^7 cfu/dose, more preferably between about 1.5×10^8 to 1.5×10^{10} cfu/dose and still more preferably about 1.5×10^9 cfu/dose. In a particularly preferred 2 ml dose, approximately 0.6 ml is *E. rhusiopathiae* antigen, approximately 1.0 ml is the adjuvant and approximately 0.4 ml is the *H. parasuis* antigen. Preferably, the bacteria are inactivated by conventional inactivation techniques and especially conventional formalin inactivation techniques.

Vaccines and compositions of the present invention are generally useful for inducing immune responses in animals as immune response-stimulating therapeutics or prophylactic vaccines.

Preferably, administration of the compositions or vaccines of the present invention results in an immune response that protects the vaccinated animal in various ways including a lessening in the severity or delay in the onset of clinical signs of *E. rhusiopathiae* and/or *H. parasuis* infection. Still more preferably, administration of the compositions or vaccines results in a reduced risk of developing clinical signs of *E. rhusiopathiae* and/or *H. parasuis* infection, even after exposure or challenge by virulent forms of *E. rhusiopathiae* and/or *H. parasuis*. In particularly preferred forms, administration of the composition or vaccine results in a complete prevention of these clinical signs.

Various conventional methods can be used to determine if an immune response was induced in an animal. For example, the animal receiving the composition or vaccine can be challenged with a virulent form of *E. rhusiopathiae* and/or *H. parasuis* and observed for the development of clinical signs of infection for a period of time after challenge. An alternative method of determining if an immune response was induced by administration of the composition or vaccine would be to assay a biological sample from the animal for antibodies to one or more antigens of *E. rhusiopathiae* and/or *H. parasuis*. Such methods are common in the field and appropriate antibody assays could be determined by those of skill in the art.

DETAILED DESCRIPTION OF THE PREFERRED EMBODIMENT

The following examples set forth preferred embodiments of the present invention. It is to be understood that these examples are provided by way of illustration and nothing therein should be taken as a limitation upon the overall scope of the invention.

EXAMPLE 1

This example provides data as to the efficacy and duration of immunity against virulent *E. rhusiopathiae* following a preferred single dose *H. parasuis*-*E. rhusiopathiae* vaccine.

Materials and Methods

A total of 37 pigs aged 3 to 4 weeks, none of which had been previously vaccinated with *Erysipelothrix* bacterins or vaccines, were used for the study leading to this example. Throughout the study, the animals were provided food sufficient for their size, age and other physical characteristics. Water was supplied *ad libitum*. The animals were housed in confinement swine facilities with full or partially slatted floors, mechanical ventilation, and supplemental heat and light appropriate for the age of the animals.

Two days prior to the study, all of the pigs were given a health exam and vaccinated for Pseudorabies Virus. On day 1 of the study, the pigs were divided into two groups. Group 1 was composed of 23 pigs that received one 2mL intramuscular dose of *H. parasuis*-*E. rhusiopathiae* Bacterin with adjuvant ISA 206 ("HPE") (Boehringer Ingelheim Vetmedica, Inc., St. Joseph, MO) in the left neck on day 1. The *E. rhusiopathiae* antigen was included in each dose at the rate of 0.6mL volume of harvest antigen. Group 2, the control group, was composed of 14 pigs that received no treatment at all. On days 21, 54 and 161 of the study, all of the animals were bled to monitor seroconversion to vaccination.

On day 162 of the example, all of the pigs (except for 3 who had died from incidental causes prior to day 162) were challenged with a virulent strain of *E. rhusiopathiae* EL-6P. All of the pigs were then observed for seven days for general health and the clinical signs of *E. rhusiopathiae*. On day 7 following the challenge, all of the animals were euthanized and those showing persistent clinical signs and/or elevated body temperature for 2 consecutive days typical of *E. rhusiopathiae* as set forth in 9 CFR 113.67 were necropsied. A necropsy was also performed on all of the animals that died during the trial. Gross lesions were assessed and recorded, and tissues were collected and sent to a laboratory for bacterial culture.

A summary of the above protocol can be found in Table 1.

Table 1

Day	Event
1	Pigs randomized and assigned to groups. Group 1 pigs received HPE and Group 2 received the non-vaccinated control treatment.
21	All pigs bled.
54	All pigs bled.
160-169	Daily observation and body temperature 2 days before challenge and 7 days post challenge.
161	All pigs bled.
162	Pigs challenged with <i>E. rhusiopathiae</i> EL-6P serial #3.
169	End of trial.

Results and Discussion:

All 13 of the pigs from Group 2 were affected and showed elevated body temperature greater than 106.5°F, clinical signs of infection by *E. rhusiopathiae*, or death after challenge with virulent *E. rhusiopathiae*. *E. rhusiopathiae* was recovered from 9 of the 13 pigs from Group 2, and 6 of the 13 pigs from Group 2 died following the challenge. In contrast, 20 of the 21 pigs from Group 1 remained healthy and were protected from the virulent challenge of *E. rhusiopathiae* 162 days post vaccination. None of the pigs from Group 1 died following the challenge. There was no *E. rhusiopathiae* recovered from the single Group 1 pig that did not remain healthy following challenge. Table 2 contains morbidity results and analysis while Table 3 contains mortality results.

Table 2 - Morbidity

	# Pigs Affected by <i>E. Rhusiopathiae</i>	# Pigs Protected from <i>E. Rhusiopathiae</i>	Total # Pigs
Group 1	1	20	21
Group 2	13	0	13

	Chi-Square	P-Value
Uncorrected:	23.28	.0000014
Mantel-Haenszel:	22.42	.0000022
Yates corrected:	19.71	.000009

Table 3 - Mortality

	# Pigs Died After Challenge	# Pigs Survived After Challenge	Total # Pigs
Group 1	0	21	21
Group 2	6	7	13

	Chi-Square	P-Value
Uncorrected:	11.77	.0006
Mantel-Haenszel:	11.42	.0007
Yates corrected:	8.81	.0029

Vaccinates challenged with virulent *E. rhusiopathiae* 162 days after vaccination were well protected when compared to controls. 100% of the non-vaccinated controls developed the disease and 46% died following the challenge. By contrast, a single dose of the HPE protected 95% of the challenged pigs and none of the pigs that received the vaccine died following challenge. The results of this study confirm the duration of immunity of at least 162 days for the HPE in a single dose regimen for prevention and control of erysipelas in nursery pigs aged 3 weeks of age or older.

EXAMPLE 2

This example demonstrates the duration of immunity of a preferred single dose vaccine against virulent *H. parasuis* challenge after vaccination.

Materials and Methods:

The study for this example began with 36 pigs aged 3 to 4 weeks, none of which had been previously vaccinated using *H. parasuis* bacterin or vaccine. Throughout the example, the animals were provided food sufficient for their size, age and other physical characteristics. Water was supplied *ad libitum*.

On day 1 of the example, the pigs were divided into two groups. Group 1 was composed of 23 pigs that received one 2mL intramuscular dose of *H. parasuis* Bacterin with adjuvant ISA 206 ("HPB") (Boehringer Ingelheim Vetmidica, Inc., St. Joseph, MO) on day 1. The *H. parasuis* antigen was included in each dose at the rate of 1.5×10^9 cfu/dose. Group 2, the control group, was composed of 13 pigs who received no treatment at all.

On day 132 of the example, 11 pigs from Group 2 and 17 of the pigs from Group 1 were healthy and suitable for challenge with a virulent strain of *H. parasuis*. The 8 pigs (6 from Group 1 and 2 from Group 2) that did not receive challenge were unhealthy or had died for reasons unrelated to vaccination. All of the pigs were then observed for seven days for general health and the clinical signs of *H. parasuis*. A necropsy was performed on all of the animals that died during the trial and tissues were taken for bacterial confirmation of the cause of death when deemed necessary. On day 7 following the challenge, all of the animals were euthanized and those showing persistent clinical signs and/or elevated body temperature for 2 consecutive days typical of *H.*

parasuis were necropsied. Gross lesions were assessed and recorded, and tissues were collected and sent to a laboratory for bacterial culture.

A summary of the above protocol can be found in Table 4.

Table 4

Day	Event
1	Pigs randomized and assigned to groups. Group 1 pigs received HPB and Group 2 received the non-vaccinated control treatment.
130-139	Daily observation and body temperature 2 days before challenge and 7 days post challenge.
132	Pigs challenged with <i>H. parasuis</i> .
139	End of trial.

Results and Discussion:

Clinical signs of *H. parasuis* infection was shown by 8 of 11 pigs of the control group and necropsy showed that 7 of the 11 had post mortem lesions typical of *H. parasuis*. A total of 6 control pigs died after challenge, and 5 of these 6 had gross lesions typical of *H. parasuis*. Severe clinical signs resulting in terminal recumbency for two or more days developed in two more pigs. These pigs also had lesions typical of *H. parasuis* at necropsy. Of the 8 affected control pigs, 6 were positive for *H. parasuis* on bacterial culture. The 3 remaining pigs did not show any signs of disease due to *H. parasuis*.

In contrast, 16 of the 17 pigs from Group 1 were protected from the virulent challenge of *H. parasuis* 132 days post vaccination. One of the pigs from Group 1 died following the challenge. There was no *H. parasuis* recovered from the single Group 1 pig who died following challenge,

however, it did have post mortem lesions consistent with the occurrence of the disease. Table 5 contains morbidity results and analysis while Table 6 contains mortality results.

Table 5 - Morbidity

	# Pigs Affected by <i>H. parasuis</i>	# Pigs Protected from <i>H. parasuis</i>	Total # Pigs
Group 1	1	16	17
Group 2	8	3	11

	Chi-Square	P-Value
Uncorrected:	13.68	.0002
Mantel-Haenszel:	13.19	.0003
Yates corrected:	6.04	.0139

Table 6 - Mortality

	# Pigs Died After Challenge	# Pigs Survived After Challenge	Total # Pigs
Group 1	1	16	17
Group 2	6	5	11

	Chi-Square	P-Value
Uncorrected:	8.43	.0037
Mantel-Haenszel:	8.13	.0043
Yates corrected:	6.04	.0139

Vaccinates challenged with virulent *H. parasuis* 132 days after vaccination were well protected when compared to controls. 73% of the non-vaccinated controls developed the disease and 55% died following the challenge. By comparison, a single dose of the HPB protected 94% of the challenged pigs. The vaccinates also experienced statistically significant lower mortality than

controls due to *H. parasuis*. The results of this example confirm the duration of immunity of at least 132 days for the HPB in a single dose regimen in nursery pigs aged 3 weeks of age or older.

EXAMPLE 3

This example describes a preferred method of preparing vaccine in accordance with the present invention.

Materials and Methods:

The composition of the *E. rhusiopathiae*-*H. parasuis* Bacterin includes strains SE-9 and Z-1517 of *E. rhusiopathiae* and *H. parasuis*, respectively. These strains have been deposited with the ATCC and have been assigned deposit numbers PTA-6261 and PTS-6262, respectively. The seed materials of each are identified by characteristic growth patterns, Gram's stain reactions and biochemical tests. The virulence of the seed materials is determined by the ability to kill mice and/or produce clinical signs in susceptible swine.

The composition of the growth media for *E. rhusiopathiae* is found in Table 7. The composition of the growth media for *H. parasuis* is found in Table 8.

Table 7

	<u>Ingredient</u>	<u>Amount</u>
VPI Salts Solution		
	Anhydrous Calcium Chloride	0.2g
	Anhydrous Magnesium Sulfate	0.2g
	Potassium Phosphate Monobasic	1.0g
	Sodium Bicarbonate	10.0g
	Sodium Chloride	2.0g
	RO Water q.s	1000.0mL
25 % Dextrose Solution		
	Dextrose	250.g
	RO Water q.s	1000.0mL
Production Seed and Production Culture Media		
	Beef Paste	2.0g
	Proteose Peptone 3	20.0g
	Sodium Phosphate Heptahydrate	8.0g
	Bacto Yeast	40.0g
	Dextrose	8.167g
	Tween 80	1.36mL
	RO Water q.s	1000.0mL

(note: to prepare the Production Seed and Production Culture Media, the pH should be adjusted to 8.6 by adding 10N NaOH or 5N HCl and it should also be heat sterilized.)

Table 8

	<u>Ingredient</u>	<u>Amount</u>
5% NAD Stock Solution for Media		
	B-Nicotinamide Adenine Dinucleotide	5.0g
	L-Cysteine	1.0g
	RO Water q.s	100.0mL
2M Tris Solution		
	TRIS (hydroxymethyl) Amino Methane	121.14.g
	RO Water q.s	500.0mL
Production Seed Culture Media		
	Tryptic Soy Broth	5.7g
	3.6% SAG 730 Antifoam Solution	1.8mL
	RO Water	842.2mL
Heat sterilize and aseptically add:		
	Sterile 10X Minimum Essential Medium Containing Non-Essential Amino Acids	95.0mL
	15% Sterile Fresh Yeast Extract Solution	9.6mL
	5% NAD Stock Solution	9.6mL
	Certified Newborn Bovine Calf Serum	38.0mL
	2M Tris Solution	2.2mL

(note: 5% NAD Stock Solution should be filter sterilized through 0.2 micron filter and stored frozen. 2M Tris Solution should be heat sterilized and stored cool.)

The strains of both *E. rhusiopathiae* and *H. parasuis* seed cultures should be grown in 500 to 20,000 mL vessels. Their production cultures are grown in 20-1000 L vessels. Master and Working Seeds of both strains should be stored frozen at < -60°C.

To prepare suspensions of *E. rhusiopathiae* for seeding or inoculation, the Master seed is returned to the liquid phase and 1 to 2 mL is inoculated into Working Seed Culture Media. The culture is then grown statically at 34 - 38°C for 6 to 24 hours. The cultures are then checked for purity by colony appearance on 5% sheep blood agar, cell morphology, and Gram's stain. An equal volume of stabilizer is added and dispensed into cryotubes for storage.

To prepare suspensions of *H. parasuis* for seeding or inoculation, the Master seed is returned to the liquid phase and is inoculated into Working Seed Culture Media. The culture is then stirred at 34 - 38°C for 12 to 18 hours. The cultures are then checked for purity by colony appearance on 5% sheep blood agar, cell morphology, and Gram's stain. An equal volume of stabilizer is added and dispensed into cryotubes for storage.

To inoculate *E. rhusiopathiae*, 1-12 mL of Working Seed are inoculated into a glass vessel containing 500 to 18,000 mL media to prepare Production Seed. Up to 5% (v/v) Production Seed is inoculated into 15 to 750 L of media in 20 to 1000 L vessels to prepare Production Culture. Production Cultures are checked for purity by streaking on 5% sheep blood agar, incubating at 34 - 38°C for 24 - 48 hours and observing colony morphology.

To inoculate *H. parasuis*, 1-10 mL of Working Seed are inoculated into a glass vessel containing 500 to 18,000 mL media to prepare Production Seed. Up to 7% (v/v) Production Seed is inoculated into 14 to 750 L of media in 20 to 1000 L vessels to prepare Production Culture. Production Cultures are checked for purity by streaking on 5% sheep blood agar, supplemented with NAD streak, incubating at 34 - 38°C for 18 - 24 hours, and observing colony morphology.

For the incubation of *E. rhusiopathiae*, Seed Cultures are incubated at 34 - 38°C for 6 to 24 hours aerobically. Production Cultures are incubated at 34 - 38°C for 6 to 12 hours aerobically with

optional agitation. For the incubation of *H. parasuis*, Seed and Production Cultures are incubated at 34 - 38°C for 6 to 18 hours while stirring and with optional sparging with compressed air.

During the growth period for *E. rhusiopathiae*, pH is controlled by 2M Tris and the cultures are observed macroscopically during the incubation period for evidence of abnormal growth or signs of contamination. The media is turbid prior to inoculation. As growth increases, settling will be observed. Samples are taken to determine % transmittance. Purity is determined by colony morphology on 5% sheep blood agar and/or Gram's stain. A macroscopic observation of sufficient turbidity indicates that the culture is ready for harvest. This will occur between 6 - 12 hours following inoculation of Production Culture.

For *H. parasuis*, cultures are observed macroscopically during the incubation period for evidence of abnormal growth or signs of contamination. Samples are taken to determine direct counts. Purity is determined by colony morphology on 5% sheep blood agar supplemented with an NAD streak and/or Gram's stain. A macroscopic observation of sufficient turbidity and a drop in pH (<7.0) indicates that a culture is ready for harvest. This will occur between 6 - 12 hours following inoculation of Production Culture.

For both strains, each Production Culture is sampled for purity testing and percent transmittance and each Production Culture vessel is prepared for inactivation. For *E. rhusiopathiae*, Production Cultures must exhibit typical growth as described, have a percent transmittance of $\leq 40\%$ at 620nm, and be free of any evidence of contamination. For *H. parasuis*, Production Cultures will have a microscopic count of $\geq 5 \times 10^7$ organisms/mL and will be free of any evidence of contamination.

Both strains are inactivated by the addition of formalin to the Production Cultures up to 0.5% (v/v). Inactivation is performed at 20 - 38° for 12 - 72 hours with optional agitation. The inactivated product is then stored at 2 to 7°C. Inactivation is confirmed by standard techniques.

Adjuvant ISA 206 is added at 30-65% (w/v). The inactivated cultures are emulsified by homogenization with ISA 206. Sodium bisulfite solution 35% may be added to fractions or product to neutralize free formaldehyde. Formaldehyde solution may be added to fractions or at assembly of product not to exceed 0.2% concentration in completed product.

The resulting products can then be concentrated in a sterile closed loop system utilizing a hollow fiber filtration with a 100,000 molecular weight cut off or by aseptically decanting settled culture to provide a concentration up to 2×10^{10} organisms/mL.

E. rhusiopathiae is standardized by percent transmittance and concentration. *H. parasuis* is standardized by direct count of organisms.

EXAMPLE 4

This example demonstrates the assembly of the different vaccine components into a preferred vaccine in accordance with the present invention.

Materials and Methods:

Vaccine in accordance with the present invention can be made by combining 90,000 mL *E. rhusiopathiae* culture (which represents 90,000 mL of *E. rhusiopathiae* culture at 40% transmittance), 56,250 mL *H. parasuis* culture (which represents 56,250 mL of 4×10^9 organisms/mL *H. parasuis* culture), 2,250 mL sterile RO water, 150,000 mL ISA 206, and 1,500 mL sterile 35% sodium bisulfate solution. Sterile 35% sodium bisulfate solution is also used as needed

to neutralize formaldehyde levels to 0.2% formaldehyde solution. The pH of the resulting mixture is adjusted to 6.2 - 7.2 by the addition of 10N sodium hydroxide or 5N hydrochloric acid as needed.

Such a mixture should provide *E. rhusiopathiae* in a concentration equivalent to 0.3 - 0.9 mL of Harvest Culture at 40% transmittance and at least 1.5×10^8 *H. parasuis* organisms in each 2 mL dose.

We claim:

1. A composition comprising:
an amount of antigen from *Erysipelothrix Rhusiopathiae*;
an amount of antigen from *Haemophilus Parasuis*; and
an adjuvant.
2. The composition of claim 1, said amount of *Erysipelothrix Rhusiopathiae* antigen in said composition being an amount effective at reducing the risk of developing clinical signs of *Erysipelothrix Rhusiopathiae* infection when administered to an animal susceptible to *Erysipelothrix Rhusiopathiae* infection.
3. The composition of claim 2, said effective amount of *Erysipelothrix Rhusiopathiae* antigen being up to about 5 ml.
4. The composition of claim 1, said amount of antigen from *Haemophilus Parasuis* being an amount effective at reducing the risk of developing clinical signs of *Haemophilus Parasuis* infection when administered to an animal susceptible to *Haemophilus Parasuis* infection.
5. The composition of claim 4, said effective amount of *Haemophilus Parasuis* antigen being up to about 5 ml.
6. The composition of claim 4, said effective amount of *Haemophilus Parasuis* antigen containing at least 1.5×10^7 cfu/dose.

7. The composition of claim 1, said adjuvant having a mineral oil base.

8. The composition of claim 1, said composition being effective at inducing an immune response against infection from a pathogen selected from the group consisting of *Haemophilus Parasuis*, *Erysipelothrix Rhusiopathiae*, and combinations thereof.

9. A vaccine for reducing the risk of developing clinical signs of *Erysipelothrix Rhusiopathiae* infection after a single administration of said vaccine, said vaccine comprising:
an amount of *Erysipelothrix Rhusiopathiae* antigen; and
an adjuvant.

10. The vaccine of claim 9, further comprising an amount of *Haemophilus Parasuis* antigen.

11. The vaccine of claim 9, said amount of *Erysipelothrix Rhusiopathiae* antigen being up to about 5 ml.

12. The vaccine of claim 10, said amount of antigen from *Haemophilus Parasuis* being an amount effective at reducing the risk of developing clinical signs of *Haemophilus Parasuis* infection.

13. The vaccine of claim 10, said amount of *Haemophilus Parasuis* antigen being up to about 5 ml.

14. The vaccine of claim 10, said effective amount of *Haemophilus Parasuis* antigen containing at least 1.5×10^7 cfu/dose.

15. The vaccine of claim 9, said adjuvant having a mineral oil base.

16. The vaccine of claim 9, said vaccine reducing the risk of developing clinical signs of *Erysipelothrix Rhusiopathiae* infection for at least four months following administration.

17. The vaccine of claim 10, said vaccine reducing the risk of developing clinical signs of *Haemophilus Parasuis* infection for at least four months following administration.

18. The vaccine of claim 10, said vaccine being effective at inducing an immune response against infection from a pathogen selected from the group consisting of *Haemophilus Parasuis*, *Erysipelothrix Rhusiopathiae*, and combinations thereof.

19. A method of reducing an animal's risk of developing clinical signs resulting from infection by a pathogen selected from the group consisting of *Haemophilus Parasuis*, *Erysipelothrix Rhusiopathiae*, and combinations thereof comprising the step of:

administering a composition to an animal susceptible to *Haemophilus Parasuis* or *Erysipelothrix Rhusiopathiae* infection, said composition comprising an amount of antigen from *Erysipelothrix Rhusiopathiae*, an amount of antigen from *Haemophilus Parasuis*, and an adjuvant.

20. The method of claim 19, said administration step being via an intramuscular injection.

21. The method of claim 19, said amount of *Erysipelothrix Rhusiopathiae* antigen being up to about 5 ml.

22. The method of claim 19, said amount of *Haemophilus Parasuis* antigen being up to about 5 ml.

23. The method of claim 19, said amount of *Haemophilus Parasuis* antigen containing at least 1.5×10^7 cfu/dose.

24. The method of claim 19, said adjuvant having a mineral oil base.

25. The method of claim 19, said animal's reduction of risk of developing clinical signs of *Haemophilus Parasuis* or *Erysipelothrix Rhusiopathiae* infection lasting for at least 132 days.

26. The method of claim 19, said administering step reducing the animal's risk of developing clinical signs from *Haemophilus Parasuis* and *Erysipelothrix Rhusiopathiae* infection.

27. The method of claim 19, further comprising the step of confirming the animal's reduction of risk by challenging the animal with a virulent strain of *Haemophilus Parasuis* or *Erysipelothrix Rhusiopathiae* and monitoring said animal for the development of said clinical signs.

28. A method inducing an immune response to *Haemophilus Parasuis* or *Erysipelothrix Rhusiopathiae* infection comprising the step of:
- administering a composition to an animal susceptible to *Haemophilus Parasuis* or *Erysipelothrix Rhusiopathiae* infection, said composition comprising an amount of antigen from *Erysipelothrix Rhusiopathiae*, an amount of antigen from *Haemophilus Parasuis*, and an adjuvant.
29. The method of claim 28, said administration step being via an intramuscular injection.
30. The method of claim 28, said amount of *Erysipelothrix Rhusiopathiae* antigen being up to about 5 ml.
31. The method of claim 28, said amount of *Haemophilus Parasuis* antigen being up to about 5 ml.
32. The method of claim 28, said amount of *Haemophilus Parasuis* antigen containing at least 1.5×10^7 cfu/dose.
33. The method of claim 28, said adjuvant having a mineral oil base.
34. The method of claim 28, said animal's immune response to *Haemophilus Parasuis* or *Erysipelothrix Rhusiopathiae* infection lasting for at least 4 months.

35. The method of claim 28, said administering step inducing an immune response against *Haemophilus Parasuis* and *Erysipelothrix Rhusiopathiae* infection.

36. The method of claim 28, further comprising the step of confirming the animal's immune response by challenging the animal with a virulent strain of *Haemophilus Parasuis* or *Erysipelothrix Rhusiopathiae* and testing for said immune response.

37. A method of preparing a composition comprising the steps of:
preparing a mixture by combining an amount of antigen from *Haemophilus Parasuis*, an amount of antigen from *Erysipelothrix Rhusiopathiae*, and an adjuvant; and emulsifying said mixture.

38. The method of claim 37, said method further comprising the step of inactivating the source of said antigen from *Haemophilus Parasuis* and *Erysipelothrix Rhusiopathiae*.

39. The method of claim 37, said *Haemophilus Parasuis* antigen being derived from strain Z-1517.

40. The method of claim 37, said *Erysipelothrix Rhusiopathiae* antigen being derived from strain SE-9.

41. The method of claim 37, further comprising the step of standardizing said composition to provide known effective amounts of *Haemophilus Parasuis* and *Erysipelothrix Rhusiopathiae* antigen.

VACUNA PARA ERYSIPELOTHRIX RHUSIOPATHIAE-HAEMOPHILUS**PARASUIS Y MÉTODOS DE USO DE LAS MISMAS****ANTECEDENTES DE LA INVENCION****Campo de la Invención**

La presente invención esta relacionada con una vacuna para *Erysipelothrix rhusiopathiae* (*E. rhusiopathiae*) y una vacuna para *Haemophilus Parasuis* (*H. parasuis*). Más particularmente la presente invención está relacionada con una vacuna para conferir inmunidad efectiva contra *E. rhusiopathiae* y *H. parasuis* y métodos para elaborar las mismas. Aún más particularmente, la presente invención está relacionada con una vacuna que se puede administrar en una dosis simple y proporcionar una duración de inmunidad (DOI) durante un tiempo que se desee. Aún más particularmente, la presente invención se relaciona con una vacuna de dosis única que suministra un DOI equivalente al intervalo de vida promedio de un animal que reciba la vacuna.

Descripción de la Técnica Anterior

E. rhusiopathiae es una bacteria gram-positiva que es patógena a más de 50 especies de animales vertebrados e invertebrados que incluyen el cerdo, la oveja, corderos, ganado, patos, pavos, y humanos. *H. parasuis* es una bacteria gram negativa que es patógena a muchos animales, más notablemente a cerdos. Las vacunas contra *E. rhusiopathiae* y *H. parasuis* son típicamente separadas y consisten de dosis múltiples dadas durante el intervalo de vida de un animal con el

fin de conferir inmunidad efectiva contra *E. rhusiopathiae* y *H. parasuis*. Actualmente existe una vacuna contra *H. parasuis* que se puede administrar en una dosis simple pero subsiste la necesidad de suministrar una vacuna separada contra *E. rhusiopathiae*. Como es bien conocido en la técnica, los problemas con las vacunas que requieren más de una dosis incluyen el tiempo y el gasto necesario para hacer el seguimiento de cuáles animales han recibido la primera y/o la segunda o subsecuentes dosis, rastrear cuándo fue dada la primera dosis, realizar la vacunación actual, incrementar el tamaño de los animales entre la primera y las subsecuentes dosis, el riesgo de daño creciente al animal y a la persona que da las dosis posteriores de la vacuna, y el gasto asociado con el suministro de múltiples dosis.

Lo que se requiere en la técnica es un régimen de una dosis que le confiera inmunidad efectiva a un animal que reciba la vacunación en donde la vacuna suministra un DOI prolongado mucho mayor de lo que se encuentra actualmente disponible a través de las vacunas. Lo que se requiere adicionalmente es una vacuna contra *E. rhusiopathiae* que se administre en una dosis simple y suministre un DOI de aproximadamente seis meses. Lo que se requiere adicionalmente es una vacuna contra *E. rhusiopathiae* y *H. parasuis* que suministre un DOI de aproximadamente seis meses después de una simple dosis de la vacuna.

RESUMEN DE LA INVENCION

La presente invención soluciona las deficiencias de la técnica anterior y suministra un avance diferente en el estado de la técnica. En particular, la presente invención suministra una vacuna que se puede administrar en una dosis única y que suministra uno o más de los siguientes: 1) confiere inmunidad efectiva

contra *E. rhusiopathiae*; 2) disminuye el riesgo de desarrollo de signos clínicos de infección de *E. rhusiopathiae*; 3) induce una respuesta inmune contra *E. rhusiopathiae*; y 4) tiene un DOI de al menos cuatro meses, más preferiblemente al menos cerca de cinco meses y más preferiblemente al menos cerca de seis meses. La presente invención también suministra una combinación de vacuna que suministra uno o más de lo siguiente: 1) confiere inmunidad efectiva contra *E. rhusiopathiae*; y/o *H. paraseis*; 2) disminuye el riesgo de desarrollar signos clínicos de *E. rhusiopathiae* y/o *H. parasuis* a través de una dosis única de la vacuna; 3) induce una respuesta inmune contra *E. rhusiopathiae* y/o *H. parasuis*; 4) suministra un DOI contra *E. rhusiopathiae* y/o *H. parasuis* de al menos aproximadamente cuatro meses, más preferiblemente al menos aproximadamente 132 días, más preferiblemente al menos aproximadamente 5 meses, y más preferiblemente al menos aproximadamente seis meses o al menos aproximadamente 162 días. Preferiblemente, la vacuna de combinación se puede dar también como una dosis única.

La vacuna contra *E. rhusiopathiae* incluye un componente bacterial de bacteria de *E. rhusiopathiae* inactivada y un adyuvante adecuado. El adyuvante se puede seleccionar con base en el método de administración y puede incluir adyuvantes minerales basados en aceite tales como adyuvantes completos e incompletos de Freund, el adyuvante Seppic incompleto Montanide tal como el ISA, tales como los adyuvantes de emulsión de aceite en agua tal como el sistema adyuvante Ribí, la formulación adyuvante syntax que contiene muramil y péptido, o adyuvante de sal de aluminio. Preferiblemente, el adyuvante es un adyuvante mineral con base en aceite, más preferiblemente el ISA206 (SEPPIC, Paris, Francia). La composición también puede incluir una cualquiera o una combinación de portadores o excipientes farmacéuticamente aceptables que incluyen pero no

están limitados a amortiguadores, estabilizadores, diluyentes, preservativos, y solubilizadores. La vacuna se administra a animales susceptibles a infección de *E. rhusiopathiae*, preferiblemente mamíferos y aún más preferiblemente cerdos, de cualquier manera convencional, que incluye la oral, intranasal, intramuscular, nodo intralinfático, intradérmica, intraperitoneal, subcutánea, y combinaciones de estas, pero más preferiblemente a través de inyección intramuscular (IM). La cantidad de dosis para administración intramuscular es preferiblemente hasta de aproximadamente 5 ml aún más preferiblemente entre 1 ml y 3 ml, y más preferiblemente aproximadamente 2 ml.

La vacuna combinada de *E. rhusiopathiae* y *H. parasuis* incluye componentes bacteriales inactivados de ambas *E. rhusiopathiae* y *H. parasuis*, junto con un adyuvante adecuado. Preferiblemente, el adyuvante está basado en aceite mineral, más preferiblemente ISA206. La vacuna se administra a mamíferos susceptible a infección con *E. rhusiopathiae* y *H. parasuis* preferiblemente mamíferos, y aún más preferiblemente cerdos, de cualquier manera convencional, que incluye la oral, la intranasal, intramuscular, nodo intralinfático, intradérmica, intraperitoneal, subcutánea, y combinaciones de estas, más preferiblemente a través de inyección intramuscular (IM). La cantidad de la dosis cuando la inyección IM es la ruta de administración seleccionada es preferiblemente hasta de aproximadamente 5 ml, y aún más preferiblemente entre 1 ml y 3 ml, y más preferiblemente aproximadamente 2 ml. La cantidad de antígeno *E. rhusiopathiae* en cada dosis debe ser suficiente para conferir inmunidad efectiva contra y disminuir el riesgo de desarrollar signos clínicos que resulten de la infección de *E. rhusiopathiae* a un animal que recibe vacunación con esta. Preferiblemente la cantidad de antígeno de *E. rhusiopathiae* debe ser hasta de aproximadamente de 5 ml, más preferiblemente entre aproximadamente 0.2 a 3 ml, aún más

preferiblemente entre aproximadamente 0.3 a 1.5 ml, más preferiblemente entre aproximadamente 0.4 a 0.8 ml, y aún más preferiblemente aproximadamente 0.6 ml. La cantidad de antígeno *H. parasuis* en cada dosis debe ser hasta de aproximadamente 5 ml, más preferiblemente entre aproximadamente 0.1 a 3 ml, aún más preferiblemente entre aproximadamente 0.15 a 1.5 ml, más preferiblemente entre aproximadamente 0.2 a 0.6 ml, y aún más preferiblemente entre aproximadamente 0.4 ml. En una forma diferente de mediciones, la cantidad de antígeno de *H. parasuis* en cada dosis debe contener al menos 1.5×10^7 cfu/dosis, más preferiblemente entre aproximadamente 1.5×10^8 a 1.5×10^{10} cfu/dosis y aún más preferiblemente aproximadamente 1.5×10^9 cfu/dosis. En una dosis de 2 ml, particularmente preferida, aproximadamente 0.6 ml de antígeno *E. rhusiopathiae*, aproximadamente 1.0 ml que es el adyuvante y aproximadamente 0.4 ml es el antígeno de *H. parasuis*. Preferiblemente, las bacterias se inactivan mediante técnicas de inactivación convencional y especialmente técnicas de inactivación convencional con formalina.

Las vacunas y las composiciones de la presente invención son útiles generalmente para inducir respuestas inmunes en animales como terapias que estimulan la respuesta inmune o vacunas profilácticas.

Preferiblemente, la administración de las composiciones o las vacunas de la presente invención dan como resultado la respuesta inmune que protege el animal vacunado de varias formas que incluyen una disminución en la severidad o retraso en la aparición de signos clínicos por infección con *E. rhusiopathiae* y/o *H. parasuis*. Aún más preferiblemente, la administración de las composiciones o vacunas da como resultado un riesgo reducido de desarrollo de signos clínicos por infección con *E. rhusiopathiae* y/o *H. parasuis*, aún después de exposición o

contaminación con las formas virulentas de *E. rhusiopathiae* y/o *H. parasuis*. En formas particularmente preferidas, la administración de la composición o la vacuna da como resultado una prevención completa de estos signos clínicos.

Se pueden utilizar varios métodos convencionales para determinar si fue inducida una respuesta inmune en un animal. Por ejemplo, un animal que recibe la composición o la vacuna puede ser infectado con una forma virulenta de *E. rhusiopathiae* y/o *H. parasuis* y observar el desarrollo de los signos clínicos de la infección durante un periodo de tiempo después de la infección. Un método alternativo para determinar si fue inducida una respuesta inmune mediante la administración de la composición o la vacuna sería ensayar una muestra biológica proveniente de una animal en busca de anticuerpos de uno o más antígenos de *E. rhusiopathiae* y/o *H. parasuis*. Tales métodos son comunes en el campo y se podrían determinar los ensayos de anticuerpo apropiados por aquellos expertos en la técnica.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA MODALIDAD PREFERIDA

Los siguientes ejemplos establecen las modalidades preferidas de la presente invención. Se debe entender que estos ejemplos se suministran por vía de ilustración y no se deben tomar como una limitación del alcance total de la invención.

EJEMPLO 1

Este ejemplo suministra datos como la eficacia y la duración de la inmunidad contra *E. rhusiopathiae* virulento luego de una dosis única preferida de vacuna contra *H. parasuis*- *E. rhusiopathiae*.

Materiales y Métodos

Un total de 37 cerdos con edades de 3 a 4 semanas, ninguno de los cuales había sido previamente vacunado con bacterinas o vacunas de *Erysipelothrix*, se utilizaron para el estudio que condujo a este ejemplo. En la totalidad del estudio, les fue suministrado a los animales suficiente alimento para su tamaño, edad, y otras características físicas. El agua fue suministrada *ad libitum*. Los animales fueron guardados en instalaciones de confinamiento para cerdos con pisos completa o parcialmente enrejados, ventilación mecánica, y calor y luz suplementaria adecuada para la edad de los animales.

Dos días antes del estudio, a todos los cerdos se les realizó un examen y se vacunaron contra el virus Seudorabies. En el día 1 del estudio, los cerdos se dividieron en dos grupos. El grupo 1 estaba compuesto por 23 cerdos que recibieron una dosis intramuscular de 2 ml de Bacterina de *H. parasuis*-*Erhusiopathiae* con adyuvante ISA206 ("HPE") (boehringer Ingelheim Vetmedica, Inc; St. Joseph, MO) al lado izquierdo del cuellos el día 1. El antígeno de *E. rhusiopathiae* se incluyó en cada dosis en una proporción de volumen de 0.6 ml del antígeno recogido. El grupo dos, el grupo de control, estaba compuesto por 14 cerdos que no recibían ningún tratamiento. En los días 21, 54 y 161 del estudio, todos los animales fueron sangrados para monitorear la seroconversión a la vacunación.

En el día 162 del ejemplo, todos los cerdos, (excepto tres que habían muerto de causas incidentales antes del día 162) se infectaron con una sepa virulenta de *E. rhusiopathiae* EL-6P. A todos los cerdos se les observó su salud general y los signos clínicos de *E. rhusiopathiae* durante siete días. Al día 7 luego de la infección, todos los animales fueron eutanizados y aquellos que mostraron signos clínicos persistentes y/o temperatura del cuerpo elevada durante dos días consecutivos típicos para *E. rhusiopathiae* como se estableció en el 9CFR 113.67 fueron sometidos a necropsia. También se desarrolló una necropsia sobre todos los animales que murieron durante el ensayo. Fueron evaluadas y registradas las lesiones totales, y fueron reconectados tejidos y enviados a un laboratorio para cultivo bacterial.

Un resumen del protocolo anterior se puede encontrar en la Tabla 1

Tabla 1

DIA	EVENTO
1	Los cerdos de manera aleatoria se asignan a grupos. Los cerdos del grupo 1 recibieron HPE y los del grupo 2 recibieron un tratamiento de control sin vacuna.
21	Todos los cerdos fueron sangrados
54	Todos los cerdos fueron sangrados
160-169	Observación diaria y temperatura del cuerpo 2 días después de la infección y 7 días post infección
161	Todos los cerdos fueron sangrados
162	Todos los cerdos fueron infectados con <i>E. rhusiopathiae</i> EL-6P serie # 3
169	Fin del ensayo

Resultados y discusiones:

Todos los 13 cerdos del grupo 2 fueron afectados y mostraron temperatura del cuerpo elevado a mayor de 106.5°F, los signos clínicos de infección de *E. rhusiopathiae* o la muerte después de la infección con *E. rhusiopathiae* virulenta. La *E. rhusiopathiae* fue recuperada de 9 de los 13 cerdos del grupo 2, y 6 de los 13 cerdos del grupo 2 murieron luego de la infección. Como contraste, 20 de los 21 cerdos del grupo 1 permanecieron saludables y fueron protegidos de la infección virulenta de *E. rhusiopathiae* 162 días post vacunación. Ninguno de los cerdos del grupo 1 murió luego de la infección. No se recuperó *E. rhusiopathiae* del grupo 1 simple de cerdos que no permaneciera saludable luego de la infección. La Tabla 2 contiene los resultados de morbilidad y los análisis mientras la Tabla 3 contiene los resultados de mortalidad.

Tabla 2- Mortalidad

	# de Cerdos Afectados por <i>E.rhusiopathiae</i>	# de Cerdos Protegidos de <i>E.</i> <i>rhusiopathiae</i>	Total # de Cerdos
Grupo 1	1	20	21
Grupo 2	13	0	13

	Chi-cuadrado	Valor - P
No corregido:	23.28	.0000014
Mantel-Haenszel:	22.42	.0000022
Yates corregido:	19.71	.000009

Tabla 3 – Mortalidad

	# de cerdos después de la Infección	# de Cerdos Sobrevivientes Después de la Infección	Total # cerdos
Grupo 1	0	21	21
Grupo 2	6	7	13

	Chi-cuadrado	Valor - P
No corregido:	11.77	.0006
Mantel-Haenszel:	11.42	.0007
Yates corregido:	8.81	.0029

Los vacunados infectados con *E. rhusiopathiae* virulento 162 días después de la vacunación fueron todos protegidos comparados con los controles. El 100% de los controles no vacunados desarrollaron la enfermedad y el 46% murieron luego de la infección. Como contraste, una dosis simple del HPE protegió del 95% de los cerdos infectados y ninguno de los cerdos que recibió la vacuna murió luego de la infección. Los resultados de este estudio confirman la duración de inmunidad de al menos 162 días para el HPE con un régimen de dosis simple o de dosis única para la prevención y el control de erisipelas en cerdos de criadero de 3 semanas de edad o mayores.

EJEMPLO 2

Este ejemplo demuestra la duración de la inmunidad de una vacuna de dosis única contra infección con *H. parasuis* virulento después de vacunación.

Materiales y Métodos

El estudio de este ejemplo inicio con 36 cerdos de edades de 3 a 4 semanas, ninguno de los cuales había sido previamente vacunado utilizando bacterina o vacuna de *H. parasuis*. Durante todo el ejemplo a los animales se les suministró suficiente alimento de acuerdo con su tamaño, edad y otras características físicas. El agua fue suministrada *ad libitum*.

En el día 1 del ejemplo los cerdos se dividieron en dos grupos. El Grupo 1 estaba compuesto de 23 cerdos que recibieron una dosis intramuscular de 2 ml de Bacterina de *H. parasuis* con el adyuvante ISA206 ("HPB") (Boehringer Ingelheim Vetmidica, Inc., St. Joseph, MO) en el día 1. El antígeno de *H. parasuis* se incluyó en cada una de las dosis en una proporción de 1.5×10^9 cfu/dosis. El grupo 2, el grupo de control, estaba compuesto de 13 cerdos que no recibieron ningún tratamiento.

En el día 132 del ejemplo, 11 cerdos provenientes del Grupo 2 y 17 de los cerdos del Grupo 1 estaban saludables y adecuados para infección con una virulenta *H. parasuis*. Los 8 cerdos (6 del Grupo 1 y 2 del Grupo 2) que no fueron infectados estaban saludables o habían muerto por razones no relacionadas con la vacunación. Todos los cerdos fueron entonces observados durante 7 días en cuanto a salud en general y los signos clínicos de *H. parasuis*. Se desarrollo una necropsia de todos los animales que murieron durante el ensayo y fueron tomados tejidos para confirmación bacterial de la causa de la muerte cuando se consideró

necesario. En el día 7 luego de la infección, todos los animales fueron sometidos a eutanasia y aquellos que mostraron signos clínicos persistentes y/o temperatura del cuerpo elevado durante dos días consecutivos típicos de *H. Parasuis* fueron sometidos a necropsia. Fueron evaluadas y registradas las lesiones totales, y fueron recogidos tejidos y enviados al laboratorio para cultivo bacterial.

Un resumen del protocolo anterior se puede encontrar en la Tabla 4

Tabla 4

Día	Evento
1	Los cerdos fueron aleatoriamente asignados a los grupos. Los cerdos del Grupo 1 recibieron HPB y los del Grupo 2 o recibieron un tratamiento de control sin vacuna.
130-139	Observación diaria y temperatura del cuerpo 2 días después de la infección y 7 días post infección.
132	Cerdos infectados con <i>H. parasuis</i>
139	Fin del ensayo

Resultados y discusión:

Signos clínicos por infección con *H. parasuis* se observaron en 8 de los 11 cerdos del grupo de control y la necropsia mostró que 7 de los 11 tenían lesiones típicas post mortem de *H. Parasuis*. Un total de 6 cerdos de control murieron después de la infección, y 5 de los 6 tenían lesiones totales típicas de *H. parasuis*. Los signos clínicos severos dieron como resultado reclinación terminal durante dos o más días desarrollado en dos o más cerdos. Estos cerdos también tenían lesiones típicas *H. Parasuis* en la necropsia. De los 8 cerdos de control afectados,

6 fueron positivos para *H. parasuis* en el cultivo bacterial. Los 3 cerdos restantes no mostraron ningún signo de enfermedad debido a *H. parasuis*.

Como contraste, 16 de los 17 cerdos provenientes del Grupo 1 fueron protegidos de la infección virulenta de *H. parasuis* 132 días post vacunación. Uno de los cerdos proveniente del Grupo 2 murió luego del la infección. No se recuperó *H. parasuis* de los cerdos del Grupo 1 simple que murieron luego de la infección, sin embargo, estos tuvieron lesiones post mortem consistentes con la ocurrencia de la enfermedad. La tabla 5 contiene los resultados y los análisis de morbilidad mientras que la Tabla 6 contiene los resultados de mortalidad.

Tabla 5-Morbilidad

	# de Cerdos Infectados por <i>H.</i> <i>parasuis</i>	# de Cerdos Protegidos de <i>H.</i> <i>parasuis</i>	Total # Cerdos
Grupo 1	1	16	17
Grupo 2	8	3	11

	Chi-cuadrado	Valor – P
No corregido:	13.68	.0002
Mantel-Haenszel:	13.19	.0003
Yates corregido:	6.04	.0139

Tabla 6 – Mortalidad

	# de Cerdos Muertos Después de la	# de Cerdos Sobrevivientes	Total # Cerdos
--	--------------------------------------	-------------------------------	----------------

	Infección	Después de la Infección	
Grupo 1	1	16	17
Grupo 2	6	5	11

	Chi-cuadrado	Valor – P
No corregido:	8.43	.0037
Mantel-Haenszel:	8.13	.0043
Yates corregido:	6.04	.0139

Los vacunados infectados con *H. parasuis* virulento 132 días después de la vacunación estuvieron bien protegidos cuando se compararon con los controles. 73% de los controles no vacunados desarrollo la enfermedad el 55% murió luego de la infección. En comparación, una dosis simple del HPB protegió el 94% de los cerdos infectados. Los vacunados también experimentaron mortalidad inferior a la de los animales de control debido a *H. parasuis* estadísticamente significativa. Los resultados de este ejemplo confirma la duración de la inmunidad de al menos 32 días para el HPB en un régimen de dosis simple en cerdos de criadero de 3 semanas de edad y más viejos.

EJEMPLO 3

Este ejemplo describe un método preferido para preparar la vacuna de acuerdo con la presente invención.

Materiales y Métodos

La composición de la Bacterina de *E. rhusiopathiae* - *H. parasuis* incluye las sepas SE-9 y Z1517 de *E. rhusiopathiae* y *H. parasuis*, respectivamente. Estas sepas se habían depositado con el ATCC y se les había asignado los números de depósito PTA-6261 y PTS-6262, respectivamente. Los materiales semilla de cada uno se identifican con patrones de crecimiento característicos, reacciones de tenido de Gram y ensayos bioquímicos. La virulencia del material de semilla se determina por la capacidad de matar ratones y/o o producir signos clínicos en cerdos susceptibles. La composición del medio de crecimiento para *E. rhusiopathiae* se encuentra en la Tabla 7. Las composiciones de los medios de crecimientos para *H. parasuis* se encuentran en la Tabla 8.

Tabla 7

	<u>Ingredientes</u>	<u>Cantidad</u>
Solución de Sales VPI		
	Cloruro de Calcio Anhidro	0.2g
	Sulfato de Magnesio Anhidro	0.2g
	Fosfato Monobásico de Potasio	1.0g
	Bicarbonato de Potasio	10.0g
	Cloruro de Sodio	2.0g
	Agua RO e.q	1000.0ml
25% de Solución de Dextrosa		
	Dextrosa	250g
	Agua RO e.q	1000.0ml
Producción de Semilla y Producción del Medio de Cultivo		

	Pasta de bife	2.0g
	Proteosa Peptona 3	20.0g
	Fosfato Heptahidrato de Sodio	8.0g
	Levadura Bacto	40.0g
	Dextrosa	8.167g
	Tween 80	1.36ml
	Agua ROq.s	1000.0ml

(Nota: para prepara la semilla de producción y el medio de cultivo de producción, el pH se debe ajustar a 8.6 a agregar NaOH 10N o HCL 5N o se debe esterilizar con calor).

Tabla 8

	<u>Ingredientes</u>	<u>Cantidad</u>
Solución Madre NAD a 5% para Medios		
	B- Nocotinamida Adenina Dinucleotido	5.0g
	L- Cisteína	1.0g
	Agua RO q.s	100.0ml
Solución Tris 2M		
	TRIS (hidroximetil) Amino Metano	121.14g
	Agua RO q.s	500.0ml
Medio de Producción de Cultivo de Semilla		
	Caldo de Soya Trípico	5.7g

	Solución Antiespuma SAG730 3.6%	1.8ml
	Agua ROq.s	842.2ml
Esterilizar con calor y agregar asépticamente		
	Medio Esencial Mínimo 10x Estéril Contiene Aminoácidos no Esenciales	95.0ml
	Solución de Extracto de Levadura Fresca Estéril 15%	9.6ml
	Solución Madre NAD 5%	9.6ml
	Suero de Becerro Bovino Recién Nacido Certificado	38.0ml
	Solución Tris 2M	2.0ml

(Nota: la solución madre de NAD 5% se debe filtrar esterilizada a través de un filtro de 0.2 micrómetros y almacenada congelada. La solución Tris 2M se debe esterilizar con calor y almacenar fría.)

Las sepas de ambos cultivos de semilla de *E. rhusiopathiae* y *H.parsuis* deben crecer en recipientes de 500 a 20,000 mL. Su cultivo de producción crecen en recipientes de 20 -1000 L. las semillas maestra y de trabajo de ambas sepas se deben almacenar congeladas a <-60°C.

Para prepara suspensiones de *E. rhusiopathiae* para semilla o inoculación, la semilla maestra es regresada a la fase liquida y 1 a 2 mL se inocula en el medio de cultivo de semilla de trabajo. El cultivo es entonces crecido estadísticamente a

34 - 38°C durante 6 a 24 horas. A los cultivos luego le son revisadas su pureza por aparición en la colonia sobre agar de sangre de oveja al 5%, morfología de célula, y tefido de Gram. Un volumen igual de estabilizador se agrega y se suministra en criotubos para almacenamiento.

Para preparar la suspensión de *H. parasuis* para semilla o inoculación, la semilla maestra se regresa a la fase líquida y se inocula en un medio de cultivo de semilla de trabajo. El cultivo se agita luego a 34 - 38°C durante 12 a 18 horas. A los cultivos entonces le es revisada la pureza por aparición de colonia y agar de sangre de oveja al 5%, morfología de célula, y tefido de Gram. Un volumen igual de estabilizador se agrega y se suministra en criotubos de almacenamiento.

Para inocular *E. rhusiopathiae*, 1-12 mL de semilla de trabajo se inocula en un recipiente de vidrio que contiene 500 a 18,000 ml de medio para preparar semilla de producción. Hasta el 5% (v/v) de semilla de producción se inocula en 15 a 750L de medio en recipientes de 20 a 1000L para preparar Cultivo de Producción. A los Cultivos de Producción es revisada la pureza mediante franjas sobre agar con sangre de oveja al 5%, incubando a 34-38°C durante 24 – 48 horas y observando la morfología de la colonia.

Para inocular *H. parasuis*, 1-10ml de semilla de trabajo se inoculan en un recipiente de vidrio que contiene 500 a 18,000 ml de medio para preparar Semilla de Producción. Hasta el 7% (v/v) de semilla de Producción se inocula en 14 a 750L de medio en recipientes de 20-1000L para preparar Cultivo de Producción. Los Cultivos de Producción se les revisa la pureza mediante o por franjas sobre agar con sangre de oveja al 5% suplementado con franjas NAD, que se incuban a 34 - 38°C durante 18-24 horas, y observando la morfología de la colonia.

Para la incubación de *E. rhusiopathiae*, los cultivos de semilla son incubados a 34-38°C durante 6 a 24 horas aeróbicamente. Los Cultivos de Producción se incuban a 34-38°C durante 6 a 12 horas aeróbicamente con agitación opcional. Para la incubación de *H. parasuis* cultivos de exploración de producción se incuban a 34-38°C durante 6 a 18 horas aunque agitando y con lavado opcional con aire comprimido.

Durante el periodo de crecimiento de *E. rhusiopathiae*, el pH se controla con Tris 2M y se observan los cultivos microscópicamente durante el periodo de incubación para evidencia de crecimiento anormal o signos de contaminación. El medio es turbio antes de la inoculación. En la medida en que se incrementa el crecimiento, se observara un decantamiento. Las muestras son tomadas para determinar la trasmittancia %. La pureza se determina mediante la morfología de la colonia sobre agar de sangre de oveja al 5% y/o tñido de Gram. Una observación macroscópica de turbidez suficiente indica que el cultivo esta listo para cosecha. Esto ocurrirá entre 6-12 horas luego de la inoculación del cultivo de producción.

Para los cultivos de *H. parasuis* se observan cultivos macroscópicamente durante el periodo de incubación para evidencia de crecimiento anormal o signos de contaminación. Las muestras son tomadas para determinar los conteos directos. La pureza se determina mediante morfología de colonia sobre agar de sangre de oveja al 5% suplementado con una estría o NAD y/o un tñido de Gram. Una observación macroscópica de suficiente turbidez y una gota con pH (<7.0) indica que el cultivo esta listo para cosecha. Esto ocurrirá entre 6-12 horas luego de inoculación del cultivo de producción.

Para ambas sepas, cada cultivo de producción es muestreado para ensayo de pureza y transmitancia porcentual y cada recipiente de cultivo de producción se prepara para inactivación. Los cultivos de producción de *E. rhusiopathiae* deben exhibir crecimientos típicos como se describió, tienen una transmitancia porcentual de <40% a 620nm, y ser libres de cualquier evidencia de contaminación. Para *H. parasuis*, los Cultivos de Producción tendrán un control microscópico de $\geq 5 \times 10^7$ organismos/mL y estarán libres de cualquier evidencia de contaminación.

Ambas sepas se inactivan por la adición de formalina a los cultivos de producción hasta 0.5% (v/v), la inactivación se desarrolla a 20 – 38° durante 12-72 horas con agitación opcional. El producto inactivado es luego almacenado a 2 a 7°C. La inactivación se confirmó mediante técnicas estándares.

El adyuvante ISA206 se agrega a 30-65% (p/v). Los cultivos inactivados son emulsificados mediante homogenización con ISA206. La solución de bisulfuro de sodio 35% se puede agregar a fracciones o productos para neutralizar el formaldehído libre. La solución de formaldehído se puede agregar a fracciones o a un montaje de producto que no exceda 0.2% de concentración en el producto terminado.

Los productos resultantes pueden ser entonces concentrados en una sistema de rizo cerrado estéril que utiliza una filtración de fibra hueca con una separación de peso molecular de 100,000 o al decantar asépticamente cultivo asentado para suministrar una concentración hasta de 2×10^{10} organismos/mL.

E. rhusiopathiae se estandariza mediante transmitancia porcentual y concentración. *H. parasuis* se estandariza mediante conteo directo de organismos.

EJEMPLO 4

Este ejemplo demuestra el montaje de diferentes componentes de vacuna en una vacuna preferida de acuerdo con la presente invención.

Materiales y Métodos

La vacuna de acuerdo con la presente invención se puede hacer al combinar 90,000 mL de cultivo de *E. rhusiopathiae* (que representa 90,000 mL de cultivo de *E. rhusiopathiae* a una transmitancia del 40%), 56,250 mL del cultivo de *H. parasuis* (que representa 56,250 mL de 4×10^9 organismos/mL de cultivo de *H. parasuis*), 2,250 mL de agua estéril RO, 150,000 mL ISA206, y 1,500mL de solución de bisulfuro de sodio estéril a 35%. La solución de bisulfuro de sodio estéril a 35% también se utiliza según se necesite para neutralizar los niveles de formaldehído a una solución de formaldehído al 0.2%. El pH de la mezcla resultante se ajusta a 6.2 -7.2 mediante la adición de hidróxido de sodio 10N o ácido clorhídrico a 5N según se necesite.

Tal mezcla debe suministrar *E. rhusiopathiae* en una concentración equivalente a 0.3 - 0.9mL del cultivo de cosecha a 40% de transmitancia y al menos 1.5×10^9 organismos de *H. parasuis* en cada 2 mL de dosis.

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende:

Una cantidad de antígeno de *Erysipelothrix Rhusiopathiae*;

Una cantidad de antígeno de *Haemophilus parasuis*; y

Un adyuvante.

2. La composición de la reivindicación 1, dicha cantidad de antígeno de *Erysipelothrix Rhusiopathiae* en dicha composición es una cantidad efectiva para reducir el riesgo de desarrollar signos clínicos de infección de *Erysipelothrix Rhusiopathiae* cuando se administra a un animal susceptible de infección con *Erysipelothrix Rhusiopathiae*.

3. La composición de la reivindicación 2, dicha cantidad efectiva de antígeno de *Erysipelothrix Rhusiopathiae* siendo hasta de aproximadamente 5 mL.

4. La composición de la reivindicación 1, dicha cantidad de antígeno de *Haemophilus Parasuis* es una cantidad efectiva para reducir el riesgo de desarrollar signos clínicos de infección *Haemophilus Parasuis* cuando se administra a una animal susceptible mediante infección con *Haemophilus parasuis*.

5. La composición de la reivindicación 4, dicha cantidad efectiva de antígeno de *Haemophilus parasuis* es hasta de aproximadamente 5 mL.

6. La composición de la reivindicación 4, dicha cantidad efectiva de antígeno de *Haemophilus Parasuis* que contiene al menos 1.5×10^7 cfu/dosis.
7. La composición de la reivindicación 1, dicho adyuvante tiene una base de aceite mineral.
8. La composición de la reivindicación 1, dicha composición es efectiva al inducir una respuesta inmune contra infección de un patógeno seleccionado del grupo que consiste de *Haemophilus parasuis*, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, y combinaciones de estos.
9. Una vacuna para reducir los riesgos de desarrollar signos clínicos de infección de *Erysipelothrix rhusiopathiae* después de una administración simple de dicha vacuna, dicha vacuna comprende: una cantidad de antígeno de *Erysipelothrix Rhusiopathiae*; y una adyuvante.
10. La vacuna de la reivindicación 9, que comprende además una cantidad de antígeno de *Haemophilus parasuis*.
11. La vacuna de la reivindicación 9, dicha cantidad de antígeno de *Erysipelothrix Rhusiopathiae* es de hasta aproximadamente 5 mL.
12. La vacuna de la reivindicación 10, dicha cantidad de antígeno de *Haemophilus parasuis* es una cantidad efectiva para reducir el riesgo de desarrollar signos clínicos mediante infección con *Haemophilus Parasuis*.

13. La vacuna de la reivindicación 10, dicha cantidad de antígeno de *Haemophilus parasuis* es de hasta de aproximadamente 5 mL
14. La vacuna de la reivindicación 10, dicha cantidad efectiva de antígeno de *Haemophilus Parasuis* contiene al menos 1.5×10^7 cfu/dosis.
15. La vacuna de la reivindicación 9, dicho adyuvante tiene una base de aceite mineral.
16. La vacuna de la reivindicación 9, dicha vacuna reduce el riesgo de desarrollar signos clínicos de infección con *Erysipelothrix rhusiopathiae* durante al menos cuatro meses luego de la administración.
17. La vacuna de la reivindicación 10, dicha vacuna reduce el riesgo de desarrollar signos clínicos de infección con *Haemophilus parasuis* durante al menos cuatro meses luego de la administración
18. La vacuna de la reivindicación 10, dicha vacuna es efectiva para inducir una respuesta inmune contra infección de un patógeno seleccionado del grupo que consiste de *Haemophilus parasuis*, *Erysipelothrix Rhusiopathiae*, y combinaciones de estos.
19. Un método para reducir el riesgo a un animal de desarrollar signos clínicos que resultan de la infección por un patógeno seleccionado del grupo que consiste de *Haemophilus parasuis*, *Erysipelothrix Rhusiopathiae*, y combinaciones de estos que comprenden la etapa de:

Administrar una composición a un animal susceptible de infección con *Haemophilus parasuis* o *Erysipelothrix Rhusiopathiae*, dicha composición comprende una cantidad de antígeno de *Erysipelothrix Rhusiopathiae*, una cantidad de antígeno de *Haemophilus parasuis*, y un adyuvante.

20. El método de la reivindicación 19, dicha etapa de administración es vía inyección intramuscular.
21. El método de la reivindicación 19, dicha cantidad de antígeno de *Erysipelothrix Rhusiopathiae* es de hasta aproximadamente 5 mL.
22. El método de la reivindicación 19, dicha cantidad de antígeno de *Haemophilus parasuis* es hasta de aproximadamente 5 mL.
23. El método de la reivindicación 19, dicha cantidad de antígeno de *Haemophilus parasuis*, contiene al menos 1.5×10^7 cfu/dosis.
24. El método de la reivindicación 19, dicho adyuvante tiene una base de aceite mineral.
25. El método de la reivindicación 19, dicha reducción de riesgo al animal de desarrollar signos clínicos de infección con *Haemophilus parasuis* o *Erysipelothrix Rhusiopathiae* dura durante al menos 132 días.

26. El método de la reivindicación 19, dicha etapa de administración reduce el riesgo al animal de desarrollar signos clínicos de infección con *Haemophilus parasuis* y *Erysipelothrix Rhusiopathiae*.

27. El método de la reivindicación 19, que comprende además la etapa de confirmar la reducción del riesgo del animal al infectarse el animal con una sepa virulenta de *Haemophilus parasuis* o *Erysipelothrix Rhusiopathiae*

y monitorear dicho animal para el desarrollo de dichas signos clínicos.

28. Un método que induce una respuesta inmune a infección con *Haemophilus parasuis* o *Erysipelothrix Rhusiopathiae* que comprende la etapa de:

Administrar una composición a un animal susceptible con infección *Haemophilus parasuis* o *Erysipelothrix Rhusiopathiae*, dicha composición comprende una cantidad de antígeno de *Erysipelothrix Rhusiopathiae*, una cantidad de antígeno de *Haemophilus parasuis*, y un adyuvante.

29. El método de la reivindicación 28, dicha etapa de administración es por vía una inyección intramuscular.

30. El método de la reivindicación 28, dicha cantidad de antígeno de, *Erysipelothrix Rhusiopathiae*, es hasta de aproximadamente 5 mL

31. El método de la reivindicación 28, dicha cantidad de antígeno de *Haemophilus parasuis*, es hasta de aproximadamente 5 mL.
32. El método de la reivindicación 28, dicha cantidad de antígeno de *Haemophilus parasuis*, contiene al menos 1.5×10^7 cfu/dosis.
33. El método de la reivindicación 28, dicho adyuvante tiene una base de aceite mineral.
34. El método de la reivindicación 28, dicha respuesta inmune del animal a infección con *Haemophilus parasuis* o *Erysipelothrix Rhusiopathiae* dura durante al menos 4 meses.
35. El método de reivindicación 28, dicha etapa de administración induce una respuesta inmune contra infección con *Haemophilus parasuis* y *Erysipelothrix Rhusiopathiae*.
36. El método de la reivindicación 28, que comprende además la etapa de confirmar la respuesta inmune del animal al infectarse el animal con una sepa virulenta de *Haemophilus parasuis* o *Erysipelothrix Rhusiopathiae* y ensayar dicha respuesta inmune.
37. Un método para preparar una composición que comprende las etapas de:

Preparar una mezcla al combinar una cantidad de antígeno de *Haemophilus parasuis*, una cantidad de antígeno de *Erysipelothrix Rhusiopathiae*, y una adyuvante; y emulsificar dicha mezcla.

38. El método de la reivindicación 37, dicho método comprende además la etapa de inactivar la fuente de dicho antígeno proveniente de *Haemophilus parasuis* y *Erysipelothrix Rhusiopathiae*.
39. El método de la reivindicación 37, dicho antígeno de *Haemophilus parasuis*, se deriva de la sepa Z-1517.
40. El método de reivindicación 37, dicho antígeno de *Erysipelothrix Rhusiopathiae* se deriva de la sepa SE-9.
41. El método de la reivindicación 37, que comprende además la etapa de estandarizar dicha composición para suministrar cantidades efectivas conocidas de antígeno de *Haemophilus parasuis*, *Erysipelothrix Rhusiopathiae*.

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference 34125-PCT	FOR FURTHER ACTION see Form PCT/ISA/210 as well as, where applicable, item 5 below.	
International application No. PCT/US04/36336	International filing date (day/month/year) 29 October 2004 (29.10.2004)	(Earliest) Priority Date (day/month/year) 30 October 2003 (30.10.2003)
Applicant BOEHRINGER INGELHEIM VETMEDICA, INC.		

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

This international search report consists of a total of 3 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, unless otherwise indicated under this item.



The international search was carried out on the basis of a translation of the international application furnished to this Authority (Rule 23.1(b)).



b. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequences 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.

60

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
 PCT/US04/36336

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC(7) : A61 K 39/085, 39/102, 39/02, 39/00, 39/12, 39/00; A61 N 63/00; C12 N 1/00; C07 K1/00
US CL : 424/234.1, 254.1, 253.1, 186.1, 192.1, 199.1, 93.2; 495/252.33, 249 29, 317.1, 320.1, 325, 6, 69.1, 69.7, 975, 7.2;
5142, 539/390, 825, 806

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
U.S. : Please See Continuation Sheet

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 practicable, search terms used)
Please See Continuation Sheet

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X — Y	US 6,342,231 B1 (BURKHARDT, D.T. et al) 29 January 2002 (29.01.2002) claims, columns 3 and examples	1-38 39 and 40
X — Y	US 6,019,984 A (MACINNES, J et al) 01 February 2000 (01.02.2000) column 15, claims, brief summary, examples	1-38 39-40
X — Y	US 6,013,266 A (BERGHE, R.P. et al) 11 January 2000 (11.01.2000) especially claims, brief summary, examples, 9-10	1-38 39-40

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family names.

Special categories of cited documents:

* "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

* "T" earlier application or patent published on or after the international filing date

* "L" document which may have priority date(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

* "I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to substantiate the principle or theory underlying the invention

* "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

* "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is considered with one or more other cited documents, each contribution being relevant to a person skilled in the art

* "Z" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

07 July 2005 (07.07.2005)

Date of mailing of the international search report

18 AUG 2005

Name and mailing address of the ISA/US

Mail Stop PCT, Attn: ISA/US
Commissioner for Patents
P.O. Box 1450
Alexandria, Virginia 22313-1450
Finnville No. (703) 872-9306

Authorized officer

Patterson v. Barker

Telephone No. 571-272-1600

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (January 2004)

MARK KAVAROS
PRIMARY EXAMINER

61

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US04/36336

Continuation of B. FIELDS SEARCHED Item 1:

434/234.1, 254.1, 235.1, 186.1, 192.1, 199.1, 98.2; 415/232.33, 243 29, 317.1, 320.1, 325, 6, 69.1, 69.7, 975, 7.2; 514/2; 530/330, 825, 806

Continuation of B. FIELDS SEARCHED Item 3:

MEXLINE, STN, A-GENEBO, N-GENEBO, EST, DERWENT, SWISS-PROT, PIR, USPTOWEST, SWISSPTREMBL, GENEBO, PUBLISHED APPLICATIONS AND ISSUED PATENTS; search terms: Hyaluronidase, chondroitinase, Heparinase and Pepsin or H. peracis, composition, vaccine, adjuvant, method, immune response.

62

The demand must be filed directly with the competent International Preliminary Examining Authority or, if two or more Authorities are competent, with the one chosen by the applicant. The full name or two-letter code of that Authority may be indicated by the applicant on the line below.

IPEA/ US

PCT

CHAPTER II

DEMAND

under Article 31 of the Patent Cooperation Treaty.

The undersigned requests that the international application specified below be the subject of international preliminary examination according to the Patent Cooperation Treaty.

For International Preliminary Examining Authority use only	
Identification of IPFA	Date of receipt of DEMAND
Box No. I IDENTIFICATION OF THE INTERNATIONAL APPLICATION	
Applicant's or agent's file reference 34125-PCT	
International application No. PCT/US2004/038336	International filing date (day/month/year) 29 October 2004 (27.10.04) (Earliest) Priority date (day/month/year) 30 October 30, 2003 (30.10.03)
Title of invention ERYSIPELOTHRIX RHUSIOPATHIAE-HAEMOPHILUS PARASUIS VACCINE AND METHODS OF USING THE SAME	
Box No. II APPLICANT(S)	
Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.) BOEHRINGER INGELHEIM VETMEDICA, INC. 2821 North Belt Highway St. Joseph, MO 64506 US	
Telephone No. Facsimile No. Teleprinter No. Applicant's registration No. with the Office	
State (that is, country) of nationality: US	State (that is, country) of residence: US
Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.) SWART, John Randall 208 Iowa Ave. N.W. Orange City, IA 51041 US	
State (that is, country) of nationality: US	State (that is, country) of residence: US
Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.) VAUGHN, Eric Martin 509 Ash Avenue Ames, IA 50014 US	
State (that is, country) of nationality: US	State (that is, country) of residence: US
☒ Further applicants are indicated on a continuation sheet.	

Form PCT/IPEA/401 (first sheet) (April 2005)

LegalStar 2005, Form PCTDEM

See Notes to the demand form

63

Sheet No. 2.

International application No.

PCT/US2004/036338

Continuation of Box No. II APPLICANT(S)

If none of the following sub-boxes is used, this sheet should not be included in the demand.

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.)

FREXING, Karen E.
112 County Road North
Hospers, IA 51238
US

State (that is, country) of nationality:

US

State (that is, country) of residence:

US

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.)

ROOF, Michael B.
3222 Rupelo Circa
Ames, IA 50014
US

State (that is, country) of nationality:

US

State (that is, country) of residence:

US

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.)

HAYES, Philip Wayne
2778 430 St.
Maurice, IA 51038
US

State (that is, country) of nationality:

US

State (that is, country) of residence:

US

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.)

PHILLIP, Reid C.
7829 Twilight Place
Parkville, MO 64152
US

State (that is, country) of nationality:

US

State (that is, country) of residence:

US

☐ Further applicants are indicated on another continuation sheet.

Sheet No. 3.

International application No.
PCT/US2004/036336**Box No. III AGENT OR COMMON REPRESENTATIVE; OR ADDRESS FOR CORRESPONDENCE**The following person is ☒ agent ☐ common representativeand ☒ has been appointed earlier and represents the applicant(s) also for international preliminary examination.☐ is hereby appointed and any earlier appointment of (an) agent(s)/common representative is hereby revoked.☐ is hereby appointed, specifically for the procedure before the International Preliminary Examining Authority, in addition to the agent(s)/common representative appointed earlier.

Name and address: (Family name followed by given names; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.)

TRUITT, Tracey S.
HOVEY WILLIAMS LLP
2405 Grand Boulevard, Suite 400
Kansas City, MO 64108
US

Telephone No.

818/474-8050

Facsimile No.

818/474-8057

Teleprinter No.

Agent's registration No. with the Office
43,205☐ Address for correspondence: Mark this check-box where no agent or common representative is/has been appointed and the space above is used instead to indicate a special address to which correspondence should be sent.**Box No. IV BASIS FOR INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION**

Statement concerning amendments:*

1. The applicant wishes the international preliminary examination to start on the basis of:

☐ the international application as originally filedthe description ☐ as originally filed☐ as amended under Article 34the claims ☐ as originally filed☐ as amended under Article 19 (together with any accompanying statement)☐ as amended under Article 34the drawings ☐ as originally filed☐ as amended under Article 342. ☐ The applicant wishes any amendment to the claims under Article 19 to be considered as reversed.3. ☒ Where the IPHA wishes to start the international preliminary examination at the same time as the international search in accordance with Rule 69.1(b), the applicant requests the IPHA to postpone the start of the international preliminary examination until the expiration of the applicable time limit under Rule 69.1(d).4. ☐ The applicant expressly wishes the international preliminary examination to start earlier than at the expiration of the applicable time limit under Rule 54bis.1(a).

* Where no check-box is marked, international preliminary examination will start on the basis of the international application as originally filed or, where a copy of amendments to the claims under Article 19 and/or amendments of the international application under Article 34 are received by the International Preliminary Examining Authority before it has begun to draw up a written opinion or the international preliminary examination report, as so amended.

Language for the purposes of international preliminary examination: English☒ which is the language in which the international application was filed;☐ which is the language of a translation furnished for the purposes of international search.☐ which is the language of publication of the international application.☐ which is the language of the translation (to be) furnished for the purposes of international preliminary examination.**Box No. V ELECTION OF STATES**

The filing of this demand constitutes the election of all Contracting States which are designated and are bound by Chapter II of the PCT.

65

Sheet No. 4.	International application No. PCT/US2004/038338																																																		
Box No. VI CHECK LIST																																																			
The demand is accompanied by the following elements, in the language referred to in Box No. IV, for the purposes of international preliminary examination: <table border="0" style="width: 100%;"> <tr> <td style="width: 40%;">1. translation of international application</td> <td style="width: 10%;">:</td> <td style="width: 10%;">sheets</td> <td style="width: 10%;"></td> <td style="width: 10%;"></td> <td style="width: 10%;"></td> </tr> <tr> <td>2. amendments under Article 34</td> <td>:</td> <td>sheets</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>3. copy (or, where required, translation) of amendments under Article 19</td> <td>:</td> <td>sheets</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>4. copy (or, where required, translation) of statement under Article 19</td> <td>:</td> <td>sheets</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>5. letter</td> <td>:</td> <td>sheets</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>6. other (specify)</td> <td>:</td> <td>sheets</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </table>	1. translation of international application	:	sheets				2. amendments under Article 34	:	sheets				3. copy (or, where required, translation) of amendments under Article 19	:	sheets				4. copy (or, where required, translation) of statement under Article 19	:	sheets				5. letter	:	sheets				6. other (specify)	:	sheets				For International Preliminary Examining Authority use only <table border="0" style="width: 100%;"> <tr> <td style="width: 50%; text-align: center;">received</td> <td style="width: 50%; text-align: center;">not received</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">☐</td> <td style="text-align: center;">☐</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">☐</td> <td style="text-align: center;">☐</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">☐</td> <td style="text-align: center;">☐</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">☐</td> <td style="text-align: center;">☐</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">☐</td> <td style="text-align: center;">☐</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">☐</td> <td style="text-align: center;">☐</td> </tr> </table>	received	not received	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
1. translation of international application	:	sheets																																																	
2. amendments under Article 34	:	sheets																																																	
3. copy (or, where required, translation) of amendments under Article 19	:	sheets																																																	
4. copy (or, where required, translation) of statement under Article 19	:	sheets																																																	
5. letter	:	sheets																																																	
6. other (specify)	:	sheets																																																	
received	not received																																																		
☐	☐																																																		
☐	☐																																																		
☐	☐																																																		
☐	☐																																																		
☐	☐																																																		
☐	☐																																																		
The demand is also accompanied by the item(s) marked below: <table border="0" style="width: 100%;"> <tr> <td style="width: 50%;">1. ☒ fee calculation sheet</td> <td style="width: 50%;">5. ☐ statement explaining lack of signature</td> </tr> <tr> <td>2. ☐ original separate power of attorney</td> <td>6. ☐ sequence listing in electronic form</td> </tr> <tr> <td>3. ☐ original general power of attorney</td> <td>7. ☐ tables in electronic form related to a sequence listing</td> </tr> <tr> <td>4. ☐ copy of general power of attorney; reference number, if any:</td> <td>8. ☐ other (specify):</td> </tr> </table>						1. ☒ fee calculation sheet	5. ☐ statement explaining lack of signature	2. ☐ original separate power of attorney	6. ☐ sequence listing in electronic form	3. ☐ original general power of attorney	7. ☐ tables in electronic form related to a sequence listing	4. ☐ copy of general power of attorney; reference number, if any:	8. ☐ other (specify):																																						
1. ☒ fee calculation sheet	5. ☐ statement explaining lack of signature																																																		
2. ☐ original separate power of attorney	6. ☐ sequence listing in electronic form																																																		
3. ☐ original general power of attorney	7. ☐ tables in electronic form related to a sequence listing																																																		
4. ☐ copy of general power of attorney; reference number, if any:	8. ☐ other (specify):																																																		
Box No. VII SIGNATURE OF APPLICANT, AGENT OR COMMON REPRESENTATIVE. <i>Next to each signature, indicate the name of the person signing and the capacity in which the person signs (if such capacity is not obvious from reading the demand)</i>  Tracey S. Trull, Agent																																																			

For International Preliminary Examining Authority use only	
1. Date of actual receipt of DEMAND:	
2. Adjusted date of receipt of demand due to CORRECTIONS under Rule 60.1(b):	
3. ☐ The date of receipt of the demand is AFTER the expiration of 19 months from the priority date and item 4 or 5, below, does not apply. ☐ The applicant has been informed accordingly.	6. ☐ The date of receipt of the demand is AFTER the expiration of the time limit under Rule 54bis.1(a) and item 7 or 8, below, does not apply.
4. ☐ The date of receipt of the demand is WITHIN the time limit of 19 months from the priority date as extended by virtue of Rule 80.5.	7. ☐ The date of receipt of the demand is WITHIN the time limit under Rule 54bis.1(a) as extended by virtue of Rule 80.5.
5. ☐ Although the date of receipt of the demand is after the expiration of 19 months from the priority date, the delay in arrival is EXCUSED pursuant to Rule 82.	8. ☐ Although the date of receipt of the demand is after the expiration of the time limit under Rule 54bis.1(a), the delay in arrival is EXCUSED pursuant to Rule 82.

For International Bureau use only	
Demand received from IPEA on:	

LAW OFFICES
HOVEY WILLIAMS LLP
A LIMITED LIABILITY PARTNERSHIP OF PROFESSIONAL CORPORATIONS
ESTABLISHED 1989
INTELLECTUAL PROPERTY LAW
U.S. & FOREIGN PATENTS, TRADEMARKS, COPYRIGHTS
& UNFAIR COMPETITION CAUSES

Timothy S. Threlk
ts@hoveywilliams.com

October 17, 2005

Commissioner for Patents
PCT
P.O. Box 1450
Alexandria, VA 22313-1450

Re: International PCT Patent Application No. PCT/US2004/036336; Filed October 29, 2005; ERYSIPELOTHRIX RHUSIOPATHIAE-HAEMOPHILUS PARASUIS VACCINE AND METHODS OF USING SAME; Boehringer Ingelheim Vetmedica, Inc.; Inventors: Swart, Vaughn, Freking, Roof, Hayes, and Phillips; Our Docket No. 34125-PCT

AMENDMENT AND ARGUMENTS UNDER ARTICLE 34

Dear Sirs:

A demand for examination under Chapter II was made for the above-referenced application on June 27, 2005. Accordingly, amendments and arguments under Article 34 are appropriate at this time. Replacement sheets, page numbers 18-24a, are included herewith.

Each of the independent claims, 1, 9, 19, 28, and 37 have been amended to specify that the antigen is cell-based. The remainder of the claims have not been amended. However, Applicant notes that new claims 42-51 have been added to further define that the antigen is from whole cells and that the whole cells are inactivated.

Each of the claims, with the exception of claim 41 which appears to have been inadvertently omitted from examination as it appeared on the back page of the published application, were rejected as either anticipated or obvious over U.S. Patent Nos. 6,019,984 to Macinnes et al (Macinnes), 6,013,266 to Sergers et al (Sergers), or U.S. Patent No. 6,342,231 to Burkhardt et al (Burkhardt). Macinnes describes cell-associated antigen from APP toxins. This differs from the newly amended claims which require that the antigen be cell-based. Moreover, Macinnes does not provide any examples of a composition which includes *Erysipelothrix Rhusiopathiae* and *Haemophilus Parasuis*. Accordingly, no efficacy of such a combination is disclosed in Macinnes.

2406 GRAND BOULEVARD SUITE 400 KANSAS CITY, MISSOURI 64108-2519

T 816.474.8060 F 816.474.8067
www.hoveywilliams.com

Commissioner of Patents
PCT
October 17, 2005
Page 2

Sergers discloses APP vaccines based on a live vaccine with a mutation limiting APP RTX toxin production. Again, this vaccine is toxin-based, while the presently claimed vaccine is cell-based. Accordingly, it cannot be said that Sergers anticipates or obviates the present claims.

Finally, Burkhardt discloses a cell-free extract vaccine for *Haemophilus Parasuis* and even notes apparent deficiencies of a bacterin. The present invention is cell-based, and is therefore, a bacterin. This reference also fails to provide any examples of a vaccine which includes antigen from both *Erysipelothrix Rhusiopathiae* and *Haemophilus Parasuis*. Accordingly, it cannot be said that Burkhardt anticipates or obviates the present invention.

Applicants assert that all references and rejections have been overcome by this response and respectfully request that the novelty and inventive step rejections contained in the Written Opinion be withdrawn.

Any additional fee which is due in connection with this amendment should be applied against our Deposit Account No. 19-0522.

Very truly yours,
HOVEY WILLIAMS LLP


By: Tracey S. Truitt
Reg. No. 43,205
HOVEY WILLIAMS LLP
2405 Grand Blvd., Ste. 400
Kansas City, MO 64108

TST/dlr
Enclosure

Membrete de Hovey Williams LLP

17 de octubre de 2005

Comisionado de Patentes
PCT
P.O. Box 1450
Alexandria, VA 22313-1450

Re: Solicitud Internacional de Patente PCT No.
PCT/US2004/036336, Presentada Octubre 29 de 2005; VACUNA
DE ERYSIPELOTHRIX RHUSIOPHATHIAE-HAEMOPHILUS PARASUIS Y
MÉTODOS PARA USAR LA MISMA; Boehringer Ingelheim
Vetmedica, Inc.; Inventores: Swart, Vaughn, Freking, Roof,
Hayes y Phillips; Nuestra Ref. No. 34125-PCT

REFORMA Y ARGUMENTOS SEGÚN EL ARTÍCULO 34

Respetados señores:

El 27 de junio de 2005 se presentó una solicitud de evaluación de conformidad con el Capítulo II para la solicitud de la referencia. Por consiguiente este es el momento oportuno para presentar reformas y argumentos de conformidad con el Artículo 34. Se adjuntan a la presente las hojas de reemplazo con los números de páginas 18 a 24a.

Cada una de las reivindicaciones independientes, 1, 9, 19, 28 y 37 han sido reformadas para especificar que el antígeno es de base celular. Las restantes reivindicaciones no han sido reformadas. Sin embargo el solicitante hace notar que las nuevas reivindicaciones 42 a 51 han sido adicionadas para definir más específicamente que el antígeno proviene de células enteras y que las células enteras se encuentran inactivadas.

Cada una de las reivindicaciones, con la excepción de la reivindicación 41, cuya evaluación parece que fue omitida de manera

inadvertida ya que aparece al respaldo de la publicación de la solicitud, fue rechazada ya sea como anticipada o como obvia según las Patentes de los Estados Unidos Nos. 6,019,984 a favor de Macinnes et al (Macinnes), 6,013,266 a favor de Sergers et al (Sergers) o la Patente de los Estados Unidos No. 6,342,231 a favor de Burkhardt et al (Burkhardt). Macinnes describe un antígeno asociado a las células derivado de toxinas APP. Lo anterior difiere de las reivindicaciones recientemente reformadas en que requieren que el antígeno sea a base de células. Adicionalmente, Macinnes no provee ningún ejemplo de una composición que incluya *Erysipelothrix Rhusiophathiae* y *Haemophilus Parasuis*. Por consiguiente no se divulga la eficacia de dicha combinación en Macinnes.

Sergers divulga vacunas contra APP basadas en una vacuna de virus vivos con una mutación que limita la producción de toxina RTX de APP. Nuevamente mientras que ésta vacuna es a base de toxinas, la vacuna reivindicada en la presente es a base de células. Por consiguiente no se puede decir que Sergers anticipa o hace obvia las presentes reivindicaciones.

Finalmente Burkhardt divulga una vacuna de extracto libre de células para *Haemophilus Parasuis* e inclusive señala aparentes deficiencias de una bacterina. La presente invención tiene es a base de células y es por consiguiente una bacterina. Esta referencia tampoco provee ningún ejemplo de una vacuna que incluya antígenos tanto de *Erysipelothrix Rhusiophathiae* como de *Haemophilus Parasuis*. En consecuencia no se puede afirmar que Buckhardt anticipa o hace obvia la presente invención.

El Solicitante declara que todas las citas y negaciones han sido superadas por esta respuesta y respetuosamente solicita que las objeciones a la novedad y nivel inventivo contenidas en el Concepto Escrito sean retiradas.

Cualquier tasa adicional que deba ser cancelada en relación con esta reforma debe ser cobrada a nuestra Cuenta de Depósito No. 19-0522.

Atentamente,

HOVEY WILLIAMS LLP

Firma Ilegible

Por: Tracey S. Truitt

Reg. No. 43,205

HOVEY WILLIAMS LLP

2405 Grand Blvd., Ste. 400

Kansas City, MO 64108

DVZ//ID-007797/WPCL002G

We claim:

1. A composition comprising:
an amount of cell-based antigen from *Erysipelothrix Rhusiopathiae*;
an amount of cell-based antigen from *Haemophilus Parasuis*; and
an adjuvant.
2. The composition of claim 1, said amount of *Erysipelothrix Rhusiopathiae* antigen in said composition being an amount effective at reducing the risk of developing clinical signs of *Erysipelothrix Rhusiopathiae* infection when administered to an animal susceptible to *Erysipelothrix Rhusiopathiae* infection.
3. The composition of claim 2, said effective amount of *Erysipelothrix Rhusiopathiae* antigen being up to about 5 ml.
4. The composition of claim 1, said amount of antigen from *Haemophilus Parasuis* being an amount effective at reducing the risk of developing clinical signs of *Haemophilus Parasuis* infection when administered to an animal susceptible to *Haemophilus Parasuis* infection.
5. The composition of claim 4, said effective amount of *Haemophilus Parasuis* antigen being up to about 5 ml.

6. The composition of claim 4, said effective amount of *Haemophilus Parasuis* antigen containing at least 1.5×10^7 cfu/dose.
7. The composition of claim 1, said adjuvant having a mineral oil base.
8. The composition of claim 1, said composition being effective at inducing an immune response against infection from a pathogen selected from the group consisting of *Haemophilus Parasuis*, *Erysipelothrix Rhusiopathiae*, and combinations thereof.
9. A vaccine for reducing the risk of developing clinical signs of *Erysipelothrix Rhusiopathiae* infection after a single administration of said vaccine, said vaccine comprising:
an amount of cell-based *Erysipelothrix Rhusiopathiae* antigen; and an adjuvant.
10. The vaccine of claim 9, further comprising an amount of *Haemophilus Parasuis* antigen.
11. The vaccine of claim 9, said amount of *Erysipelothrix Rhusiopathiae* antigen being up to about 5 ml.

12. The vaccine of claim 10, said amount of antigen from *Haemophilus Parasuis* being an amount effective at reducing the risk of developing clinical signs of *Haemophilus Parasuis* infection.
13. The vaccine of claim 10, said amount of *Haemophilus Parasuis* antigen being up to about 5 ml.
14. The vaccine of claim 10, said effective amount of *Haemophilus Parasuis* antigen containing at least 1.5×10^7 cfu/dose.
15. The vaccine of claim 9, said adjuvant having a mineral oil base.
16. The vaccine of claim 9, said vaccine reducing the risk of developing clinical signs of *Erysipelothrix Rhusiopathiae* infection for at least four months following administration.
17. The vaccine of claim 10, said vaccine reducing the risk of developing clinical signs of *Haemophilus Parasuis* infection for at least four months following administration.
18. The vaccine of claim 10, said vaccine being effective at inducing an immune response against infection from a pathogen selected from the group consisting of *Haemophilus Parasuis*, *Erysipelothrix Rhusiopathiae*, and combinations thereof.

19. A method of reducing an animal's risk of developing clinical signs resulting from infection by a pathogen selected from the group consisting of *Haemophilus Parasuis*, *Erysipelothrix Rhusiopathiae*, and combinations thereof comprising the step of:

administering a composition to an animal susceptible to *Haemophilus Parasuis* or *Erysipelothrix Rhusiopathiae* infection, said composition comprising an amount of cell-based antigen from *Erysipelothrix Rhusiopathiae*, an amount of cell-based antigen from *Haemophilus Parasuis*, and an adjuvant.

20. The method of claim 19, said administration step being via an intramuscular injection.

21. The method of claim 19, said amount of *Erysipelothrix Rhusiopathiae* antigen being up to about 5 ml.

22. The method of claim 19, said amount of *Haemophilus Parasuis* antigen being up to about 5 ml.

23. The method of claim 19, said amount of *Haemophilus Parasuis* antigen containing at least 1.5×10^7 cfu/dose.

24. The method of claim 19, said adjuvant having a mineral oil base.

25. The method of claim 19, said animal's reduction of risk of developing clinical signs of *Haemophilus Parasuis* or *Erysipelothrix Rhusiopathiae* infection lasting for at least 132 days.

26. The method of claim 19, said administering step reducing the animal's risk of developing clinical signs from *Haemophilus Parasuis* and *Erysipelothrix Rhusiopathiae* infection.

27. The method of claim 19, further comprising the step of confirming the animal's reduction of risk by challenging the animal with a virulent strain of *Haemophilus Parasuis* or *Erysipelothrix Rhusiopathiae* and monitoring said animal for the development of said clinical signs.

28. A method of inducing an immune response to *Haemophilus Parasuis* or *Erysipelothrix Rhusiopathiae* infection comprising the step of:

administering a composition to an animal susceptible to *Haemophilus Parasuis* or *Erysipelothrix Rhusiopathiae* infection, said composition comprising an amount of cell-based antigen from *Erysipelothrix Rhusiopathiae*, an amount of cell-based antigen from *Haemophilus Parasuis*, and an adjuvant.

29. The method of claim 28, said administration step being via an intramuscular injection.

30. The method of claim 28, said amount of *Erysipelothrix Rhusiopathiae* antigen being up to about 5 ml.

31. The method of claim 28, said amount of *Haemophilus Parasuis* antigen being up to about 5 ml.

32. The method of claim 28, said amount of *Haemophilus Parasuis* antigen containing at least 1.5×10^7 cfu/dose.

33. The method of claim 28, said adjuvant having a mineral oil base.

34. The method of claim 28, said animal's immune response to *Haemophilus Parasuis* or *Erysipelothrix Rhusiopathiae* infection lasting for at least 4 months.

35. The method of claim 28, said administering step inducing an immune response against *Haemophilus Parasuis* and *Erysipelothrix Rhusiopathiae* infection.

36. The method of claim 28, further comprising the step of confirming the animal's immune response by challenging the animal with a virulent strain of *Haemophilus Parasuis* or *Erysipelothrix Rhusiopathiae* and testing for said immune response.

37. A method of preparing a composition comprising the steps of:
preparing a mixture by combining an amount of cell-based antigen from *Haemophilus Parasuis*, and an amount of cell-based antigen from *Erysipelothrix Rhusiopathiae*, and an adjuvant; and emulsifying said mixture.

38. The method of claim 37, said method further comprising the step of inactivating the source of said antigen from *Haemophilus Parasuis* and *Erysipelothrix Rhusiopathiae*.

39. The method of claim 37, said *Haemophilus Parasuis* antigen being derived from strain Z-1517.

40. The method of claim 37, said *Erysipelothrix Rhusiopathiae* antigen being derived from strain SE-9.

41. The method of claim 37, further comprising the step of standardizing said composition to provide known effective amounts of *Haemophilus Parasuis* and *Erysipelothrix Rhusiopathiae* antigen.

42. The composition of claim 1, said cell-based antigen being whole cells from *Haemophilus Parasuis* or *Erysipelothrix Rhusiopathiae*.

43. The composition of claim 42, said whole cells being inactivated.

44. The vaccine of claim 9, said cell-based antigen being whole cells from *Erysipelothrix Rhusiopathiae*.

45. The vaccine of claim 44, said whole cells being inactivated.

46. The method of claim 19, said cell-based antigen being whole cells from *Haemophilus Parasuis* or *Erysipelothrix Rhusiopathiae*.

47. The composition of claim 46, said whole cells being inactivated.

48. The method of claim 28, said cell-based antigen being whole cells from *Haemophilus Parasuis* or *Erysipelothrix Rhusiopathiae*.

49. The composition of claim 48, said whole cells being inactivated.

50. The method of claim 37, said cell-based antigen being whole cells from *Haemophilus Parasuis* or *Erysipelothrix Rhusiopathiae*.

51. The composition of claim 50, said whole cells being inactivated.

REIVINDICACIONES MODIFICADAS

PARA EFECTUAR

EXAMEN DE PATENTABILIDAD

Reivindicaciones modificadas:**1. Una composición que comprende:**

Una cantidad de antígeno de basado en célula de *Erysipelothrix Rhusiopathiae*;

Una cantidad de antígeno basado en célula de *Haemophilus parasuis*; y

Un adyuvante.

2. La composición de la reivindicación 1, dicha cantidad de antígeno de *Erysipelothrix Rhusiopathiae* en dicha composición es una cantidad efectiva para reducir el riesgo de desarrollar signos clínicos de infección de *Erysipelothrix Rhusiopathiae* cuando se administra a un animal susceptible de infección con *Erysipelothrix Rhusiopathiae*.

3. La composición de la reivindicación 2, dicha cantidad efectiva de antígeno de *Erysipelothrix Rhusiopathiae* es hasta de aproximadamente 5 mL.

4. La composición de la reivindicación 1, dicha cantidad de antígeno de *Haemophilus Parasuis* es una cantidad efectiva para reducir el riesgo de desarrollar signos clínicos de infección por *Haemophilus Parasuis* cuando se administra a una animal susceptible a infección con *Haemophilus parasuis*.

5. La composición de la reivindicación 4, dicha cantidad efectiva de antígeno de *Haemophilus parasuis* es hasta de aproximadamente 5 mL.

6. La composición de la reivindicación 4, dicha cantidad efectiva de antígeno de *Haemophilus Parasuis* contiene al menos 1.5×10^7 cfu/dosis.
7. La composición de la reivindicación 1, dicho adyuvante tiene una base de aceite mineral.
8. La composición de la reivindicación 1, dicha composición es efectiva para inducir una respuesta inmune contra infección de un patógeno seleccionado del grupo que consiste de *Haemophilus parasuis*, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, y combinaciones de estos.
9. Una vacuna para reducir los riesgos de desarrollar signos clínicos de infección de *Erysipelothrix rhusiopathiae* después de una administración simple de dicha vacuna, dicha vacuna comprende:

una cantidad de antígeno de *Erysipelothrix Rhusiopathiae* basada en célula; y una adyuvante.
10. La vacuna de la reivindicación 9, que comprende además una cantidad de antígeno de *Haemophilus parasuis*.
11. La vacuna de la reivindicación 9, dicha cantidad de antígeno de *Erysipelothrix Rhusiopathiae* es hasta de aproximadamente 5 mL.
12. La vacuna de la reivindicación 10, dicha cantidad de antígeno de *Haemophilus parasuis* es una cantidad efectiva para reducir el riesgo de desarrollar signos clínicos de infección con *Haemophilus Parasuis*.

13. La vacuna de la reivindicación 10, dicha cantidad de antígeno de *Haemophilus parasuis* es hasta de aproximadamente 5 mL
14. la vacuna de la reivindicación 10, dicha cantidad efectiva de antígeno de *Haemophilus Parasuis* contiene al menos 1.5×10^7 cfu/dosis.
15. La vacuna de la reivindicación 9, dicho adyuvante tiene una base de aceite mineral.
16. La vacuna de la reivindicación 9, dicha vacuna reduce el riesgo de desarrollar signos clínicos de infección con *Erysipelothrix rhusiopathiae* durante al menos cuatro meses luego de la administración.
17. La vacuna de la reivindicación 10, dicha vacuna reduce el riesgo de desarrollar signos clínicos de infección con *Haemophilus parasuis* durante al menos cuatro meses luego de la administración
18. La vacuna de la reivindicación 10, dicha vacuna es efectiva para inducir una respuesta inmune contra infección de un patógeno seleccionado del grupo que consiste de *Haemophilus parasuis*, *Erysipelothrix Rhusiopathiae*, y combinaciones de estos.
19. Una método para reducir el riesgo a un animal de desarrollar signos clínicos que resultan de la infección por un patógeno seleccionado del grupo que consiste de *Haemophilus parasuis*, *Erysipelothrix Rhusiopathiae*, y combinaciones de estos que comprenden la etapa de:

administrar una composición a un animal susceptible de infección con *Haemophilus parasuis* o *Erysipelothrix Rhusiopathiae*, dicha composición comprende una cantidad de antígeno basado en célula de *Erysipelothrix Rhusiopathiae*, una cantidad de antígeno basado en célula de *Haemophilus parasuis*, y un adyuvante.

20. El método de la reivindicación 19, dicha etapa de administración es vía una inyección intramuscular.
21. El método de la reivindicación 19, dicha cantidad de antígeno de *Erysipelothrix Rhusiopathiae* es de hasta aproximadamente 5 mL.
22. El método de la reivindicación 19, dicha cantidad de antígeno de *Haemophilus parasuis* es hasta de aproximadamente 5 mL.
23. El método de la reivindicación 19, dicha cantidad de antígeno de *Haemophilus parasuis*, contiene al menos 1.5×10^7 cfu/dosis.
24. El método de la reivindicación 19, dicho adyuvante tiene una base de aceite mineral.
25. El método de la reivindicación 19, dicha reducción de riesgo al animal de desarrollar signos clínicos de infección con *Haemophilus parasuis* o *Erysipelothrix Rhusiopathiae* dura durante al menos 132 días.

26. El método de la reivindicación 19, dicha etapa de administración reduce el riesgo del animal de desarrollar signos clínicos de infección con *Haemophilus parasuis* y *Erysipelothrix Rhusiopathiae*.

27. El método de la reivindicación 19, que comprende además la etapa de confirmar la reducción del riesgo del animal al infectarse el animal con una sepa virulenta de *Haemophilus parasuis* o *Erysipelothrix Rhusiopathiae*

y monitorear dicho animal para el desarrollo de dichas signos clínicos.

28. Un método que induce una respuesta inmune a infección con *Haemophilus parasuis* o *Erysipelothrix Rhusiopathiae* que comprende la etapa de:

Administrar una composición a un animal susceptible de infección *Haemophilus parasuis* o *Erysipelothrix Rhusiopathiae*, dicha composición comprende una cantidad de antígeno basado en célula de *Erysipelothrix Rhusiopathiae*, una cantidad de antígeno basado en célula de *Haemophilus parasuis*, y un adyuvante.

29. El método de la reivindicación 28, dicha etapa de administración es por vía de una inyección intramuscular.

30. El método de la reivindicación 28, dicha cantidad de antígeno de, *Erysipelothrix Rhusiopathiae*, es hasta de aproximadamente 5 mL

31. El método de la reivindicación 28, dicha cantidad de antígeno de *Haemophilus parasuis*, es hasta de aproximadamente 5 mL.
32. El método de la reivindicación 28, dicha cantidad de antígeno de *Haemophilus parasuis*, contiene al menos 1.5×10^7 cfu/dosis.
33. El método de la reivindicación 28, dicho adyuvante tiene una base de aceite mineral.
34. El método de la reivindicación 28, dicha respuesta inmune del animal a infección *Haemophilus parasuis* o *Erysipelothrix Rhusiopathiae* durante al menos 4 meses.
35. El método de la reivindicación 28, dicha etapa de administración induce una respuesta inmune contra infección con *Haemophilus parasuis* y *Erysipelothrix Rhusiopathiae*.
36. El método de la reivindicación 28, que comprende además la etapa de confirmar la respuesta inmune del animal al infectarse el animal con una sepa virulenta de *Haemophilus parasuis* o *Erysipelothrix Rhusiopathiae* y ensayar dicha respuesta inmune.
37. Un método para preparar una composición que comprende las etapas de:

Preparar una mezcla al combinar una cantidad de antígeno basado en célula de *Haemophilus parasuis*, una cantidad de antígeno basado en

célula de *Erysipelothrix Rhusiopathiae*, y un adyuvante; y emulsificar dicha mezcla.

38. El método de la reivindicación 37, dicho método comprende además la etapa de inactivar la fuente de dicho antígeno de *Haemophilus parasuis* y *Erysipelothrix Rhusiopathiae*.

39. El método de la reivindicación 37, dicho antígeno de *Haemophilus parasuis*, se deriva de la sepa Z-1517.

40. El método de reivindicación 37, dicho antígeno de *Erysipelothrix Rhusiopathiae* se deriva de la sepa SE-9.

41. El método de la reivindicación 37, que comprende además la etapa de estandarizar dicha composición para suministrar cantidades efectivas conocidas de antígeno de *Haemophilus Parasuis*, *Erysipelothrix Rhusiopathiae*.

42. La composición de la reivindicación 1, dicho antígeno basado en célula es de células completas de *Haemophilus Parasuis*, *Erysipelothrix Rhusiopathiae*.

43. La composición de la reivindicación 42, dichas células completas son inactivadas.

44. La vacuna de la reivindicación 9, dicho antígeno basado en célula es de células completas de *Erysipelothrix Rhusiopathiae*.

45. La vacuna de la reivindicación 44, dichas células completas son inactivadas.
46. El método de la reivindicación 19, dicho antígeno basado en célula es de células completas de *Haemophilus parasuis*, *Erysipelothrix Rhusiopathiae*.
47. La composición de la reivindicación 46, dichas células completas son activadas.
48. El método de la reivindicación 28, dicho antígeno basado en célula es de células completas de *Haemophilus parasuis*, *Erysipelothrix Rhusiopathiae*.
49. La composición de la reivindicación 48, dichas células completas son inactivadas.
50. El método de la reivindicación 37, dicho antígeno basado en células es de células completas de *Haemophilus parasuis*, *Erysipelothrix Rhusiopathiae*.
51. La composición de la reivindicación 50, dichas células completas son inactivadas.

89

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 06 - 36,149
FECHA : MAYO 15 DE 2006

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
Rad: 06-050044- -00000-0000
Fec: 2006-05-24 17:36:51 Dep. 2020 NUECREACIONES
Tra. 11 PATENTEIYS
Eje: 376 FASENACIONALI

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CAVELIER ABOGADOS	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	54982575	15/05/2006	47,972,500.00

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

CANT. REMISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1 50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	463,000.00
	TOTAL :	\$ 463,000.00

SON: CUATROCIENTOS SESENTA Y TRES MIL PESOS

RESPONSABLE : 

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

060 15144 8A1 002 7

90



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
Rad: 06-050044-00000-0000
Fec 2006-05-24 17:36:51 Dep. 2020 NUECREACIONES
Trz. 11 PATENTEYS
Ext. 376 FABENACIONAL

**Delegatura de Propiedad Industrial
División de Nuevas Creaciones**

**REQUISITOS NECESARIOS PARA PRESENTACIÓN Y AGILIZACIÓN DEL
TRAMITE**

PCT

PATENTE DE INVENCION	MODELO DE UTILIDAD ()	USUARIO ()	RADICADOR ()
-Indicación de que se solicita la concesión de una patente.	()	()	(X)
-Datos de identificación del solicitante o de la persona que se presenta la solicitud.	()	()	(X)
-Descripción de la invención.	()	()	(X)
-Dibujos de ser estos pertinentes.	()	()	(X)
-Comprobante de Pago de las tasas establecidas.	()	()	(X)
COMPLETA ()	INCOMPLETA ()	()	()

DISEÑO INDUSTRIAL ()			
-Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial.	()	()	()
-Datos de identificación del solicitante o de la persona que se presenta la solicitud.	()	()	()
-Representación gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del Material que incorpora el diseño.	()	()	()
-Comprobante de Pago de las tasas establecidas.	()	()	()
COMPLETA ()	INCOMPLETA ()	()	()

ESQUEMA DE TRAZADO ()			
-Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial.	()	()	()
-Datos de identificación del solicitante o de la persona que se presenta la solicitud.	()	()	()
-Representación gráfica del Esquema Trazado.	()	()	()
-Comprobante de Pago de las tasas establecidas.	()	()	()
COMPLETA ()	INCOMPLETA ()	()	()

Firma Responsable: _____
Fecha: _____

91

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Bogotá,
2020

Doctor(a)
FERRERO EMILIO

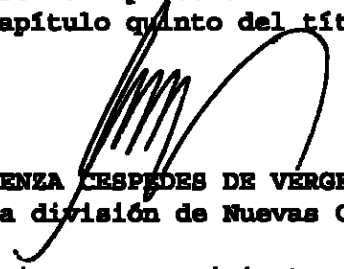
REFERENCIA	Radicación No.	6 50044
	Solicitud internacional	US2004/036336
	Fecha inicio fase nacional	30/05/2006
	Trámite	11
	Evento	379
	Actuación	430
	Oficio No.	8793

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

1. Si fuere el caso, el solicitante debe adjuntar la traducción de los anexos del reporte de examen preliminar internacional (Art. 36.2.b) del tratado PCT.
2. La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante. (Art. 26-k) Decisión 486.
3. La solicitud no contiene el poder debidamente otorgado, con el lleno de los requisitos exigidos por los artículos 63 y subsiguientes del Código de Procedimiento Civil. Adicionalmente, deberá presentar el documento que acredita la existencia y representación legal de la sociedad solicitante, cuando ésta fuere persona jurídica.

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Única No.10 de 2001.


ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL
Jefe de la división de Nuevas Creaciones

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha _____ 11 AGO. 2006
adpa11

~~110708~~