

PETITORIO

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCI

02 082038 00

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO

Radicación : 02082038 00000000

Folios: 78

Fecha (AMB): 2002-09-13 15:43:12

Trámite : 811 PCT-PATENT 379 FASE NACI 411 PRESENTAC

Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

**FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL**

①

SOLICITUD DE:



Patente de Invención



Patente de Modelo de Utilidad



Capítulo I.



Capítulo II.

②

SOLICITANTE
(71)Nombre: PHARMACIA & UPJOHN
COMPANYDirección: 301 Henrietta Street Kalamazoo
Michigan 49001, U.S.A.

Nacionalidad o Domicilio: Michigan, U.S.A.

Lugar de Constitución: Estado de Delaware

Teléfono: 3264270 Fax: 6069701

E-mail: jllcco@lloredacamacho.com

IDENTIFICACION

C.C. ☐NIT ☐C.E. ☐Otro ☐

Cual _____

Número _____

③

REPRESENTANTE
O APODERADO

Nombre: JOSE ANTONIO LLOREDA

Dirección: Calle 72 No. 5-83 Piso 5o.

Teléfono: 3264270 Fax: 6069701

E-mail: jllcco@lloredacamacho.com

C.C. ☒NIT ☐C.E. ☐Otro ☐

Cual _____

Número 17.159.881 TP 10.784

④

INVENTOR(ES)
(72)

Nombre: LOWERY, David; KENNEDY, Michael J.

Dirección: 1207 Woodland Drive, Portage, MI 49024 U.S.A. y 2384 Quincy
Avenue, Portage, MI 49024, U.S.A.

Nacionalidad o Domicilio: U.S.A.

⑤

PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/US01/08042

Fecha: Marzo 13, 2001

Publicación Internacional No. WO 01/70247 A2

Fecha: Septiembre 27, 2001

⑥

Título (54) "MATERIALES Y METODOS PARA LA VACUNA CONTRA LA SALMONELLA"

⑦

Clasificación Internacional (51) A.61K 35/74

⑧

Prioridad

(33) País de Origen

(32) Fecha

(31) Número de Solicitud

SI ☒ NO ☐

US

Marzo 17, 2000

60/190,178

⑨

Comprobante de Pago No. 02-57,015

Fecha: Agosto 28, 2002

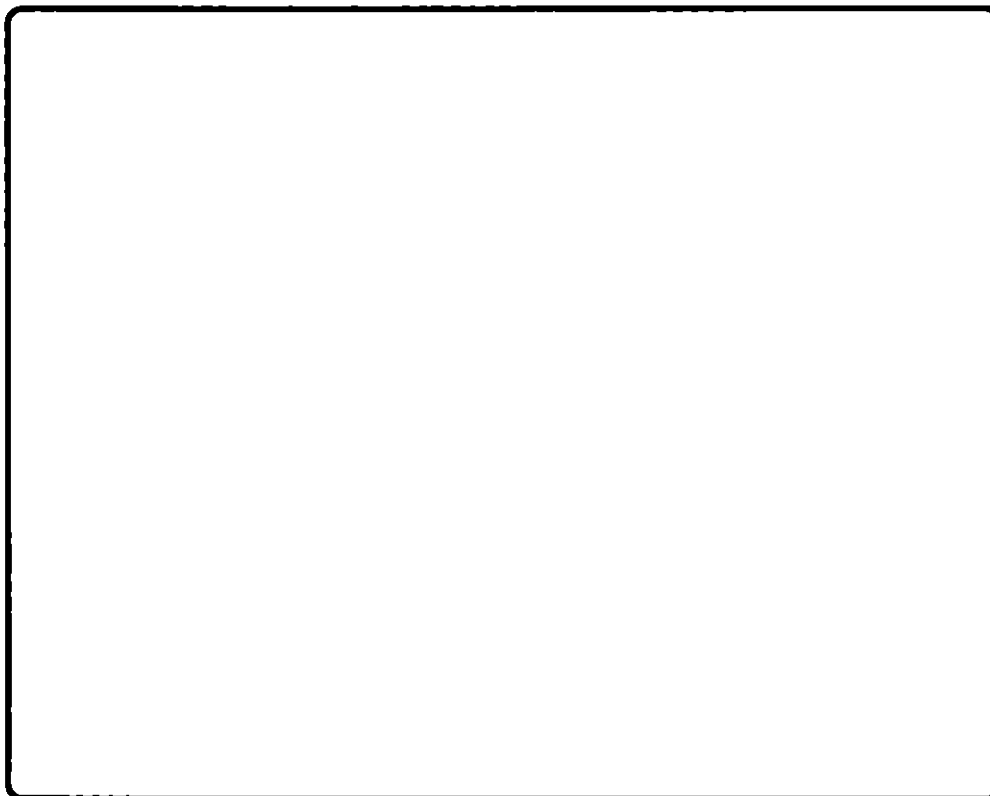
10

ANEXOS

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.
- ☐ Documento que acredite la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- ☒ Documento de Representación Legal. Número de Protocolización 17.109.
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- ☐ Declaraciones
- ☐ Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen Preliminar (IPEA).
- ☒ Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA.
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- ☐ 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, relacionados parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☐ De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.
- ☒ Otros: Informe Búsqueda Preliminar, Publicación con sus traducciones y Dibujos.

11

FIGURA CARACTERISTICA:



12

Solicito la concesión de la patente

NOMBRE: JOSE ANTONIO OLLOREDA

FIRMA:

C.C. 17.459.884-BIA T.P. 10.784



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

NIT : 800176089-2

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO
 Radicación : 2002-09-13 15:43:12 Folios: 78
 Fecha (AMD): 2002-09-13 15:43:12
 Trámite : 011 PCT-PATENT 379 FASE INCI 411 PRESENTAC
 Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 02 - 57,015
 FECHA : AGOSTO 28 DE 2002

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
LLORENDA Y CIA S. A	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	2406993	28/08/2002	2,756,900.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01	SOLICITUDES	
1		TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	378,000.00
		TOTAL :	\$ 378,000.00

SON: TRESCIENTOS SETENTA Y OCHO MIL PESOS

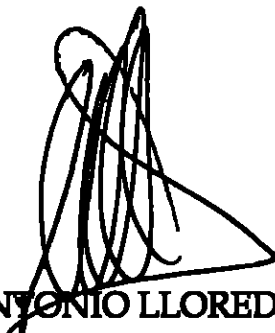
RESPONSABLE :

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

Carrera 13 No. 27-00 Pisos 5, 7 y 10
 Conmutador 382 0840
 Fax 350 5220
 E-mail: info@sic.gov.co
 www.sic.gov.co
 Bogotá, D.C., Colombia

ANEXO

El documento que acredita la calidad REPRESENTANTES LEGALES en Bogotá de los doctores JOSE ANTONIO LLOREDA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o ANGELA MARIA RESTREPO para TODOS LOS ASUNTOS RELACIONADOS CON LA PROPIEDAD INDUSTRIAL de la sociedad peticionaria, que faculta a cada uno de dichos abogados para actuar individualmente, se encuentra protocolizado ante esa División bajo el No. 17.109. En consecuencia, ruego a usted reconocer la personería de cada uno de dichos Representantes Legales para actuar dentro del presente expediente, a fin de que cualquiera de ellos pueda intervenir en cualquier tiempo respecto de la solicitud en él contenida.



JOSE ANTONIO LLOREDA

T.P. No. 10.784

Código 231

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA SEGÚN EL TRATADO DE COOPERACION DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de Propiedad Intelectual
Oficina Internacional



(43) Fecha de Publicación

Septiembre 27, 2001 (27.09.2001)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional

WO 01/70247 A2

(51) Clasificación Internacional de Patentes⁷: A61K 35/74

(21) Número de Solicitud Internacional: PCT/US01/08042

(22) Fecha de Registro Internacional: Marzo 13, 2001 (13.03.2001)

(25) Idioma de registro: Inglés

(26) Idioma de Publicación: Inglés

(30) Información de Prioridad:

60/190,178 Marzo 17, 2000 (17.03.2000) US

(71) Solicitante (para todos los estados designados excepto USA):

PHARMACIA & UPJOHN [US/US]; Global Intellectual
Property, Building 209, Kalamazoo, MI 49001 (US)

(72) Inventores; e

(75) Inventores/Solicitantes (únicamente para USA): LOWERY,
David, E. [US/US]; 1207 Woodland Drive, Portage, MI 49024
(US). KENNEDY, Michael, J. [US/US]; 2364 Quincy
Avenue, Portage, MI 49024 (US).

(74) Agentes: WILLIAMS, Joseph, A., Jr.; Marshall, O'Toole,
Gerstein, Murray & Borun, 6300 Sears Tower, 233 South Wacker
Drive, Chicago, IL 60606 (US).

(81) Estados Designados (nacionales): AE, AG, AI, AM, AT, AU, AZ,
BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK,
DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS,
JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD,
MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE,
SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU,
ZA, ZW.

(84) Estados Designados (regionales): Patente ARIPO (GH, GM, KE,
LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Patente Euroasiática (AM,
AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), Patente Europea (AT, BE, CH,
CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR),
Patente OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR,
NE, SN, TD, TG).

Publicado:

— sin reporte de búsqueda internacional y para ser publicado apenas se
reciba el reporte.

Para los códigos de dos letras y otras abreviaturas, véase a
"Las Notas Gúlas sobre Códigos y Abreviaturas" que aparecen
al comienzo de cada emisión regular de la Gaceta PCT.

(54) Título:

"MATERIALES Y METODOS PARA LA VACUNA CONTRA LA SALMONELLA"

(57) Resumen:

Se suministran bacterias atenuadas mutantes de *Salmonella* que contienen genes inactivados de virulencia,
para ser usadas en vacunas seguras y eficaces.

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

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



INTERNATIONAL PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(43) International Publication Date
27 September 2001 (27.09.2001)

PCT

(10) International Publication Number
WO 01/70247 A2

- (51) International Patent Classification: A61K 35/74, 39/112
- (21) International Application Number: PCT/US01/08042
- (22) International Filing Date: 13 March 2001 (13.03.2001)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 60/190,178 17 March 2000 (17.03.2000) US
- (71) Applicant (for all designated States except US): PHARMACIA & UPJOHN [US/US]; Global Intellectual Property, Building 309, Kalamazoo, MI 49001 (US).
- (72) Inventors; and
- (75) Inventors/Applicants (for US only): LOWERY, David, E. [US/US]; 1207 Woodland Drive, Portage, MI 49024 (US). KENNEDY, Michael, J. [US/US]; 2364 Quincy Avenue, Portage, MI 49024 (US).
- (74) Agent: WILLIAMS, Joseph, A., Jr.; Marshall, O'Toole, Gerstein, Murray & Borun, 6300 Sears Tower, 233 South Wacker Drive, Chicago, IL 60606 (US).
- (81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Published:
— without international search report and to be republished upon receipt of that report
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 01/70247 A2

(54) Title: SALMONELLA VACCINE MATERIALS AND METHODS

(57) Abstract: Attenuated mutant *Salmonella* bacteria containing inactivated virulence genes are provided for use in safe, efficacious vaccines.

PCT

REQUEST

The undersigned requests that the present international application be processed according to the Patent Cooperation Treaty.

For receiving Office use only

International Application No.

International Filing Date

Name of receiving Office and "PCT International Application"

Applicant's or agent's file reference
(if desired) (12 characters maximum) 28341/6114.P

Box No. I TITLE OF INVENTION
SALMONELLA VACCINE MATERIALS AND METHODS

Box No. II APPLICANT

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. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)

PHARMACIA & UPJOHN
Global Intellectual Property
Building 209
Kalamazoo, Michigan 49001
United States of America

☐ This person is also inventor.

Telephone No.
(816) 833-4000

Facsimile No.
(816) 833-8897

Teleprinter No.

State (that is, country) of nationality:
US

State (that is, country) of residence:
US

This person is applicant for the purposes of: ☐ all designated States ☒ all designated States except the United States of America ☐ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box

Box No. III FURTHER APPLICANT(S) AND/OR (FURTHER) INVENTOR(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. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)

LOWERY, David E.
1207 woodland Drive
Portage, Michigan 49024
United States of America

This person is:

☐ applicant only

☒ applicant and inventor

☐ inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.)

State (that is, country) of nationality:
US

State (that is, country) of residence:
US

This person is applicant for the purposes of: ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☒ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box

☒ Further applicants and/or (further) inventors are indicated on a continuation sheet.

Box No. IV AGENT OR COMMON REPRESENTATIVE; OR ADDRESS FOR CORRESPONDENCE

The person identified below is hereby/has been appointed to act on behalf of the applicant(s) before the competent International Authorities as:

☒ agent ☐ common representative

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.)

WILLIAMS, Jr., Joseph A.
MARSHALL, O'TOOLE, GERSTEIN, MURRAY & BORUN
6300 Sears Tower
233 South Wacker Drive
Chicago, Illinois 60606
United States of America

Telephone No.
(312) 474-6300

Facsimile No.
(312) 474-0448

Teleprinter No.

☐ 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.

Continuation of Box No. III FURTHER APPLICANTS AND/OR (FURTHER) INVENTOR(S)

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

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. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)
KENNEDY, Michael J.
2384 Quincy Avenue
Portage, Michigan 49024
United States of America

This person is:

- ☐ applicant only
☒ applicant and inventor
☐ inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.)

State (that is, country) of nationality:

State (that is, country) of residence:

This person is applicant for the purposes of: ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☒ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box

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. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)

This person is:

- ☐ applicant only
☐ applicant and inventor
☐ inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.)

State (that is, country) of nationality:

State (that is, country) of residence:

This person is applicant for the purposes of: ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☐ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box

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. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)

This person is:

- ☐ applicant only
☐ applicant and inventor
☐ inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.)

State (that is, country) of nationality:

State (that is, country) of residence:

This person is applicant for the purposes of: ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☐ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box

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. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)

This person is:

- ☐ applicant only
☐ applicant and inventor
☐ inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.)

State (that is, country) of nationality:

State (that is, country) of residence:

This person is applicant for the purposes of: ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☐ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box

☐ Further applicants and/or (further) inventors are indicated on another continuation sheet.

Box No.V DESIGNATION OF STATES

The following designations are hereby made under Rule 4.9(a) (mark the applicable check-boxes; at least one must be marked):

Regional Patent

- ☒ **AP ARIPO Patent:** GH Ghana, GM Gambia, KE Kenya, LS Lesotho, MW Malawi, MZ Mozambique, SD Sudan, SL Sierra Leone, SZ Swaziland, TZ United Republic of Tanzania, UG Uganda, ZW Zimbabwe, and any other State which is a Contracting State of the Harare Protocol and of the PCT
- ☒ **EA Eurasian Patent:** AM Armenia, AZ Azerbaijan, BY Belarus, KG Kyrgyzstan, KZ Kazakhstan, MD Republic of Moldova, RU Russian Federation, TJ Tajikistan, TM Turkmenistan, and any other State which is a Contracting State of the Eurasian Patent Convention and of the PCT
- ☒ **EP European Patent:** AT Austria, BE Belgium, CH and LI Switzerland and Liechtenstein, CY Cyprus, DE Germany, DK Denmark, ES Spain, FI Finland, FR France, GB United Kingdom, GR Greece, IE Ireland, IT Italy, LU Luxembourg, MC Monaco, NL Netherlands, PT Portugal, SE Sweden, and any other State which is a Contracting State of the European Patent Convention and of the PCT
- ☒ **OA OAPI Patent:** BF Burkina Faso, BJ Benin, CF Central African Republic, CG Congo, CI Côte d'Ivoire, CM Cameroon, GA Gabon, GN Guinea, GW Guinea-Bissau, ML Mali, MR Mauritania, NE Niger, SN Senegal, TD Chad, TG Togo, and any other State which is a member State of OAPI and a Contracting State of the PCT (if other kind of protection or treatment desired, specify on dotted line)

National Patent (if other kind of protection or treatment desired, specify on dotted line):

- | | |
|--|--|
| ☒ AE United Arab Emirates | ☒ LC Saint Lucia |
| ☒ AG Antigua and Barbuda | ☒ LK Sri Lanka |
| ☒ AL Albania | ☒ LR Liberia |
| ☒ AM Armenia | ☒ LS Lesotho |
| ☒ AT Austria | ☒ LT Lithuania |
| ☒ AU Australia | ☒ LU Luxembourg |
| ☒ AZ Azerbaijan | ☒ LV Latvia |
| ☒ BA Bosnia and Herzegovina | ☒ MA Morocco |
| ☒ BB Barbados | ☒ MD Republic of Moldova |
| ☒ BG Bulgaria | ☒ MG Madagascar |
| ☒ BR Brazil | ☒ MK The former Yugoslav Republic of Macedonia |
| ☒ BY Belarus | ☒ MN Mongolia |
| ☒ BZ Belize | ☒ MW Malawi |
| ☒ CA Canada | ☒ MX Mexico |
| ☒ CH and LI Switzerland and Liechtenstein | ☒ MZ Mozambique |
| ☒ CN China | ☒ NO Norway |
| ☒ CR Costa Rica | ☒ NZ New Zealand |
| ☒ CU Cuba | ☒ PL Poland |
| ☒ CZ Czech Republic | ☒ PT Portugal |
| ☒ DE Germany | ☒ RO Romania |
| ☒ DK Denmark | ☒ RU Russian Federation |
| ☒ DM Dominica | ☒ SD Sudan |
| ☒ DZ Algeria | ☒ SE Sweden |
| ☒ EE Estonia | ☒ SG Singapore |
| ☒ ES Spain | ☒ SI Slovenia |
| ☒ FI Finland | ☒ SK Slovakia |
| ☒ GB United Kingdom | ☒ SL Sierra Leone |
| ☒ GD Grenada | ☒ TJ Tajikistan |
| ☒ GE Georgia | ☒ TM Turkmenistan |
| ☒ GH Ghana | ☒ TR Turkey |
| ☒ GM Gambia | ☒ TT Trinidad and Tobago |
| ☒ HR Croatia | ☒ TZ United Republic of Tanzania |
| ☒ HU Hungary | ☒ UA Ukraine |
| ☒ ID Indonesia | ☒ UG Uganda |
| ☒ IL Israel | ☒ US United States of America |
| ☒ IN India | ☒ UZ Uzbekistan |
| ☒ IS Iceland | ☒ VN Viet Nam |
| ☒ JP Japan | ☒ YU Yugoslavia |
| ☒ KE Kenya | ☒ ZA South Africa |
| ☒ KG Kyrgyzstan | ☒ ZW Zimbabwe |
| ☒ KP Democratic People's Republic of Korea | |
| ☒ KR Republic of Korea | |
| ☒ KZ Kazakhstan | |

Check-boxes reserved for designating States which have become party to the PCT after issuance of this sheet:

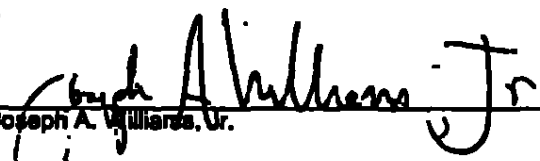
☒ CO Colombia

Precautionary Designation Statement: In addition to the designations made above, the applicant also makes under Rule 4.9(b) all other designations which would be permitted under the PCT except any designation(s) indicated in the Supplemental Box as being excluded from the scope of this statement. The applicant declares that those additional designations are subject to confirmation and that any designation which is not confirmed before the expiration of 15 months from the priority date is to be regarded as withdrawn by the applicant at the expiration of that time limit. (Confirmation (including fees) must reach the receiving Office within the 15-month time limit.)

Box No. VI PRIORITY CLAIM		☐ Further priority claims are indicated in the Supplemental Box.	
Filing date of earlier application (day/month/year)	Number of earlier application	Where earlier application is	
		national application: country	regional application: regional Office
item (1) 17.03.2000 17 March 2000	80/190,178	US	
item (2)			
item (3)			
☒ The receiving Office is requested to prepare and transmit to the International Bureau a certified copy of the earlier application(s) <i>only if the earlier application was filed with the Office which for the purposes of the present international application is the receiving Office</i> identified above as item(s). (1)			
* Where the earlier application is an ARIPO application, it is mandatory to indicate in the Supplemental Box at least one country party to the Paris Convention for the Protection of Industrial Property for which that earlier application was filed (Rule 4.10(b)(ii)). See Supplemental Box.			

Box No. VII INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY		
Choice of International Searching Authority (ISA) <i>(if two or more International Searching Authorities are competent to carry out the international search, indicate the Authority chosen; the two-letter code may be used):</i>	Request to use results of earlier search: reference to that search <i>(if an earlier search has been carried out by or requested from the International Searching Authority)</i>	
ISA/EP	Date (day/month/year)	Number (Country (or regional Office))

Box No. VIII CHECK LIST: LANGUAGE OF FILING	
This international application contains the following number of sheets:	This international application is accompanied by the item(s) marked below:
request : 4	1. ☒ fee calculation sheet
description (excluding sequence listing part) : 38	2. ☐ separate signed power of attorney
claims : 4	3. ☒ copy of general power of attorney; reference number, if any:
abstract : 1	4. ☐ statement explaining lack of signature
drawings : 4	5. ☐ priority document(s) identified in Box No. VI as item(s):
sequence listing part of description : 11	6. ☐ translation of international application into (language):
Total number of sheets : 62	7. ☐ separate indications concerning deposited microorganism or other biological material
	8. ☒ nucleotide and/or amino acid sequence listing in computer readable form
	9. ☒ other (specify): Postcard; Sequence Statement
Figure of the drawings which should accompany the abstract:	Language of filing of the international application: English

Box No. IX SIGNATURE OF APPLICANT OR AGENT	
<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 request).</i>	
 Joseph A. Williams, Jr.	Date: March 13, 2001

For receiving Office use only	
1. Date of actual receipt of the purported international application:	2. Drawings:
3. Corrected date of actual receipt due to later but timely received papers or drawings completing the purported international application:	☐ received:
4. Date of timely receipt of the required corrections under PCT Article 11(2):	☐ not received:
5. International Searching Authority (if two or more are competent): ISA/	6. ☐ Transmittal of search copy delayed until search fee is paid.

For International Bureau use only	
Date of receipt of the record copy by the International Bureau:	

13
10

PCT

FEE CALCULATION SHEET

Annex to the Request

For receiving Office use only

International application No.

Date stamp of the receiving Office

Applicant's or agent's
file reference

28341/8114.P

Applicant

PHARMACIA & UPJOHN

CALCULATION OF PRESCRIBED FEES

1. TRANSMITTAL FEE 240.00 T

2. SEARCH FEE 848.00 S

International search to be carried out by EP

(If two or more International Searching Authorities are competent in relation to the international application, indicate the name of the Authority which is chosen to carry out the international search.)

3. INTERNATIONAL FEE

Basic Fee

The international application contains 53 sheets.

first 30 sheets 382.00 b1

23 x \$9.00 = 207.00 b2
remaining sheets additional amount

Add amounts entered at b1 and b2 and enter total at B 589.00 B

Designation Fees

The international application contains 92 designations.

8 x 82.00 = 492.00 D

number of designation fees amount of designation fee payable (maximum 6)

Add amounts entered at B and D and enter total at I 1,081.00 I

(Applicants from certain States are entitled to a reduction of 75% of the international fee. Where the applicant is (or all applicants are) so entitled, the

4. FEE FOR PRIORITY DOCUMENT (if applicable) 15.00 P

5. TOTAL FEES PAYABLE 2,182.00

Add amounts entered at T, S, I and P, and enter total in the TOTAL box

TOTAL

☐ The designation fees are not paid at this time.

MODE OF PAYMENT

☐ authorization to charge
deposit account (see below)

☐ bank draft

☐ coupons

☒ cheque

☐ cash

☐ other (specify):

☐ postal money order

☐ revenue stamps

DEPOSIT ACCOUNT AUTHORIZATION (this mode of payment may not be available at all receiving Offices)

The RO/ US ☐ is hereby authorized to charge the total fees indicated above to my deposit account.

☒ (this check-box may be marked only if the conditions for deposit accounts of the receiving Office so permit) hereby authorized to charge any deficiency or credit any overpayment in the total fees indicated above to my deposit account.

☒ is hereby authorized to charge the fee for preparation and transmittal of the priority document to the International Bureau of WIPO to my deposit account.

13-2855

13 March 2001

Deposit Account No.

Date (day/month/year)

Signature

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF THE RECORDING
OF A CHANGE(PCT Rule 92bis.1 and
Administrative Instructions, Section 422)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

WILLIAMS, Joseph, A., Jr.
Marshall, O'Toole, Gerstein,
Murray & Borun
6300 Sears Tower
233 South Wacker Drive
Chicago, IL 60606
ETATS-UNIS D'AMERIQUERECEIVED
MAR 13 2001
MARSHALL O'TOOLE GERSTEIN

Date of mailing (day/month/year) 02 November 2001 (02.11.01)	IMPORTANT NOTIFICATION
Applicant's or agent's file reference 28341/6114.P	
International application No. PCT/US01/08042	International filing date (day/month/year) 13 March 2001 (13.03.01)

1. The following indications appeared on record concerning:

☒ the applicant ☐ the inventor ☐ the agent ☐ the common representative

Name and Address

PHARMACIA & UPJOHN
Global Intellectual Property
Building 209
Kalamazoo, MI 49001
United States of America

State of Nationality

US

State of Residence

US

Telephone No.

Facsimile No.

Teleprinter No.

2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:

☐ the person ☒ the name ☒ the address ☐ the nationality ☐ the residence

Name and Address

PHARMACIA & UPJOHN COMPANY
301 Henrietta Street
Kalamazoo, MI 49001
United States of America

State of Nationality

US

State of Residence

US

Telephone No.

Facsimile No.

Teleprinter No.

3. Further observations, if necessary:

4. A copy of this notification has been sent to:

☒ the receiving Office	☒ the designated Offices concerned
☐ the International Searching Authority	☐ the elected Offices concerned
☐ the International Preliminary Examining Authority	☐ other:

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

Facsimile No.: (41-22) 740.14.35

Authorized officer

Ingrid AULICH

Telephone No.: (41-22) 338.83.38

TRATADO DE COOPERACION DE PATENTES
PCT
REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

(PCT Artículo 18 y Reglas 43 y 44)

Registro de referencia del solicitante o agente 28341/6114.P	PARA FUTURAS ACCIONES ver Notificación o Transmisión del Reporte de Búsqueda Internacional (Forma PCT/ISA/220) así como, donde aplique, el ítem 5 a continuación.	
Solicitud internacional No. PCT/US01/08042	Fecha de registro internacional (día/mes/año) 13/03/2001	Fecha de Prioridad (Primera) (día/mes/año) 17/03/2000
Solicitante PHARMACIA & UPJOHN et al.		

Este Reporte de Búsqueda Internacional ha sido preparado por esta Autoridad de Búsqueda Internacional y es transmitido al solicitante según el Artículo 18. Una copia será transmitida a la Oficina Internacional.

Este Reporte de Búsqueda Internacional consta de un total de 4 hojas.

☒ También está acompañado de una copia de cada documento técnico anterior citado en este reporte.

I. Bases del reporte

a. Respecto al lenguaje, la búsqueda internacional se llevó a cabo según la solicitud internacional en el lenguaje en el cual se presentó, a menos que se indique de otro modo en este ítem.

☐ la búsqueda internacional se llevó a cabo según la traducción de la solicitud internacional proporcionada a esta Autoridad (Regla 23.1(b)).

b. Respecto a una secuencia de ácido nucleótico y/o amino revelado en la solicitud internacional, la búsqueda internacional se llevó a cabo según la lista de la secuencia:

☒ contenido en la solicitud internacional en forma escrita.

☒ presentada junto con la solicitud internacional en forma legible por computador.

☐ proporcionada subsecuentemente a esta Autoridad en forma escrita.

☐ proporcionada subsecuentemente a esta Autoridad en forma legible por computador.

☐ se ha proporcionado la afirmación de que el listado de secuencias escrito proporcionado subsecuentemente no va más allá de la revelación en la solicitud internacional según se presentó.

☐ se ha proporcionado la afirmación de que la información registrada en forma legible por computador es idéntica al listado de la secuencia escrita.

2. ☒ Ciertas reivindicaciones no pudieron localizarse (Ver Casilla I).

3. ☐ Falta unidad de invención (ver Casilla II).

4. Respecto al título,

☒ El texto es aprobado según lo presenta el solicitante.

☐ Esta Autoridad ha establecido que el texto se lee así:

5. Respecto al resumen,

☒ El texto es aprobado según lo presenta el solicitante.

☐ Esta Autoridad ha establecido el texto de acuerdo con la Norma 38.2(b), según aparece en el Recuadro III. El solicitante puede, un mes después de la fecha de haber enviado por correo este reporte de búsqueda internacional, presentar comentarios a esta Autoridad.

6. La figura de los dibujos que se publicará con el resumen es la Figura No.

☐ como lo sugirió el solicitante.

☐ porque el solicitante no sugirió una figura.

☐ porque esta figura caracteriza mejor a la invención.

☒ Ninguna de las figuras.

15
13

REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud Internacional No.
 PCT/US01/09042

A. CLASIFICACION DE MATERIA IPC7: A61K 35/74 A61K 39/112 Según la Clasificación de Patentes Internacional (CPI) o según la clasificación nacional y la CPI		
B. CAMPOS BUSCADOS Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de símbolos de clasificación) IPC7: C07K A61K Documentación buscada fuera de documentación mínima hasta donde dichos documentos se incluyan en los campos buscados Base de datos electrónica consultada durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, donde sea práctico, buscar términos usados) EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, CHEM ABS Data, EMBASE		
C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES		
Categoría *	Citación de documento, con indicación, donde sea apropiado, de los textos relevantes	Relevante a la reivindicación No.
A	WO 00 14240 A (GUZMAN CARLOS ALBERTO; apfel heiko (DE); HENSEL MICHAEL (DE); HUEC) Marzo 16, 2000 (2000-03-16) página 52, línea 15 - línea 19 resumen	1-28
A	HENSEL M ET AL: "FUNCTIONAL ANALYSIS OF SSAJ AND THE SSAK/U OPERON, 13 GENES ENCODING COMPONENTS OF THE TYPE III SECRETION APPARATUS OF SALMONELLA PATHOGENICITY ISLAND 2" MOLECULAR MICROBIOLOGY, BLACKWELL SCIENTIFIC, OXFORD, GB, vol. 24, no. 1, Abril 1997 (1997-04), páginas 155-167, XP000906797 ISSN: 0950-382X página 156, columna de la izquierda, párrafo 1	1-28
☐ En el recuadro C se enumeran más documentos. ☒ En el anexo se enumeran miembros de la familia de patentes.		
* Categorías especiales de documentos citados: 'A' documento que define el estado general de la técnica el cual no se considera de relevancia particular 'B' documento anterior pero publicado en o después de la fecha de presentación internacional 'L' documento que puede arrojar dudas sobre reivindicaciones de prioridad o que se cita para establecer la fecha de publicación de otra citación u otra razón especial (según se especifica) 'O' documento que se refiere a una revelación oral, uso, exhibición u otros medios 'P' documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero después de la fecha de prioridad reivindicada 'T' documento posterior publicado después de la fecha de presentación internacional o fecha de prioridad y que no está en conflicto con la solicitud pero citado para entender el principio o teoría que sustenta la invención 'X' documento de relevancia particular; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o no puede considerarse que comprende un paso inventivo cuando el documento se toma solo 'Y' documento de relevancia particular; la invención reivindicada no puede considerarse que comprende un paso inventivo cuando el documento se combina con uno o más documentos, siendo dicha combinación obvia para una persona experta en la técnica 'Z' documento miembro de la misma familia de patentes		
Fecha de la terminación real de la búsqueda internacional Septiembre 28, 2001		Fecha de envío por correo del reporte de búsqueda internacional 08/10/2001
Nombre y dirección de correo de ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL-2280 HV Rijswijk Tel. No. (+31-70) 340-2040 Tx. 31 651 epo nl. Fax No. (+31-70) 340-3016		Funcionario autorizado Mata Vicente, T.

REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud Internacional No.
PCT/US01/08042

Casilla I Observaciones donde ciertas reivindicaciones fueron inescrutables (Continuación del ítem 1 de la primera hoja)

Este informe de búsqueda internacional no ha sido establecido respecto a ciertas reivindicaciones bajo el Artículo 17(2)(a) por las siguientes razones:

1. ☒ Reivindicaciones Nos.:
porque se relacionan con un asunto que no es necesario que esta Autoridad busque, a saber:
Las reivindicaciones 15-28 se refieren a métodos para tratamiento del cuerpo humano o animal, la búsqueda ha sido basada en supuestos efectos de los compuestos/composiciones.
2. ☐ Reivindicaciones Nos.:
porque se relacionan con partes de la solicitud internacional que no cumplen con los requisitos prescritos hasta tal grado que no se puede llevar a cabo una búsqueda internacional significativa, específicamente:
3. ☐ Reivindicaciones No.:
porque son reivindicaciones dependientes y no están diseñadas de acuerdo con la segunda y tercera oración de la Norma 6.4(a).

Casilla II Observaciones donde falta unidad de invención (Continuación del ítem 2 de la primera hoja)

Esta Autoridad de Búsqueda Internacional encontró invenciones múltiples en esta solicitud internacional, así:

1. ☐ Puesto que todos los derechos de búsqueda adicionales requeridos fueron pagados oportunamente por el solicitante, este informe de búsqueda internacional cubre todas las reivindicaciones investigables.
2. ☐ Puesto que todas las reivindicaciones investigables pudieron investigarse sin esfuerzo que justifique derechos adicionales, esta Autoridad no solicitó pago de derechos adicionales.
3. ☐ Puesto que sólo algunos de los derechos de búsqueda adicionales fueron pagados oportunamente por el solicitante, este informe de búsqueda internacional cubre únicamente aquellas reivindicaciones para las cuales se pagaron derechos, específicamente las reivindicaciones Nos.:
4. ☐ El solicitante no pagó oportunamente los derechos de búsqueda adicionales requeridos. Por consiguiente, este informe de búsqueda internacional se restringe a la primera invención mencionada en las reivindicaciones; está cubierto por las reivindicaciones Nos.:

- Comentario sobre Protesta
- ☐ Los derechos de búsqueda adicionales estuvieron acompañados por la protesta del solicitante.
 - ☐ El pago de los derechos de búsqueda adicionales no estuvo acompañado por una protesta.

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference 28341/6114.P	FOR FURTHER ACTION see Notification of Transmittal of International Search Report (Form PCT/ISA/220) as well as, where applicable, item 5 below.	
International application No. PCT/US 01/08042	International filing date (day/month/year) 13/03/2001	(Earliest) Priority Date (day/month/year) 17/03/2000
Applicant PHARMACIA & UPJOHN et al.		

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

This International Search Report consists of a total of 4 sheets.
☒ It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1. Basis of the report

- a. With regard to the language, the international search was carried out on the basis of the international application in the language in which it was filed, 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 sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of the sequence listing:
- ☒ contained in the international application in written form.
- ☒ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ the statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☐ the statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

2. ☒ Certain claims were found unsearchable (See Box I).

3. ☐ Unity of invention is lacking (see Box II).

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 III. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority.

6. The figure of the drawings to be published with the abstract is Figure No.

- ☐ as suggested by the applicant.
- ☐ because the applicant failed to suggest a figure.
- ☐ because this figure better characterizes the invention.
- ☒ None of the figures.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

17-20

International Application No
PCT/US 01/08042

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 A61K35/74 A61K39/112

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C07K A61K

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

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

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, CHEM ABS Data, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 00 14240 A (GUZMAN CARLOS ALBERTO ;APFEL HEIKO (DE); HENSEL MICHAEL (DE); HUEC) 16 March 2000 (2000-03-16) page 52, line 15 - line 19 abstract	1-28
A	HENSEL M ET AL: "FUNCTIONAL ANALYSIS OF SSAJ AND THE SSAK/U OPERON, 13 GENES ENCODING COMPONENTS OF THE TYPE III SECRETION APPARATUS OF SALMONELLA PATHOGENICITY ISLAND 2" MOLECULAR MICROBIOLOGY, BLACKWELL SCIENTIFIC, OXFORD, GB, vol. 24, no. 1, April 1997 (1997-04), pages 155-167, XP000906797 ISSN: 0950-382X page 156, left-hand column, paragraph 1	1-28

☐ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

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

E earlier document but published on or after the international filing date

L document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

O document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

P document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

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

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

Z document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

28 September 2001

Date of mailing of the international search report

08/10/2001

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl
Fax (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Mata Vicente, T.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 01/08042

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)

The International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Although claims 15-28 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this International application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

The demand must be filed directly with the competent International Preliminary Examining Authority or, if two or more authorities are 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 IPEA/ EP

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 and hereby elects all eligible States (except where otherwise indicated).

For International Preliminary Examining Authority use only			
Identification of IPEA		Date of receipt of DEMAND	
Box No. I IDENTIFICATION OF THE INTERNATIONAL APPLICATION		Applicant's or agent's file reference 28341/8114.P	
International application No. PCT/US01/08042	International filing date (day/month/year) 13 March 2001 (13/03/01)	(Earliest) Priority date (day/month/year) 17 March 2000 (17/03/00)	
Title of invention SALMONELLA VACCINE MATERIALS AND METHODS			
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.) PHARMACIA & UPJOHN COMPANY 301 Henrietta Street Kalamazoo, Michigan 49001 United States of America		Telephone No. (616) 833-4000	
		Facsimile No. (616) 833-8897	
		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.) LOWERY, David E. 1207 Woodland Drive Portage, Michigan 49024 United States of America			
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.) KENNEDY, Michael J. 2364 Quincy Avenue Portage, Michigan 49024 United States of America			
State (that is, country) of nationality: US		State (that is, country) of residence: US	
☐ Further applicants are indicated on a continuation sheet.			

Box No. III AGENT OR COMMON REPRESENTATIVE: OR ADDRESS FOR CORRESPONDENCE

The following person is ☒ agent ☐ common representative
and ☒ 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 name; for a legal entity, full official
The address must include postal code and name of country.)

MERKEL, William K.
MARSHALL, GERSTEIN & BORUN
6300 Sears Tower
233 South Wacker Drive
Chicago, Illinois 60606-6402
United States of America

Telephone No.
(312) 474-6300

Facsimile No.
(312) 474-0448

Teleprinter No.

Agent's registration No. with the Office
40,725

☐ 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 filed.

the description ☒ as originally filed
☐ as amended under Article 34

the claims ☒ as originally filed
☐ as amended under Article 19 (together with any accompanying statement)
☐ as amended under Article 34

the drawings ☒ as originally filed
☐ as amended under Article 34

2. ☐ The applicant wishes any amendment to the claims under Article 19 to be considered as reversed.

3. ☐ The applicant wishes the start of the international preliminary examination to be postponed until the expiration of 20 months from the priority date unless the International Preliminary Examining Authority receives a copy of any amendments made under Article 19 or a notice from the applicant that he does not wish to make such amendments (Rule 69.1(d)). (This check-box may be marked only where the time limit under Article 19 has not yet expired.)

* 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 applicant hereby elects all eligible States (that is, all States which have been designated and which are bound by Chapter II of the PCT)

excluding the following States which the applicant wishes not to elect:

Sheet No. 3

International application No.

PCT/US01/08042

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:

- | | | |
|--|---|--------|
| 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

received not received

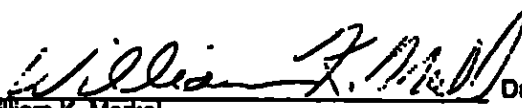
☐	☐
☐	☐
☐	☐
☐	☐
☐	☐
☐	☐

The demand is also accompanied by the item(s) marked below:

- | | |
|--|--|
| 1. ☒ fee calculation sheet | 5. ☐ statement explaining lack of signature |
| 2. ☐ original separate power of attorney | 6. ☐ sequence listing in computer readable form |
| 3. ☐ original general power of attorney | 7. ☐ other (specify): |
| 4. ☐ copy of general power of attorney; reference number, if any: | |

Box No. VII SIGNATURE OF APPLICANT, AGENT OR COMMON REPRESENTATIVE

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).

 Date: 27 September 2001
William K. Merkel

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. |
| 4. ☐ The date of receipt of the demand is WITHIN the period of 19 months from the priority date 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. | |

For International Bureau use only

Demand received from IPEA on:

PCT

FEE CALCULATION SHEET

Annex to the Demand

International application No. PCT/US01/08042		For International Preliminary Examining Authority use only	
Applicant's or agent's file reference 28341/6114.P		Date stamp of the IPEA	
Applicant Pharmacia & Upjohn, David E. Lowery and Michael J. Kennedy			
CALCULATION OF PRESCRIBED FEES			
1. Preliminary examination fee		2,998.29	P
2. Handling fee <i>(Applicants from certain States are entitled to a reduction of 75% of the handling fee. Where the applicant is (or all applicants are) so entitled, the amount to be entered at H is 25% of the handling fee.)</i>		287.51	H
3. Total of prescribed fees Add the amounts entered at P and H and enter total in the TOTAL box		3,285.80	
		TOTAL	
MODE OF PAYMENT			
☒ authorization to charge deposit account with the IPEA (see below)	☐ cash		
☐ cheque	☐ revenue stamps		
☐ postal money order	☐ coupons		
☐ bank draft	☐ - other (specify):		
AUTHORIZATION TO CHARGE (OR CREDIT) DEPOSIT ACCOUNT <i>(This mode of payment may not be available at all IPEAs)</i>			
☒ Authorization to charge the total fees indicated above.	IPEA/ EP	Deposit Account No.: 28300287	
☒ <i>(This check-box may be marked only if the conditions for deposit accounts of the IPEA so permit)</i> Authorization to charge any deficiency or credit any overpayment in the total fees indicated above.	Date: 27 September 2001	Name: William K. Merkel	
	Signature: <i>William K. Merkel</i>		

TRATADO DE COOPERACION DE PATENTES
PCT
REPORTE DE EXAMEN PRELIMINAR INTERNACIONAL

(PCT Artículo 36 y Regla 70)

Registro de referencia del solicitante o agente 28341/6114.P	PARA FUTURAS ACCIONES Ver Notificación o Transmisión del Reporte de Examen Preliminar Internacional (Formato PCT/IPEA/416)	
Solicitud Internacional No. PCT/US01/08042	Fecha de registro internacional (día/mes/año) 13/03/2001	Fecha de prioridad (día/mes/año) 17/03/2000
Clasificación Internacional de Patentes (IPC) o clasificación nacional e IPC A61K 35/74		
Solicitante PHARMACIA & UPJOHN COMPANY et al.		

1. Este informe de examen preliminar internacional ha sido preparado por esta Autoridad Examinadora Preliminar Internacional y se transmite al solicitante de conformidad con el Artículo 36. 2. Este REPORTE consta de un total de _____ páginas, incluyendo la carátula. ☐ Este reporte también está acompañado de ANEXOS, es decir, páginas de descripción, reivindicaciones y/o dibujos que han sido modificados y son la base de este informe y/o páginas que contienen rectificaciones hechas ante esta Autoridad (ver Regla 70.16 y la Sección 607 de las Instrucciones Administrativas de conformidad con el PCT). Estos anexos constan de un total de _____ páginas.	
3. Este informe contiene indicaciones relacionadas con los siguientes ítems: - I ☒ Bases del Reporte - II ☐ Prioridad - III ☒ No establecimiento de opinión respecto a novedad, nivel inventivo y aplicabilidad Industrial. - IV ☐ Falta de unidad de invención - V ☒ Afirmación razonada de conformidad con el Artículo 35(2) con respecto a novedad, nivel inventivo o aplicabilidad industrial; citas y explicaciones que sustentan dicha afirmación. - VI ☐ Ciertos documentos citados - VII ☐ Ciertos defectos en la solicitud internacional - VIII ☐ Ciertas observaciones sobre la solicitud internacional	
Fecha de presentación de la demanda 12/10/2001	Fecha de terminación de este reporte 25/03/2002
Nombre y dirección de correo de IPEA/ European Patent Office D-80298 Munich Tel: (+49-89) 2399-0, Tx: 523656 epmu d Fax: (+49-89) 2399-4465	Funcionario autorizado BOUTRUCHE J E E

28
25

I. BASE DEL REPORTE

La base de este examen preliminar internacional es la solicitud según se presentó originalmente.

III. No establecimiento de opinión respecto a la novedad, nivel inventivo y aplicabilidad industrial.

La pregunta de si la invención reivindicada parece ser nueva, comprende un nivel inventivo o ser aplicable industrialmente no ha sido el tema del examen internacional preliminar respecto de las reivindicaciones que no han sido buscadas (Artículo 17(2)(a) o (3) y la Regla 66.1 (e) PCT); ver también reporte de búsqueda internacional.

V. Afirmación razonada de conformidad con la Regla 66.2(a)(ii) respecto a la novedad, nivel inventivo o aplicabilidad industrial.

Hasta el punto de que se ha llevado a cabo el examen preliminar internacional (ver el ítem III anterior), se indica lo siguiente:

A la luz de los documentos citados en el reporte de búsqueda internacional, se considera que la invención según se define en las reivindicaciones, que han sido el objeto de un reporte de búsqueda internacional, llena los criterios mencionados en el Artículo 33(1) del PCT, es decir, parece ser nueva, comprender un nivel inventivo y ser aplicable industrialmente.

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference 28341/6114.P	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/US 01/ 08042	International filing date (day/month/year) 13/03/2001	Priority date (day/month/year) 17/03/2000
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC A61K35/74		
Applicant PHARMACIA & UPJOHN COMPANY et al.		

1.	This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.
2.	This REPORT consists of a total of _____ sheets, including this cover sheet. ☐ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT). These annexes consists of a total of _____ sheets.
3.	This report contains indications relating to the following items: I ☒ Basis of the report II ☐ Priority III ☒ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability IV ☐ Lack of unity of invention V ☒ Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement VI ☐ Certain documents cited VII ☐ Certain defects in the international application VIII ☐ Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 12/10/2001	Date of completion of this report 25/03/2002
Name and mailing address of the IPEA/  European Patent Office D-80298 Munich Tel. (+49-89) 2399-0, Tx: 523636 epmu d Fax: (+49-89) 2399-4465	Authorized officer BOUTRUCHE J E E



Form PCT/IPEA/409 (cover sheet) (July 1998)

27-20

**INTERNATIONAL PRELIMINARY
EXAMINATION REPORT**

International application No PCT/US 01/ 08042

I. Basis of the report

The basis of this international preliminary examination is the application as originally filed.

III. Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

The question of whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step, or to be industrially applicable has not been the subject of the international preliminary examination in respect of the claims which have not been searched (Article 17(2)(a) or (3) and Rule 66.1(e) PCT); see also international search report).

V. Reasoned statement under Rule 66.2(a)(II) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability

To the extent that the international preliminary examination has been carried out (see item III above), the following is pointed out:

In light of the documents cited in the international search report, it is considered that the invention as defined in the claims, which have been the subject of an international search report, meets the criteria mentioned in Article 33(1) PCT, i.e. appears to be novel, to involve an inventive step and to be industrially applicable.

28-31

RESUMEN DE LA INVENCION

Se suministran bacterias atenuadas mutantes de *Salmonella* que contienen genes inactivados de virulencia, para ser usadas en vacunas seguras y eficaces.

MATERIALES Y METODOS PARA LA VACUNA C NTRA LA SALMONELLA

El presente invento reivindica la prioridad de la solicitud provisional U.S. No. 60/190.178 presentada en Marzo 17 de 2000 cuya descripción total se incorpora al presente documento a manera de referencia.

CAMPO DEL INVENTO

El presente invento se relaciona en términos generales con la salmonellae diseñada genéticamente, que son útiles como vacunas vivas.

ANTECEDENTES DEL INVENTO

Las enfermedades causadas por las bacterias *Salmonella* presentan síntomas que van desde una leve diarrea autocontrolada hasta una enfermedad gastrointestinal y septicémica grave en humanos y animales. La *Salmonella* es una bacteria gram-negativa, en bastoncillo, y motil (entre las excepciones no motiles están *S. gallinarum* y *S. pullorum*) que no forman esporas. Las fuentes ambientales del organismo están conformadas por agua, suelo, insectos, superficies de fabricas, superficies de cocinas, heces de animales, carnes crudas, carne cruda de aves de corral y alimentos marinos crudos.

La Infección por *Salmonella* es de una ocurrencia diseminada en animales, especialmente en aves de corral y en cerdos, y es una de las más dañinas desde el punto de vista económico dentro de la categoría de enfermedades entéricas y septicémicas que afectan a los animales productores de alimento. Aun cuando muchos serotipos de *Salmonellas* se han aislado de animales, las *S. choleraesuis* y *S. typhimurium* son los dos serotipos más frecuentemente aislados que se asocian con la salmonellosis clínica en los cerdos. En estos animales, la *S. typhimurium* causa básicamente una enfermedad entérica, en tanto que la *S. choleraesuis* (que se adapta al hospedero cerdo) es frecuentemente el agente etiológico de una enfermedad septicémica fatal con poco compromiso del tracto intestinal. La *S. dublin* y *S. typhimurium* son causas comunes de Infección en el ganado; de estas la *S. dublin* es adaptada al hospedero de ganado y es frecuentemente el agente biológico de una enfermedad septicémica fatal. Otros serotipos tales como *S. gallinarum* y *S. pullorum* son agentes etiológicos de importancia en la salmonellosis en especies aviarias y otras.

Aun cuando estos serotipos afectan esencialmente a los animales, la *S. dublin* y la *S. choleraesuis* también causan frecuentemente enfermedad en los humanos.

Las diversas especies de *Salmonella* se han aislado de la parte externa de la envoltura del huevo, incluyendo la *S. enteritidis* que puede incluso estar presente dentro de la yema del huevo. Se ha sugerido que la presencia del organismo en la yema se debe a la transmisión proveniente de la capa infectada de la gallina antes de la deposición del caparazón. Los alimentos distintos de los huevos han causado igualmente brotes de la enfermedad *S. enteritidis* en humanos.

La *S. typhi* y *S. paratyphi* A, B, y C producen fiebre tifoidea y otra similar a la tifoidea en humanos. Aun cuando la infección inicial con *salmonella* ocurre típicamente a través del tracto gastrointestinal, la fiebre tifoidea es una enfermedad sistémica que se disemina a través de todo el hospedero y puede infectar múltiples sitios de órganos. El promedio de fatalidad de fiebre tifoidea puede incluso ser tan alto que llega al 10% (en comparación con menos del 1% para la mayor parte de las formas de salmonellosis). La *S. dublin* tiene una tasa de mortalidad del 15% cuando el organismo causa septicemia en pacientes de edad avanzadas, y la *S. enteritidis* presenta una tasa de mortalidad de aproximadamente 3.6% en brotes detectados en hospitales y ancianatos, en donde los pacientes de avanzada edad son los que se afectan especialmente.

Se han hecho numerosos intentos de proteger a los animales y humanos mediante inmunización utilizando una serie de vacunas. Muchas de éstas proporcionan una protección pobre a moderada y exigen grandes dosis para que se puedan considerar totalmente eficaces. Las vacunas utilizadas anteriormente contra las salmonellas y otros agentes infecciosos se han clasificado por lo general en dos categorías: (i) componentes específicos a partir de un agente biológico, que incluye fracciones celulares o lisados, antígenos intactos, sus fragmentos o análogos sintéticos de antígenos que ocurren en la naturaleza o epítopes (conocidos frecuentemente como vacunas subunidades); (ii) anticuerpos anti-idiotípicos; (iii) el agente etiológico eliminado totalmente (conocido frecuentemente como vacunas eliminadas); o (iv) un derivado avirulento (atenuado) del agente etiológico utilizado como una vacuna viva.

La literatura muestra que las vacunas vivas atenuadas son más eficaces que las vacunas eliminadas o las denominadas vacunas

subunidades para Inducir Inmunidad protectora. A pesar de este hecho, las dosis elevadas de vacunas vivas son las que se requieren con frecuencia para lograr eficacia y un número relativamente pequeño de vacunas contra la *Salmonella* atenuadas son ofrecidas por el comercio hoy en día. En términos ideales, una vacuna viva atenuada que sea eficaz conserva la capacidad de infectar al hospedero sin causar enfermedad grave, siendo por lo tanto capaz de estimular la inmunidad humoral (basada en anticuerpos) y la inmunidad mediada por células en forma suficiente para lograr una resistencia contra cualquier infección futura causada por bacterias virulentas.

Se han utilizado varias estrategias de atenuación para lograr que la *Salmonella* sea avirulenta [Cardenas et al., Clin Microbiol Rev. 5:328-342 (1992); Chatfield et al., Vaccine 7:495-498 (1989); Curtiss, in Woodrow et al., eds., New Generation Vaccines, Marcel Dekker, Inc., New York, p. 161 (1990); Curtiss et al., in Kohler et al., eds., Vaccines: new concepts and developments. Proceedings of the 10th Int'l Convocation of Immunology, Longman Scientific and Technical, Harlow, Essex, UK, pp. 261-271 (1987); Curtiss et al., in Blankenship et al., eds., Colonization control of human bacterial enteropathogens in poultry, Academic Press, New York, pp. 169-198 (1991)]. Estas estrategias son entre otras el uso de mutantes sensibles a la temperatura [e.g., Germanier et al., Infect Immun. 4:663-673 (1971)], mutantes aromáticos y auxotróficos (e.g., -aroA, -asd, -cys, o -thy [Galan et al., Gene 94:29-35 (1990); Holseth et al., Nature 291:238-239 (1981); Roberetsson et al., Infect Immun. 41:742-750 (1983); Smith et al., Am J. Vet Res. 45:59-66 (1984); Smith et al., Am J. Vet Res. 45:2231-2235 (1984)], mutantes defectuosas en purina o biosíntesis del ácido diaminopimélico (e.g., Apur y Adap [Clarke et al., Can J. Vet Res. 51:32-38 (1987); McFarland et al., Microb Pathog. 3:129-141 (1987); O'Callaghan et al., Infect Immun. 56:419-423 (1988)], cepas alteradas en la utilización o síntesis de carbohidratos (e.g., AgalE [Germanier et al., Infect Immun. 4:663-673 (1971); Hone et al., J. Infect Dis. 156:167-174 (1987)], cepas alteradas en la capacidad de sintetizar los lipopolisacáridos (e.g., galE, pmI, rfa) o curados de plásmidos de virulencia, cepas con mutaciones en uno o más genes virulentos (e.g., invA) y mutantes alterados en la expresión global de genes (e.g., -cya -crp, ompR o -phoP [Curtiss (1990), *supra*; Curtiss et al. (1987), *supra*; Curtiss et al. (1991), *supra*]).

Además de lo anterior, se han utilizado técnicas aleatorias de mutagénesis para identificar los genes de virulencia expresados durante la infección en un modelo animal. Por ejemplo, la utilización de una serie de enfoques con mutagénesis aleatoria se lleva a cabo en bacterias después de hacer una evaluación de los mutantes en modelos animales o en sistemas de cultivos tisulares, tales como el Signature- Tagged Mutagenesis (STM) [ver Patente U.S. No. 5.876.931].

Sin embargo, los Informes publicados han demostrado que los intentos de atenuar la *Salmonella* mediante la aplicación de estos y otros métodos han conducido a diversos grados de éxito y han demostrado diferencias tanto en la virulencia como en la inmunogenicidad [Chatfield et al., Vaccine 7:495-498 (1989); Clarke et al., Can J. Vet Res. 51:32-38 (1987); Curtiss (1990), *supra*; Curtiss et al. (1987), *supra*; Curtiss et al. (1991), *supra*]. Los intentos anteriores de utilizar metodologías de atenuación para lograr vacunas vivas seguras y eficaces han experimentado una serie de problemas.

Primero, una cepa atenuada de *Salmonella* que muestra reducción parcial o total de virulencia no puede retener conservar su capacidad de inducir una respuesta inmune protectora cuando se administre en forma de vacuna. Por ejemplo, los mutantes Aaro A y los mutantes galE del *S. typhimurium* carentes de actividad epimerasa de la galactosa UDP demostraron ser inmunogénicos en ratones [Germanier et al., Infect Immun. 4:663-673 (1971), Hohmann et al., Infect Immun. 25:27-33 (1979); Holseth et al., Nature, 291:238-239 (1981); Hone et al., J. Infect Dis. 156:167-174 (1987)] en tanto que los mutantes Aasd, Athy, y Apur del *S. typhimurium* no lo fueron [Curtiss et al. (1987), *supra*, Nnalue et al., Infect Immun. 55:955-962 (1987)]. Todas estas cepas sin embargo fueron atenuadas para los ratones cuando se administraron por vía oral o parenteral en dosis suficientes como para dar muerte a ratones con la cepa parental en estado natural. De manera análoga, los mutantes AaroA, Aasd, Athy, y Apur del *S. choleraesuis* fueron avirulentos en ratones, pero solamente los mutantes AaroA fueron suficientemente avirulentos y ninguno de ellos eficaces como vacunas vivas [nnalue et al., Infec Immun. 54:635-640 (1986); Nnalue et al., Infect Immun. 55:955-962 (1987)].

Segundo, las cepas atenuadas de *S. dublin* portan mutaciones en *phoP*, *phoP crp*, [*crp-cdt*] *cya*, *crp cya* y demostraron ser inmunogénicas en ratones pero no en el ganado vacuno [Kennedy et al., Abstracts of the 97th

General Meeting of the American Society for Microbiology. B-287:78 (1997)]. De igual manera, otra cepa de *S. dublin*, SL5631, con una eliminación que afecta al gen *aroA* demostró ser altamente protectora contra la invasión letal a una cepa heteróloga en ratones [Lindberg et al., Infect Immun. 61:1211-1221 (1993)] pero no en ganado vacuno [Smith et al., Am J. Vet Res. 54:1249-1255 (1993)].

Tercero, las cepas de *Salmonella* diseñadas genéticamente que contienen una mutación tan solo en un gen pueden mutar espontáneamente y "revertir" hasta llegar al estado virulento. La introducción de mutaciones en dos o más genes tiende a proporcionar un alto nivel de seguridad contra la restauración de patogenicidad por recombinación [Tacket et al., Infect Immun. 60:536-541 (1992)]. Sin embargo el uso de interrupciones de genes dobles o múltiples es impredecible en cuanto a su efecto sobre la virulencia e inmunogenicidad; además, la introducción de mutaciones múltiples puede sobreatenuar una bacteria para un hospedero en particular [Linde et al., Vaccine 8:278-282 (1990); Zhang et al., Microb. Pathog., 26(3):121-130 (1999)].

En el presente invento es de interés la identificación de las denominadas islas de patogenicidad (PAIs) en la *Salmonella* y otras bacterias, que son grandes regiones cromosómicas algunas veces inestables que albergan racimos de genes que frecuentemente definen las características de virulencia en las bacterias entéricas. La composición base del ADN en estas regiones PAIs frecuentemente difiere de la que se presenta en los cromosomas de las bacterias en las que se ubican, lo cual indica que probablemente han sido adquiridas por una transferencia horizontal de genes. Una isla de patogenicidad de *Salmonella* que contenga genes requeridos para la invasión celular epitelial se ha identificado en aproximadamente 63 centisomas cs en el cromosoma *S. typhimurium*, y se ha demostrado que contienen componentes codificadores de genes del tipo III (contacto dependiente) en el sistema de secreción, proteínas efectoras secretadas, y proteínas reguladoras asociadas [Millis et al., Mol Microbiol 15(4):749-59 (1995)]. Una segunda *Salmonella* PAI de 40 kb se ubica en 30.7 y se ha designado como isla de patogenicidad de la *Salmonella* 2 (SPI2) [Shea et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA, 19;93(6):2593-2597 (1996)]. El análisis secuencial nucleótido de regiones de SPI2 reveló que los genes codificaban un aparato de secreción tipo III en segundo lugar, que según se indica participó en una etapa de la

patogénesis posterior a la penetración de células epitellales. Se ha demostrado que las mutaciones en algunos genes dentro del SPI2 producen atenuación de virulencia bacteriana en ratones. Consultar la Patente U.S. No. 5.876.931; Shea et al., *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 93:2593-2597 (1996); Ochman et al., *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 93(15):7800-7804 (1996); Hensel et al., *J. Bacteriol.*, 179(4):1105-1111 (1997); hensel et al., *Molec. Microbiol.*, 24(1):155-167 (1997); Dunyak et al., e Información en afiches presentados en la Novena Asamblea General de la Sociedad Americana de Microbiología (1997), p. 76.

Continúa existiendo la necesidad de vacunas atenuadas vivas, que sean más seguras y eficaces contra la *Salmonella*, hasta el grado en que idealmente no requieran ser administradas en dosis muy grandes.

BREVE RESUMEN DEL INVENTO

El presente invento se relaciona con vacunas seguras y eficaces que utilizan una o más cepas de las bacterias mutantes atenuadas gram-negativas en las que uno o más genes homólogos a los genes que están dentro de la Isla de patogenicidad 2 (SPI2) de la *Salmonella* se han inactivado, preferiblemente por eliminación del 5% al 100% aproximadamente del gene, y más preferiblemente por eliminación del 50% o más del gene aproximadamente. Se analizan específicamente las vacunas que comprenden una o más especies de bacterias mutantes atenuadas de la *Salmonella* en las que uno o más genes, y preferiblemente dos o más genes, dentro de SPI2 se han desactivado. En una presentación preferida, uno o más de los genes *ssa*, particularmente los genes *ssaT*, *ssaJ*, *ssaC* o *ssaM*, se han desactivado en la bacteria mutante. La invención se basa en resultados de pruebas extensas sobre seguridad y eficacia de estas vacunas, incluyendo aquellas que contienen más de un serotipo de *Salmonella* en especies animales distintas de roedores, incluyendo ganado vacuno y cerdos.

De acuerdo con un aspecto del presente invento, la composición de las vacunas comprenden una cantidad inmunológicamente protectora, de una primera bacteria mutante atenuada de la *Salmonella* en la que uno o más genes *ssa* se desactiva. Una presentación, los genes *ssa* se seleccionan a partir del grupo conformado por *ssaT*, *ssaJ*, *ssaC* y *ssaM*. Las cantidades adecuadas variaran, pero pueden incluir aproximadamente 10^9 bacterias o menos. En estas bacterias mutantes, el gen o genes inactivados

se inactivan preferiblemente por eliminación de una porción de la región codificante del gene. De manera alterna, la inactivación se efectúa mediante mutación de inserto. Cualquier especie de bacterias de *Salmonella*, particularmente las subespecies y subtipos *S. enterica* pueden mutarse de acuerdo con el invento, incluyendo las *Salmonellas* provenientes de los serogrupos A, B, C₁, C₂, D₁ y E₁. Todas las *Salmonellas* serovars pertenecen a dos especies: *S. bongori* y *S. enterica*. Las seis subespecies de *S. enterica* son: *S. enterica* subespecies *enterica* (I o 1), *S. enterica* subespecies *salamae* (II o 2), *S. enterica* subespecies *arizonae* (IIIa o 3a), *S. enterica* subespecies *diarizonae* (IIIb o 3b), *S. enterica* subespecies *houtenae* (IV o 4), *S. enterica* subespecies *indica* (VI o 6). Entre los ejemplos de las subespecies están: *S. Choleraesuis*, *S. Typhimurium*, *S. Typhi*, *S. Paratyphi*, *S. Dublin*, *S. Enteritidis*, *S. Gallinarum*, *S. Pullorum*, *Salmonella Anatum*, *Salmonella Hadar*, *Salmonella Hamburg*, *Salmonella Kentucky*, *Salmonella Miami*, *Salmonella Montevideo*, *Salmonella Ohio*, *Salmonella Sendai*, *Salmonella Typhimurium*.

Dos o más genes de virulencia se pueden inactivar en las bacterias mutantes de la *Salmonella*, de las cuales por lo menos un gen es del tipo del que se encuentra al interior de SPI2. En un aspecto, el gen es del tipo *ssa*. Preferiblemente, dos genes seleccionados a partir del grupo conformado por *ssaT*, *ssaJ* y *ssaC* se han inactivado. Más preferiblemente, la combinación de *ssaT* y *ssaC*, o *ssaT* y *ssaJ* se han inactivado.

La composición de las vacunas puede comprender incluso una segunda bacteria mutante atenuada de la *Salmonella* en la cual uno o más genes *ssa* se han inactivado. En un aspecto, el gen *ssa* se selecciona a partir del grupo conformado por *ssaT*, *ssaJ* y *ssaC*. Preferiblemente, la primera y segunda bacterias mutantes *Salmonella* son de distintos serotipos. Para el ganado, las vacunas que comprenden *S. dublin* y *S. typhimurium* son las que se prefieren.

El invento proporciona igualmente métodos de inmunización, es decir confieren Inmunidad protectora al animal administrando las composiciones de la vacuna del invento. Los signos de Inmunidad protectora se describen más adelante. El invento proporciona además métodos para reducir la transmisión de Infección mediante la administración de vacunas del invento en cantidades eficaces para reducir la cantidad o duración de eliminación bacteriana durante la infección. Los animales que son receptores adecuados de tales vacunas son entre otros ganado vacuno, ovejas,

caballos, cerdos, aves de corral y otras, gatos, perros y humanos. Los métodos del invento utilizan cualquiera de las composiciones de vacunas del Invento, y preferiblemente la vacuna comprende una cantidad eficaz de un mutante atenuado, que es la bacteria mutante no reversible de la *Salmonella* en la cual uno o más genes dentro de la región SPI2 se han inactivado, bien sea por eliminación de la porción del gen o genes, o alternativamente, por la mutación de inserción. En un aspecto, los métodos utilizan bacterias atenuadas en donde un gen *ssa* se inactiva, y preferiblemente el gen *ssa* se selecciona del grupo conformado por *ssaT*, *ssaJ*, *ssaC*, y *ssaM*.

Según otro aspecto del invento, la bacteria mutante atenuada *Salmonella* puede comprender además un polipéptido codificante polinucleótido distinto de la *Salmonella*. La administración de las bacterias mutantes o de una composición de vacuna que comprenda a la bacteria mutante brinda de esta manera un método para administrar a un animal un antígeno polipéptido inmunogénico.

Son numerosos los aspectos y ventajas adicionales del invento que resultaran claros para los expertos en esta área al considerar la descripción en detalle del invento en la que se encuentra una relación de las presentaciones preferidas de dicho trabajo.

BREVE DESCRIPCION DE LOS DIBUJOS

Las Figuras 1, 2 y 3 muestran una representación esquemática de las secuencias nucleótidas del *S. typhimurium* que flanquean las eliminaciones internas de los genes *ssaT*, *ssaJ* y *ssaC*, respectivamente, en el estado natural y en genoma mutante. La secuencia superior muestra los nucleótidos que flanquean los puntos de eliminación, en tanto que la secuencia inferior muestra la secuencia ADN presente en el locus eliminado. Las letras minúsculas indican nucleótidos en tanto que las mayúsculas se refieren a amino ácidos.

La Figura 4 muestra la organización del SPI2 en *S. typhimurium*, que se agrupó utilizando las secuencias disponibles en el GenBank (Accession #'s AJ224892, Z95891, U51927, Y09357 y X99944). Se muestran marcos abiertos de lectura pre-establecida en forma de casillas abiertas con la orientación del marco de lectura abierto que se indica. El diagrama está dibujado a escala y en la parte inferior se indican los sitios de las eliminaciones *ssaC*, *ssaJ* y *ssaT*.

DESCRIPCION DETALLADA DEL INVENTO

El presente Invento proporciona vacunas, o composiciones Inmunogénicas, que comprenden una o más especies de bacterias atenuadas mutantes de *Salmonella* en las que uno o más genes de virulencia, preferiblemente los genes que se encuentran dentro de SPI2, han sido eliminados. Una ventaja de las vacunas del presente invento es que las bacterias vivas mutantes y atenuadas se pueden administrar como vacunas en dosis razonables, a través de una serie de rutas diversas, y seguir induciendo la Inmunidad protectora en los animales vacunados. Otra ventaja es que las bacterias mutantes contienen Inactivación en dos genes distintos que no son revertibles, o por lo menos tienen mucha menos probabilidad de revertir a un estado virulento.

El riesgo de reversión se puede evaluar haciendo pasar las bacterias en múltiples oportunidades (5 veces) y administrando las bacterias resultantes a animales. Los mutantes no reversibles continuarán atenuándose.

Los ejemplos del presente Invento demuestran que la inactivación de dos o más genes al Interior de SPI2 no atenúa posteriormente (ni sobreatenua) las bacterias si se hace la comparación con aquellas bacterias en las que solo se ha inactivado un gen. Los ejemplos demuestran también que la eliminación de genes dentro del SPI2 da como resultado vacunas seguras y eficaces según se observa a través de reducciones observables en signos y síntomas adversos asociados con Infección por las bacterias en estado natural. Las vacunas de los ejemplos que aparecen en el presente invento han demostrado que confieren una Inmunidad protectora superior en comparación con otras vacunas que contienen bacterias atenuadas vivas, por ejemplo Salmo Shield^(R)TD (Grand Laboratories, Inc.) y bacterias mutantes de *Salmonella* que contienen mutaciones Arfa K o Acya Acrp. Los ejemplos demuestran además que una combinación de vacunas que contienen dos o más cepas de *Salmonella* de mutante atenuado de diferentes serotipos es eficaz y que la inclusión de los distintos serotipos no cause Interferencia con la respuesta inmune.

Cuando dos o más genes dentro del SPI2 se Inactivan, los dos genes pueden provenir de Igual o distinta "región" SPI2 (por ejemplo, de las regiones de maquinaria exportadora, proteínas efectoras, y sensores/reguladores). Los genes pueden también provenir de iguales o

distintos grupos funcionales según se observa en la Figura 4, que incluyen los componentes estructurales *ssa* (aparato del sistema de secreción, como *ssaB*, *ssaC*, *ssaD*, *ssaE*, *ssaF*, *ssaG*, *ssaH*, *ssaI*, *ssaJ*, *ssaK*, *ssaL*, *ssaM*, *ssaN*, *ssaO*, *ssaP*, *ssaQ*, *ssaR*, *ssaS*, *ssaT*, y/o *ssaU*) objetivo secretados del sistema de secreción tipo III (efector del sistema de secreción), sistema regulador de sensor de dos componentes, *ssr* (regulador de sistema de secreción), y chaperones de las proteínas secretadas, *ssc* (chaperona del sistema de secreción).

La secuencia nucleótida de *ssaT* proveniente de *S. dublin* se establece en SEQ ID NO: 1. La secuencia nucleótida de *ssaT* proveniente de *S. typhimurium* se establece en SEQ ID NO: 2. De acuerdo con el presente texto, "*ssaT*" incluye SEQ ID NOS: 1, 2 y otras especies de *Salmonellas* que le son equivalente, secuencias nucleótidas de *Salmonella* de longitud completa que se hibridizan con el complemento no codificante de SEQ ID NOS: 1 o 2 bajo condiciones estrictas (por ejemplo según se describe en la Figura 4 de Shea et al., Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA, 93:2593-2597 (1996), que se incorpora al presente estudio a manera de referencia), y las secuencias nucleótidas de *Salmonella* de longitud total que poseen identidad secuencial al 90% con SEQ ID NO: 1 o 2. Los profesionales de esta disciplina pueden fácilmente identificar los equivalentes de las especies *Salmonella* y además incluir secuencias de nucleótidos con identidad por ejemplo de 90%, 95%, 98% y 99% a SEQ ID NO: 1 o 2.

La secuencia nucleótida de *ssaJ* tomada de *S. dublin* se establece en SEQ ID NO:3. La secuencia nucleótida de *ssaJ* proveniente de *S. typhimurium* se establece en NO:4. De acuerdo con este trabajo, "*ssaJ*" incluye SEQ ID NOS: 3, 4 y otras especies equivalentes de *Salmonella* que le corresponden, por ejemplo secuencias nucleótidas de *Salmonella* de longitud total que se hibridizan con el complemento no codificante de SEQ ID NO:3 o 4 bajo condiciones estrictas, y secuencia de nucleótidos de *Salmonella* de longitud total que tienen una identidad de secuencia al 90% al SEQ ID NO: 3 o 4. Los equivalentes de las especies *Salmonella* pueden ser fácilmente identificado por profesionales en este campo y además incluir secuencias de nucleótidos con identidad de por ejemplo de 90%, 95%, 98% y 99% al SEQ ID NO: 3 o 4.

La secuencia nucleótida de *ssaC* tomada de *S. dublin* se establece en SEQ ID NO:5. La secuencia nucleótida de *ssaC* proveniente de *S. typhimurium* se establece en SEQ ID NO:6. De acuerdo con este trabajo,

"*ssaC*" Incluye SEQ ID NOS: 5, 6 y otras especies equivalentes de *Salmonella* que le corresponden, por ejemplo secuencias nucleótidas de *Salmonella* de longitud total que se hibridizan con el complemento no codificante de SEQ ID NO:5 o 6 bajo condiciones estrictas, y secuencia de nucleótidos de *Salmonella* de longitud total que tienen una identidad de secuencia al 90% al SEQ ID NO: 5 o 6. Los equivalentes de las especies *Salmonella* pueden ser fácilmente Identificado por profesionales en este campo y además incluir secuencias de nucleótidos con identidad de por ejemplo de 90%, 95%, 98% y 99% al SEQ ID NO: 5 o 6.

La secuencia nucleótida de *ssaM* tomada de *S. dublin* se establece en SEQ ID NO:30. La secuencia nucleótida de *ssaM* proveniente de *S. typhimurium* se establece en SEQ ID NO:7. De acuerdo con este trabajo, "*ssaM*" incluye SEQ ID NOS: 7, 30 y otras especies equivalentes de *Salmonella* que le corresponden, por ejemplo secuencias nucleótidas de *Salmonella* de longitud total que se hibridizan con el complemento no codificante de SEQ ID NO:7 o 30 bajo condiciones estrictas, y secuencia de nucleótidos de *Salmonella* de longitud total que tienen una identidad de secuencia al 90% al SEQ ID NO: 7 o 30. Los equivalentes de las especies *Salmonella* pueden ser fácilmente Identificado por profesionales en este campo y además incluir secuencias de nucleótidos con identidad de por ejemplo de 90%, 95%, 98% y 99% al SEQ ID NO: 7 o 30.

El invento describe igualmente que los genes equivalentes (es decir aquellos que tienen una homología superior al 80%) en otras bacterias gram-negativa se pueden activar de manera similar para obtener vacunas eficaces.

Las secuencias de nucleótidos de otros genes en SPI2 se pueden ensamblar utilizando las secuencias disponibles en el GenBank (e.g., Accession #'s AJ224892, Z95891, U51927, Y09357 y X99944) que cubren SPI2.

De acuerdo con este contexto, un gen "inactivado" es aquel que ha sido mutado por inserción, eliminación o sustitución de secuencia nucleótida de manera que la mutación inhibe o elimina la expresión y/o actividad biológica del producto del gen codificado. La mutación puede actuar a través de la afectación de la transcripción o traslado del gen o su mRNA, o bien la mutación puede afectar el mismo producto del gen polipéptido de tal manera que se haga inactivo.

En presentaciones preferidas, la Inactivación se realiza por eliminación de una porción de la región codificante del gen, debido a que la mutación por eliminación reduce el riesgo de que de el mutante se revierta a un estado virulento. Por ejemplo, algunos, la mayoría (por ejemplo la mitad o más) o prácticamente todas las regiones codificantes se pueden eliminar (es decir del 55 al 100% aproximadamente del gen, pero preferiblemente el 20% o más aproximadamente del gen, y más preferiblemente el 50% o más aproximado del gen se pueden eliminar). De manera alterna, la mutación puede ser una Inserción o eliminación o incluso un nucleótido sencillo que cause un desplazamiento de trama en el marco de lectura abierta, que a su vez puede causar una terminación prematura del polipéptido codificado o de la expresión de un polipéptido completamente inactivo. También se pueden generar las mutaciones a través de la Inserción de secuencias de genes extraños, por ejemplo la inserción de un gen que codifica la resistencia a los antibióticos.

Los mutantes por eliminación se pueden construir utilizando cualquiera de ellos tomados de una serie de técnicas bien conocidas y sistemáticamente aplicadas en este campo de trabajo. En uno de los ejemplos, se puede emplear una estrategia que utilice marcadores contraseleccionables, y que se haya utilizando comúnmente para eliminar los genes en muchas bacterias. Para consultas, referirse por ejemplo a los trabajos de Reyrat, et al., *Infection and Immunity* 66:4011-4017 (1998), que se incorporan a este estudio a manera de referencia. Según esta técnica, se emplea frecuentemente una estrategia de selección doble en la cual se construye un plásmido que codifica a un marcador seleccionable y contraseleccionable, con secuencias de flaqueo ADN derivadas de ambos lados de la eliminación deseada. El marcador seleccionable se utiliza para seleccionar bacterias en las cuales el plásmido se ha integrado dentro del genoma en el sitio y forma apropiados. El marcador contra-seleccionable se utiliza para seleccionar el porcentaje mínimo de bacterias que han eliminado espontáneamente al plásmido integrado. Una fracción de estas bacterias contendrá entonces tan solo la eliminación deseada sin presencia de ningún otro ADN extraño. La clave para el uso de esta técnica es la disponibilidad de un marcador contra-seleccionable adecuado.

Según otra técnica, el sistema *cre-lox* se utiliza para recombinación de ADN específica para el sitio. El sistema está conformado por 34 secuencias de par de base *lox* que se reconocen por medio del gen de la

recombinasa *cre* bacteriana. Si los sitios *lox* están presentes en el ADN en la orientación apropiada, el ADN flanqueado por los sitios *lox* será suprimido por la recombinasa *cre*, lo cual da como resultado la eliminación de todas las secuencias excepto de la copia que queda de la secuencia *lox*. Aplicando las técnicas estándar de recombinación, es posible eliminar el gen de interés considerado como un blanco en el genoma *Salmonella* y reemplazarlo por un marcador seleccionable (por ejemplo un gen que codifica la resistencia a la canamicina) que es flanqueado por los sitios *lox*. La expresión transitoria (por electroporación de un plásmido suicida que contiene al gen *cre* bajo control de un promotor que funciona en la *Salmonella* de la recombinasa *cre* deberá dar como resultado una eficiente eliminación del marcador flanqueado del *lox*. Este proceso podría dar como resultado un mutante que contiene la mutación de eliminación deseada y una copia de las secuencias *lox*.

De acuerdo con otro enfoque, es posible reemplazar directamente una secuencia deseada que se elimina en el genoma de *Salmonella* con un gen marcador, tal como la proteína verde fluorescente GFP, β -galactosidasa, o luciferasa. Según esta técnica, los segmentos ADN que flanquean una eliminación deseada se preparan por medio del PCR y se clonan dentro de un vector suicida (que no se replica) para la *Salmonella*. Un cassette de expresión, que contiene un promotor activo en *Salmonella* y un gen marcador apropiado se clona entre las secuencias de flanco. El plásmido se introduce dentro de la *Salmonella* en estado natural. Las bacterias que incorporan y expresan el gen marcador (probablemente a una frecuencia muy baja) se aíslan y examinan con respecto del evento adecuado de recombinación (es decir reposición del gen en estado natural con el gen marcador). Para que una cepa modificada sea eficaz en una formulación de vacuna, la atenuación deberá ser lo suficientemente significativa para evitar que el patógeno evoque severos síntomas clínicos, pero también lo suficientemente insignificante como para permitir replicas limitadas y crecimiento de las bacterias dentro del receptor. El receptor es un sujeto que requiere de protección contra una enfermedad causada por una forma virulenta de la *Salmonella* u otros micro-organismos patógenos. El sujeto que se debe inmunizar puede ser un humano u otro mamífero o animal, por ejemplo animales de granja como vacas, ovejas, cerdos, caballos, cabras y aves de corral (por ejemplo pollos, pavos, patos y gansos) y animales de compañía como perros y gatos; y animales exóticos

y/o de zoológico. La inmunización de roedores y no roedores también se analiza dentro de este estudio.

Una "cantidad Inmunológicamente protectora" de las bacterias mutantes atenuadas es una cantidad eficaz para Inducir una respuesta inmunogénica en el receptor y que es adecuada para prevenir o mejorar los signos o síntomas de la enfermedad, Incluyendo efectos nocivos para la salud o complicaciones de la misma, causados por infección con bacterias de *Salmonella* en estado natural. Se pueden Inducir Inmunidad humoral o Inmunidad mediada por las células o ambas. La respuesta inmunogénica de un animal a una composición de vacuna se pueden evaluar, por ejemplo Indirectamente a través de mediciones de títulos de anticuerpos, ensayos de proliferación de linfócitos, o directamente a través de monitoreo de signos y síntomas después del contacto con una cepa en estado natural.

La Inmunidad protectora conferida por una vacuna se puede evaluar midiendo por ejemplo la reducción de signos clínicos como son mortalidad, morbilidad, temperatura, número y porcentaje de días de diarrea, productividad de leche, ganancia promedio diaria de peso, condición física y salud general y desempeño del sujeto.

Cuando se administran una combinación de dos o más serotipos distintos de bacterias, resulta altamente deseable que exista poca o ninguna interferencia entre los serotipos, de tal suerte que el hospedero no quede impedido de desarrollar una respuesta Inmune protectora, a uno de los dos o más serotipos administrados. Puede presentarse la Interferencia por ejemplo si una cepa predomina en el hospedero hasta el punto en que Impida o limite el desarrollo por parte del hospedero de una respuesta protectora Inmune a las demás cepas. De manera alterna, una cepa puede inhibir directamente a las otros cepas.

Además de la inmunización del receptor, las vacunas del invento pueden también promover el crecimiento del receptor y/o aumentar la Inmunidad de éste y/o mejorar el estado de salud general del mismo. Los componentes de las vacunas del invento, o productos microbianos, pueden actuar como inmuno-moduladores que están en condiciones de Inhibir o mejorar los aspectos del sistema Inmune. Por ejemplo, las vacunas del invento pueden señalar trayectorias que podrían reclutar citóquinas que tengan un beneficio general positivo para el hospedero.

Las vacunas del presente invento también proporcionan ventajas de salud para la comunidad veterinaria y humana al reducir la diseminación de

bacterias virulentas por parte de animales infectados. Se puede reducir bien sea la carga bacteriana que se produce (es decir la cantidad de bacterias, por ejemplo las CFU/ml) o la duración de la proliferación (por ejemplo número de % de días que se observe de diseminación), o ambos. Preferiblemente, la carga de diseminación se reduce aproximadamente en 10% o más en comparación con los animales no vacunados, preferiblemente en 20% o más, y/o se reduce la duración de la diseminación en por lo menos un día, o más, preferiblemente 2 o 3 días, o en 10% o más o 20% o más.

Si bien es posible que una bacteria atenuada del invento de administre sola, es preferible administrar una o más de tales bacterias mutantes junto con uno o varios excipientes, diluyentes, adyuvantes o portadores adecuados y farmacéuticamente aceptables. El portador o portadores deberán ser "aceptables" en el sentido que sean compatibles con las bacterias mutantes atenuadas del invento, y no deletereas para el sujeto que se inmunice. Básicamente, los portadores serán agua o solución salina que se esterilicen y estén libres de pirógenos.

Cualquier adyuvante conocido en el arte se puede utilizar en la composición de la vacuna, incluyendo adyuvantes de base en aceite como es el caso del Adyuvante Completo de Freund y el Adyuvante Incompleto de Freund, los adyuvantes de base de micolato (por ejemplo dimicolato de trehalose), los lipopolisacáridos bacterianos (LPS), peptidoglicanos (ejemplo, mureinas, mucopéptidos, o glicoproteínas como N-Opaca, muramyl dipéptido [MDP] o análogos MDP), proteoglicanos (e.g., extraídos de *Klebsiella pneumoniae*), preparaciones de estreptococos (e.g., OK432), Biostim™ (e.g., 01K2), los "Iscoms" de EP 109 942, EP 180 564 y EP 231 039, hidróxido de aluminio, saponina, DEAE-dextran, aceites neutrales (como el miglitol), aceites vegetales (como el aceite de arachis), liposomas, poliols Pluronic^(R), el sistema adyuvante Ribi (ver por ejemplo GB-A-2 189 141) o interleuquinas, particularmente aquellas que estimulan la inmunidad mediada por células. Un adyuvante alternativo consiste en extractos de *Amycolata*, que es un género bacteriano del orden de las Actinomicetales, que se ha descrito en la Patente U.S. No. 4.877.612. Adicionalmente, las mezclas adyuvantes propietarias se encuentran disponibles en el mercado. El adyuvante utilizando dependerá en parte del organismo receptor. La cantidad de adyuvante para administrar dependerá del tipo y tamaño del

animal. Las dosis óptimas pueden estar rápidamente determinadas por métodos de rutina.

Las composiciones de vacunas podrán opcionalmente incluir diluyentes líquidos, sólidos o semisólidos farmacéuticos aceptables (es decir estériles y no tóxicos) compatibles con las vacunas que sirvan como vehículos, excipientes o medios farmacéuticos. Se puede utilizar cualquier diluyente conocido dentro de este campo de estudio. Entre los diluyentes utilizados como ejemplos están entre otros el monolaurato de sorbitan de polioxetileno, estearato de magnesio, metil y propilhidroxibenzoato, talco, alginatos, almidones, lactosa, sucrosa, dextrosa, sorbitol, manitol, goma acacia, fosfato de calcio, aceite mineral, manteca de cacao, y aceite de teobroma.

Las composiciones de las vacunas se pueden empacar en formas adecuadas para su entrega. las composiciones se pueden encerrar dentro de una cápsula, caplet, sachet, cachet, gelatina, papel u otro envase. Estas formas de presentación son preferibles cuando son compatibles con el ingreso de una composición inmunogénica dentro del organismo receptor, y particularmente cuando la composición inmunogénica se esta administrando en forma de dosis unitaria. Las unidades de dosificación se pueden empacar por ejemplo en tabletas, cápsulas, supositorios o cachets.

Las composiciones de las vacunas se pueden introducir dentro del sujeto que se va a inmunizar aplicando cualquiera de los métodos adecuados por ejemplo por vía intravenosa, intradérmica, intramuscular, intramamaria, intraperitoneal, o inyección subcutánea, por vía oral, transdérmica, sublingual, intranasal, anal o vaginal. El tratamiento puede consistir en una sola dosis o en una serie de las mismas en un determinado tiempo.

Según la ruta de administración, se pueden administrar cantidades adecuadas de las bacterias mutantes que son por ejemplo bacterias de $\sim 10^9$ o menos, siempre y cuando que el vacunado induzca una adecuada respuesta inmunogénica. Las dosis de $\sim 10^{10}$ o menos o de $\sim 10^{11}$ o menos puede requerirse para lograr la respuesta deseada. Las dosis significativamente superiores a $\sim 10^{11}$ pueda que no sean comercialmente deseables.

Otro aspecto del invento involucra la construcción de bacterias mutantes atenuadas que comprenden adicionalmente una secuencia polinucleótida que codificada un polipéptido heterólogo. Por ejemplo, para

la *Salmonella*, un polipéptido "heterólogo" podría ser un polipéptido distinto de la *Salmonella* que no se exprese normalmente por las bacterias de *Salmonella*. Estas bacterias mutantes atenuadas se pueden emplear en métodos para la administración del polipéptido heterólogo o el ADN. Por ejemplo, la *Salmonella* podría diseñarse para que haga una lisis sobre el ingreso dentro del citoplasma de una célula de hospedero eucariótica sin causar un daño significativo, convirtiéndose de esta manera en un vector para la introducción del ADN plásmido dentro de la célula. Los polipéptidos heterólogos adecuados incluyen antígenos inmunogénicos provenientes de otros agentes infecciosos (que incluyen bacterias gram-negativo y bacterias gram-positivo y virus) que inducen una respuesta inmune protectora en los receptores, y expresión del antígeno polipéptido por parte de las bacterias mutantes en la vacuna que hace que el receptor sea inmunizado contra el antígeno. Otros polipéptidos heterólogos que se pueden introducir utilizando la *Salmonella* mutante incluyen las moléculas inmunomoduladoras por ejemplo citóquinas o proteínas de "desempeño" tales como la hormona del crecimiento, GRH, y GDF-8.

El Ejemplo 1 enfoca la construcción de mutantes atenuados de la bacteria *Salmonella* que contiene eliminaciones sencillas o dobles definidas en los genes *ssaT*, *ssaJ*, *ssaC*, *rfaK* y *glnA*; y construcción de *Salmonella* mutante que contiene inserciones inactivantes. El Ejemplo 2 aborda los resultados de pruebas de seguridad y eficacia de animales inoculados con estas bacterias de la *Salmonella* mutantes y atenuadas.

Ejemplo 1

Construcción de Mutantes de *Salmonella* que contienen Eliminaciones Sencillas y Dobles de Genes Seleccionados: *ssaT*, *ssaJ*, *ssaC*, *rfaK* y *glnA*

A. Construcción de plásmidos de genes pCVD442::A

Para cada uno de los genes *S. typhimurium* y *S. dublin* *ssaT*, *ssaJ*, *ssaC*, *rfaK* y *glnA* se construyeron vectores suicidas de selección positiva basados en el plásmido pCVD442 [Donnenberg y Kaper, Infect Immun 59:4310-17 (1991)] que contenían una porción de las regiones cromosómicas 5' y 3' que flanquean cada gene, pero con eliminaciones internas sustanciales (típicamente >95%) dentro del gen mismo. La división del gen por extensión de sobreposición ("gene SOEing" [Horton et

al., Biotechniques 8:528-535 (1990)) se utilizó para generar fragmentos de ADN que fueron complementarios al gen que se debía eliminar, pero que carecían de la mayoría de la secuencia nucleótida interna. Los plásmidos que contienen estos genes internamente eliminados fueron designados como pCVD442::AssaT, pCVD442::AssaJ, pCVD442::AssaC, pCVD442::ArfaK, pCVD442::AglIA, respectivamente. Estos vectores fueron luego utilizados para generar mutantes de eliminación *S. typhimurium* y *S. dublin* por medio de Intercambio alélico. Los plásmidos que contienen los genes eliminados *S. dublin* se utilizaron para producir las eliminaciones en *S. dublin*, y los plásmidos que contienen las secuencias *S. typhimurium*, se usaron para producir las eliminaciones en *S. typhimurium* (ver Ejemplo 1B a continuación).

En términos breves, se designaron dos conjuntos de primers PCR para sintetizar aproximadamente 600 fragmentos bp que fueran complementarios al flanco ADN en los lados 5' y 3' del gen deseado. Los primers A y D (Tabla 1) contienen secuencias cromosómicas ascendentes y descendentes, respectivamente del gen deseado y cada uno contienen además la secuencia nucleótida para un sitio deseado de endonucleasa de restricción. El Primer B expande la unión ascendente entre las secuencias flanqueando inmediatamente el lado 5' del gen, y al gen mismo, e incluye una cierta porción del extremo de 5' del gen (en algunos casos, solamente en codon de inicio). De manera análoga, el primer C expande la unión descendente entre las secuencias que hacen un flanco inmediato del lado 3' del gen y el gen mismo, e incluye una porción del extremo 3' del gen (en algunos casos, solamente en codon de inicio). Las reacciones PCR con *S. typhimurium* o ADN genómico *S. dublin* y los primers A y B o primers C y D se realizaron, obteniéndose productos PCR (fragmentos designados AB y CD, respectivamente) de aproximadamente 600 bp con secuencias que correspondían a las regiones de flanco ascendente o descendente del gen deseado, respectivamente. Cada fragmento AB o CD contenía además el sitio de restricción deseado (*Xba I* para *ssaT*, *ssaJ*, *ssaC*, y *glnA* y *Sal I* para *rfaK*). Una segunda reacción PCR que utilizaba fragmentos AB y CD con los primers A y D se realizó luego, obteniéndose un producto PCR de fragmento designado AD. El fragmento AD es complementario a la secuencia nucleótida que rodea el gen señalado como un objetivo, pero que contiene esencialmente una eliminación completa de las secuencias señaladas como objetivo (más del 95% de eliminación) para *ssaS*, *ssaT*,

rfaK, y *glnA* y una eliminación de la mitad terminal C (~50% de la eliminación) para *ssaJ* (ver Figuras 1-3). El producto resultante PCR para cada *S. dublin* o *S. typhimurium* *AssaT*, *AssaJ*, *AssaC*, *ArfaK*, y *AglnA* en genes se clonó luego a través de diversos vectores y cepas de hospederos y finalmente se introdujo en el sitio de clonado múltiple del vector pCVD442 en la cepa del hospedero SM10 λ pir.

Las Figuras 1, 2 y 3 muestran el flaqueo de las secuencias de nucleótidos para las uniones de los genes *ssaT*, *ssaJ* y *ssaC* en estado natural y el genoma mutante. Estas eliminaciones fueron diseñadas para retirar la mayor cantidad de marco de lectura abierta como fuera posible. Para el caso de los genes *ssaC* (1052 bp) y *ssaT* (779 bp) el marco total de lectura abierta de cada uno se eliminó, dejando tan solo los codones de inicio y parada (6 bp) después de que se generó la eliminación. Solamente la mitad terminal C del gen *ssaJ* pudo retirarse cuando se creó la eliminación. Este procedimiento redujo el tamaño del gen pasando de 749 bp a 324 bp.

La Figura 4 muestra la distribución genética del locus SPI2 en *S. typhimurium*. Esta es entonces una compilación de la región SPI2 del *S. typhimurium* ensamblado utilizando las secuencias disponibles en el GenBank (Accession #'s AJ224892, Z95891, U51927, Y09357 y X99944). Igualmente se muestran las posiciones de las eliminaciones construidas en los genes *ssaC*, *ssaJ* y *ssaT*.

Tabla 1 Primers usado en la construcción de genes modificados *S. Typhimurium* y *duplin**

Gen	Numero Primer (Letra)	Identificación De Secuencia Nos	Secuencia Primer	Sitio de Restricción
ssaT	642 (A)	10	5 GCCAATCTAGAAATTATTTTCGGAATTTGATAAA 3	XbaI
	643 (B)	11	5 AGGCTGTTCTGTTTTCTCGCTCACATTCAACCATGCTCTCCAATTCGTA 3	
	644 (C)	12	5 TACGAATTGGAGAGCATGGTTGAATGTGAGCGAGAAAACAGAACAGCCT 3	
	645 (D)	13	5 GCCAATTCTAGATCTTTTCTAATCTTATAATATTG 3	XbaI
ssaJ	638 (A)	14	5 GCCAATCTAGACTGCAGAACCGAGCCAGGAGCAA 3	XbaI
	639 (B)	15	5 CACCTCGGGATCAGGTCGGCTCATAAAAAATTAATCTTCTGCTGTT 3	
	640 (C)	16	5 AACAGCAGAAGATTAATTTTTTATGAGCCGACCTGATCCGAGGTG 3	
	646 (D)	17	5 GCCAATCTAGAGAAGATAATCTCGGTAAGAGAAGT 3	XbaI
ssaC	634 (A)	18	5 GCCAATCTAGATTCAAATTGTAAGTTTTTATGTCAAT 3	XbaI
	635 (B)	19	5 TTTATCCAGCACAGCCTGGATATTACATTTTATACCCACCCGAATAAAG 3	
	647 (C)	20	5 TTATTCGGGTGGGGTATAAAATGTAATATCCAGGCTGTGCTG 3	
	637 (D)	21	5 GCCAATCTAGATTCCCGGCATCAACAAATAAACT 3	XbaI
rfaK	882 (A)	22	5 GCCAAGTCGACATAGTAGGTGTTCTGTGGGCAATA 3	SalI
	883 (B)	23	5 TTCTGGATTATAGCTATTATGATTGTTTGATAAGTGATTGAGTCCTGA 3	

Gen	Numero Primer (Letra)	Identificación De Secuencia Nos	Secuencia Primer	Sitio de Restricción
	884 (C)	24	5 TCAGGACTCAATCACTTATCAAACAATCATAATAGCTATAATCCAGAA 3	
	885 (D)	25	5 GCCAAGTCGACGTGTACGAACAGGCTTCAGTGGAT 3	<i>SalI</i>
<i>glnA</i>	886 (A)	26	5 GCCAATCTAGATCAGGCATTAGAAATAGCGCGTTA 3	<i>XbaI</i>
	887 (B)	27	5 ATTTTAAATATACGATTAAACGCTCAAACATTTTGCCTTCTTCAAAGA 3	
	888 (C)	28	5 TCTTTGAAGAAGGCAAAATGTTTGAGCGTTTAATCGTATATTAAAAAT 3	
	889 (D)	29	5 GCCAATCTATATGCTCCTGACTCAGACGACGCTGG 3	<i>XbaI</i>

* Los primers PCR utilizados en la generación de las regiones de flaqueo izquierda (5) y derecha (3) de los genes del *ssaT* *ssaI* *ssaC*, *rfaK* y *glnA* Los primers A/B y C/D son las series de primer de 5 y 3 respectivamente para dicho gen Los Primers A y D son los que se encuentran en el sitio más alejado ascendente y descendente con respecto del gen y que fueron designados para incorporar los sitios de restricción indicados en el producto PCR

Los genes *S. dublin* y *S. typhimurium* son lo suficientemente similares que los mismos primers podrían utilizarse para ambos serotipos.

B. Construcción de Mutantes de Eliminación de *S. typhimurium* y *S. dublin*

Los plásmidos del gen pCVD442::A contruidos en el Ejemplo 1A anterior se utilizaron para producir mutantes de eliminación por recombinación homóloga con la cepa apropiada *Salmonella*, es decir un plásmido que contiene el gen eliminado *S. dublin* se utilizó para producir la eliminación *S. dublin*, y un plásmido que contenía las secuencias *S. typhimurium* se utilizó para producir la eliminación en *S. typhimurium*. El plásmido pCVD442 es un vector suicida de selección positiva. Este contiene el origen de la replica para los plásmidos R6K (*ori*), el gen de movilización para los plásmidos RP4 (*mob*), el gen para resistencia a la ampicilina (*bla*), el gen *sacB* proveniente del *B. subtilis*, que modifica el gen para la sucrasa de levan y un sitio de clonado múltiple.

El plásmido pCVD442 se puede mantener únicamente extracromosómicamente en cepas bacterianas que producen la proteína π , el producto del gen *pir* (e.g., *E. coli* SM10 λ *pir* o DH5 α *pir*). La introducción de un vector de base pCVD442 dentro de una cepa hospedera no permisiva (*S. typhimurium* o *S. dublin*), por conjugación y selección en Ap (ampicilina) y Nal (ácido nalidíxico) que contiene un medio, permite el aislamiento de los aislados merodiploides Ap^R en donde el plásmido se ha integrado dentro del genoma de la cepa objetivo por una recombinación homóloga con el gen en estado natural.

En breve, la cepa *E. coli* SM10 λ *pir* (*thi thr leu tonA lacY supE recA::RP4-2-Tc::Mu km*) [Donnenberg y Kaper, Infect Immun 59:4310-17 (1991)] que porta los plásmidos pCVD442 con los genes *S. typhimurium* o *S. dublin* *AssaT*, *AssaJ*, *AssaC*, *ArfaK* o *AglA* (designados como gen SM10 λ *pir*/pCVD442::A) se acoplaron con Nal^R *S. typhimurium* MK315N o *S. dublin* B94-058N y los recombinantes se seleccionaron en Ap y Nal. Tanto MK315N y B94-058N son cepas espontaneas Nal^R preparadas por plaqueado de las respectivas cepas parentales en un agar LB que contenía 50 μ g/ml Nal (aislados clínicos tomados de un sujeto bovino y humano respectivamente). Los recombinantes Ap^R Nal^R recubiertos deben tener el plásmido integrado dentro del cromosoma ya que el plásmido no se puede mantener extra-cromosoma. Lo anterior da como resultado la formación de

una cepa merodiploide que contiene el gen pCVD442::A plásmido que se integra dentro del locus del gen en el cromosoma.

El gen Ap^R Nal^R *S. typhimurium* MK315N::pCVD442::A y el gen *S. dublin* B94-058N::pCVD442::A tienen recombinantes que luego fueron desarrollados bajo condiciones no selectivas seguidas por el crecimiento en el agar LA (-sucrosa) y TYES (+ sucrosa). En ausencia de la presión de selección puede ocurrir un evento de recombinación espontánea en el que el plásmido pCVD442 y el gen en estado natural o el gen eliminados son extirpados del cromosoma. Las células que retienen el plásmido pCVD442 fueron contra-seleccionadas en el agar TYES por medio de productos tóxicos elaborados a partir de la descomposición de la sucrosa por sucrasa levan, codificada por el gen *sacB*. Por consiguiente, el número de colonias en el agar TYES es significativamente reducido en relación con el número en LA. Después de confirmar el fenotipo Ap^S de las colonias aisladas en el agar TYES, los recombinantes fueron analizados por PCR para determinar si el gen en estado natural o el gen eliminado se habían conservado.

En experimentos Iniciales, el donante y el receptor se unieron durante 5 horas en el agar LB y luego se seleccionaron en el agar LB que contenía Nal (20 o 100µg/ml) y Ap (20 o 100µg/ml). Si bien aparecía un fuerte crecimiento en la placa inicial de selección fueron pocas por no decir ninguna de las colonias aisladas que pudieron confirmarse como Ap^R Nal^R. La incapacidad de aislar el crecimiento recombinante se debió probablemente al crecimiento del receptor como resultado de la degradación de la ampicilina por medio de la liberación de la β-lactamasa a partir de las células del donante. Para contrastar este problema, se diseñaron condiciones de acople y selección que favorecían a los recombinantes y se seleccionaron contra las cepas de donante y receptor. Específicamente, las cepas de receptor y donante se acoplaron durante la noche en el agar LB o se modificaron en el agar M9 (Difco Laboratory, Detroit, MI), seguido del enriquecimiento de recombinantes por crecimiento en caldo selectivo LB (Nal y Ap (75µg/ml)) (Difco Laboratory, Detroit, MI), y aislamiento en medio de agar selectivo (Nal y Ap (75µg/ml)). El acople en el agar modificado M9 permitió que ocurriera la conjugación, pero una replica limitada, lo cual redujo el número de células de donante y receptor que se introdujeron en el caldo de selección. El crecimiento hasta alcanzar una fase logarítmica inicial en la selección del caldo favoreció la replica de los recombinantes pero no las cepas de donante y receptor. La selección

posterior en el agar LB Nal Ap (75µg/ml) favoreció a un más a los recombinantes sobre el donante y receptor, lo cual se confirmó cuando casi todas las colonias aisladas fueron Ap^R Nal^R. Este procedimiento produjo recombinantes merodiploides *S. typhimurium* o *S. dublin* que portaban el plásmido apropiado del gen pCVD442::A introducido dentro del genoma.

Los aislados merodiploides fueron luego desarrollados bajo condiciones no selectivas hasta alcanzar la fase posterior logarítmica e Inocularse en el agar LB y el agar TYES. Durante el crecimiento no selectivo puede ocurrir una recombinación espontánea entre las secuencias duplicadas en el estado merodiploide, dejando una copia del estado natural o del gen eliminado en el cromosoma. El crecimiento en la sucrosa (TYES) se selecciona contra las células que no se han sometido al segundo evento de recombinación debido a que los productos de la sucrosa levan, codificados por el gen *sacB* en el plásmido pCVD442 son tóxicos para las células gram-negativo. Por consiguiente, el número de colonias en el agar TYES es mucho menor que en el LA. En nuestras manos, fue esencial incubar las placas TYES a temperatura ambiente para que la selección fuera exitosa. La incubación a temperaturas mayores (30° o 37°C) no redujo el número de colonias en el TYES en relación con LA indicado que la selección para las células pCVD442-negativas no ocurrió en absoluto.

Las colonias de crecimiento TYES pasaron a una colonia sencilla y se confirmó el genotipo Nal^R Ap^S. El análisis PCR del ADN genómico de las colonias que utilizaron los Primers A y D apropiados descritos anteriormente para cada gen tuvieron por objeto determinar si el gen eliminado o en estado natural habían sido conservados dentro del cromosoma. Para el *ssaT*, un producto PCR de 1206 bp (vs. 1980 bp para el gen en estado natural) indicó que el gen se había eliminado. Para *ssaJ*, un producto PCR de 1074 bp (vs. 1500 bp para el gen en estado natural) indicó que el gen se había eliminado. Para *ssaC*, un producto PCR de 1229 bp (vs. 2275 bp para el gen en estado natural) indicó que el gen se había eliminado. Para *rfaK*, un producto PCR de 1300 bp (vs. 2400 bp para el gen en estado natural) indicó que el gen se había eliminado. Para *glnA*, un producto PCR de 1161 bp (vs. 2411 bp para el gen en estado natural) indicó que el gen se había eliminado.

Aun cuando teóricamente el 50% de estos aislados debe portar el gen aislado, el porcentaje real de aislados que portan el gen eliminado fue bastante variable, dentro de un rango de 1.4% (1 de 73 aislados) para el

gen *S. dublin glnA* hasta el 80% (4 de 5) para el gen *S. dublin ssaJ*, lo cual sugiere que la supresión del gen no fue aleatoria. Los mutantes de supresión fueron confirmados como *S. typhimurium* o *S. dublin* mediante pruebas serológicas.

C. Construcción de Mutantes de Eliminación Doble Correspondientes a *S. typhimurium* y *S. dublin*

Los mutantes de eliminación doble de *Salmonella* se construyeron de la misma manera que los mutantes de eliminación sencilla de *Salmonella* utilizando cepas de *E. coli* y *Salmonella* descritas anteriormente. En resumen, las cepas de donante *E. coli* SM10 λ pir que portan el plásmido pCVD442 con el gen eliminado *ssaT* (*AssaT*) provenientes del *S. typhimurium* o *S. dublin* se aparearon con los mutantes *S. dublin* B94-058N o *S. typhimurium* MK315N con el gen eliminado *ssaC* o *ssaJ* (*AssaC* y *AssaJ*), y se seleccionaron los conjugantes Ap^R. La introducción del plásmido dentro del hospedero no permisivo de *Salmonella* y la selección de las colonias Ap^R permitieron el aislamiento de los recombinantes merodiplóides donde el plásmido pCVD442 se integró dentro del genoma mediante recombinación homóloga con el gen en estado natural. El crecimiento subsiguiente de los recombinantes merodiplóides hacia la fase logarítmica tardía bajo condiciones no selectivas permitió un evento de recombinación espontánea que ocurriera entre las secuencias duplicadas en el genoma merodiplóide, dejando una copia bien del estado natural o del gen eliminado en el cromosoma. Las colonias desarrolladas bajo estas condiciones de crecimiento no selectivo se inocularon luego dentro del medio que contenía sucrosa, que se seleccionó contra aquellas células que no se han sometido al segundo evento de recombinación. Las colonias aisladas resistentes a la sucrosa del *S. typhimurium* fueron analizadas por PCR para identificar el mutante deseado de eliminación *ssaT*.

A pesar de ensayar diversas colonias resistentes a la sucrosa por medio del PCR, un mutante de eliminación *S. dublin ssaT* no se pudo identificar. Los recombinantes purificados B94-058N::*AssaCssaT* y B94-058N::*AssaJAssaT* se identificaron mediante la hibridación de colonia. La cepa de donante *E. coli* SM10 λ pir portadora del plásmido pCVD442 con el gen eliminado *ssaT* (*AssaT*) a partir del *S. dublin* se aparearon con mutantes *S. dublin* B94-058N, utilizando bien el gen eliminado *ssaC* o *ssaJ* (*AssaC* y *AssaJ*) y seleccionándose para las colonias resistentes a la

sucrosa según se describió anteriormente. Estas colonias fueron luego desarrolladas en medios selectivos (Ap y Nal) y posteriormente transportadas para ser colocadas en la nitrocelulosa (Schleicher & Schuell BA85: Schleicher & Schuell, Keene, NH). La mancha de nitrocelulosa se procesó según se describe en Davis et al., Basic methods in molecular biology, Elsevier, New York (1986) excepto que el segundo y tercer buffers utilizados fueron 1 M Tris, pH 7.6, y 1.5 M NaCl-0.25 M Tris, pH 7.6, respectivamente. El ADN bacteriano se entrecruzó con la nitrocelulosa utilizando un Stratagene UV Stratalinker 1800 (Stratagene, La Jolla, CA) por medio del auto cruzamiento (1200 μ J X 100). La mancha fue pre-hibridizada, hibridizada, lavada y desarrollada de acuerdo con las instrucciones del sistema Genius (Boehringer Mannheim Biochemicals, Indianapolis, IN), utilizando las Instrucciones del fabricante. Las secuencias Internas del gen *ssaT* se utilizaron como sondeo durante el paso de hibridación. El sondeo fue generado por PCR utilizando DEL-1680 (5'-TGGCTTTTATTTCGACCATTTGAGCCTTT-3' (SEQ ID NO:8)) y DEL-1681 (5'-TTTATCGCTTTCAACCAAATAGTGATG-3' (SEQ ID NO:9)) como primers y crecimiento de colonias suspendidos B94-058N en forma de una plantilla de ADN. La sonda ADN fue etiquetada incorporando digoxigenin dentro del gen abreviado *ssaT* y empleando el DIG-High Primer kit (Boehringer Mannheim Biochemicals). Las colonias que no arrojaron una señal positiva, es decir las mutantes de eliminación purificada *ssaT*, se analizaron para detectar la presencia en estado natural o gen eliminado *ssaT* por medio del PCR utilizando crecimiento suspendido de colonias y primers A y D (ver Ejemplo 1A) para el gen *ssaT* según se describió anteriormente.

Para aislar los mutantes deseados de eliminación doble fue necesario analizar los recombinantes después de un crecimiento no selectivo utilizando PCR (recombinantes *S. typhimurium*) o hibridación de colonia seguida de PCR (recombinantes *S. dublin*). En teoría la escisión en estado natural y del gen eliminado deberían ocurrir aleatoriamente y a una frecuencia igual produciendo el 50% de los recombinantes que portan el gen eliminado. Según se aprecia en el Ejemplo 1B, sin embargo, el porcentaje de aislados con el gen eliminado fue bastante variable. La frecuencia con la cual el gen eliminado *AssaT* se recubrió en los recombinantes purificados *S. typhimurium* MK315N::*AssaT**AssaT*, *S. typhimurium* MK315N::*AssaCAssaT*, *S. dublin* B94-058N::*AssaCAssaT* y

S. dublin B94-058N::*AssaJAssaT*, fue del 50% (4 de 8), 12.5% (1 de 8), 3.8% (8 de 209) y 8.9% (14 de 158), respectivamente.

El análisis PCR del ADN genómico de los mutantes de doble eliminación purificados *S. typhimurium* y *S. dublin* (utilizando los Primers A y D adecuados descritos anteriormente) confirmó la presencia del *ssaC* y *ssaT* o del *ssaJ* y *ssaT* como genes eliminados. Los mutantes de eliminación se confirmaron mediante pruebas serológicas siendo éstos *S. typhimurium* o *S. dublin*. Se demostró que los mutantes *S. typhimurium* y *S. dublin* se aglutinan en los antisueros de la *Salmonella* O Grupo B y de la *Salmonella* O Grupo D₁ (Difco Laboratory, Detroit, MI), respectivamente, según se esperaba.

D. Construcción de los Mutantes *S. choleraesuis*

Se construyeron los mutantes *S. choleraesuis* aplicando el proceso STM descrito en general en la Patente U.S. No.5.876.931 que se incorpora al presente estudio a manera de referencia. Brevemente, cada mutación de Inserción que se produjo portaba una etiqueta de señalización distinta de ADN lo cual le permite a los mutantes diferenciarse entre sí. Las marcas comprenden regiones centrales variables de 40-bp flanqueadas por "brazos" invariantes de 20-bp que permiten que las porciones centrales sean co-amplificadas por PCR. Las cepas de mutantes marcados se ensamblan en platillos de microtitulación, y luego se combinan para formar el "inoculum pool" y poder realizar los estudios sobre Infección. EN un momento adecuado después de la inoculación, las bacterias se aíslan separándolas del animal y se agrupan luego para formar el "pool recuperado". Las etiquetas de este pool recuperado y las que se encuentran en el pool Inoculum se amplían por separado, luego se marcan y se utilizan para filtros de sonda distribuidos de tal manera que las diversas etiquetas representen a los mutantes en el inoculum. Los mutantes que presentan una virulencia atenuada son aquellos que tienen marcas que producen señales de hibridación cuando se sondean con marcas provenientes del pool Inoculum pero no cuando el sondeo se hace con marcas proveniente del pool recuperado. El STM permite que un gran número de cepas mutantes de Inserción se tamicen simultáneamente en un solo animal para determinar la pérdida de virulencia. Mediante este método, se obtuvo la generación de mutantes de Inserción de *S. choleraesuis* que contenían un transposon mini-tn5 que interrumpía al gen en particular. Las secciones del

gen rodean a cada transposon fueron secuenciadas para identificar el sitio de inserción mediante alineación de la secuencia utilizando la que le correspondía a los genes conocidos como *S. typhimurium*. El transposon *mini-tn5* que le da origen a la mutación *AssaM* se ubicó entre las posiciones nucleótidas 126 y 127 en SEQ ID NO: 7, y el transposon *mini-tn5* que produce la mutación *AssaJ* se ubicó entre las posiciones nucleótidas 209 y 210 en SEQ ID NO: 4.

E. Caracterización de Mutantes SPI2 Sencillos y Dobles

Los datos demostraron que algunos de los mutantes de eliminación sencilla y doble, específicamente los *AssaC* y *AssaCAssaT*, son menos invasivos que en estado natural y otros mutantes. Este dato puede contribuir a mejorar ligeramente la eficacia, ya que pueden ser los mutantes *AssaC* los que permanezcan asociados con la mucosa intestinal por períodos de tiempos prolongados, mostrando sin embargo una menor capacidad de invadir las células hepáticas del hospedero, pero que están mejor equipados para provocar una inmunidad fuerte de la mucosa.

EJEMPLO 2

Seguridad y Eficacia de Mutantes SPI2 de Eliminación Sencilla y Doble

A. Eficacia de un Mutante *S. choleraesuis* *AssaC* como vacuna en cerdos

(Trial No. 704-7923-I-MJK-96-008)

La seguridad y eficacia de un mutante vivo y atenuado de *S. choleraesuis* *AssaC* como vacuna se determinó en cerdos (cerdos de 3-4 semanas de edad). Los animales (8 por grupo) fueron vacunados por vía oral a través del agua que consumían o por vía intramuscular (IM), a una dosis de aproximadamente $\sim 1 \times 10^9$ CFUs/cerdo. Para la vacuna oral, se diluyeron 10 ml de cultivo de crecimiento hecho en laboratorio de la vacuna (desarrollado generalmente según se describe en el Ejemplo 2.D. a continuación) de la siguiente manera 1:4 en ddH₂O. Se diluyó posteriormente 40 ml de esta mezcla adicionando 960 ml de ddH₂O

esterilizado; y finalmente se le aplicaron 100 ml de esta mezcla final a los cerdos por vía oral por medio de un aplicador (los animales tomaron aproximadamente 50 ml del agua aplicada, obteniéndose una dosis final de vacuna de $\sim 2.6 \times 10^8$ por animal). Para la vacuna por vía Intramuscular, se adicionó un cultivo de la vacuna diluido en proporción de 1:4 a 3 ml de WFI esterilizado; 2.5 ml de esta mezcla se administró por vía intramuscular a cada animal obteniéndose una dosis final de $\sim 3.0 \times 10^8$ por animal. Los cerdos fueron supervisados diariamente para conocer su temperatura, peso corporal, puntajes de consistencia fecal, condición física y mortalidad. Los animales fueron igualmente monitoreados para conocer la eliminación de la vacuna y de los organismos interactuantes. Los animales fueron todos sometidos a necropsia al finalizar el ensayo y se hizo cultivo de los tejidos para determinar el comportamiento del organismo en cuestión.

Después de la vacuna, no se observaron signos clínicos de enfermedad en los animales que recibieron la dosis oral o la aplicación intramuscular con el mutante *AssaC* excepto que se registro un aumento de temperatura de corta duración. Los cerdos fueron luego sometidos a la aplicación de alta virulencia de la *S. choleraesuis* en estado natural, en forma de aislado de campo que se obtuvo de un caso de salmonellosis a los 28 días post-vacuna. Los resultados demostraron que la administración del mutante *AssaC* por ruta oral o intramuscular era una práctica segura y eficaz contra la salmonellosis inducida experimentalmente. Los animales no vacunados mostraron pirexia severa, acompañada de diarrea acuosa, anorexia, deshidratación y muerte. Por el contrario, los animales vacunados con los constructos *AssaC* fueron resistentes a la infección. Para estos animales, se registró una reducción estadísticamente significativa en severidad y duración de la morbilidad, mortalidad, días de inactividad y eliminación del organismo atacante.

B. Eficacia de los Mutantes *S. choleraesuis AssaM* o *S. choleraesuis AssaC* como vacunas en cerdos
(704-7923-I-MJK-96-012)

La seguridad y eficacia de un *S. choleraesuis AssaM* vivo y atenuado o de un mutante *S. choleraesuis AssaC* como vacuna se determinaron en cerdos (cerdos de 3-4 semanas de nacidos). Cada uno de los animales fue vacunado por vía oral a través del agua que consumían a una dosis de aproximadamente $\sim 1 \times 10^9$ CFUs/cerdo. Para la vacuna oral, se diluyo un

cultivo de vacuna de crecimiento (desarrollado generalmente según se describe en el Ejemplo 2.D. a continuación) en una proporción de 1:4 en ddH₂O; 40 ml de esta mezcla se adicionó a 960 ml de ddH₂O esterilizado; y finalmente se le aplicaron 100 ml de esta mezcla final a los animales a través de un dispositivo para suministrarle el agua de beber. El número de CFUs por ml se determinó realizando diluciones seriales de 10 veces correspondientes a la formulación, final, y colocándolos en el agar. La dosis por cerdo fue determina luego mediante la multiplicación del número CFUs/ml por el número de mls de agua consumida por el animal (cada uno de ellos tomó aproximadamente 50 ml del agua), obteniéndose una dosis final de vacuna de $\sim 1 \times 10^9$ animal). Los valores basales para temperaturas corporales, consistencia fecal y condición física de cada animal se recolectaron durante los cuatro días inmediatamente anteriores a la vacuna, y se hizo la comparación con los valores post-vacuna con el fin de evaluar la seguridad de cada una de estas vacunas. Los animales fueron supervisados diariamente para conocer su temperatura, pero corporal, puntajes de consistencia fecal, condición física y mortalidad. Los cerdos fueron igualmente monitoreados para conocer la eliminación de la vacuna y de los organismos interactuantes. Los animales fueron todos sometidos a necropsia al finalizar el ensayo y se hizo cultivo de los tejidos para determinar el comportamiento del organismo en cuestión.

Después de la vacuna, no se observaron signos clínicos de enfermedad en los animales que recibieron la dosis oral con el mutante SPI2 excepto de una elevación de temperatura de corto tiempo. Los cerdos fueron luego sometidos a la aplicación de alta virulencia de la *S. choleraesuis* en estado natural, en forma de aislado de campo que se obtuvo de un caso de salmonellosis a los 28 días post-vacuna. Los resultados demostraron que la administración del mutante SPI2 por ruta oral era una segura y eficaz contra la salmonellosis inducida experimentalmente. Los animales no vacunados mostraron pirexia severa, acompañada de diarrea acuosa, anorexia, deshidratación y muerte. Por el contrario, los animales vacunados con los constructos *AssaC* o *AssaM* fueron resistentes a la infección. Para estos animales, no hubo ninguna reducción significativa en severidad y duración de la morbilidad, mortalidad, días de inactividad y eliminación del organismo atacante.

C. Eficacia de un Mutante *S. choleraesuis* AssaJ o *S. choleraesuis* AssaC como vacunas en cerdos

704-7923-I-MJK-96-004

Se determinaron la seguridad y eficacia de un *S. choleraesuis* AssaJ o un *S. choleraesuis* AssaC vivos y atenuados en cerdos (56 machos y ___ hembras cruzadas, 18-24 días de edad en el momento de la vacuna). Las temperaturas basales y los puntajes clínicos (mortalidad, morbilidad, diarrea, eliminación y bacterias y ganancia de peso diario promedio) se registraron en los Días 1-4. Los cerdos fueron vacunados por vía oral a través del agua que tomaban en el Día 4 a una dosis de aproximadamente $\sim 1 \times 10^9$ CFUs/cerdo según se describió anteriormente en el Ejemplo 2B. Los animales fueron monitoreados a diario para analizar su sintomatología clínica (% de mortalidad, % de morbilidad, % de días con diarrea, % de días de eliminación y ganancia diaria promedio, que se determinó todo ello según se describe en el Ejemplo 2D más adelante) durante 21 días post-vacuna (Días 5-25) de los cuales los Días 22-25 se consideraron como una línea basal antes de aplicar el elemento atacante que en este caso era la bacteria en estado natural. Los cerdos fueron luego sometidos a la *S. choleraesuis* en estado natural que es altamente virulenta, en forma de aislado en campo obtenida de un caso de salmonellosis, inducida por vía oral (después de un ayuno de 24 horas) a los 21 días post-vacuna (Día 25). Los cerdos continuaron siendo analizados para estudiar su sintomatología clínica durante otros 21 días posteriores a la aplicación del organismo atacante (Días 26-46). Los resultados post-vacunas (y previos a la aplicación del organismo atacante) se pueden observar en la Tabla 2 a continuación. Los resultados posteriores a la aplicación del organismo atacante se pueden observar en la Tabla 3 a continuación. Los resultados demostraron que la administración oral de cada uno de estos dos mutantes como vacuna es segura y eficaz contra la salmonellosis inducida experimentalmente.

Tabla 2. La carencia de signos clínicos en vacunados muestra la seguridad de la vacuna *S. choleraesuis* posterior a su aplicación.

Vacu na	Tiem po	N =	% Mortali dad	% Morbili dad	% Días con Diarrea	% Días de Eliminació n	Ganancia Diarla Promedio
------------	------------	--------	---------------------	---------------------	-----------------------------	------------------------------	--------------------------------

Ninguna	pre post	8	0 0	0 0	0 3.3	0 0	0.48
AssaC	pre post	8	0 0	0 0	3.1 4.0	0.0 9.7	0.39
AssaJ	pre post	8	0 0	0 1.6	2.1 1.9	0.0 13.5	0.38

Tabla 3. Reducción en los signos clínicos de vacunados post-aplicación del atacante que muestra la eficacia de la vacuna *S. choleraesuls*.

Vacuna	N=	% Mortalidad	% Morbilidad	% con Días de Diarrea	% Días de Eliminación	Ganancia Diaria Promedio
Ninguna	8	0	13.9	34.5	54.8	0.44
AssaC	8	0	5.2	11.1	14.4	0.69
AssaJ	8	0	10.7	10.7	18.3	0.61

D. Eficacia de mutantes *S. dublin* AssaC o un *S. dublin* AssaJ o un *S. dublin* AssaT como vacunas en el ganado vacuno (2051-7923-I-MJK-98-004)

Se determinó la seguridad y eficacia de mutantes *S. dublin* AssaC o *S. dublin* AssaJ o *S. dublin* AssaT vivos o atenuados en ganado vacuno (36 machos y terneros hembras, 10-14 días de edad en el momento de la aplicación de la vacuna). Las cepas *S. dublin* vivas y atenuadas fueron revividas de cultivos stock mediante una toma de agar de sangre. Después de la incubación durante 18-24 horas a 37°C, las colonias provenientes de una sólida área de crecimiento fueron barridas con un bucle esterilizado e inoculadas dentro del caldo LB. Después de 14 horas de incubación estática a 37°C, 1.0 ml de este cultivo se utilizó para inocular 22.5 ml de caldo fresco LB en frascos Erlenmeyer de polycarbonato esterilizado de capacidad de 250 ml. Después de 6 horas de incubación estática a 37°C, se adicionaron 2.5 ml del cultivo resultante del caldo sin diluir a 3.0 litros de reposicionador de leche para administrarle a cada uno de los terneros. La dilución y el conteo viable en placa sobre agar de sangre determinó los "Números de Bacterias Viables" para cada cepa en el momento de la

preparación. Cada una de las vacunas se mantuvo a temperatura ambiente y se le administró a los animales dentro de la mayor brevedad posible después de la preparación (dentro de aproximadamente 30 minutos). Se tomo registro de las temperaturas basales y puntajes clínicos (mortalidad, condición física, inactividad, diarrea (puntaje para heces fecales), y eliminación de bacterias) en los Días 1-4. Los terneros fueron vacunados oralmente vía reemplazador de leche en el Día 4 con el estado natural o con una bacteria mutante a una dosis de aproximadamente $\sim 1 \times 10^9$ CFUs/ternero. Para la vacuna oral, se inoculó 1 ml del cultivo de vacuna desarrollado en laboratorio en el elemento de reemplazo de leche para el ternero. El número de CFUs/ml se determinó según se describió anteriormente en el Ejemplo 2B. Debido a que cada animal consumía su ración completa de la leche en el reemplazador el día de la vacuna, el número de CFUs por animal fue el mismo que el número de CFUs/ml del cultivo.

Los terneros fueron monitoreados diariamente para analizar sus síntomas clínicos (% mortalidad, condición física, % días inactivos, puntaje fecal y 5 días de eliminación) durante 28 días después de la vacuna (Días 5-32) de los cuales los Días 29-32 se consideraron como línea basal antes de la aplicación de la bacteria en estado natural. En caso de que un ternero muriera durante el período de estudio, se le asignaba un puntaje de "1" para la variable de mortalidad, de lo contrario a esta variable se le daba un puntaje de "0". La condición se calificó en una escala de 1 a 5, en donde "1" era condición saludable, es decir animal activo con pelaje normal; "2" mostraba que el animal estaba ligeramente deprimido y que su actividad era intermedia y el pelaje era áspero; "3" animal deprimido en forma moderada a severa, inactivo, letárgico y/o huesudo independientemente de la condición de su pelaje; "4" animal moribundo; y "5" animal muerto. Si moría un ternero, a la condición física se le daba un puntaje de "5" para el día del deceso (o al siguiente día según la hora en que muriera), y de allí en adelante no se le asignaban valores. La condición física promedio se consideró como el promedio de puntajes diarios dentro del período de estudio para cada uno de los animales. Los puntajes físicos promedios fueron utilizados luego para calcular los puntajes re-escalados de la siguiente manera: puntaje de re-escalación = $100 \times (\text{puntaje de condición física promedio} - 1) / 4$. Este valor convierte a la escala 1-5 a una escala 0-100. El porcentaje de días inactivos se determinó calculando el valor

porcentual de los días durante el período de estudio en que un ternero presentaba un puntaje superior a 2 dentro de la calificación de su condición físico. El puntaje de heces fecales se calificó en una escala de 1-4 donde "1" es normal, con formas sólidas o blandas; "2" son heces blandas sin forma; "3" heces acuosas con material sólido; y "4" acuoso/expulsado profusamente con poco o ningún material sólido. El porcentaje de días de eliminación se calculó como el valor porcentual de los días durante el período de interés en que un ternero arrojaba positivo de *Salmonella* en análisis rectal.

Los terneros fueron luego sometidos a una aplicación del *S. dublin* en estado natural heterólogo altamente virulento, aislado en campo y obtenido de un caso de salmonellosis bovina a los 28 días posteriores a la vacuna (Día 32). Los animales continuaron siendo supervisados para analizar su sintomatología clínica durante 14 días posteriores a las aplicaciones (Días 33-46). Los resultados de post-vacuna (y previos a las aplicaciones) se pueden observar en la Tabla 4 a continuación. Los resultados de post-aplicación se observan en la Tabla 5 a continuación. Se hizo necropsia el Día 46 o e el momento del fallecimiento del animal, para obtener luego muestras tisulares y fecales para hacer cultivos del organismo atacante. Los datos tomados del cultivo tisular (>2g) o fecal (>2g) mostraron que había una reducción de las cepas de los organismos que se aplicaron en los tejidos provenientes de animales vacunados con los mutantes SPI2 en comparación con los controles ingenuos, y además que la administración oral de cada uno de estos tres mutantes como vacuna era una práctica segura y eficaz contra la salmonellosis inducida experimentalmente. Los efectos protectores que se observan con estos mutantes SPI2 fueron mejores que los observados con los mutantes Acya Acrp.

Tabla 4. Carencia de signos clínicos en animales vacunados, lo cual muestra la seguridad de las vacunas *S. dublin* post-aplicación.

Vacuna/ Cepa	Tiempo	N =	Mortalidad (%)	Condición Física	% Días Inactivos	Puntaje Fecal	% Días de Eliminación
Ninguna	pre	6	0	0.0	0	1.2	0.0
	post (1-28)		0	0.0	0	1.1	0.0

Estado Natural	pre post (1-28)	6	0 16.7	0.0 5.4	0 5.6	1.3 1.4	0.0 64.1
AssaC	pre post (1-28)	6	0 0	0.0 0.0	0 0	1.0 1.2	0.0 9.7
AssaJ	pre post (1-28)	4	0 0	0.0 2.0	0 2.7	1.0 1.1	0.0 13.5
AssaT	pre post (1-28)	6	0 0	1.0 0.3	0 0	1.3 1.2	0.0 22.4

Tabla 3. Reducción de signos clínicos en vacunados post-aplicación mostrando la eficacia de vacunas *S. dublin*.

Vacuna/ Cepa	N=	Mortalidad (%)	Condición Física	% Días Inactivos	Puntaje Fecal	% Días de Eliminación
Ninguna	6	50.0	13.9	16.4	1.8	78.5
Estado Natural	5	0	0.0	0.0	1.2	39.5
AssaC	6	0	0.0	0.0	1.0	39.3
AssaJ	4	0	0.0	0.0	1.1	19.6
AssaT	6	0	2.1	0.0	1.2	29.2

E. Eficacia de los mutantes *S. typhimurium* AssaC o un *S. typhimurium* AssaJ o un *S. typhimurium* AssaT como vacunas en el ganado

(2051-7923-I-MJK-98-006)

La seguridad de un mutante *S. typhimurium* AssaC o *S. typhimurium* AssaJ o *S. typhimurium* AssaT vivo y atenuado como vacuna se determinó en el ganado según describió anteriormente en el Ejemplo 2D. Los resultados, que aparecen en las Tablas 6 y 7 a continuación, demostraron que la administración oral de cada uno de estos tres mutantes como vacuna era seguro y eficaz contra la salmonellosis inducida experimentalmente. Los efectos protectores que se observan con estos mutantes SPI2 fueron mejores que los observados con los mutantes ArfaK.

Tabla 6. Carencia de signos clínicos posteriores a la vacuna que muestran la seguridad de las vacunas *S. typhimurium*

Vacuna/ Cepa	Tiempo	N =	Mortali dad (%)	Condic ión Física	% Días Inactiv os	Punta je Fecal	% Días de Eliminaci ón
Ninguna	pre	6	0	0.0	0	1.0	0.0
	post (1-28)		0	0.4	0	1.4	7.6
AssaC	pre	6	0	0.0	0	1.0	0.0
	post (1-28)		0	0.3	0	1.3	84.8
AssaJ	pre	6	0	0.0	0	1.3	0.0
	post (1-28)		0	0.0	0	1.4	57.6
AssaT	pre	6	0	0.0	0	1.0	0.0
	post (1-28)		0	0.0	0	1.4	62.9
Estado Natural	pre	6	0	1.0	0	1.0	0.0
	post (1-28)		0	0.0	0	1.6	58.8

Tabla 7. Reducción de signos clínicos en vacunados post-aplicación de organismos que muestran la eficacia de vacunas *S. typhimurium*

Vacuna/ Cepa	N=	Mortalid ad (%)	Condic ón Física	% Días Inactiv os	Puntaje Fecal	% Días de Eliminación
Ninguna	6	100.0	50.5	73.9	3.0	100
AssaC	6	33.3	21.9	18.8	2.6	82.1
AssaJ	6	83.3	38.6	43.1	2.8	94.0
AssaT	6	50.0	33.0	39.5	2.4	81.0
Estado Natural	6	66.7	51.8	61.0	3.1	91.7

F. Eficacia de un mutante *S. dublin* AssaC o *S. dublin* AssaC/AssaT o *S. dublin* AssaJ/AssaT o una combinación de *S. dublin* AssaC/AssaT con *S. typhimurium* AssaC/AssaT como vacunas en el ganado (2051-7923-I-MJK-99-011)

La seguridad y eficacia de un mutante *S. dublin* AssaC o *S. dublin* AssaC/AssaT o *S. dublin* AssaJ/AssaT o combinación de *S. dublin* AssaC/AssaT con *S. typhimurium* AssaC/AssaT como vacunas se

determinó en el ganado según se describió anteriormente en el Ejemplo 2D. Los resultados, que se aprecian en las Tablas 8 y 9 a continuación, demostraron que la administración oral de cada uno de estos tres mutantes en forma de vacuna era una práctica segura y eficaz contra la salmonellosis inducida experimentalmente. Los resultados también demostraron que no hubo interferencia alguna cuando una combinación de mutantes *S. dublin* y *S. typhimurium* se administraron. Los animales vacunados con los constructos de las vacunas *S. dublin* *AssaC/AssaT* y *S. typhimurium* *AssaC/AssaT* no presentaron mortalidad y sus puntajes clínicos fueron los más bajos para todos los grupos con posterioridad a la exposición del organismo inoculado que para el caso fue una cepa *S. dublin* heteróloga altamente virulenta. Debido a que tan solo la protección parcial a la inoculación con *S. dublin* se logra mediante la vacuna de terneros con vacunas atenuadas vivas de *S. typhimurium*, la resistencia de estos animales se debió probablemente a la inmunidad inducida por el componente *S. dublin* de la vacuna. Así las cosas, la eficacia del componente *S. dublin* de la vacuna no fue interferida por la presencia del componente *S. typhimurium*, y es posible que este último componente pueda en realidad mejorar las condiciones de Inmunidad de *S. dublin* cuando se administre en forma de vacuna combinada.

Tabla 8. Carencia de signos clínicos con posterioridad a la vacuna que muestran la seguridad de vacunas de eliminación sencilla y doble del *S. dublin*, y de las vacunas de combinación *S. dublin/S. typhimurium*.

Vacuna	Tiempo	N =	Mortalidad (%)	Condición Física	% Días Inactivos	Puntaje Fecal	% Días de Eliminación
Ninguna	pre post (1-28)	6	0 16.7	0 2.65	0 3.3	7.5 17.5	0 0
<i>S. dublin</i> <i>AssaC/T</i> <i>S. typhim.</i> <i>AssaC/T</i>	pre post (1-28)	6	0 0	0 0.89	0 0	7.5 17.5	0 0
<i>S. dublin</i>	pre	6	0	0	0	10.0	0

<i>AssaC</i>	post (1-28)		0	0.15	0	12.5	8.0
<i>S. dublin AssaC/T</i>	pre post (1-28)	6	0 0	0 0.89	0 0	0 10.0	0 13.9
<i>S. dublin AssaJ/T</i>	pre post (1-28)	6	0 0	1.0 1.03	0 0	1.4 1.4	8.3 26.8

Tabla 9. Reducción en signos clínicos post-aplicación que muestra la eficacia de las vacunas de eliminación sencilla y doble *S. dublin*, y de las vacunas de combinación *S. dublin/S. typhimurium*.

Vacuna	N=	Mortalidad (%)	Condición Física	% Días Inactivos	Puntaje Fecal	% Días de Eliminación
Ninguna	6	100.0	36.1	33.2	50.0	100.0
<i>S. dublin AssaC/T</i> <i>S. typhim. AssaC/T</i>	6	0	10.0	2.8	27.5	68.6
<i>S. dublin AssaC</i>	6	16.7	12.4	11.6	22.5	75.0
<i>S. dublin AssaC/T</i>	6	20.0	12.7	14.8	20.0	78.6
<i>S. dublin AssaJ/T</i>	6	16.7	17.6	23.7	27.5	83.3

G. Eficacia de un mutante *S. typhimurium AssaC* o *S. typhimurium AssaC/AssaT* o *S. typhimurium AssaJ/AssaT* o una combinación de *S. dublin AssaC/AssaT* con *S. typhimurium AssaC/AssaT* como vacunas en el ganado bovino (2051-7923-I-MJK-99-007)

La seguridad y eficacia de un mutante *S. typhimurium AssaC* o *S. typhimurium AssaC/AssaT* o *S. typhimurium AssaJ/AssaT* o combinación de *S. dublin AssaC/AssaT* con *S. typhimurium AssaC/AssaT* como vacunas se determinó en bovinos a los cuales se les aplicó *S. typhimurium* según se describió anteriormente en el Ejemplo 2D. Los resultados, que aparecen en las Tablas 10 y 11 a continuación, demostraron que la administración oral

de cada uno de estos tres mutantes como vacuna era una práctica segura y eficaz contra la salmonellosis inducida experimentalmente. Según se describió anteriormente en el Ejemplo 2F, estos resultados también mostraron que no había ninguna interferencia con una combinación de *S. dublin* y *S. typhimurium* en el momento de su administración.

Tabla 10. Carencia de signos clínicos con posterloridad a la vacuna que muestran la seguridad de las vacunas *S. typhimurium*.

Vacuna	Tiempo	N =	Mortalidad (%)	Condición Física	% Días Inactivos	Puntaje Fecal	% Días de Eliminación
Ninguna	pre post (1-28)	6	0 0	0 0.45	4.2 0		0 0
<i>S. dublin</i> <i>AssaC/T</i> <i>S. typhim.</i> <i>AssaC/T</i>	pre post (1-28)	6	0 0	0 0	0 0		0 61.4
<i>S. typhim.</i> <i>AssaC</i>	pre post (1-28)	6	0 0	0 0	8.3 0.6		0 71.4
<i>S. typhim.</i> <i>AssaC/T</i>	pre post (1-28)	6	0 0	0 0	4.2 0		0 76.2
<i>S. typhim.</i> <i>AssaJ/T</i>	pre post (1-28)	6	0 0	0 0.74	4.2 0		0 71.2

Tabla 11. Reducción de signos clínicos vacunados post-aplicación que muestran la eficacia de las vacunas *S. typhimurium*.

Vacuna	N=	Mortalidad (%)	Condición Física	% Días Inactivos	Puntaje Fecal	% Días de Eliminación
Ninguna	6	100.0	36.98	32.6	77.5	100.0

<i>S. dublin</i> AssaC/T	6	16.7	11.11	1.4	25.0	82.2
<i>S. typhim.</i> AssaC/T	6	33.3	11.61	7.1	30.0	92.4
<i>S. typhim.</i> AssaC/T	6	0	9.23	5.6	22.5	86.9
<i>S. typhim.</i> AssaJ/T	6	16.7	18.4	18.4	30.0	79.0

Se espera que ocurran numerosas modificaciones y variaciones del invento antes descrito, a los ojos de los profesionales de este campo de estudio. En este sentido, deben trabajarse tan solo las aplicaciones que aparezcan en las reivindicaciones del presente trabajo.

REIVINDICACIONES

1. Una composición de vacuna que comprende una cantidad inmunológicamente protectora de una bacteria primeramente atenuada, mutante y no reversible de la *Salmonella* en la cual dos o más genes dentro de la región SPI2 se han inactivado.

2. La composición de la vacuna de la reivindicación 1 en donde tales genes son inactivados por eliminación de una porción de la región codificante del gen.

3. La composición de la vacuna descrita en la reivindicación 1 donde tales genes son inactivados por una mutación de inserción.

4. La composición de la vacuna descrita en la reivindicación 1 donde los genes son del aparato del sistema de secreción (*ssa*).

5. La composición de la vacuna descrita en la reivindicación 1 donde los genes se seleccionan a partir del grupo conformado por *ssaT*, *ssaJ*, *ssaC* y *ssaM*, y donde:

(a) el mencionado gen *ssaT* está conformado por SEQ ID NO: 1 o 2, o una secuencia nucleótida de longitud total que se hibridiza al complemento no codificante de SEQ ID NO: 1 o 2 bajo condiciones estrictas, o bien una secuencia nucleótida de *Salmonella* de longitud total que tenga una identidad secuencial del 95% al SEQ ID NO: 1 o 2.

(b) el mencionado gen *ssaJ* está conformado por SEQ ID NO: 3 o 4, o una secuencia nucleótida de longitud total que se hibridiza al complemento no codificante de SEQ ID NO: 3 o 4 bajo condiciones estrictas, o bien una secuencia nucleótida de *Salmonella* de longitud total que tenga una identidad secuencial del 95% al SEQ ID NO: 3 o 4.

(c) el mencionado gen *ssaC* está conformado por SEQ ID NO: 5 o 6, o una secuencia nucleótida de longitud total que se hibridiza al complemento no codificante de SEQ ID NO: 5 o 6 bajo condiciones estrictas, o bien una secuencia nucleótida de *Salmonella* de longitud total que tenga una identidad secuencial del 95% al SEQ ID NO: 5 o 6; y

(d) el mencionado gen *ssaM* está conformado por SEQ ID NO: 7 o 30, o una secuencia nucleótida de longitud total que se hibridiza al complemento no codificante de SEQ ID NO: 7 o 30 bajo condiciones estrictas, o bien una secuencia nucleótida de *Salmonella* de longitud total que tenga una identidad secuencial del 95% al SEQ ID NO: 7 o 30.

6. La composición de la vacuna de la reivindicación 5 donde, en la mencionada bacteria mutante primeramente atenuada de la *Salmonella*, se han inactivado *ssaT* y *ssaC*.

7. La composición de la vacuna de la reivindicación 2 donde, en la mencionada bacteria mutante primeramente atenuada de la *Salmonella*, se han inactivado *ssaT* y *ssaJ*.

8. La composición de la vacuna descrita en la reivindicación 1 que comprende además una segunda bacteria *Salmonella* mutante y atenuada donde uno o más genes dentro de la región SPI2 han sido inactivados.

9. La composición de la vacuna de la reivindicación 8 donde los genes mencionados se seleccionan a partir del grupo conformado por *ssaT*, *ssaJ*, *ssaC* y *ssaM*.

10. La composición de la vacuna de la reivindicación 8 donde la mencionada primera y segunda bacteria mutantes de *Salmonella* provienen de distintos serogrupos.

11. La composición de la vacuna de las reivindicaciones 1 u 8 donde las mencionada bacterias *Salmonella* son *Salmonella enterica* subespecie *Enterica*.

12. La composición de la vacuna de las reivindicaciones 1 u 8 donde las mencionadas bacterias *Salmonella* provienen de cualquiera de los serogrupos A, B, C₁, C₂, D₁ o E₁.

13. La composición de la vacuna de la reivindicación 8 donde las mencionadas primera y segunda bacterias atenuadas mutantes *salmonellas* se seleccionan del grupo conformado por *S. dublin* y *S. typhimurium*.

14. La composición de la vacuna de la reivindicación 1 donde la mencionada primera bacteria mutante y atenuada *Salmonella* comprende además un polinucleótido que codifica un polipéptido distinto de la *Salmonella*.

15. Un método para conferir inmunidad protectora a un animal no roedor que comprende el paso de administrarle a dicho animal una composición de la vacuna que comprenda una cantidad inmunológicamente protectora de una bacteria no reversible y mutante de *Salmonella* en la cual uno o más genes dentro de la región SPI2 hayan sido inactivados.

16. El método de la reivindicación 15 donde la mencionada cantidad inmunológicamente protectora de la mencionada bacteria

atenuada proporciona una mejor condición de mortalidad, diarrea sintomática, condición física, o producción de leche.

17. El método de la reivindicación 15 donde el gen mencionado es inactivado por eliminación de la porción de la región codificante del gen.

18. El método de la reivindicación 15 donde el gen mencionado pertenece a un aparato del sistema de secreción (*ssa*).

19. El método de la reivindicación 15 donde los genes mencionados se seleccionan a partir del grupo conformado por *ssaT*, *ssaJ*, *ssaC* y *ssaM*.

20. Un método para reducir la cantidad o duración de la eliminación bacteriana durante la infección, que comprende el paso de administrarle a un animal no roedor una composición de vacuna que consiste en una bacteria *Salmonella* atenuada, mutante y no reversible en la cual uno o más genes dentro de la región SPI2 han sido inactivados, en una cantidad eficaz para reducir la eliminación bacteriana por el mencionado animal.

21. El método descrito en la reivindicación 20 donde la cantidad de eliminación bacteriana se reduce en aproximadamente el 10% o más.

22. El método descrito en la reivindicación 20 donde la reducción de la eliminación bacteriana se reduce en aproximadamente el 10% o más.

23. El método descrito en la reivindicación 20 donde el mencionado gen pertenece al aparato del sistema de secreción (*ssa*).

24. Los métodos de la reivindicación 20 donde el mencionado gen se selecciona del grupo conformado por *ssaT*, *ssaJ*, *ssaC* y *ssaM*.

25. El método de las reivindicaciones 15 o 20 donde el animal mencionado se selecciona del grupo conformado por ganado vacuno, ovejas, cabras, caballos, cerdos, aves de corral y otras aves, gatos, perros, y humanos.

26. El método de la reivindicación 15 o 20 donde el mencionado animal es un cerdo.

27. El método de la reivindicación 15 o 20 donde el mencionado animal es un bovino.

28. Un método de aplicación de un antígeno polipéptido a un animal que comprende el paso de administrar la composición de la vacuna de la reivindicación 13 a dicho animal.

LOCALIZACION PRECISA DE LA ELIMINACION DE ssaT

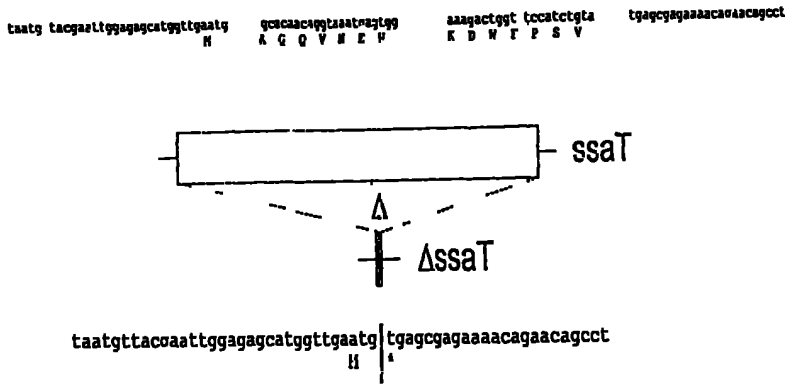


FIG 1

73

LOCALIZACION PRECISA DE LA ELIMINACION DE ssaJ

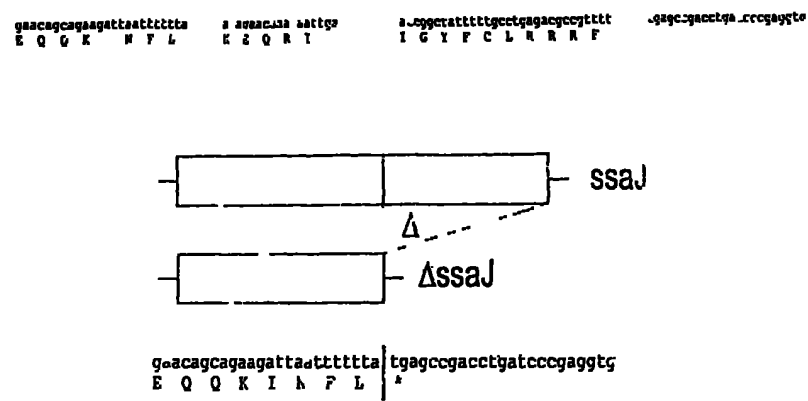


FIG 2

af

REQUISITOS NECESARIOS PARA PRESENTACIÓN Y AGILIZACIÓN DEL TRAMITE

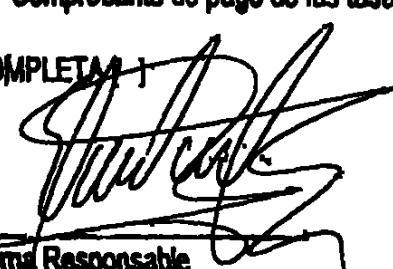
		USUARIO	RADICADOR
PATENTE DE INVENCION ☒	MODELO DE UTILIDAD	☐	☐
• Indicación de que se solicita la concesión de una patente		☐	☐
• Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud		☐	☐
• Descripción de la invención		☐	☐
• Dibujos de ser estos pertinentes		☐	☐
• Comprobante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

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

• Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial.	☐	☐
• Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud	☐	☐
• Representación gráfica y foto gráfica del Diseño Industrial o muestra del material que incorpora el diseño	☐	☐
• Comprobante de pago de 3 tasas establecidas	☐	☐
COMPLETA ☐	INCOMPLETA	☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐

• Indicación de que se solicita el registro de un Esquema de trazado	☐	☐
• Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud	☐	☐
• Representación gráfica del esquema de trazado	☐	☐
• Comprobante de pago de las tasas establecidas	☐	☐
COMPLETA ☐	INCOMPLETA	☐


Firma Responsable

Fecha Radicación: 2002-09-12 15:43:12 Folios 78
Trámite 011 PCT-PATENT 379 FASE NACI 411 PRESENTAC
Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

Carrera 13 No 27-00 Piso 2 m - 111
Conmutador 362 08 43
Fax 350 52 20 e-mail info@sic.gov.co
Bogotá D.C. Colombia