



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 279 963**

(51) Int. Cl.:

C12N 15/68 (2006.01)

C12N 15/74 (2006.01)

C12N 15/64 (2006.01)

A61K 39/112 (2006.01)

A61K 39/02 (2006.01)

A61K 35/74 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

C12N 1/36 (2006.01)

C12R 1/42 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Número de solicitud europea: **03752862 .7**

(86) Fecha de presentación : **19.05.2003**

(87) Número de publicación de la solicitud: **1507863**

(87) Fecha de publicación de la solicitud: **23.02.2005**

(54) Título: **Estabilización de plásmidos *in vivo*.**

(30) Prioridad: **18.05.2002 GB 0211459**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.09.2007

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.09.2007

(73) Titular/es: **Cobra Biologics Limited**
The Science Park, University of Keele
Keele, Newcastle Staffordshire ST5 5SP, GB

(72) Inventor/es: **Hanak, Julian;**
Cranenburgh, Rocky y
Gorman, Scott

(74) Agente: **Carpintero López, Francisco**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Estabilización de plásmidos *in vivo*.

5 **Campo de la invención**

Esta invención se refiere a una célula bacteriana atenuada transformada para su uso como un medicamento.

Antecedentes de la invención

10 La expresión de proteínas recombinantes en células huésped es importante para varias aplicaciones terapéuticas. En particular, la expresión de proteínas antigénicas en una célula huésped adecuada es un procedimiento eficaz de inmunización frente a microorganismos patógenos. Un procedimiento conveniente para lograr esto es generar una célula huésped recombinante que contiene un plásmido que codifica para uno o más antígenos o epítomos. Sin embargo, 15 con el fin de mantener tales plásmidos a un número de copias suficiente, se requiere algo de presión selectiva. Esto es debido a que el ADN extracromosómico llevado en las células huésped es inherentemente inestable ya que las células que contienen plásmidos normalmente tienen una carga metabólica aumentada comparado con células segregadoras libres de plásmido.

20 El procedimiento convencional de mantener el número de copias de plásmidos deseados en células en cultivo es incluir un marcador seleccionable, tal como un gen de resistencia frente a antibióticos, en el plásmido, y cultivar las células en presencia del antibiótico apropiado. Para las células o plásmidos previstos para uso terapéutico, esto tiene ciertas ventajas incluso en cultivo *in vitro*, por ejemplo el riesgo potencial de propagar genes de resistencia frente a antibióticos. Por ejemplo, para el uso *in vivo*, la presencia requerida de una concentración suficiente de antibiótico 25 para garantizar la selección de células que contienen un alto número de copias de plásmidos puede no ser deseable, práctico o posible.

Otros procedimientos satisfactorios para mantener plásmidos no utilizan selección por antibióticos, sino que en su lugar se basan en un huésped mutante que no puede sintetizar un metabolito esencial e insertar el gen que proporciona 30 esta síntesis en el plásmido. Otras soluciones implican colocar un gen que codifica para un producto tóxico en el cromosoma y luego incluir un sistema de represor o inhibidor correspondiente en el plásmido, con el resultado de que las células libres de plásmido mueren eficazmente en la segregación.

35 Qian Feng *et al* (Infection and Immunity, 2002, 70:2029-2038) y Mastroeni *et al* (Veterinary Journal, 2001,161 (2):132-164) describen procedimientos de expresar un gen de interés en una célula transformada dentro de un organismo receptor. El documento EP0851932 describe un procedimiento de mantener plásmidos dentro de células huésped en cultivo *in vitro* por medio de valoración de represor operador. Esto implica diseñar por ingeniería una célula huésped adecuada, de tal manera que se condiciona la expresión de un gen cromosómico esencial mediante inserción de una secuencia de operador dentro de su región de control. Este operador se une a una proteína represora, y en presencia 40 de tal represor unido, la expresión del gen se regula por disminución, y en ausencia de este producto esencial, la célula muere o no consigue dividirse. El cromosoma de la célula huésped se diseña por ingeniería adicionalmente de manera que contiene un gen que expresa la proteína represora, de manera que ahora la célula no es viable a menos que se inhiba el gen de alguna manera o se reduzca la auxotrofia de la célula mediante adición del producto esencial requerido como nutriente complementario en el medio de cultivo.

45 Los plásmidos deseados para su mantenimiento en esta célula huésped se diseñan mediante ingeniería para contener uno o más sitios de operador similares al que controla la expresión del gen de la célula huésped esencial tal como se describió anteriormente. Cuando se transforman en la célula huésped, tales plásmidos compiten por la unión del represor dentro de la célula. Si se alcanza un número de copias suficiente, todo el represor está unido a los plásmidos 50 y el gen celular esencial se deprime, liberando la célula de su auxotrofia y permitiéndola crecer y dividirse en ausencia de nutrientes complementarios.

Aunque el documento EP 0851932 (y Cranenburgh *et al*, 2000, Nucleic Acids Research 29:E26) describe un sistema de este tipo para su uso *in vitro*, no hay descripción de células huésped y plásmidos adecuados para un uso 55 terapéutico *in vivo* conveniente y seguro. En consecuencia, hay una necesidad de un sistema de este tipo para la expresión conveniente de una variedad de genes terapéuticos llevados en plásmidos en células huésped aceptables para el uso terapéutico *in vivo*.

Sumario de la invención

60 La invención se basa en células huésped modificadas, para su uso terapéutico *in vivo*, que pueden usarse para expresar un gen llevado por plásmidos terapéuticamente útil, usando un sistema de mantenimiento de plásmidos que no requiere el uso de un marcador seleccionable dominante llevado por plásmidos, sino que en su lugar utiliza un sistema de valoración de represor.

65 Una aplicación particularmente útil de esto es en el campo de la vacunación. Las formas más tempranas de inmunización profiláctica implicaban el uso de cepas atenuadas de microorganismos patógenos, que llevaban antígenos compartidos con los microorganismos de tipo natural más peligrosos. La reacción inmunitaria generada frente a las

cepas atenuadas era protectora frente a la infección con los microorganismos de tipo natural. Este enfoque todavía se utiliza en la actualidad, por ejemplo en el uso de la cepa BCG de *Mycobacterium bovis*.

Tal como se usa en el presente documento, “inmunización” significa la estimulación de una respuesta inmunitaria protectora o terapéutica. La “vacunación” es la administración deliberada de antígenos que pueden estimular una respuesta inmunitaria protectora o terapéutica para el fin de la profilaxis. En este contexto, tales antígenos pueden denominarse “inmunógenos”.

Un microorganismo “atenuado”, en este contexto, es uno que provoca un efecto patógeno reducido (idealmente poco o ninguno) cuando se administra a un organismo receptor, comparado con un patógeno de tipo natural. Tales microorganismos atenuados pueden surgir de manera natural, pueden seleccionarse deliberadamente mediante paso repetido *in vivo* o *in vitro*, o pueden construirse mediante tecnología de ADN recombinante manipulando o eliminando genes que se sabe que están asociados con la virulencia.

Sin embargo, hay limitaciones al enfoque de utilizar cepas atenuadas de patógenos particulares como vacunas frente a la infección provocada por sus equivalentes de tipo natural. Puede no haber disponible una cepa atenuada segura del patógeno relevante, o una cepa de este tipo puede generar una mala respuesta inmunitaria protectora. El uso de técnicas de ADN recombinante permiten, en principio, la identificación de genes responsables de la expresión de antígenos específicos por los patógenos, que pueden generar una respuesta inmunitaria protectora, y transferirlos a células huésped más seguras, o más convenientes, que pueden usarse entonces como vacunas. Tales genes pueden codificar directamente para antígenos de proteínas, o pueden codificar para enzimas responsables de la biosíntesis de estructuras antigénicas de lípidos o hidratos de carbono más complejas. Además, esto permite el uso de un número limitado de cepas huésped para administrar antígenos recombinantes de cualquiera de una amplia gama de especies de patógenos.

Los genes asociados a antígenos transferidos a una célula huésped más segura y conveniente (preferiblemente atenuada) de esta manera pueden, en principio, o bien insertarse (integrarse) en el cromosoma del huésped, o bien llevarse en un elemento extracromosómico tal como un plásmido autoreplicante. La ventaja de la integración es que el gen se mantiene de manera estable como parte del cromosoma. La desventaja es que una integración estable de este tipo es un procedimiento complejo y que requiere mucho tiempo, particularmente cuando deben expresarse varios genes asociados a antígenos diferentes. La integración aleatoria puede producir efectos inesperados debido a la inactivación por inserción de genes de la célula huésped. La integración específica del sitio mediante recombinación homóloga es compleja y requiere un esfuerzo y atención considerables.

La vacunación puede llevarse a cabo con microorganismos atenuados recombinantes que expresan genes asociados a antígenos apropiados llevados en elementos extracromosómicos tales como plásmidos (por ejemplo, Oyston *et al*, 1995, Infect. Immun. 63:563-568; Titball *et al*, 1995, Infect. Immun. 63: 563-568). La construcción de vectores de expresión adecuados es sencilla en comparación, y la transformación o transfección con tales vectores es rutina para muchos tipos de células. La desventaja es que tales plásmidos no se replican de manera estable a lo largo de divisiones celulares repetidas en ausencia de algunos medios de selección. Convencionalmente, en el caso de células transformadas en cultivo, esto se logra por medio de un marcador seleccionable dominante, casi siempre un gen de resistencia frente a antibióticos, llevado en el plásmido. Las células crecen en un medio en el que se añade el antibiótico relevante en una concentración apropiada y sólo las células que llevan el plásmido, y por tanto expresan el gen de resistencia, sobreviven y se dividen. Esto tiene obviamente dificultades prácticas principales cuando se aplica al uso *in vivo* de tales células para su uso terapéutico, tal como la vacunación. Además del riesgo de propagar la resistencia frente a antibióticos y la posibilidad de una respuesta inmunitaria inapropiada frente al producto del gen de resistencia, puede ser difícil o imposible mantener una concentración suficiente de antibiótico en el compartimiento o tejido apropiado del organismo receptor. En cualquier caso, no es deseable exponer al receptor a la dosis requerida de antibiótico si puede evitarse.

La presente invención permite el mantenimiento estable de un plásmido dentro de una célula huésped, en ausencia de cualquier selección externa tal como un antibiótico. La valoración de represor operador permite a los plásmidos ser de autoselección en una célula huésped adecuadamente modificada. Es necesario diseñar mediante ingeniería una célula huésped modificada de este tipo (“célula huésped ORT[®]”) con respecto a dos genes cromosómicos, pero una vez construida, puede usarse para cualquier número de “plásmidos ORT[®]” que expresen diferentes transgenes. La capacidad de expresar cualquier número de antígenos diferentes usando la misma célula huésped atenuada (y validada), transformándola sencillamente con un plásmido ORT[®] que codifica para el gen asociado a antígenos correspondiente, sería una gran ventaja. La falta de un requisito para cualquier presión de selección externa añadida permite a las células huésped colocadas dentro de un organismo receptor mantener de manera estable plásmidos que codifican y expresan un gen terapéutico único (tal como un antígeno inmunogénico o epítipo del mismo).

De manera igualmente importante, la invención permite la transformación de un plásmido libre de cualquier gen de resistencia frente a antibióticos dentro de una célula huésped bacteriana (o de otro tipo) adecuadamente modificada, con posterior crecimiento preferencial y selección de transformantes resultantes, en ausencia de antibióticos.

Por tanto, la presente invención es particularmente útil para la expresión de una o más proteínas antigénicas o péptidos, o de enzimas que se requieren para la biosíntesis de antígenos no peptídicos, en células huésped, con el fin de administrar tales células huésped recombinantes a un organismo receptor para el fin de generar una respuesta

inmunitaria protectora frente al patógeno del que se deriva(n) dicho(s) antígeno(s). Tales células huésped pueden seguir o no creciendo y dividiéndose en dicho organismo receptor. El (los) gen(es) llevado(s) por plásmido que codifica(n) para el (los) antígeno(s) puede(n) expresarse en la célula huésped antes de la administración al organismo receptor o sólo tras la administración al organismo receptor. La fase en la que se expresa el antígeno puede regularse colocando el gen llevado por plásmido bajo el control de diferentes promotores. Por ejemplo, cuando la célula huésped es una célula bacteriana y el gen llevado por plásmido está bajo el control de un promotor bacteriano, el antígeno se expresará en células huésped en las que el plásmido se mantiene antes de la administración a un organismo receptor. Cuando la célula huésped es una célula bacteriana y el gen llevado por plásmido está bajo el control de un promotor eucariota, el antígeno no se expresará en células huésped antes de la administración sino que se expresará tras la administración de células huésped que han mantenido el plásmido a un organismo receptor eucariota, tal como se muestra en Galmory *et al* (FEMS Microbiol Rev., 2002, 26(4):339-53).

El experto será consciente de que los antígenos que pueden usarse para generar una respuesta inmunitaria frente a patógenos y el plásmido administrado a la célula huésped de la invención pueden codificar para cualquiera de estos antígenos. Por ejemplo, se ha mostrado que el operón *caf* de *Y. pestis* es un candidato de vacuna prometedor que induce niveles altos de inmunidad frente a *Y. pestis* (Titball *et al*, 1997, Infection & Immunity, 65: 1926-1930). Por tanto, podría usarse una célula huésped ORT que comprende un plásmido ORT que comprende el operón *caf* para generar una respuesta inmunitaria frente a *Y. pestis*.

Alternativamente, los antígenos pueden derivarse de un tumor, y usarse la técnica para generar una respuesta inmunitaria antitumoral con el objetivo de destruir el tumor, o al menos de ralentizar su crecimiento.

En una realización alternativa, la invención puede usarse para expresar y administrar productos génicos terapéuticos para fines distintos de generar una respuesta inmunitaria. En principio, puede administrarse una amplia gama de productos terapéuticos recombinantes mediante este procedimiento.

Por ejemplo, pueden administrarse proteínas para sustituir el producto reducido o que falta de un gen defectuoso, tal como a-1-antitripsina en una deficiencia de a-1-antitripsina, o Factor VIII en hemofilia. Serían particularmente adecuadas las aplicaciones en las que se secretan productos terapéuticos dentro del lumen del intestino introduciendo microorganismos recombinantes producidos según la invención. Ejemplos incluyen la producción de enzimas pancreáticas para sustituir enzimas naturales reducidas o ausentes como resultado de fibrosis quística, pancreatitis o pancreatomelectomía, o producción de vitamina K en exceso.

Se prevé que el producto del gen codificado en el plásmido ORT® pueda expresarse sobre la superficie de la célula (particularmente útil para fines de vacunación) o secretarse de la célula huésped. En el caso de una célula huésped bacteriana que puede sobrevivir dentro de la células del organismo receptor (por ejemplo *Listeria* y *Salmonella*) este sistema permite que se introduzcan antígenos recombinantes directamente dentro de compartimientos intracelulares, lo que puede tener ventajas en el caso de células presentadoras de antígenos, influyendo en el tipo de presentación posterior por las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad. Tales ventajas resultarán evidentes para un experto en la técnica apropiada. Procedimientos adecuados para la secreción de antígenos expresados en bacterias gram-negativas incluyen el sistema de secreción de hemolisina de *E coli* (Gentshev *et al*, 1996, Gene 179; 133; Gentshev *et al*, 2001, Vaccine 19:2621).

La invención también puede usarse para administrar productos génicos terapéuticos que son los productos de transcripción de los genes llevados por plásmidos, tales como oligonucleótidos antisentido. También se prevé que la invención pueda usarse para administrar genes llevados por plásmidos que son en sí mismos productos terapéuticos, por ejemplo para fines de terapia génica.

La invención abarca una célula huésped bacteriana atenuada, transformada, que contiene un plásmido que comprende un gen de interés y un operador susceptible a la unión por un represor expresado en trans, un segundo gen que codifica para el represor presente en un cromosoma, y un tercer gen cromosómico que está funcionalmente asociado con un operador y esencial para el crecimiento celular, en el que el plásmido está presente en la célula en números suficientes para valorar el represor de tal manera que se expresa el gen esencial, permitiendo así el crecimiento celular.

Preferiblemente, el tercer gen no es un gen de resistencia frente a antibióticos.

Tal como se usa en el presente documento, “funcionalmente asociado” u “operativamente asociado”, con respecto a cualquier secuencia de operador y un gen asociado, significa que el operador está unido en cis al gen de tal manera que la expresión del gen es susceptible a la represión tras la unión de un represor al operador.

Un experto en la técnica entenderá que el término operador se usa para definir cualquier secuencia de ácido nucleico a la que se une un represor para evitar la transcripción de un promotor asociado. La secuencia de operador sobre el plásmido no necesita ser una secuencia que sea idéntica a la secuencia de operador en el gen cromosómico, ya que el operador del plásmido sólo necesita estar constituido por las secuencias mínimas necesarias para la unión al represor que reprime la transcripción del gen cromosómico. También se entenderá que las secuencias de operador mutadas también son útiles según la invención, por ejemplo, secuencias que tienen uno o más nucleótidos insertados, eliminados, o sustituidos que dan como resultado un aumento o disminución de la afinidad por el represor correspondiente.

Tal como se usa en el presente documento, “crecimiento celular” se refiere a números crecientes de células en un medio de cultivo o *in vivo* a lo largo del tiempo, y también se refiere a la supervivencia celular en la que el número de células no aumenta a lo largo del tiempo, sino más bien que el número de células vivas no disminuye a lo largo del tiempo.

Preferiblemente, el gen represor codifica para uno de los represores lac de *E. coli*, en particular el represor lac I^q, el represor trp de *E. coli*, el represor galR de *E. coli*, el represor araC de *E. coli*, el represor ArgRNV de *E. coli* (Burke *et al* (1994) Mol. Microbiol., 13, 609-618) y el represor Tet de *E. coli*.

Tal como se describió anteriormente, cada represor es operativo en trans con una secuencia de operador trans-asociada que está presente tanto en el cromosoma como en el plásmido. La invención contempla la presencia de uno o más genes represores en el cromosoma del huésped, por ejemplo, uno, dos o tres genes represores, con el fin de garantizar la estabilidad del plásmido cuando se muta o elimina un gen represor cromosómico.

Por tanto, las secuencias de operador preferidas incluyen el operador lac, el operador A, el operador trp, el operador gal, el operador ara, el operador Arg y el operador Tet. Si se desea, el promotor correspondiente puede asociarse funcionalmente con su operador.

Puede estar presente en el cromosoma de la célula más de un gen cromosómico esencial diferente que está funcionalmente asociado con el operador, en el que el gen esencial está unido a un operador y por tanto es susceptible de represión mediante el represor, para asegurar contra la pérdida de susceptibilidad del represor en un operador cromosómico. En una realización preferida de la invención, el gen que codifica para la proteína represora está presente en dos o tres copias en ubicaciones diferentes en el cromosoma para asegurar contra la pérdida de expresión del represor en una ubicación cromosómica.

Genes esenciales preferidos que están ubicados en el cromosoma del huésped incluyen, pero no se limitan a, genes que se incluyen en las siguientes categorías: genes que codifican para productos relacionados con la biosíntesis de metabolitos celulares tales como precursores de pared celular, genes cuyos productos están implicados en el metabolismo del carbono, genes que codifican para resistencia frente a antibióticos y genes que codifican para la biosíntesis o regulación de macromoléculas, por ejemplo, genes esenciales para la síntesis de ADN y/o ARN y funciones de replicación.

Preferiblemente, el plásmido comprende un origen de replicación que permite la replicación de aproximadamente 20 copias del plásmido por célula huésped, o de hasta aproximadamente 200 copias del plásmido por célula huésped. Ejemplos de talas plásmidos incluyen, pero no se limitan a, aquellos que contienen el origen de replicación pBR322 y la serie de plásmidos pUC tal como se describe por Vieira & Messing (1982, Gene, 19(3), 259268) y Yanisch-Perron *et al.* (1985, Gene, 33(1), 10S-119), denominados en el presente documento pUC. Plásmidos alternativos que pueden usarse incluyen el plásmido pAHL, derivado del plásmido pAH34L descrito por Titball *et al* (1997, Infection & Immunity, 65: 1926-1930).

Tal como se usa en el presente documento, “origen de replicación” se refiere a aquellas secuencias en el plásmido que son necesarias para mantener el plásmido a un número de copias dado por célula.

El sistema de valoración de represor descrito en el presente documento permite el mantenimiento estable de plásmidos en un número de copias moderado o alto sin el uso de marcadores seleccionables dominantes codificados por plásmido, tales como para resistencia frente a antibióticos, y pueden usarse con cualquier huésped que pueda soportar un sistema de represor/operador de acción en trans. Una ventaja de la invención es que se basa en un mantenimiento de plásmidos distinto de selección por antibióticos de células que llevan plásmido. La ausencia de marcadores seleccionables dominantes, tales como genes de resistencia frente a antibióticos, en el plásmido, tal como se describe en el presente documento, también es ventajosa porque evita problemas potencialmente graves relacionados con la expresión de esos genes en un organismo receptor, especialmente un ser humano y porque evita un uso ampliamente extendido de genes bacterianos que codifican para resistencia frente a antibióticos, cuyo uso favorece la transferencia de tales genes en la población bacteriana en su totalidad.

La célula bacteriana atenuada transformada es preferiblemente una célula enterobacteriana, más preferiblemente una célula del género *Salmonella*, y lo más preferiblemente una célula de la especie *Salmonella typhimurium* o de la especie *Salmonella typhi*.

Se prefiere adicionalmente que dicha célula bacteriana atenuada transformada se haya atenuado para reducir su patogenicidad mediante una modificación de su gen *aroA*, gen *aroC*, gen *aroD* o gen *htrA*. La célula transformada puede contener una modificación de más de uno de esos genes.

Lo más preferiblemente, la célula transformada atenuada es de la cepa SL3261 de *Salmonella typhimurium* o de la cepa CVD 908-htr de *Salmonella typhi*.

También se prefiere que dicho tercer gen contenido por la célula codifique para una enzima requerida para la síntesis de la pared de la célula bacteriana. Más preferiblemente dicho gen es *dapD*.

Alternativamente, dicho tercer gen codificado por la célula codifica para una enzima requerida para la síntesis de ácidos grasos. Más preferiblemente, dicho tercer gen es *fabA*.

El gen de interés puede ser cualquier gen que se desea administrar al organismo receptor. El gen de interés puede codificar para un antígeno o el producto de transcripción del gen de interés puede ser un oligonucleótido antisentido. Preferiblemente, el gen de interés está funcionalmente asociado con un promotor bacteriano o un promotor eucariota.

La célula bacteriana atenuada transformada se usa como un medicamento. El uso de la célula transformada como un medicamento dependerá de la naturaleza del gen de interés. Preferiblemente, la célula transformada puede usarse como un sistema de administración de genes. Por ejemplo, la célula transformada puede usarse para administrar un gen de interés para fines de terapia génica. La célula transformada también puede usarse para administrar un gen de interés, cuyo producto de transcripción tiene un efecto terapéutico, tal como un oligonucleótido antisentido, o administrar un gen de interés que codifica para un antígeno que tiene un efecto terapéutico.

Alternativamente, la célula transformada puede usarse como inmunógeno. Según esta realización, el gen de interés puede codificar para uno o más antígenos que provocan una respuesta inmunitaria en el organismo receptor. El experto será consciente de genes de interés que codifican para antígenos que provocan una respuesta inmunitaria en el organismo receptor y que pueden incluirse en el plásmido en la célula transformada de la invención. Un ejemplo de genes de interés que pueden incluirse en el plásmido para inducir una respuesta inmunitaria en el organismo receptor son los genes *cafI*, *cafII* y *cafIM* del operón *caf*.

El gen de interés puede transcribirse, o transcribirse y traducirse, en la célula transformada antes de la administración a un organismo receptor o sólo tras la administración a un organismo receptor dependiendo de la identidad del promotor y la célula transformada. Por ejemplo, cuando el gen de interés codifica para un antígeno que provoca una respuesta inmunitaria funcionalmente unida a un promotor eucariota y la célula transformada es una célula bacteriana, el antígeno sólo se expresará para provocar una respuesta inmunitaria tras la administración al organismo receptor.

En un aspecto adicional de la invención, se proporciona una composición para su uso como un medicamento que comprende cualquiera de las células descritas anteriormente junto con un tampón, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable, tal como se conocen bien por los expertos en la técnica relevante. Según una realización de este aspecto, la composición farmacéutica es una composición de vacuna. La composición de vacuna puede comprender uno o más adyuvantes además del excipiente, diluyente o tampón.

Otras características y ventajas de la invención resultarán evidentes a partir de la siguiente descripción de las realizaciones preferidas de la misma y a partir de las reivindicaciones.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 es un diagrama que ilustra el uso del plásmido pKO3 (figura 1A) para la inserción de genes (figura 1B) a partir de Link *et al*, 1997, J. Bacteriol 179: 6228-6237)

La figura 2A muestra el locus *dapD* cromosómico, y B muestra los productos de PCR generados a partir del mismo para el procedimiento de clonación.

La figura 3 muestra mapas de plásmidos usados en la construcción de SL3261*dapD* (A: pTrc99; B: pGEM-T Easy; C: *placPdapD6*; D: pTrc99*dapD*; E: pGEM-Teasy*dapDL*(-); F: pGEM-Teasy*dapDR*(-); G: pDR*dapD*(+); H: *pdapDB*(+); I: pKO3; J: pKO3*dapD*).

La figura 4A muestra el locus *fabA* cromosómico, y B muestra los productos de PCR generados a partir del mismo para el procedimiento de clonación.

La figura 5 muestra mapas de los plásmidos usados en la construcción de SL3261*fabA* (A: pCR2.1; B: pORT1; C: pCR2.1ST*fabA*(-); D: pOR*fabA*(+); E: *placfabA*; F: pTrc99*fabA*; G: pOR*llacfabA*; H: pKO3*fabA*).

La figura 6 es una comparación de las curvas de crecimiento de SL3261 en LB y de SL3261 *dapD* en LB e IPTG.

Figura 7: el plásmido pUC18I.

Figura 8: mantenimiento *in vitro* de pUC18I en SL3261*dapD*. Se muestran los números medios de colonias de SL3261*dapD*(pUC18I) sobre LB-IPTG y sobre ampicilina.

Figura 9: mantenimiento *in vitro* de pUC18I en SL3261*dapD*. Gel de agarosa de las minipreparaciones para mostrar la presencia de pUC18I en SL3261*dapD*. M = escalera de kb; C = referencia pUC18I. Se cargaron los puntos de tiempo desde el "día 0" hasta el "día 5" según se describen en el ejemplo 4 en orden cronológico. 1-2-3: clones de SL3261 *dapD*(pUC 18I).

Figura 10: mantenimiento *in vivo* de pUC 18I en SL3261 *dapD* en ratones. Al primer grupo de ratones se le inyectó SL3261 como control: rombos en negro = *Salmonella* viable total detectada en células del bazo sembradas en placas

sobre agar LB; rombos en blanco = *Salmonella* viable total detectada en células PP sembradas en placas sobre agar LB.

Al segundo grupo de ratones se le inyectó SL3261 que contenía pUC18I: triángulos en negro = *Salmonella* viable total detectada en células del bazo sembradas en placas sobre agar LB; triángulos en blanco = *Salmonella* que contiene pUC18I detectada en células del bazo sembradas en placas sobre agar LB que contiene ampicilina; triángulos con una barra = *Salmonella* viable total detectada en células PP sembradas en placas sobre agar LB; triángulos con múltiples barras = *Salmonella* que contiene pUC18I detectada en células PP sembradas en placas sobre agar LB que contiene ampicilina.

Al tercer grupo de ratones se le inyectó SL3261 dapD que contenía pUC 18I: círculos en negro = *Salmonella* viable total detectada en células del bazo sembradas en placas sobre agar LB e IPTG; círculos en blanco = *Salmonella* que contiene pUC18I detectada en células del bazo sembradas en placas sobre agar LB que contiene ampicilina; círculos con una barra = *Salmonella* viable total detectada en células PP sembradas en placas sobre agar LB con IPTG; triángulos con múltiples barras = *Salmonella* que contiene pUC18I detectada en células PP sembradas en placas sobre agar LB que contiene ampicilina.

Recuentos bacterianos para los tres grupos mostrados 8, 12 y 16 días tras la inyección. La línea horizontal a través de las gráficas justo por encima de 1 en el eje vertical representa el límite de detección.

Figura 11: el plásmido pAHL.

Figura 12: curvas de crecimiento de SL3261(pAH34L) en LB-kanamicina y de SL3261dapD(pAHL) en LB.

Figura 13: mantenimiento *in vitro* de pAHL en SL3261dapD. Se muestran los números medios de colonias de SL3261dapD(pAHL) sobre IPTG y sobre LB.

Figura 14: mantenimiento *in vitro* de pAHL en SL3261dapD. Gel de agarosa de las minipreparaciones para mostrar la presencia de pAHL en SL3261dapD. M = escalera de kb; K = referencia pAHL. Se cargaron los puntos de tiempo desde el "día 0" hasta el "día 5" tal como se describe en el ejemplo 7 en orden cronológico. 1-2-3: clones de SL3261dapD(pAHL).

Descripción detallada de la invención

La invención se ilustra mediante los siguientes ejemplos no limitativos en los que se emplean los siguientes materiales y procedimientos. La totalidad de la descripción de cada referencia bibliográfica citada a continuación en el presente documento se incorpora como referencia en el presente documento.

Sistemas de represor/operador útiles según la invención

La invención puede usarse con cualquier sistema de represor/operador de acción en trans. Por ejemplo, el sistema de valoración de represor descrito en el presente documento puede incluir cualquier represor que tenga suficiente afinidad por su secuencia de unión a ADN de tal manera que puede evitar la expresión de un gen cromosómico esencial, pero también puede valorarse mediante una secuencia de unión a ADN llevada por plásmido.

El gen cromosómico esencial que es susceptible a la represión por el represor se vuelve susceptible a la represión porque se coloca bajo el control de un operador/promotor que se une al represor, o la secuencia de unión al represor (es decir, operador) se inserta en, o se asocia con, el promotor natural del gen esencial de tal manera que puede evitar la transcripción cuando se une al represor, pero no altera la capacidad del promotor natural para iniciar la transcripción del gen esencial en ausencia de unión al represor.

Más de un gen diferente puede estar presente en el cromosoma, por ejemplo, dos o tres genes, unido funcionalmente cada gen a una secuencia de operador y por tanto susceptible a la represión por el represor. La presencia de diferentes genes esenciales susceptibles al represor en el cromosoma, preferiblemente en posiciones diferentes en el cromosoma, reduce la posibilidad de pérdida de estabilidad del plásmido mediante una mutación o delección que da como resultado la pérdida de represión de un gen cromosómico esencial.

El represor se codifica por un gen cromosómico. Según la invención, una o más, preferiblemente una, dos o tres copias del gen represor cromosómico están presentes en la célula huésped. El gen represor cromosómico puede ser un gen que se produce de manera natural que no se ha modificado, o puede contener una mutación genética que proporciona a la molécula represora afinidad superior o inferior con respecto a la fuerza de unión a su operador correspondiente. Tales mutaciones se conocen en la técnica anterior, por ejemplo, la afinidad del represor lac por su operador puede potenciarse mediante cambios de aminoácido único (véase Betz, (1986) Gene, 42, 283-292 y Khoury *et al.*, (1991) J. Mol. Biol., 219, 623-634). Alternativamente, pueden introducirse más o menos copias del sitio de unión al operador dentro del plásmido o pueden introducirse más o menos copias del gen represor en el cromosoma o en una realización alternativa llevarse en un plásmido.

Alternativamente, las secuencias que inician la expresión del gen represor tales como promotores, potenciadores, etc., pueden mutarse o diseñarse por ingeniería genética de tal manera que se prepara un número superior o inferior de moléculas represoras en la célula.

Por ejemplo, el número de copias del represor lacI puede aumentarse mediante la introducción de la mutación lacI^q (véase Carlos (1978) Nature 274, 762-765). El número de moléculas represoras presentes en la célula estará relacionado con el número de copias del plásmido que lleva la secuencia de operador correspondiente. Según el sistema de valoración de represor de la invención, la concentración de represor presente en la célula huésped es tal que, en ausencia del plásmido, el gen esencial de interés no se expresa, pero en presencia del plásmido, el represor se valora separado del gen esencial. Cuando más de una copia del gen represor está presente en el cromosoma, por ejemplo, dos o tres copias, la cantidad de proteína represora preparada en la célula aumentará con respecto a la presencia de un gen; este aumento se tendrá en consideración cuando se seleccione un origen de replicación de plásmido correspondiente, y al seleccionar el número de genes esenciales/operadores cromosómicos que están presentes en la célula.

La fuerza de los operadores y las afinidades de los represores puede alterarse para adaptar el sistema para su uso con plásmidos de número de copias diferente. Por ejemplo, el grado de represión del operón lac puede potenciarse introduciendo un operador lac ideal auxiliar colocado de manera óptima (es decir, un operador lac que tiene afinidad por el represor potenciada), o la introducción del operador ideal dentro del promotor (Muller *et al.*, (1996) Mol. Biol., 257, 21-29 y Lewis *et al.*, (1996) Science 271, 1247-1254).

Alternativamente, la fuerza del operador puede reducirse mediante la introducción de un operador no ideal, la colocación de manera no óptima del operador o la eliminación de un operador auxiliar (Muller *et al.*, (1996) Mol. Biol., 257, 21-29 y Oehler *et al.*, (1990) EMBO J. 219,973-979). Por ejemplo, puede potenciarse la afinidad del represor lac por su operador mediante cambios de un único aminoácido (Betz, (1986) Gene, 42, 283-292).

Sistemas de represor útiles según la invención

Los sistemas de represor útiles según la invención incluyen, pero no se limitan a, los siguientes. El represor lac de *E. coli* descrito en "The Lactose Operon", J. Beckwith, en *Escherichia coli* y *Salmonella typhimurium*, Eds., J.L. Ingraham *et al.*, 1987 Amer. Soc. Micro., págs. 1444-1452, y Dickson *et al.*, 1975, Science 187:27-35.

El operón lac se regula tal como sigue. En condiciones no de inducción (tales como crecimiento sobre glucosa) LacI se une al operador del operón lac y evita la transcripción de β -galactosidasa (LacZ), lactosa permeasa (LacY) y una transacetilasa (LacA). En condiciones de inducción (tales como crecimiento sobre lactosa o adición de IPTG, un análogo no metabolizable) el represor ya no se une al operador y se produce la transcripción. La expresión del operón se detecta fácilmente mediante ensayo para detectar β -galactosidasa. Otros sistemas de represor útiles según la presente invención incluyen el sistema de represor lac descrito anteriormente y el sistema de represor tet para su uso para regular la actividad génica en células eucariotas (Gossen *et al.*, (1994) Current Opinions in Biotechnology, 5, 516-520). El sistema de represor tet se ha usado en la levadura, *Dictyostelium*, células vegetales y plantas del tabaco. Un sistema de represor adicional útil según la presente invención es el sistema de represor ArgRNV (Burke *et al.*, (1994) Mol. Microbiol. 13, 609-618). Normalmente, el represor ArgR sólo se une a su operador en presencia de arginina. Sin embargo, el represor ArgRNV mutante se une al operador en ausencia de arginina y permanece unido en presencia de arginina y tiene un efecto dominante en trans. Puede diseñarse por ingeniería un sitio de unión a ArgR idealizado (operador), que tiene dos cajas de Arg simétricas, dentro del plásmido de interés para permitir la valoración por ArgRNV separado de un gen esencial cuya expresión está controlada por el sitio de unión a ArgR.

Un experto en la técnica apreciará que pueden realizarse ciertas modificaciones a los sistemas de valoración de represor descritos en el presente documento que sirven para adaptar el sistema a un protocolo dado. Por ejemplo, cuando el medio de crecimiento contiene componentes que inducen más que permiten una represión del operador, y no se desean condiciones de inducción durante el crecimiento, pueden usarse mutantes de operador o represor para superar la inducción y permitir la represión. Un ejemplo de un represor mutante es un mutante LacI del represor lac. Un mutante LacI ya no tiene la capacidad para unirse al inductor. Ejemplos de mutantes LacI incluyen, por ejemplo, mutantes LacI (Beyreuther, 1978, Cold Spring Harbor Laboratory, CSH, NY) y otros mutantes tales como Asp276 - > Asn274 (Chang *et al.*, 1994, Biochem. 10 22:3607-3616). Sustituyendo el represor de tipo natural por un represor mutante que no es sensible al inductor, el represor puede unirse al operador durante el crecimiento, y el plásmido se mantiene en la célula huésped incluso en condiciones que normalmente inducirían al represor.

El represor trp de *E. coli* también es útil según la invención (véase "The tryptophan Operon", Yanofsky y Crawford, en *Escherichia coli* y *Salmonella typhimurium*, Eds., J.L. Ingraham *et al.*, 1987, Amer. Soc. Micro., pp.1453-1472). El represor trp está presente a aproximadamente 50 copias/célula, y requiere la presencia de triptófano en el medio de fermentación como inductor de unión al represor.

El represor gal R de *E. coli* también es útil según la invención (véase "The Galactose Operon", S. Adhya, en *Escherichia coli* y *Salmonella typhimurium*, Eds., J.L. Ingraham *et al.*, 1987, Amer. Soc. Micro., pp. 1503-1512).

El represor ara C de *E. coli* también es útil según la invención (véase "The L-Arabinose Operon", R. Schlieff, en *Escherichia coli* y *Salmonella typhimurium*, Eds., J.L. Ingraham *et al.*, 1987, Amer. Soc. Micro., págs. 1473-1481; Dunn *et al.*, 1984, Proc. Nat. Aca. Sci. 81:5017-5020). El represor ara C tiene una afinidad de unión aumentada

en presencia de arabinosa. Finalmente, el represor A es útil según la invención (Introduction to Lambda Phages, en Current Protocols in Molecular Biology, Eds. Ausubel, *et al.*, 1994, Sección III, Unidad 1.9; Hochschild *et al.*, 1986, Cell 47(5); 807-816).

5 Plásmidos útiles según la invención

La invención puede utilizarse ventajosamente con un origen de replicación de plásmido que permite la replicación de al menos 5, preferiblemente al menos 10-100, y lo más preferiblemente al menos 100-500 copias del plásmido por célula huésped. Los orígenes de replicación que permiten la replicación de números de copias de plásmido de moderados (es decir, 20-50) a altos (es decir, 100-500) son especialmente útiles porque los números de copias de plásmido de moderados a altos pueden valorar fácilmente moléculas represoras. Obviamente, si se desea, también puede usarse un plásmido que tiene un número de copias de hasta 1000-2000 copias por célula.

Los plásmidos con bajos números de copias (es decir, 5 copias o menos) se utilizan de la manera más ventajosa según la invención tras la mutación para ocasionar un aumento del número de copias (J. Scott, 1984, Microbial Reviews 48:1-23). De los orígenes de replicación usados frecuentemente, pBR322 (20 copias/célula) es útil según la invención, y se prefieren pUC (a 200 copias/célula). Aunque no se prefieren, otros plásmidos que son útiles según la invención son los que requieren la presencia de proteínas codificadas por plásmido para la replicación, por ejemplo, los orígenes de replicación pT181, FII, y FI.

Ejemplos de orígenes de replicación que son útiles según la invención en *E. coli* y *S. typhimurium* incluyen, pero no se limitan a, pMB1 (25 o más copias por célula, 20 Bolivar *et al.*, 1977, Gene 2:95-113), ColEI (15 o más copias por célula, Kahn *et al.*, 1979, Methods Enzymol. 68:268-280), p15A (aproximadamente 15 copias por célula, Chang *et al.*, 1978, J. Bacteriol. 134:1141-1156); pSC101 (aproximadamente 6 copias por célula, Stoker *et al.*, 1982, Gene 18:335-341); R6K (menos de 15 copias por célula, Kahn *et al.*, 1979, mencionado anteriormente); R1 (origen de replicación dependiente de la temperatura, Uhlin *et al.*, 1983, Gene 22:255-265); lambda dv (Jackson *et al.*, 1972, Proc. Nat. Aca. Sci. 69:2904-2909). Un ejemplo de un origen de replicación que es útil en estafilococos es pT181 (aproximadamente 20 copias por célula, J. Scott, 1984, Microbial Reviews 48:1-23). De los orígenes de replicación descritos anteriormente, se prefieren pMB1, p15A y ColEI porque estos orígenes no requieren proteínas codificadas por plásmido para su replicación.

Células huésped útiles según la invención

La invención puede aplicarse a todos los tipos de células incluyendo células de animales tales como células de mamíferos e insectos, células vegetales, hongos tales como levaduras, y la mayoría de las cepas de bacterias, por ejemplo, cepas bacterianas gram positivas y negativas, siempre que exista un plásmido que pueda mantenerse en la célula huésped en un número de copias de medio a alto.

Las bacterias gram negativas útiles según la invención incluyen, pero no se limitan a, *E. coli* y *Salmonella*, por ejemplo, *S. typhimurium*.

Las especies gram positivas útiles según la invención incluyen, pero no se limitan a, *Bacillus*, *Streptomyces*, *Lactobacillus* y *Lactococcus*, para las que ya existen plásmidos con número de copias alto. Ejemplos de plásmidos útiles según la invención en *Lactococcus* son pNZ2123 y p1L253 (Simon *et al.*, Biochimie 70:559, 1988). El operón de lactosa de lactococos se ha usado para controlar la expresión de proteínas heterólogas (Wells *et al.*, 1993, Mol. Microbiol. 8(6):1155-1162). Este operón utiliza el represor lacR (van Rooijen *et al.*, J. Biol. Chem. 265:18499-18503, 1990) para controlar la expresión de T7 polimerasa, que entonces controla la expresión de la proteína heteróloga. Ejemplos de plásmidos útiles según la invención en *Bacillus* son pC 194, pUB110 y pT181. En *Bacillus*, por ejemplo, *B. subtilis*, el represor A se ha usado para controlar la expresión de proteínas heterólogas. El represor A se ha colocado bajo el control del promotor sak42D, que puede transcribirse eficazmente en *B. subtilis* (Breitling *et al.*, 1990, Gene 93(1):35-40).

Las levaduras son útiles según la invención, ya que se mantienen números de copias altos en las levaduras. Ejemplos de tales plásmidos incluyen los plásmidos YRp (basados en las secuencias de replicación autónoma (ARS)) que tienen números de copias de hasta aproximadamente 100 copias por célula, y los plásmidos YEp (basados en el círculo de 2 micrómetros), con un número de copias de 50-100 por célula. (véase Sikorski, "Extrachromosomal cloning vectors of *Saccharomyces cerevisiae*", en Plasmids, A Practical Approach, Ed. K.G. Hardy, IRL Press, 1993; y Yeast Cloning Vectors and Genes, Sección II, Unidad 13.4, Current Protocols in Molecular Biology, Eds., Ausubel *et al.*, 1994.) Las levaduras pueden expresar el gen lacZ de *E. coli*, por tanto se contempla según la invención utilizar el sistema de valoración de represor lac para controlar la expresión de genes de levadura esenciales tales como ura3 o Ieu2, genes que se han usado para el mantenimiento de plásmidos en levaduras (Gunge, 1983, Ann. Rev. Micro. 37:253-276).

Son particularmente útiles las células huésped atenuadas que se han atenuado de manera que estén aceptablemente libres de efectos secundarios, libres para su uso terapéutico en organismos receptores. Dependiendo de la especificidad de la célula, puede ser adecuada para uso terapéutico veterinario o en seres humanos.

Entre las bacterias atenuadas disponibles están las siguientes:

Salmonella typhimurium incluyendo las cepas SL3261 (mutante aroA, Titball *et al*, 1997, Infection and Immunity 65: 1926, Titball *et al*, 1995, Infection and Immunity 63: 563), VNP20009 (mutante purl y msbB, Toso *et al*, 2002, J Clin Oncol 20: 142);

Salmonella typhi incluyendo las cepas CVD 908-htrA, χ 4073, χ 4632, Ty800, CVD 909 y CVD 915 (Galen *et al*, 1999, Infect. Immun. 67: 6424-6433; Morona *et al*, 1991, Gene 107: 139-144; Tacket *et al*, 1997, Infect. Immun. 65:3381-3385; Garmory *et al*, 2002, FEMS Microbiology Reviews 26: 339-353);

Salmonella gallinarum incluyendo la cepa 9R (para la vacunación aviar, Feberwee *et al*, 2001, Avian Dis 45: 1024);

Escherichia coli incluyendo los mutantes aroA, cnfl y OMP (Rippere-Lampe *et al*, 2001, Infect Immunol 69: 3954);

Shigella flexneri incluyendo la cepa S. flexneri 2a guaBA (Altboum *et al*, 2001, Infect Immunol 69:3150);

Vibrio cholerae incluyendo la cepa Peru2 (Ryan *et al*, 2000, Infect. Immun. 68: 221-226);

Listeria monocytogenes incluyendo los mutantes PrfA y SvpA (Sheehan *et al*, 1996, Mol Microbiol 20: 785; Borezee *et al*, 2001, Microbiology 747:2913);

Brucella abortus incluyendo la cepa RB51 (Vemulapalli *et al*, 2000, Infect Immunol 68:3290);

Mycobacterium bovis incluyendo la cepa Calmette-Guerin (BCG); y

Mycobacterium tuberculosis. Se conocen auxótrofos de M tuberculosis que pueden usarse directamente para el enfoque de ORT®, tales como el mutante trpD (auxótrofo triptofano, Smith *et al*, 2001, Infect Immun 69: 1142).

Genes esenciales útiles según la invención

La invención puede usarse junto con varios genes de huésped cromosómicos esenciales diferentes para el mantenimiento estable del plásmido. Estos genes esenciales incluyen, pero no se limitan a, las siguientes categorías, por ejemplo, genes que codifican para productos relacionados con la biosíntesis de metabolitos celulares, genes cuyos productos están implicados en el metabolismo del carbono, genes que codifican para resistencia frente a antibióticos, y genes que codifican para la biosíntesis o regulación de macromoléculas, por ejemplo, genes esenciales para funciones de replicación y síntesis de ADN y/o ARN.

1. Genes esenciales que codifican para productos relacionados con la síntesis de componentes de la estructura celular

Ciertos genes que codifican para enzimas implicadas en el suministro de componentes celulares, en particular el suministro de precursores de la pared celular, también son esenciales para el crecimiento de la célula huésped y son útiles según la invención. Por ejemplo, la pared de la célula bacteriana contiene ácido meso-diamiopimélico (DAP), y una incapacidad de sintetizar este componente da como resultado la lisis celular.

Se ha demostrado que pueden usarse mutantes en los que se ha eliminado el gen asd (aspartato p-semialdehído deshidrogenasa) o el gen dapD (tetrahidrodipicolinato N-succinil transferasa) para el mantenimiento de plásmidos que llevan una copia completa de ese gen en el plásmido. (Nakayama *et al*., Bio/technology 6:693-697, 1988; DeGryse, patente de los EE. UU. número 5.198.343).

También pueden usarse varios otros genes en la ruta biosintética del DAP, concretamente los genes dapA, dapB, dapC y dapE. Se han clonado y secuenciado dapA y dapB, y dapB está disponible como cistrón único (Richaud *et al*., J. Bacteriol. 166:297-300, 1986; Bouvier *et al*., J. Biol. Chem. 259:14829-14834, 1984).

Los genes implicados en la biosíntesis de otros componentes de la pared celular, tales como biosíntesis de D-alanina, también son útiles según la invención (Walsh, 1989, J. Biol. Chem. 264(5):2393-2396). Se ha usado una secuencia de ADN que codifica para un componente de D-alanina para la estabilización de plásmidos sin usar antibióticos (véase el documento EP 85/309020).

Los genes implicados en la biosíntesis de ácidos grasos también son útiles según la invención. Un ejemplo es fabA, que codifica para 3-hidroxidecanoil-ACP deshidrasa, responsable de la introducción de un doble enlace en la cadena de ácido graso en crecimiento en el punto en el que diverge la biosíntesis de ácido graso insaturado y saturado (Cronan Jr. J. E. y Rock. C. O. (1987)). Biosynthesis of membrane lipids. En "Escherichia coli and Salmonella typhimurium: cellular and molecular biology". Neidhardt F.C. (ed.) American Society of Microbiology, Washington D. C.). La enzima está presente en una concentración relativamente alta, y se produce la lisis de los mutantes de fabA a menos que se complementen con un ácido graso insaturado.

La invención contempla el uso de valoración de represor junto con tales genes. Se elimina el gen de interés de tipo natural de la cepa huésped y se sustituye por una copia en la que la expresión está dirigida por un promotor/operador que se une a la proteína represora elegida, usando una cepa huésped que sintetiza la proteína represora. Por tanto, la transformación de la cepa con un plásmido que contiene la secuencia de unión a represor da como resultado la valoración del represor separado del gen biosintético, permitiendo la expresión del gen esencial.

2. Genes esenciales para el crecimiento celular

El procedimiento de valoración de represor de la invención puede usarse con genes implicados en la utilización de fuentes de carbono. Específicamente, el procedimiento puede usarse con el operón de la lactosa y la utilización de lactosa como única fuente de carbono, tal como se describe en el presente documento. Otras modificaciones resultarán evidentes a un experto en la técnica. Existen mutantes de represor lac que ya no pueden unirse al inductor (alolactosa) y permanecen unidos al operador lac en condiciones de inducción normales. Se representan por los mutantes lac Is; sin embargo, existen otras mutaciones que no tienen capacidad para unirse al inductor pero son normales en todas las demás funciones (Chang *et al.*, Biochem. 33:3607-3616 (1994)).

Las cepas que lleven estas mutaciones no podrán expresar los genes del operón lac y por tanto no podrán crecer con lactosa como única fuente de carbono. La transformación de tales cepas con un alto número de copias de plásmidos que contienen las secuencias de operador lac de tipo natural valorará el represor separado del operón lac y permitirán el crecimiento sobre lactosa.

La glutamina sintetasa es un gen esencial para las células eucariotas tales como la línea de células de mieloma NSO (Bebbington *et al.*, (1992) Bio/Technology 10, 169-175) y se usa preferiblemente cuando la célula huésped es una célula eucariota.

3. Genes que codifican para la síntesis de ácidos nucleicos

La invención también puede usarse junto con genes esenciales que codifican para proteínas de replicación o síntesis de ADN y/o ARN de la célula huésped. Ejemplos de tales genes con respecto a estas funciones esenciales en bacterias tales como *E. coli* y *Salmonella* se proporcionan en McMacken *et al.* (en *Escherichia coli* y *Salmonella typhimurium*, Cellular and Molecular Biology, Ed. Neidhardt *et al.*, Amer. Soc. Micro., Wash. D.C., 1987, págs.564-612), e incluyen, pero no se limitan a, los siguientes genes: dnaA, dnaB, dnaC, ssb, dnaG, polC (dnaE), dnaQ (mutD) dnaN, dnaZX, gyrA, gyrB, polA, lig, dnaT, rpoA, rpoB, rpoC, y rpoD.

4. Genes que confieren una ventaja seleccionable para la supervivencia en un organismo receptor

Para células huésped administradas a un organismo receptor, dependiendo de la vía de administración, varios factores en el entorno local pueden ejercer presión selectiva. Cuando una capacidad de resistir tal presión está relacionada con un gen identificado, entonces puede usarse un marcador seleccionable. Por ejemplo, para células, especialmente células bacterianas que deben administrarse por vía oral, la resistencia frente al pH bajo del contenido del estómago constituye una ventaja selectiva significativa. Entre los genes que se ha mostrado que están asociados con esto, están el gen uvrA de mutantes de *Streptococcus* (Hanna *et al.*, 2001 J. Bacteriol 183: 5964), los genes gadA, B y C de *E. coli* (Castanie-Comet y Foster, 2001, Microbiology 147: 709), los genes rpoS, fur, atp y atbR de *Salmonella typhimurium* (Baik *et al.*, 1996 Microbiology 142: 3195), los genes lepA, Frasel, czcA, uvrA, atpF^r y aldo-ceto reductasa de *Helicobacter pylori* (Bijlsma *et al.*, 2000, J Infect Dis 182: 1566) y los genes que codifican para la F₀F₁ ATPasa de *Listeria monocytogenes* (Cotter *et al.* 2000 Int J Food Microbiol 60: 137).

Los genes que confieren supervivencia intracelular (por ejemplo, SvpA en *Listeria monocytogenes* Borezee *et al.*, 2001, Microbiology 147:2913) o resistencia frente a ubicaciones intracelulares particulares tales como lisosomas también pueden ser útiles en células huésped apropiadas.

5. Genes que codifican para resistencia frente a antibióticos

Aunque no se prefiere, la invención también puede usarse junto con resistencia frente a antibióticos. El gen de resistencia se construye de tal manera que su expresión está bajo el control del promotor/operador que se une a la proteína represora deseada. Entonces se inserta este constructo dentro del cromosoma de la cepa huésped. La transformación de la cepa con plásmido que contiene la secuencia de unión a represor valorará el represor del gen de resistencia frente a antibióticos y permitirá la expresión y por tanto el crecimiento en presencia de ese antibiótico. Un gen de resistencia frente a antibióticos es un marcador seleccionable tan útil que una persona que pone en práctica la invención puede seleccionar resistencia frente a antibióticos como el gen esencial del huésped aunque deberá prestarse atención a los efectos sistémicos sobre el receptor. En este caso, la ventaja de utilizar el enfoque de valoración de represor operador se basa en la capacidad del plásmido. El hecho de que el propio gen de resistencia frente a antibióticos se codifique en el cromosoma de la célula huésped aumenta el tamaño de inserto que puede clonarse dentro del plásmido de expresión ORT[®].

Genes llevados en plásmido útiles según la invención

El gen de interés llevado en el plásmido en las células atenuadas transformadas de la invención puede ser cualquier gen. El gen puede ser uno que se desea administrar al organismo receptor debido a su efecto terapéutico. Por ejemplo, puede ser deseable administrar el gen al organismo receptor para fines de terapia génica.

Alternativamente, puede ser deseable administrar el gen al organismo receptor porque el producto de transcripción o el producto de transcripción y traducción del gen tenga un efecto terapéutico. Por ejemplo, el producto de transcripción del gen de interés puede ser un oligonucleótido antisentido o el gen de interés puede codificar para un antígeno que tiene un efecto terapéutico. En particular, el gen de interés puede codificar para uno o más antígenos que provocan una respuesta inmunitaria en el organismo receptor. Un ejemplo de genes de interés que pueden incluirse en el plásmido para inducir una respuesta inmunitaria en el organismo receptor son los genes *cafI*, *cafIA* y *cafIM* del operón *caf*.

Cuando se desea que el gen de interés se transcriba o se transcriba y traduzca, preferiblemente se asocia de manera funcional con un promotor. Preferiblemente, el promotor es un promotor eucariota o un promotor bacteriano. La elección del promotor funcionalmente asociado con el gen de interés y la elección de la célula huésped determina si el gen de interés se transcribe, o se transcribe y se traduce, en la célula huésped antes de la administración al organismo receptor o sólo tras la administración al organismo receptor.

En algunos casos, puede ser deseable administrar células huésped que ya expresan a gen de interés, en cuyo caso, el promotor funcionalmente asociado con el gen de interés se elegirá de tal manera que sea operacional en la célula huésped y favorezca la transcripción y traducción del gen de interés en la célula huésped. Por ejemplo, cuando la célula huésped es una célula bacteriana, el promotor funcionalmente asociado con el gen de interés en esta situación puede ser un promotor bacteriano.

En otros casos, puede ser deseable administrar células huésped que comprenden el plásmido que comprende el gene de interés al organismo receptor pero retrasar la expresión del gen de interés hasta después de la administración de las células al organismo receptor. Por ejemplo, cuando la célula huésped es una célula bacteriana, el promotor funcionalmente asociado con el gene de interés en esta situación puede ser un promotor eucariota, que no favorecerá la transcripción y traducción del gen de interés en la célula huésped, sino que lo hará tras la administración a un organismo receptor.

Procedimientos de vacunación útiles según la invención

Se prevé que la vacunación con células atenuadas vivas recombinantes según la invención pueda ser cualquiera de varias vías de administración. Para *Mycobacterium*, por ejemplo, la vía habitual es mediante inyección intradérmica o subcutánea. Para bacterias entéricas tales como *Salmonella*, *Shigella* o *E coli*, se prefiere la administración por vía oral (particularmente de transformantes resistentes al ácido) o administración por vía rectal. En algunas circunstancias, puede preferirse la administración por vía mucosa, intravenosa o intraperitoneal.

Administración para otras aplicaciones in vivo

Se prevé que pueden usarse varios procedimientos de administración para aplicaciones distintas de la vacunación.

Además de las vías de administración enteral y parenteral usadas para la vacunación, la aplicación distinta de vacunas puede requerir otros procedimientos. Entre ellos está el uso de depósitos permeables implantables en los que se contienen las células según la invención.

Ejemplos**Ejemplo 1***Conversión de Salmonella typhimurium SL3261 en una cepa ORT[®] dapD*

Se convierte el mutante SL3261 de *Salmonella typhimurium* *aroA* (Oyston *et al*, 1995, Infect. Immun. 63:563-568; Titball *et al*, 1997, Infect. Immun. 63: 563-568) en una cepa que facilita el mantenimiento de plásmido mediante valoración de operador-represor (ORT[®]). Esto implica sustituir un gen cromosómico esencial con el mismo gen bajo el control del operador/promotor *lac* (*lacO/P*; Williams *et al*, 1998, Nucleic Acids Res. 26: 2120-2124). La sustitución del gen se lleva a cabo usando una estrategia que no deja un gen de resistencia frente a antibióticos en el cromosoma de SL3261.

Gen dapD esencial controlado por lacO/P

El gen *dapD* codifica para tetrahidrodipicolinato N-succinil transferasa, que cataliza la conversión de tetrahidrodipicolinato y succinil-CoA en N-succinil- α -amino- ϵ -cetopimilato y CoA en la ruta de lisina/diaminopimelato (Richaud *et al*, 1984, J. Biol. Chem, 259:14824-14828; Gilvarg, 1961, J. Biol. Chem, 236: 1429-1431). El locus *dapD* cromosómico se muestra en la figura 2A. DAP se reticula con el peptidoglicano en la pared de la célula bacteriana y es un

precursor para la biosíntesis de lisina (Work, 1950, Nature 765: 74-75). Por tanto, los mutantes con dapD alterado son auxótrofos para DAP y lisina. Ya que la lisina está presente en el medio rico usado a menudo para hacer crecer *E. coli* y *S. typhimurium* (tal como caldo LB) y DAP no lo está, los mutantes dapD experimentarán lisis celular a menos que se añada DAP al medio (Davis, 1952, Nature 169: 534-536). Ya se ha usado dapD satisfactoriamente como gen ORT[®] en cepas DH1lacdapD y DH1lacP2dapD de *E. coli* (Cranenburgh *et al.*, 2001, Nucleic Acids Research 29: E26). Por tanto, se usan los constructos de de lac-dapD de *E. coli* para complementar dapD en *S. typhimurium*.

Crear los constructos de fusión de lac-gen

El constructo con el dapD de *E. coli* bajo el control del promotor *lac* mutado, no rezumante (*lacP2*) está presente en el plásmido placPdapD6. El extremo 3' del gen represor de lactosa *lacI* ya está presente en estos constructos, de modo que puede clonarse el gen de longitud completa. Esto es necesario ya que *lacI* o bien está ausente o bien no es funcional en *S. typhimurium* SL3261 (Oyston *et al.*, 1995, Infect. Immun. 63:563-568 y confirmado por los inventores). La fuente de este gen es el plásmido pTrc99 (Amersham-Pharmacia), que tiene la mutación de sobreexpresión *lacI^q*.

Crear el casete de sustitución de gen

Se amplificaron mediante PCR las regiones que flanquean *dapD* de *S. typhimurium*, y se clonaron estos productos (mostrados en la figura 2B) en plásmidos pGEM-T Easy (Promega) separados. Entonces se cortaron estos flancos izquierdo y derecho y se ligaron a un pTrc99dapD adecuadamente preparado (que tiene *lacO/P-dapD* junto a *lacI^q*), a ambos lados del casete de expresión (es decir, flanqueando a *lacI^q* y *lacO/P-dapD*) y en orientación correcta con respecto al *dapD* cromosómico. Este procedimiento creó el plásmido pdapDB(+).

Inserción del casete ORT[®] en el cromosoma de SL3261

El plásmido de integración se basa en pKO3 (Link, 1997, J. Bacteriol 179: 6228-6237), que utiliza el gen de levansucrosa *sacB* de *Bacillus subtilis* como contraselección. *sacB* convierte la sacarosa en un compuesto tóxico que destruirá las células que contienen pKO3. Se subclona el casete de sustitución de gen a partir de pdapDB+ en el polilicador de pKO3, entonces el gen de resistencia a cloramfenicol *cat* es la selección para la integración cromosómica inicial mediante un único acontecimiento de recombinación. La siguiente etapa es la selección de la resolución del cointegrante en presencia de sacarosa para dar la eliminación de las secuencias de pKO3 del cromosoma, dejando sólo la fusión lac-gen. El principio de este procedimiento se muestra en la figura 1.

Resumen

1. Clonar las fusiones lac-gen dentro de pTrc99 adyacentes a *lacI^q*.
2. Amplificar las regiones que flanquean *dapD* de ADN cromosómico de *S. typhimurium* mediante PCR.
3. Reunir los loci de genes eliminados.
4. Clonar los productos de PCR de loci de genes eliminados en pGEM-T Easy.
5. Cortar los flancos del gen *dapD* y ligarlos a ambos lados de *lacI^q* y *lacO/P-dapD*.
6. Cortar el casete de delección y ligarlo en el sitio de clonación múltiple de pKO3.
7. Usar este plásmido basado en pKO3 para insertar el casete *lacI^q + lac-dapD* en el locus de *dapD* cromosómico, eliminar el gen de tipo natural en el procedimiento.
8. Verificar el genotipo de la cepa ORT[®] mediante análisis de tipo Southern y PCR, y someter a prueba el mantenimiento y selección de plásmido mediante ORT[®].

Estrategia de clonación detallada para una cepa dapD ORT[®] cepa de *Salmonella typhimurium* SL3261

1. Cortar pTrc99 (figura 3A) con *PfIMI* y extremos romos (con T4 DNA polimerasa).
2. Eliminar el casete de expresión *lacZ-dapD* de *E. coli* de placPdapD6 (figura 3C) como un fragmento de *A/III-EarI* y extremos romos.
3. Ligar para crear pTrc99dapD (figura 3D). Las orientaciones de *dapD* y *lacI^q* deben ser opuestas.
4. Amplificar los flancos en 5' y 3' de *dapD* ADN cromosómico de *Salmonella typhimurium* SL3261 mediante PCR usando cebadores 5STdapD con LST2dapD (producto de PCR = 2406 pb) y RSTdapD con 3STdapD (producto de PCR = 1361 pb). Los cebadores flanqueantes (5STdapD y 3STdapD) contienen sitios *SphI* y *NotI*.
5. Clonar ambos flancos dentro de pGEM[®]-Teasy (Promega) mostrado en la figura 3B para crear pGEM-TeasydapDL(-) (figura 3E) y pGEM-TeasydapDR(-) (figura 3F).

ES 2 279 963 T3

6. Cortar el flanco derecho de pGEM-TeasydapDR(-) (figura 3F) como un fragmento de *NsiI*, crear extremos romos y ligarlo dentro de pTrc99dapD (figura 3D) cortado con *Ec/1136II* para crear pDRdapD(+) (figura 3G). Entonces cortar el flanco izquierdo de pGEM-TeasydapDL(-) (figura 3F) como un fragmento de *NsiI* y ligarlo dentro de pDRdapD(+) (figura 3G) cortado con *NsiI* para crear pdapDB(+) (figura 3H).

7. Cortar el inserto de pdapDB(+) (figura 3H) como un fragmento de *NotI* y ligarlo dentro de pKO3 cortado con *NotI* (figura 3I) para crear pKO3dapD (figura 3J) (la orientación del inserto no es importante).

8. Usar pKO3dapD (figura 3J) para sustituir *dapD* de tipo natural con *lacZ-dapD* en *S. typhimurium* SL3261. La cepa resultante es SL3261 *dapD*.

Cebadores de PCR usados

Sitios de *SphI* y *NotI* en negrita, sitios de *NsiI* subrayados.

5STdapD (39 nt)

CGAATGGCATGCGGCCGAGCTATTTTATCAGGATTTG

LST2dapD (35 nt)

GCGAATGCATAGCGGGGGCGACAGCCCCCTTTGC

3STdapD (39 nt)

TGTGGGGCATGCGGCCGAGTGGTCGCACATCGTCGGAC

RSTdapD (46nt)

GCTTTTCACTCGATGCATCTACCCTTTATCGTTTGGATTGAGGGCC

Ejemplo 2

Conversión de *Salmonella typhimurium* SL3261 en una cepa *fabA* ORT[®]

Gen *fabA* esencial controlado por *lacO/P*

Un gen alternativo adecuado para su uso en una cepa ORT[®] es *fabA*, que codifica para 3-hidroxidecanoil-ACP deshidrasa, que cataliza la introducción de un doble enlace en la cadena de ácido graso en crecimiento en el punto en el que diverge la biosíntesis de ácido graso insaturado y saturado (Cronan y Rock, 1987, Biosynthesis of membrane lipids. En "Escherichia coli and Salmonella typhimurium: cellular and molecular biology". Neidhardt, F.C. (ed.). American Society of Microbiology, Washington DC). El locus *fabA* cromosómico se muestra en la figura 4A. La enzima está presente a una concentración relativamente alta, y los mutantes *fabA* experimentan lisis a menos que se complementen con un ácido graso insaturado, incluso en medio LB. Esto hace de *fabA* una elección adecuada para una cepa ORT[®].

Se usa un procedimiento similar al explicado en el ejemplo 1 para generar una cepa *fabA* ORT[®], pero en vez de amplificar las dos regiones flanqueantes del gen como productos de PCR separados, se amplificó mediante PCR una única región que contenía todo el locus *fabA* y se clonó. Entonces se cortó *fabA* y se sustituyó con el casete *lacI^q* y *lacO/P-fabA*. El producto de PCR generado a partir del locus *fabA* para el procedimiento de clonación se muestra en la figura 4B.

Estrategia de clonación detallada para generar una cepa ORT[®] basada en *fabA*

1. Cortar pTrc99 (figura 3A) con *PfiMI* y extremos romos (con T4 ADN polimerasa).

2. Eliminar el casete de expresión *lacZ-fabA* de *E. coli* de placfabA (figura 5E) como un fragmento de *EarI-DraIII* y extremos romos.

3. Ligarlo para crear pTrc99fabA (figura 5F) (las orientaciones de *fabA* y *lacI^q* deben ser opuestas).

4. Amplificar el locus *fabA* de ADN cromosómico de *Salmonella typhimurium* SL3261 mediante PCR (Taq polimerasa) usando los cebadores 5STfabA y 3STfabA (contienen sitios de *SphI* y *NotI*, el producto de PCR tiene 4713 pb).

5. Clonar el producto de PCR dentro de pCR[®]2.1-TOPO (Invitrogen), para crear pCR2.1StfabA (figura 5C).

ES 2 279 963 T3

6. Cortar el locus *fabA* de pCR2.1 (figura 5A) como un fragmento de *NotI* y clonarlo dentro de pORT1 (figura 5B) cortado con *NotI*, para crear pORfabA (figura 5D).

7. Cortar *lacZ-fabA* y *lacI^q* de pTrc99fabA (figura 5F) como un fragmento de *SmaI-BsaBI*.

8. Cortar pORfabA (figura 5D) con *PmlI-BsaBI* para eliminar la región codificante N-terminal de *fabA* y ligarla al fragmento de *SmaI-BsaBI* de pTrc99fabA (figura 5F) para crear pORlacfabA (figura 5G).

9. Cortar el inserto de pORlacfabA (figura 5G) como un fragmento de *NotI* y ligarlo dentro de pKO3 cortado con *NotI* para crear pKO3fabA (figura 5H) (la orientación del inserto no es importante).

10. Usar pKOSfabA (figura 5H) para sustituir el *fabA* de tipo natural con *lacZ-fabA* en *S. typhimurium* SL3261. La cepa resultante se denomina SL3261 *fabA*.

Cebadores de PCR usados.

Sitios de *SphI* y *NotI* en negrita.

5STfabA(41 nt)

CACCGCGCATGCGGCCGCCCCGATGCCAAAGGTATTCGTGTG

3STfabA(41 nt)

TTTGCAGCATGCGGCCGCGTGTGCAGCGTGACGGGTTAGGC

Ejemplo 3

Perfiles de crecimiento de SL3261 y SL3261dapD

Se comparó la tasa de crecimiento de SL3261 en LB con la de SL3261dapD en LB-IPTG.

Se inocularon tres clones de SL3261 y SL3261dapD en cultivos de 5 ml y se dejaron crecer durante la noche a 37°C en un agitador orbital a 200 rpm. Se usaron los preclonados para inocular cultivos de 50 ml hasta una densidad óptica de inicio de 0,01 DO₆₀₀ y se realizaron lecturas cada hora (figura 6).

Las curvas de crecimiento no mostraron diferencia significativa, lo que indica que el crecimiento de la cepa ORT no se ve afectado de manera adversa por las modificaciones a *dapD*.

Ejemplo 4

Mantenimiento de plásmido in vitro de pUC18I en SL3261dapD

El plásmido pUC18I (figura 7) tiene el origen de replicación *pMB1* y *bla* (resistencia frente a la ampicilina) de pUC18 así como un operador *lac* palindrómico ideal. El operador *lac* activa ORT, permitiendo el crecimiento celular sobre un medio libre de DAP/IPTG.

Se investigó la estabilidad del plásmido de pUC18I en SL3261 *dapD* tal como sigue. Se inocularon tres clones en 50 ml de LB ampicilina (25 µg/ml) y se incubaron durante la noche a 37°C en un agitador orbital a 200 rpm. Se determinó la densidad óptica y dio los valores para el “día 0”, luego se inocularon 50 ml de LB nuevo en ausencia de ampicilina hasta 0,001 de DO₆₀₀, se incubaron tal como anteriormente, dando “día 1”. El procedimiento se repitió hasta el “día 5”.

Las células crecieron aproximadamente 11,6 generaciones al día durante cinco días, de modo que dieron aproximadamente 59 generaciones a lo largo del experimento. Número de generaciones cada día = $\ln(\text{DO}_{\text{final}}/\text{DO}_{\text{inicial}})/\ln 2$.

Para comparar el mantenimiento de plásmido, cada día se sembraron en placa 10⁻⁷ DOml en medio permisivo y no permisivo y se contaron los clones (figura 8).

Se realizó una minipreparación (miniprep) a muestras diarias de 20 Dml y se examinaron los plásmidos mediante electroforesis en gel de agarosa. Tal como se muestra en la figura 9, pUC18I es claramente visible en muestras de todos los puntos de tiempo en un estado sumamente multimerizado (esto se espera ya que la cepa es competente para la recombinación y el plásmido carece de sitios correctos para permitir la inversión hasta el estado de monómero).

Ejemplo 5

Mantenimiento de plásmido *in vivo* de pUC18I en SL3261dapD

Procedimientos

Se cultivaron las cepas SL3261, SL3261 (pUC 181) y SL3261 dapD(pUC 181) de *S. enterica* serovar Typhimurium en caldo LB suplementado con histidina al 1% (v/v), "aromix" (tirosina 4 mg/ml, fenilalanina 4 mg/ml, ácido p-aminobenzoico 1 mg/ml, ácido dihidroxibenzoico 1 mg/ml) al 1% (v/v) (para suplementar el genotipo *aro his* de SL3261). Se añadió IPTG 0,1 mM a cultivos de SL3261dapD(pUC18I). Ya que SL3261(pUC18I) y SL3261dapD(pUC18I) contenían ambas un gen que confiere resistencia frente a ampicilina, se cultivaron estas cepas en medio suplementado también con ampicilina 25 µg/ml. Para producir inóculos, se cultivó estáticamente *S. enterica* serovar Typhimurium durante la noche a 37°C, luego se centrifugó (6000 g, 20 min, 4°C), se lavó una vez en PBS y volvió a centrifugarse, y volvió a suspenderse en PBS hasta una densidad celular final de aproximadamente 5×10^9 ufc/ml. Se enumeraron las bacterias viables sobre placas de agar LB que contenían IPTG/ampicilina cuando era apropiado.

Se inocularon grupos de 30 ratones Balb/c hembra por vía intragástrica con dosis de aproximadamente 5×10^8 ufc/100 µl de *Salmonella* usando una aguja de sonda. En los días 8, 12 y 16 tras la inoculación, se sacrificaron 10 ratones mediante dislocación cervical y para cada ratón se extirparon el bazo y 6 placas de Peyer (PP). El programa usado fue:

Grupo	Día 0 12/3/03	Día 8 20/3/03	Día 12 24/3/03	Día 16 28/3/03
A SL3261-DAPD/pUC18I	Inoc 30	10 bazo 10 PP	10 bazo 10 PP	10 bazo 10 PP
B SL3261/pUC18I	Inoc 30	10 bazo 10 PP	10 bazo 10 PP	10 bazo 10 PP
C SL3261	Inoc 30	10 bazo 10 PP	10 bazo 10 PP	10 bazo 10 PP

Se homogeneizaron el bazo o las 6 PP en 1 ml de PBS estéril usando tamices celulares de 50 µm (Becton Dickinson Labware) y se sembraron en placas diluciones adecuadas sobre agar adecuado para su enumeración. Específicamente, SL3261 se sembró en placas sobre agar LB solo, SL3261(pUC18I) se sembró en placas sobre agar LB y agar LB que contenía ampicilina, y SL3261dapD(pUC18I) se sembró en placas sobre agar LB que contenía IPTG o agar LB que contenía ampicilina.

Resultados

Se detectaron bacterias viables en los bazos y pulmones de todos los grupos de ratones inoculados en el experimento (véase la figura 10). Se realizaron las siguientes observaciones:

1. SL3261 colonizó los bazos y PP según se esperaba.
2. SL3261(pUC18I) fue inestable *in vivo*. Se detectaron números significativamente inferiores de SL3261 (pUC 18I) en las placas de LB agar que contenía ampicilina comparado con placas de agar LB, indicando que se perdió el plásmido pUC18I de la bacteria.
3. SL3261 dapD(pUC18I) fue estable *in vivo*. Se detectaron números similares de SL3261dapD(pUC18I) sobre placas de agar LB que contenía IPTG y placas de agar LB que contenía ampicilina, indicando que el plásmido pUC 18I estaba estabilizado.
4. Se detectaron SL3261(pUC18I) y SL3261dapD(pUC18I) (en algunos casos) con números significativamente inferiores tanto en bazos como PP comparado con SL3261. Esto puede reflejar la carga sobre la *Salmonella* de albergar el plásmido de alto número de copias pUC18I.

Conclusiones

1. pUC18I fue inestable en SL3261 *in vivo*, pero se estabilizó en SL3261dapD.
2. pUC18I redujo la capacidad de SL3261 y (algunas veces) de SL3261dapD para colonizar bazos y PP.

3. Es posible que un plásmido con un bajo número de copias, tal como pAH34L que contiene el operador lac se estabilice en SL3261dapD, sin efectos perjudiciales sobre la colonización.

Ejemplo 6

Perfiles de crecimiento de SL3261(pAH34L) y SL3261dapD(pAHL)dapD

El plásmido pAHL (figura 11) tiene el origen de replicación pSC101, un operador lac palindrómico ideal así como el operón termorregulado *caf* de *Yersinia pestis*. El operador lac activa ORT, permitiendo el crecimiento celular en un medio libre de DAP/IPTG. La expresión a 37°C y no a 28°C de los genes *cafI*, *cafIA* y *cafIM* está controlada por *cafIR*. El plásmido pAH34L es el precursor para pAHL y confiere resistencia frente a kanamicina, pero carece del operador *lac* necesario para ORT.

Se comparó el perfil de crecimiento de SL3261(pAH34L) en LB-kanamicina con el perfil de crecimiento de SL3261dapD(pAHL) en LB. Se inocularon tres clones de SL3261(pAH34L) y SL3261dapD(pAHL) en cultivos de 5ml y se dejaron crecer durante la noche a 37°C en un agitador orbital a 200 rpm. Se usaron los precultivos para inocular cultivos de 50 ml hasta una densidad óptica de partida de 0,01 DO₆₀₀ y se realizaron lecturas cada hora (figura 12). Las curvas de crecimiento no mostraron diferencia significativa entre estas dos cepas.

Ejemplo 7

Mantenimiento de plásmido *in vitro* pAHL en SL3261 dapD

Se investigó la estabilidad del plásmido de pAHL en SL3261dapD tal como sigue. Se inocularon tres clones en 50 ml de LB y se incubaron durante la noche a 37°C en un agitador orbital a 200 rpm. Se determinó la densidad óptica y se obtuvieron valores para el "día 0", luego se inocularon 50 ml de LB nuevo hasta 0,001 de DO₆₀₀, se incubaron tal como anteriormente, dando el "día 1". Se repitió el procedimiento hasta el "día 5".

Las células crecieron aproximadamente 11,6 generaciones al día durante cinco días (aproximadamente 59 generaciones a lo largo del experimento). Número de generaciones cada día = $\ln(\text{DO}_{\text{final}}/\text{DO}_{\text{inicial}})/\ln 2$.

Para demostrar el mantenimiento de plásmido, cada día se sembraron en placas 10⁻⁷ DOml sobre medio permisivo y no permisivo y se contaron las colonias. Véase la figura 13.

Se realizó una minipreparación a muestras diarias de 20 Dml, se examinaron los plásmidos mediante electroforesis en gel de agarosa. El plásmido es claramente visible en muestras de todos los puntos de tiempo (figura 14). Todas estas muestras preparadas a partir de *Salmonella* muestran una banda distorsionada pequeña, que está por debajo de la banda superenrollada, que presumiblemente es ADN desnaturalizado de manera irreversible.

Sumario y conclusiones

La cepa SL3261dapD permite la selección de plásmido libre de antibióticos y el mantenimiento en medio complejo (LB) de plásmidos de número de copias alto y muy bajo mediante ORT. La cepa también permite el mantenimiento estable *in vivo* de pUC18I en ratones, mientras que se pierde este plásmido de la cepa SL3261 original.

La cepa SL3261dapD(pAHL) permite la selección y mantenimiento estable de un plásmido que lleva el operón *caf* de *Y. pestis*. Se ha demostrado que esto es un candidato de vacuna prometedor, que induce altos niveles de inmunidad frente a *Y. pestis*. (Titball *et al.*, 1997, Infection and Immunity 65: 1926-1930).

Por tanto, la tecnología ORT permitirá la construcción de cepas recombinantes de *Salmonella* adecuadas para su uso para administración de antígenos mediante vacunas vivas. Estas cepas no necesitarán genes de resistencia frente a antibióticos para el mantenimiento del plásmido. También tendrán la ventaja de un nivel superior de expresión de antígeno que sería posible mediante integración cromosómica del gen del antígeno. Además, la cepa se convertirá fácilmente para la administración de diferentes antígenos mediante transformación con plásmidos apropiados.

Otras realizaciones

Otras realizaciones resultarán evidentes a los expertos en la técnica. Debe entenderse que la descripción detallada anterior se proporciona sólo para claridad y meramente a modo de ejemplo. El alcance de la presente invención no se limita a los ejemplos anteriores, sino que se define por las siguientes reivindicaciones.

REIVINDICACIONES

1. Célula bacteriana atenuada transformada para su uso como un medicamento, conteniendo dicha célula:

- a) un plásmido que comprende un gen de interés y una secuencia de operador susceptible de unirse a un represor,
- b) un segundo gen, que codifica para dicho represor, y que está presente en un cromosoma, y

c) un tercer gen que está presente en el cromosoma y es esencial para el crecimiento y un operador unido en cis al tercer gen de tal manera que la expresión del tercer gen es susceptible a la represión al unirse un represor al operador, en la que dicho plásmido está presente en dicha célula en números suficientes para valorar dicho represor de tal manera que dicho gen esencial se expresa, permitiendo así el crecimiento celular.

2. Célula transformada según la reivindicación 1, en la que dicho gen no es un gen de resistencia frente a antibióticos.

3. Célula transformada según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en la que dicha célula transformada es una enterobacteria.

4. Célula transformada según la reivindicación 3, en la que dicha célula transformada es del género *Salmonella*.

5. Célula transformada según la reivindicación 4, en la que dicha célula transformada es de la especie *Salmonella typhimurium*.

6. Célula transformada según la reivindicación 4, en la que dicha célula huésped transformada es de la especie *Salmonella typhi*.

7. Célula transformada según una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, en la que dicha célula transformada se ha atenuado mediante modificación de su gen *aroA*, gen *aroC*, gen *aroD* o gen *htrA*.

8. Célula transformada según la reivindicación 7, en la que dicha célula huésped transformada es de la cepa *Salmonella typhimurium* SL3261.

9. Célula transformada según la reivindicación 7, en la que dicha célula huésped transformada es de la cepa *Salmonella typhi* CVD908-htr.

10. Célula transformada según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en la que dicho tercer gen contenido en la célula codifica para una enzima requerida para la síntesis de la pared de la célula bacteriana.

11. Célula transformada según la reivindicación 10 en la que dicho tercer gen es *dapD*.

12. Célula transformada según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en la que dicho tercer gen contenido en dicha célula codifica para una enzima requerida para la síntesis de ácidos grasos.

13. Célula transformada según la reivindicación 12, en la que dicho tercer gen es *fabA*.

14. Célula transformada según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en la que dicho tercer gen de interés está funcionalmente asociado con un promotor bacteriano.

15. Célula transformada según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en la que dicho tercer gen de interés está funcionalmente asociado con un promotor eucariota.

16. Célula transformada según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, en la que dicho tercer gen de interés codifica para un antígeno.

17. Célula transformada según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, en la que el producto de transcripción de dicho gen de interés es un oligonucleótido antisentido.

18. Uso de una célula transformada según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17 en la fabricación de un medicamento que comprende dicha célula transformada para la administración de genes.

19. Uso de una célula transformada según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17 en la fabricación de un medicamento que comprende dicha célula transformada para la inmunización.

20. Composición para su uso como un medicamento que comprende una célula según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17 y un excipiente, diluyente o tampón farmacéuticamente aceptables.

FIG. 1A

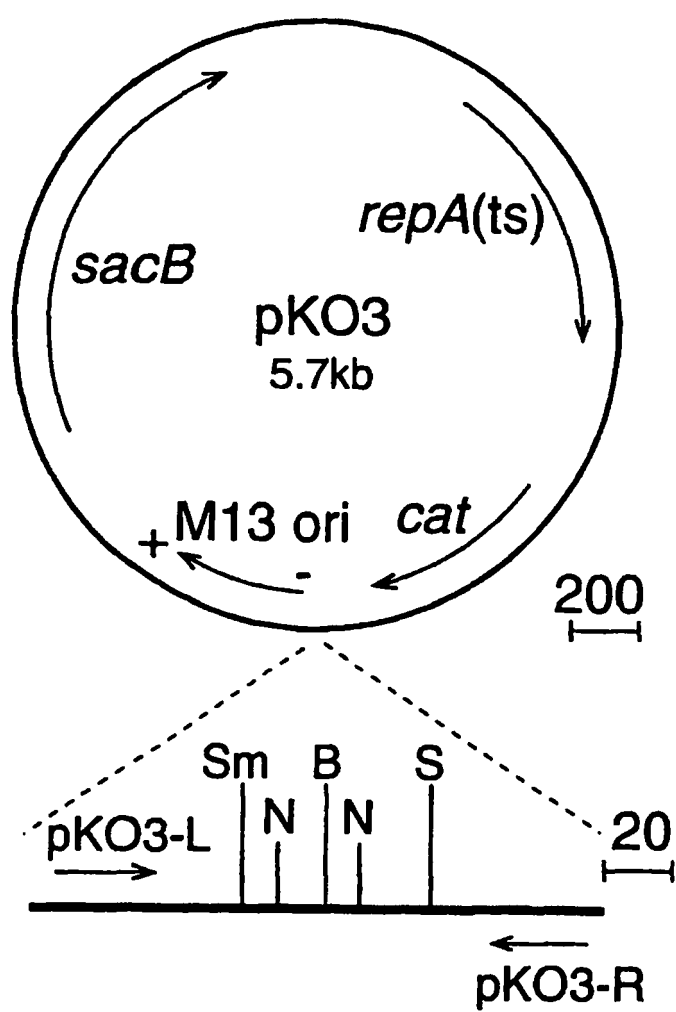
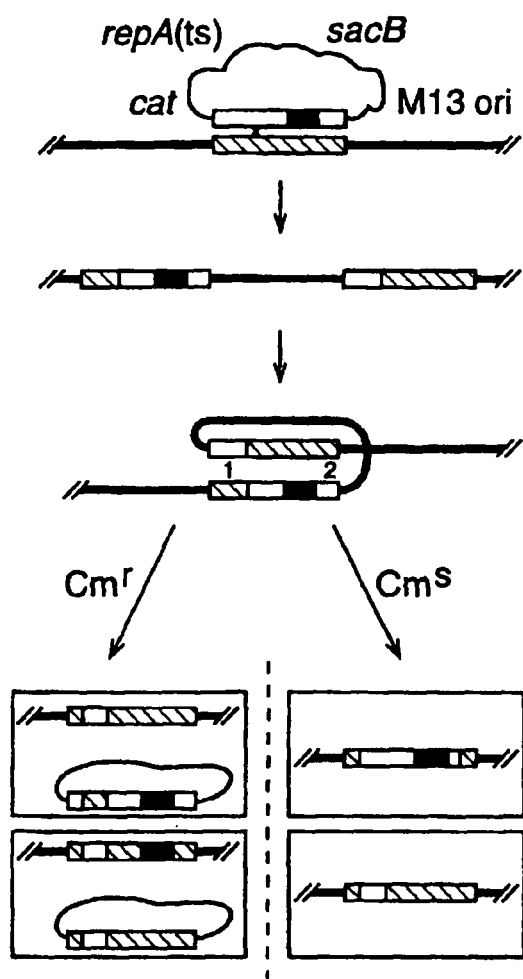


FIG. 1B



Transformar *E. coli* de tipo natural con pK03 que contiene secuencia alterada *in vitro*

Seleccionar integrados a 43 °C

Resolver integrados a 30°C y seleccionar para detectar pérdida de plásmido sobre sacarosa

Examinar colonias resistentes a sacarosa y sensibles a cloramfenicol para detectar acontecimiento de sustitución mediante
1. Réplica en placa
2. PCR

FIG. 2A

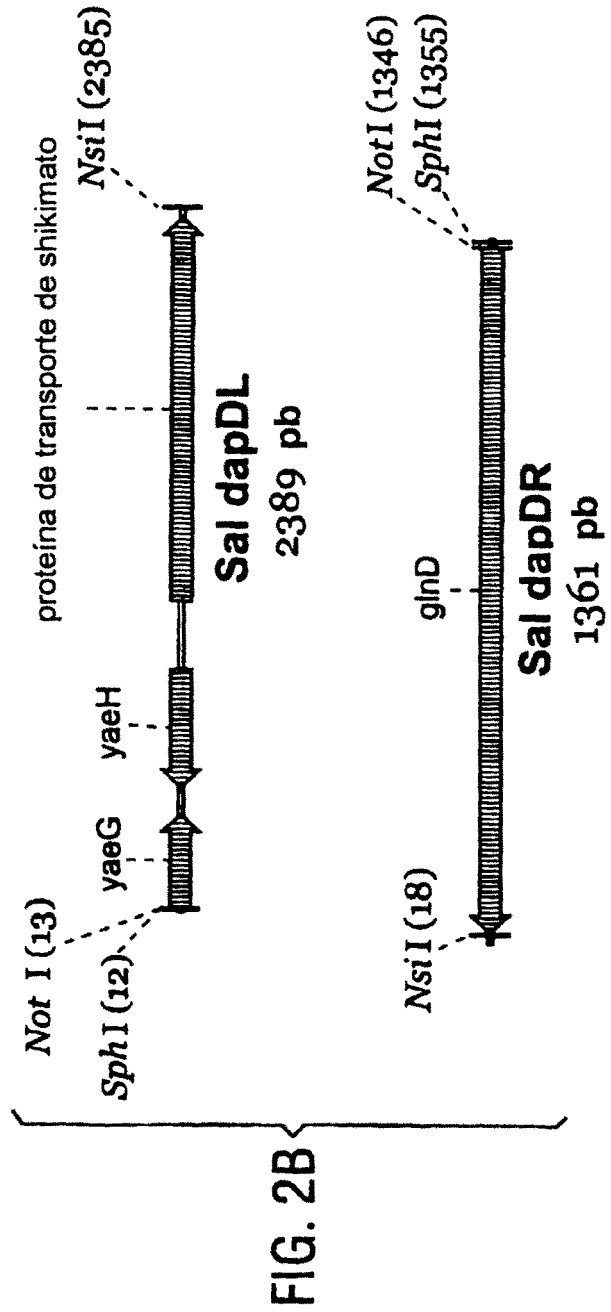
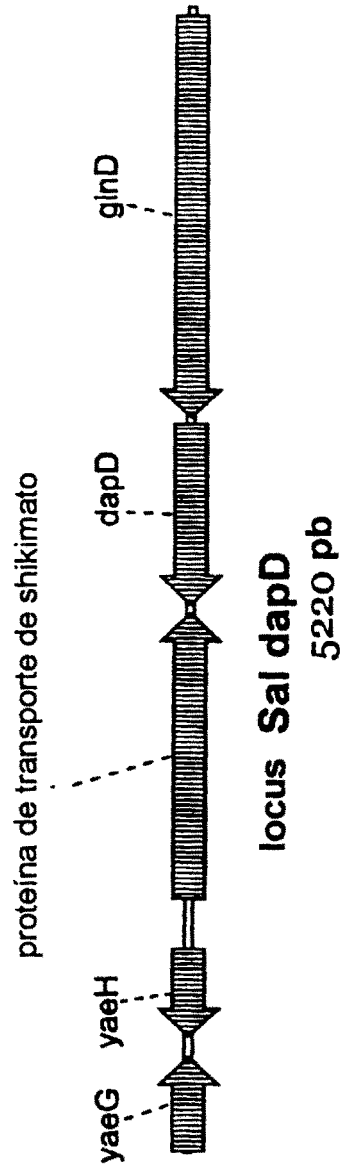


FIG. 3A

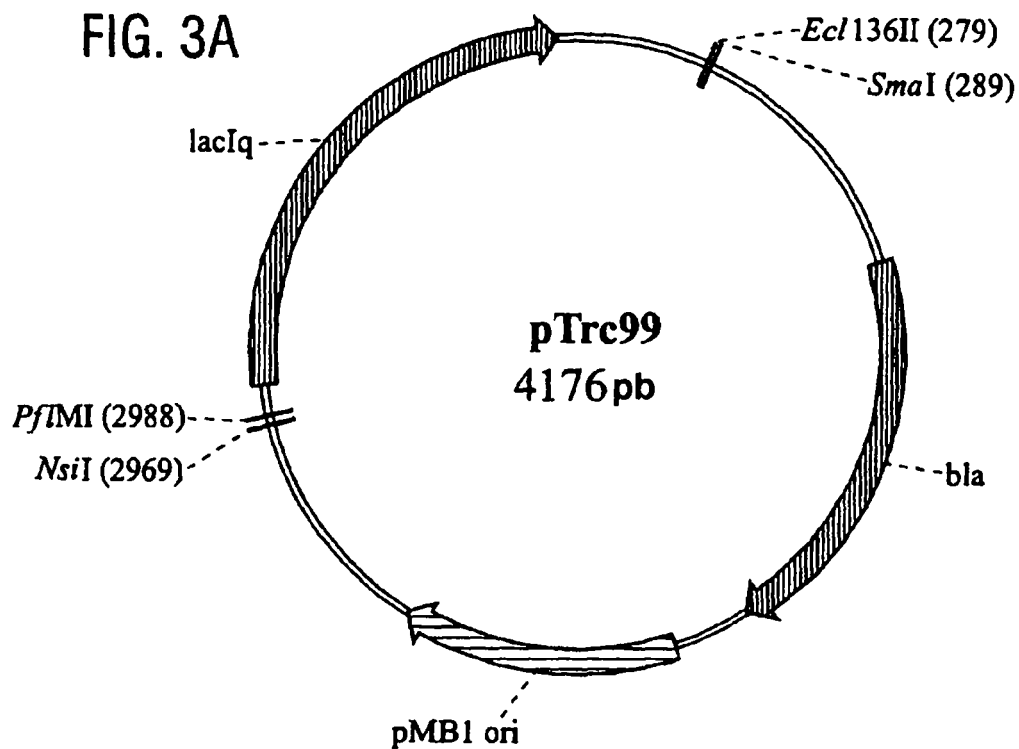


FIG. 3B

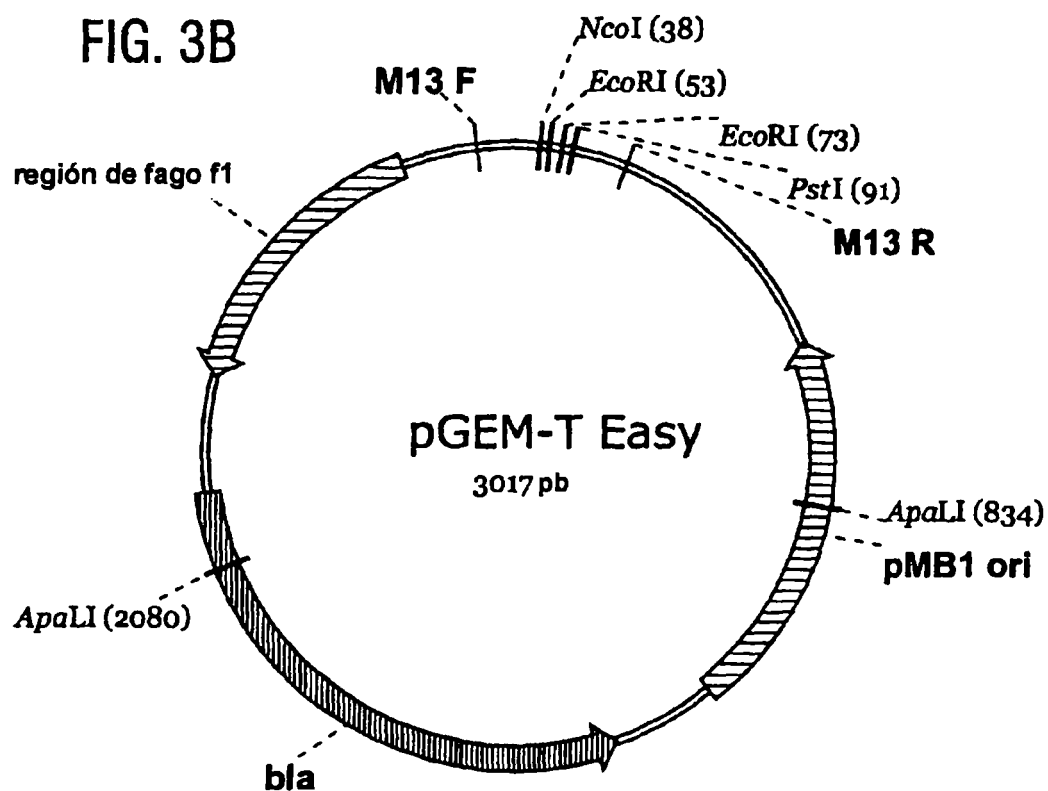


FIG. 3C

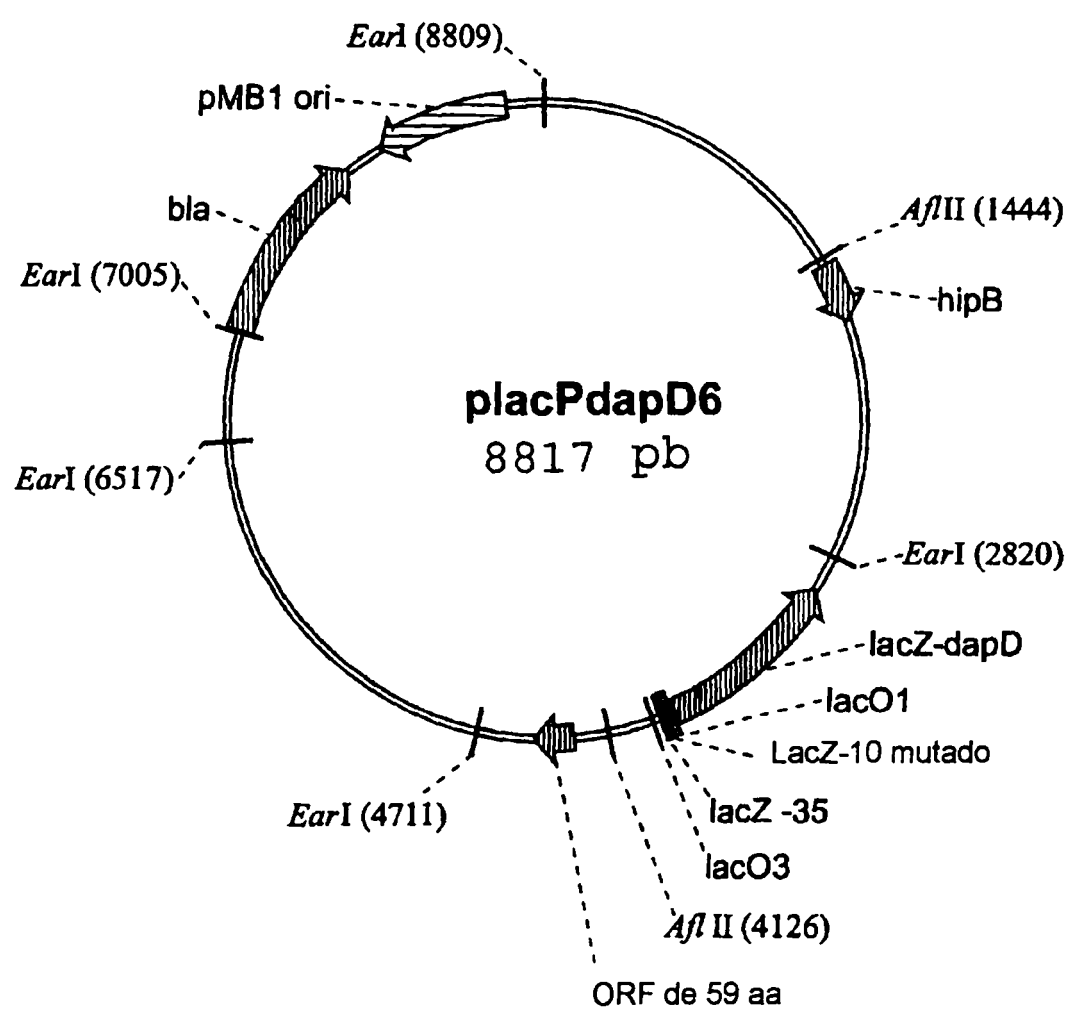


FIG. 3D

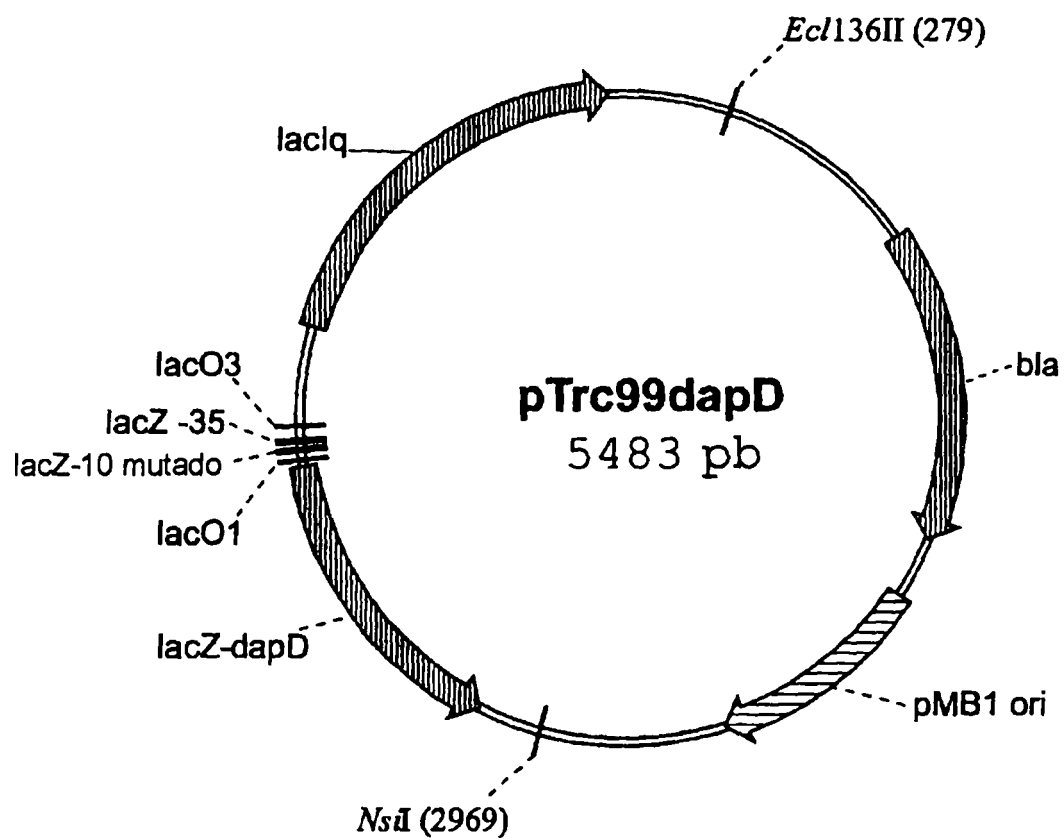


FIG. 3E

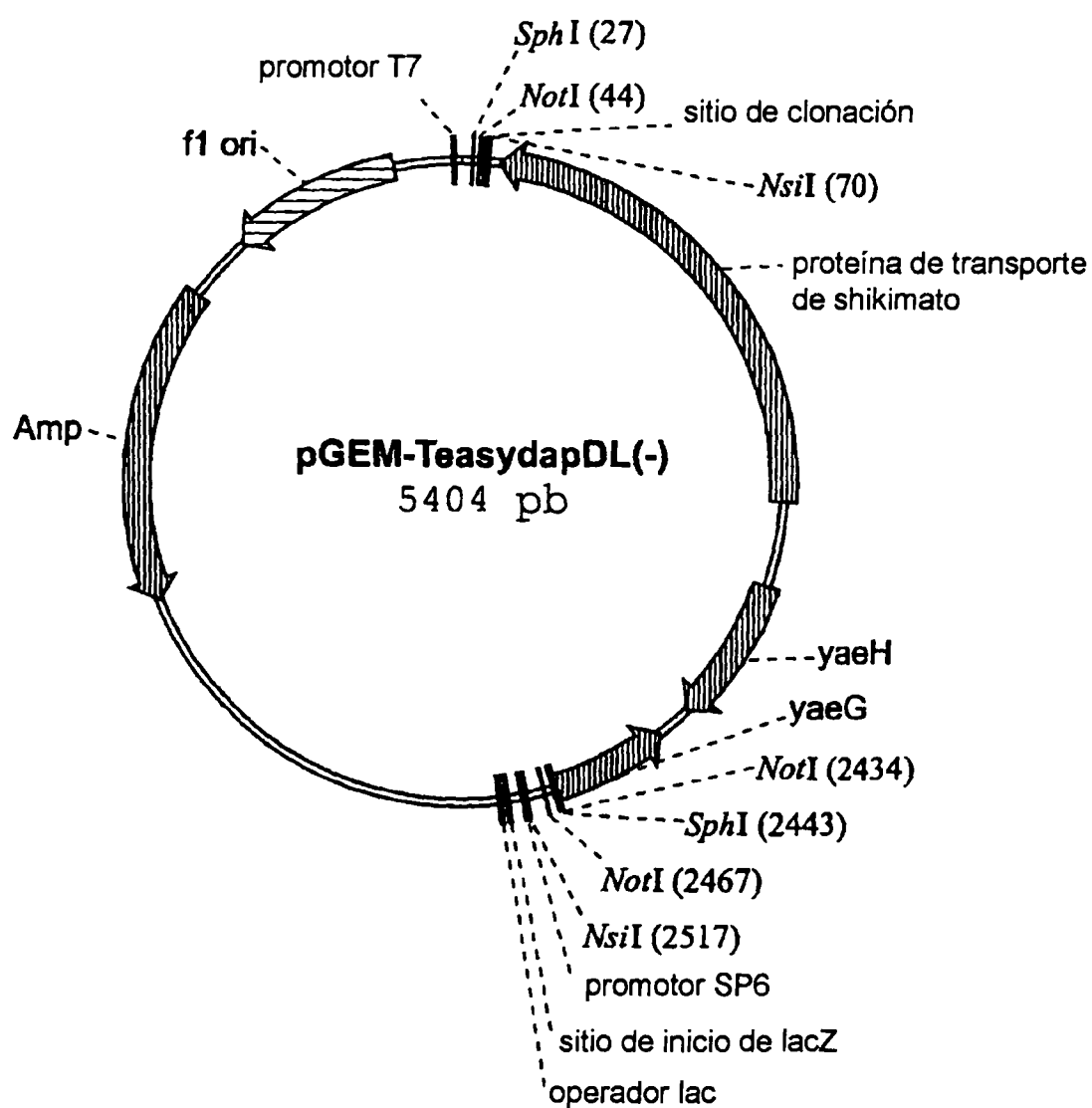


FIG. 3F

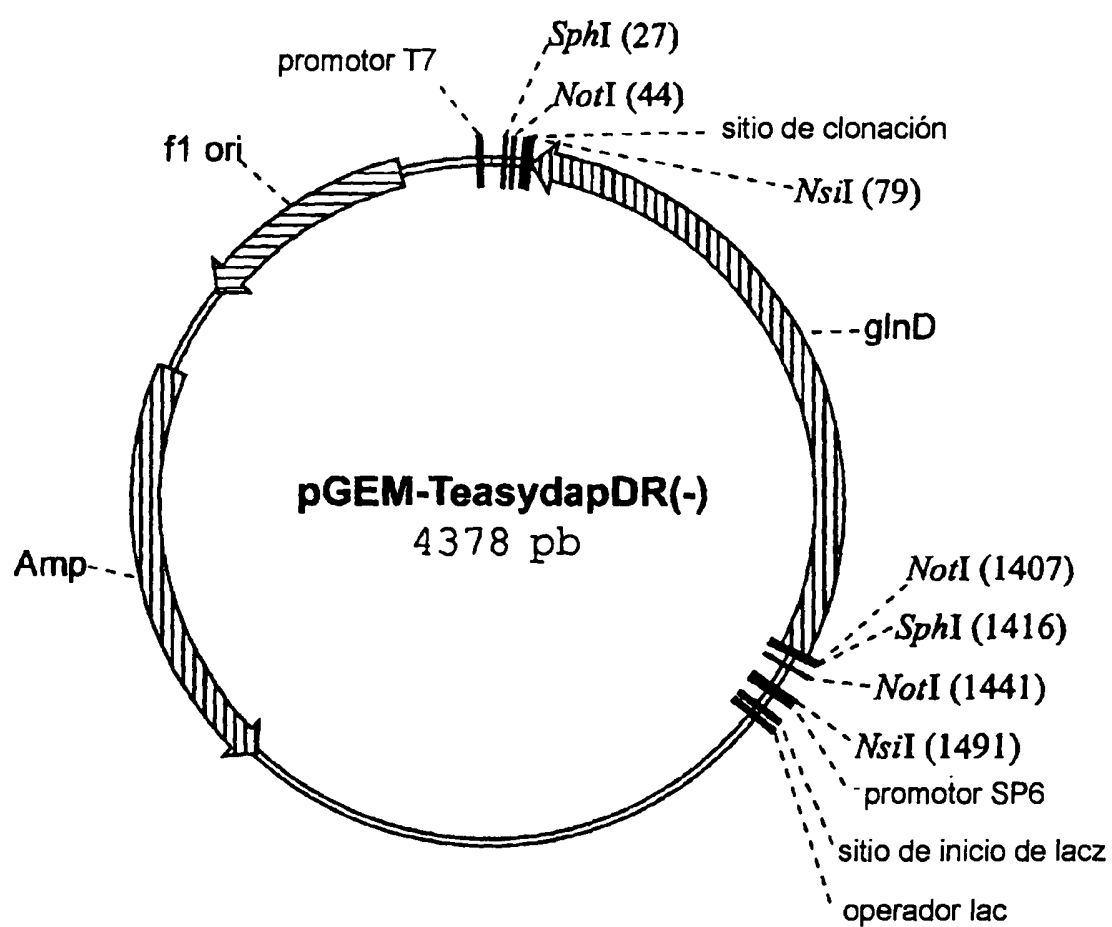


FIG. 3G

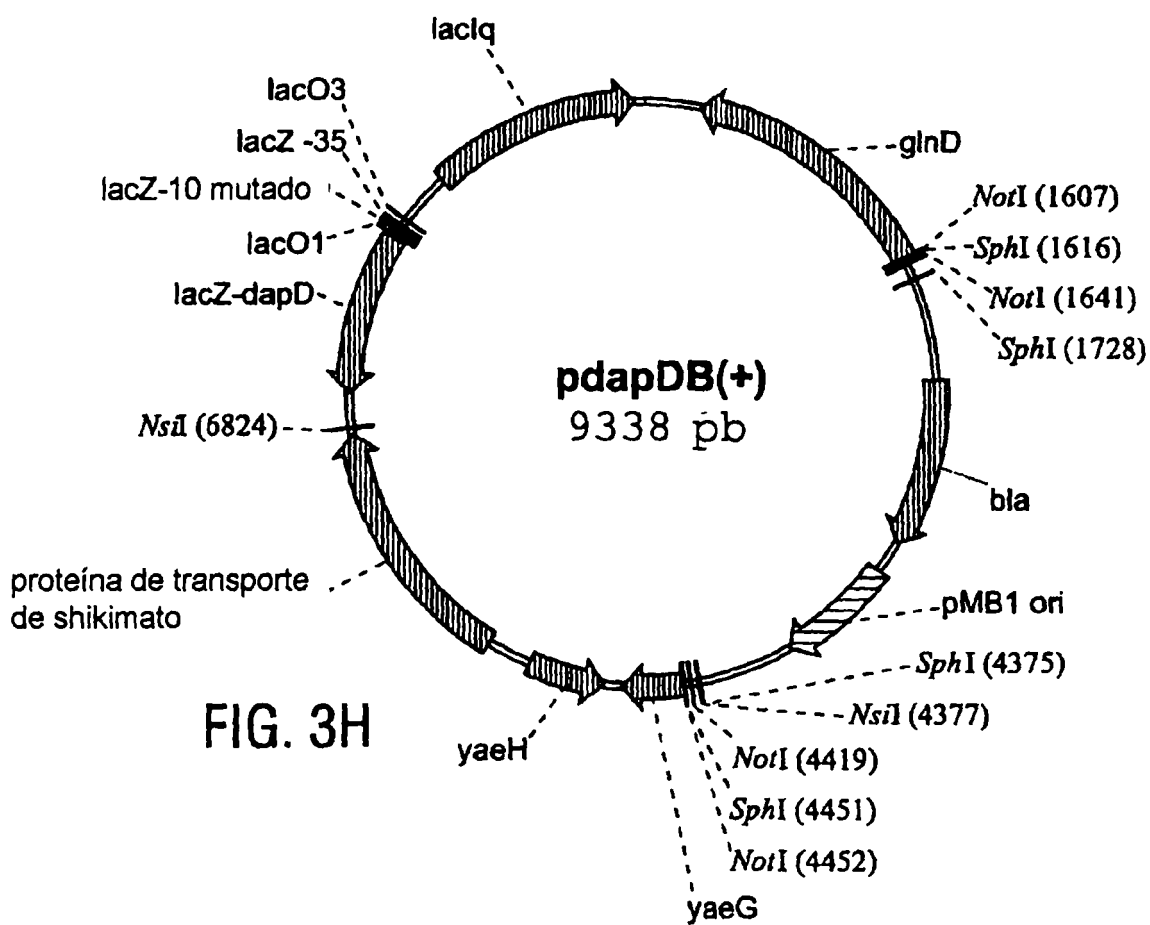
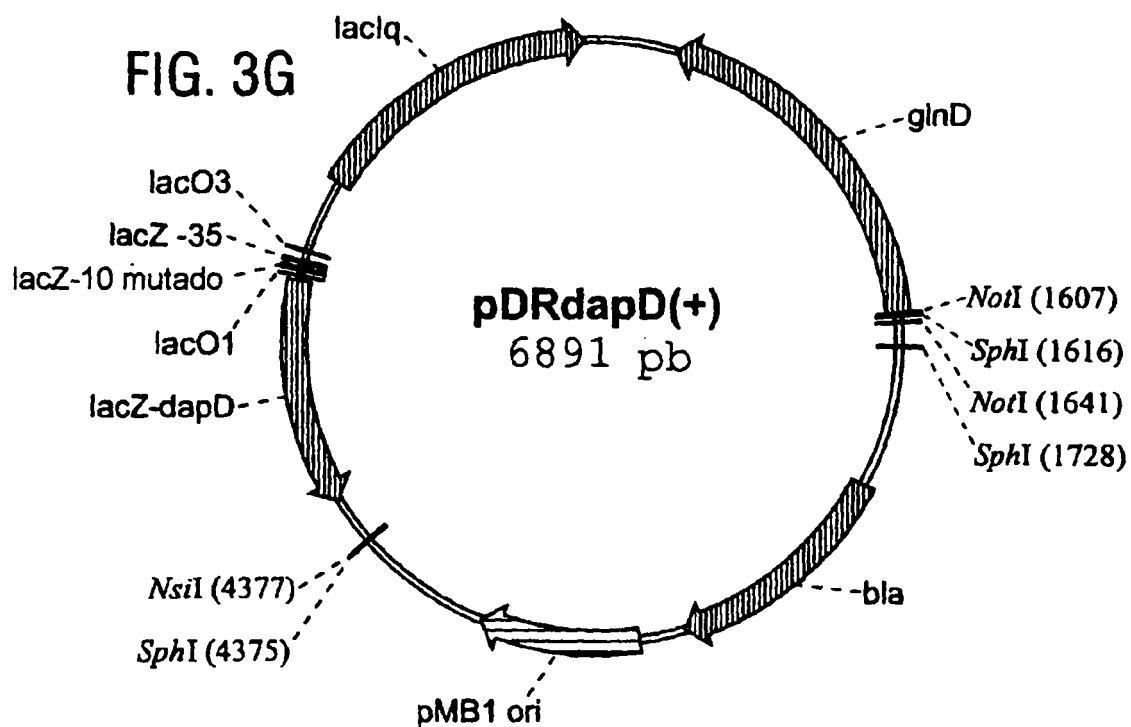


FIG. 3H

FIG. 3I

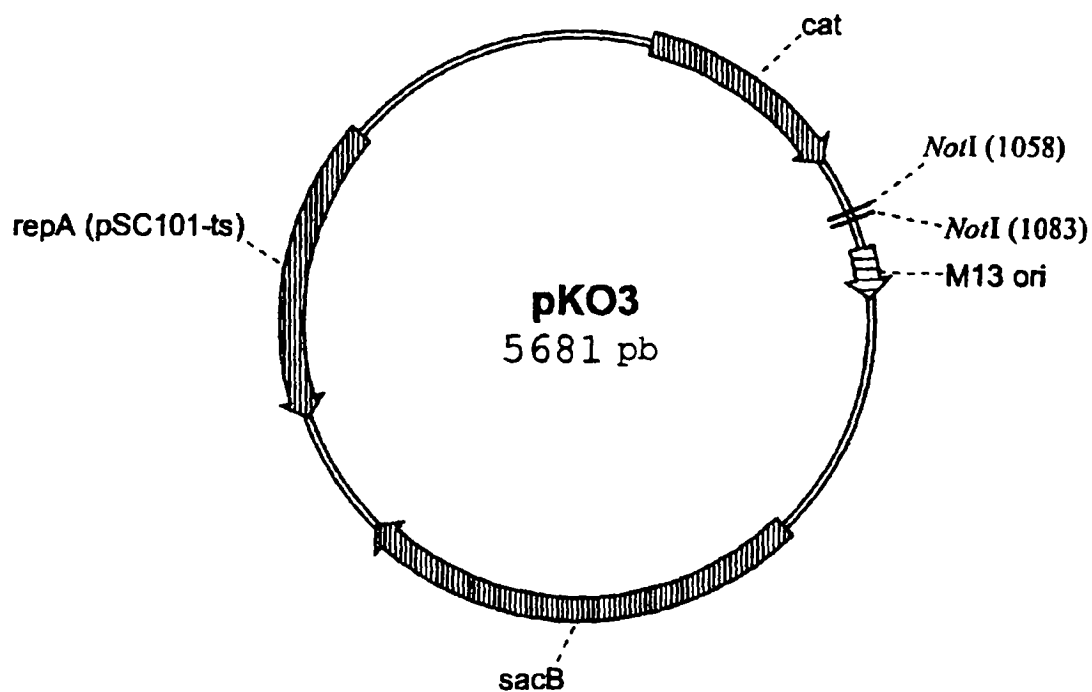


FIG. 3J

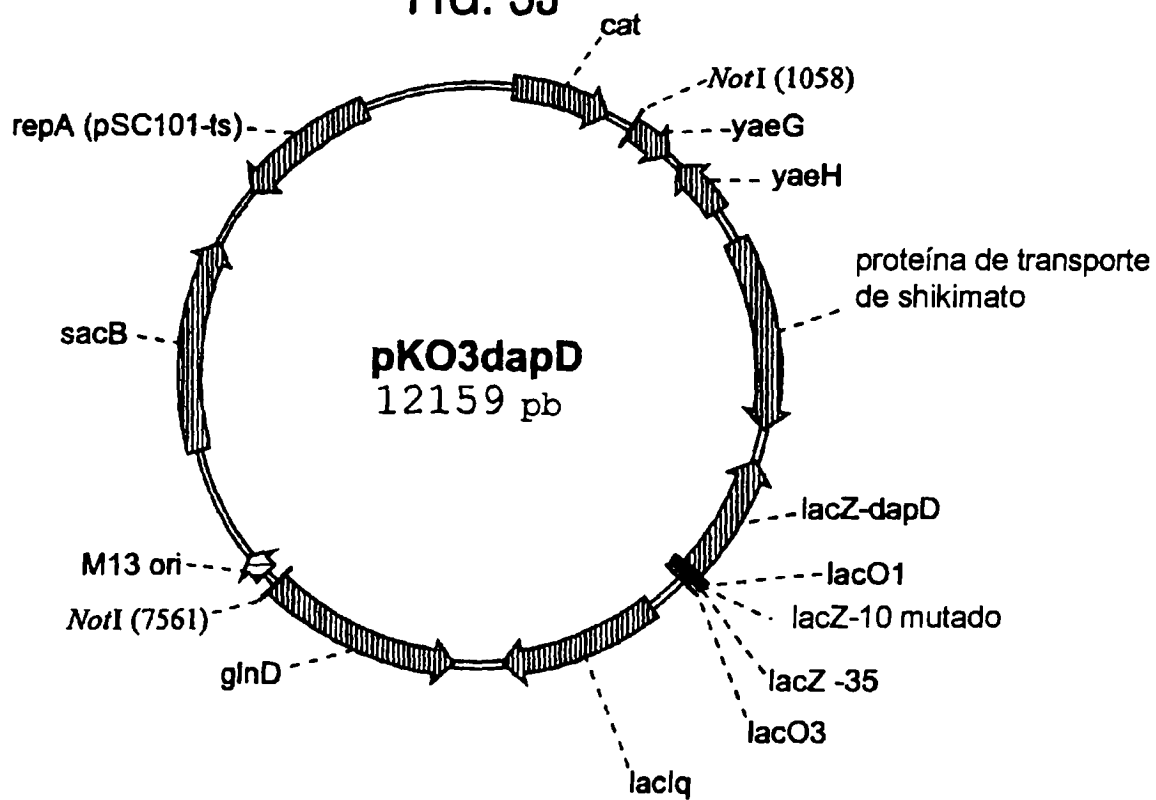


FIG. 4A

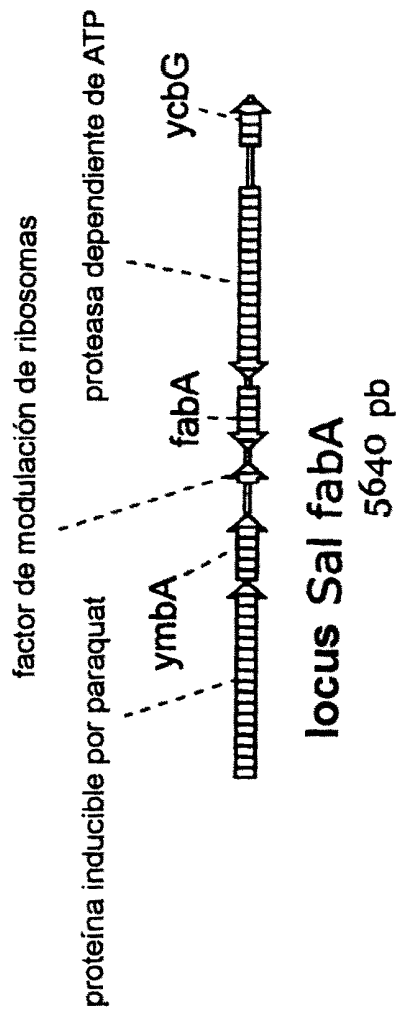


FIG. 4B

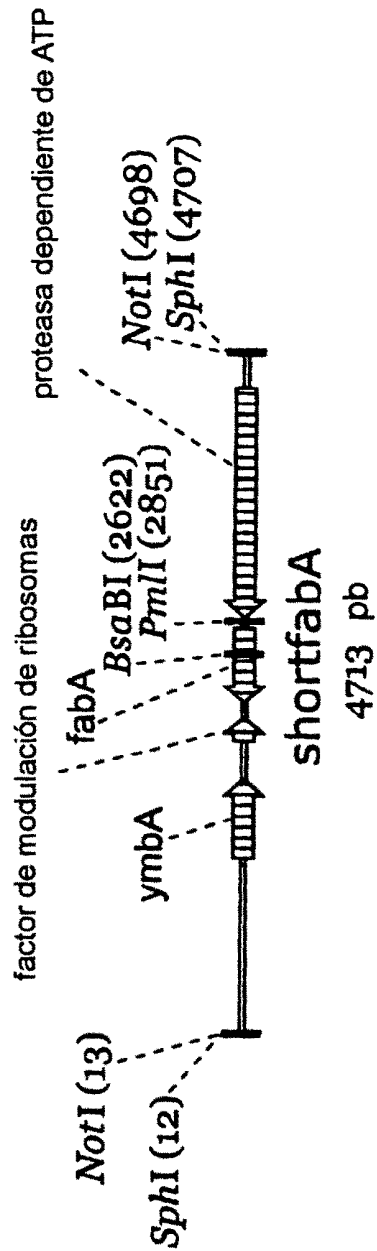


FIG. 5A

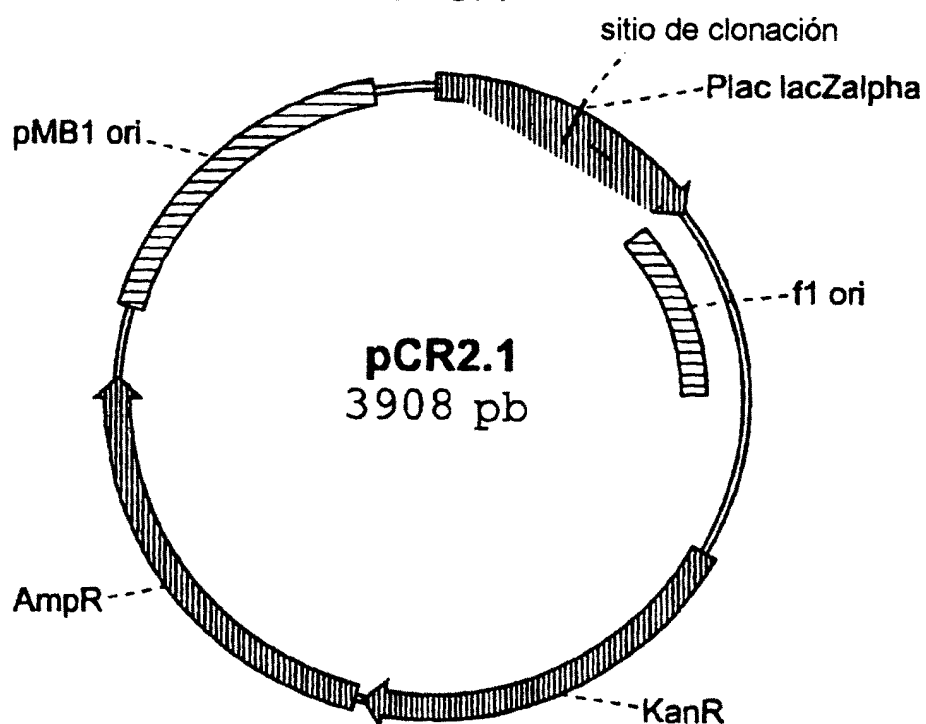


FIG. 5B

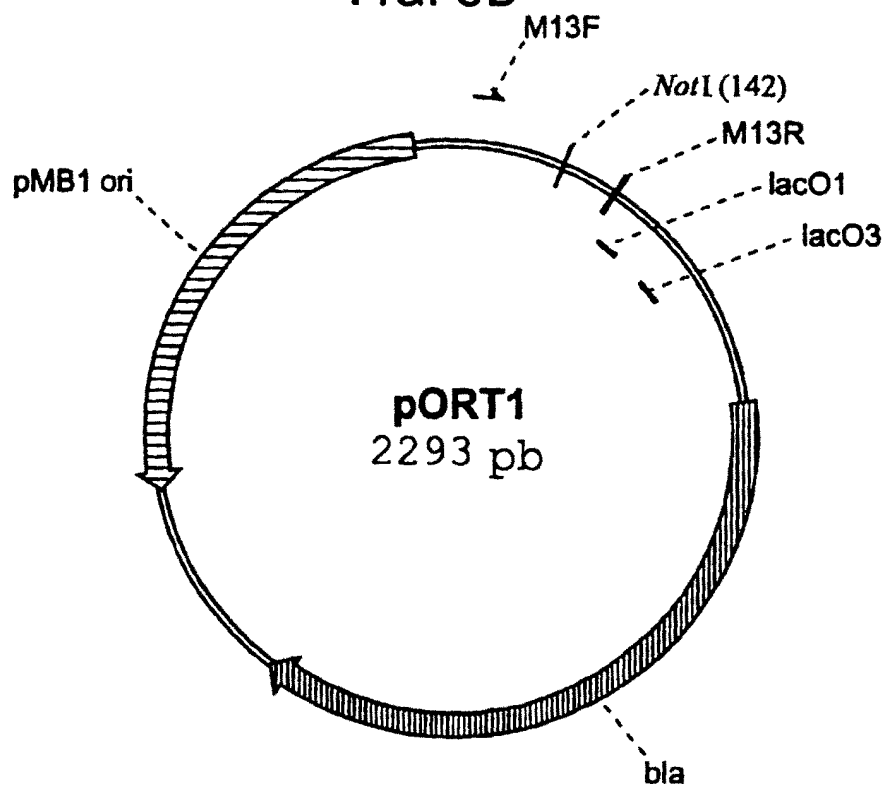
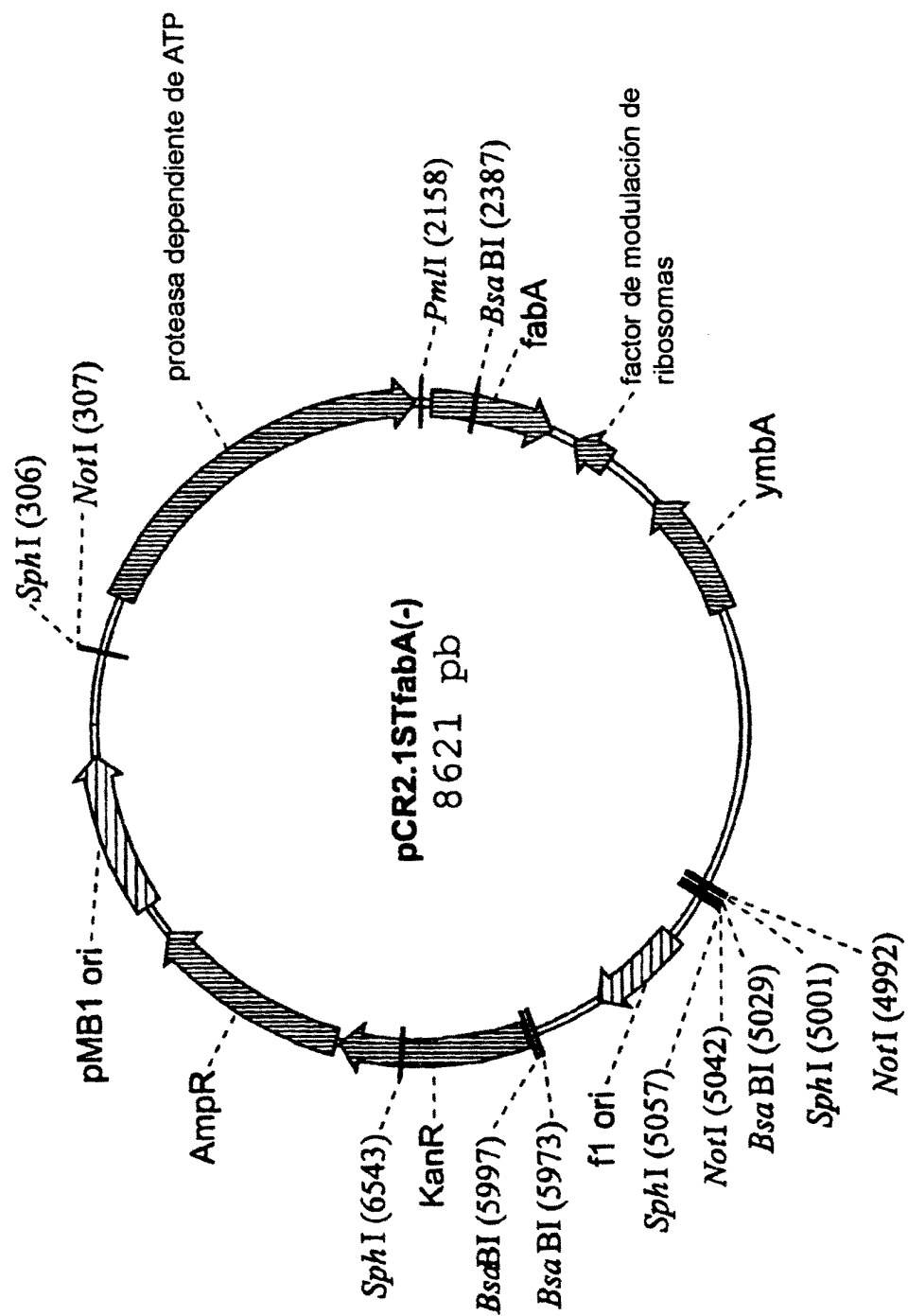


FIG. 5C



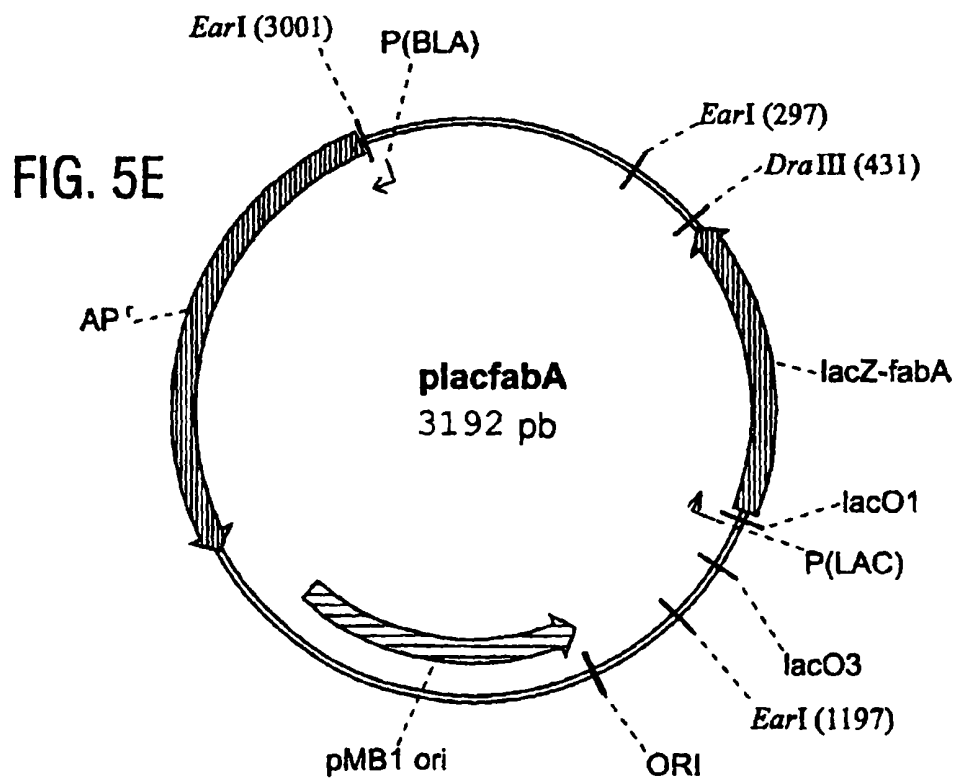
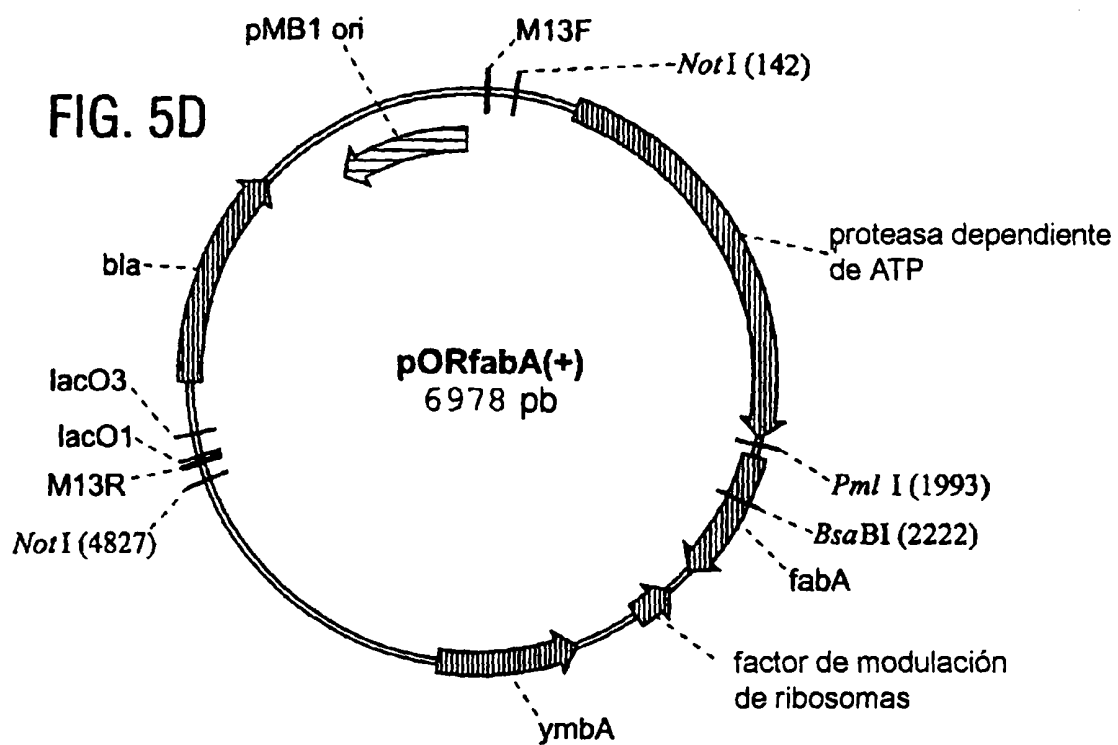


FIG. 5F

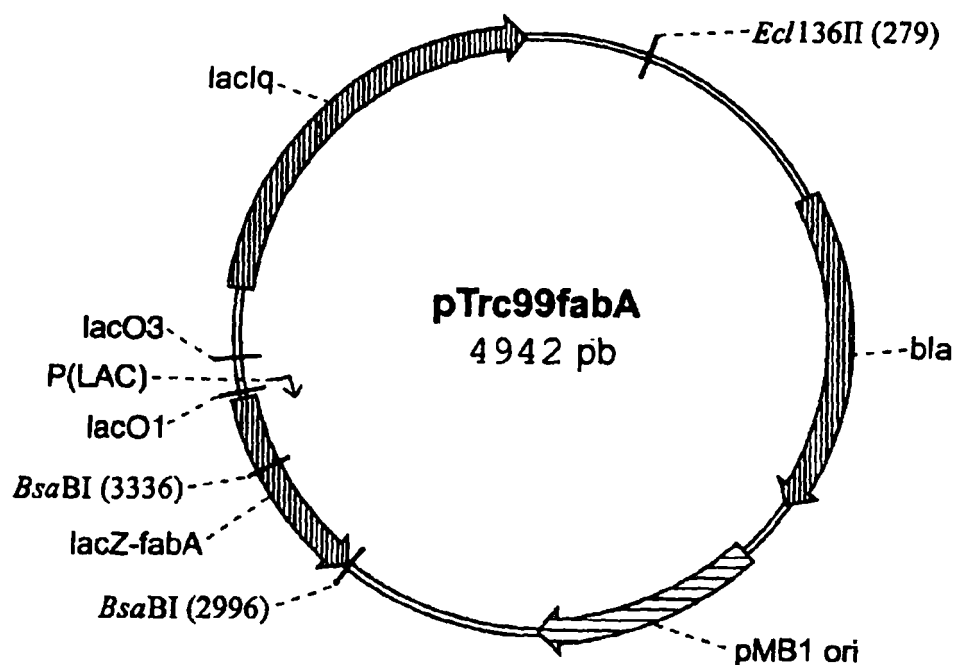


FIG. 5G

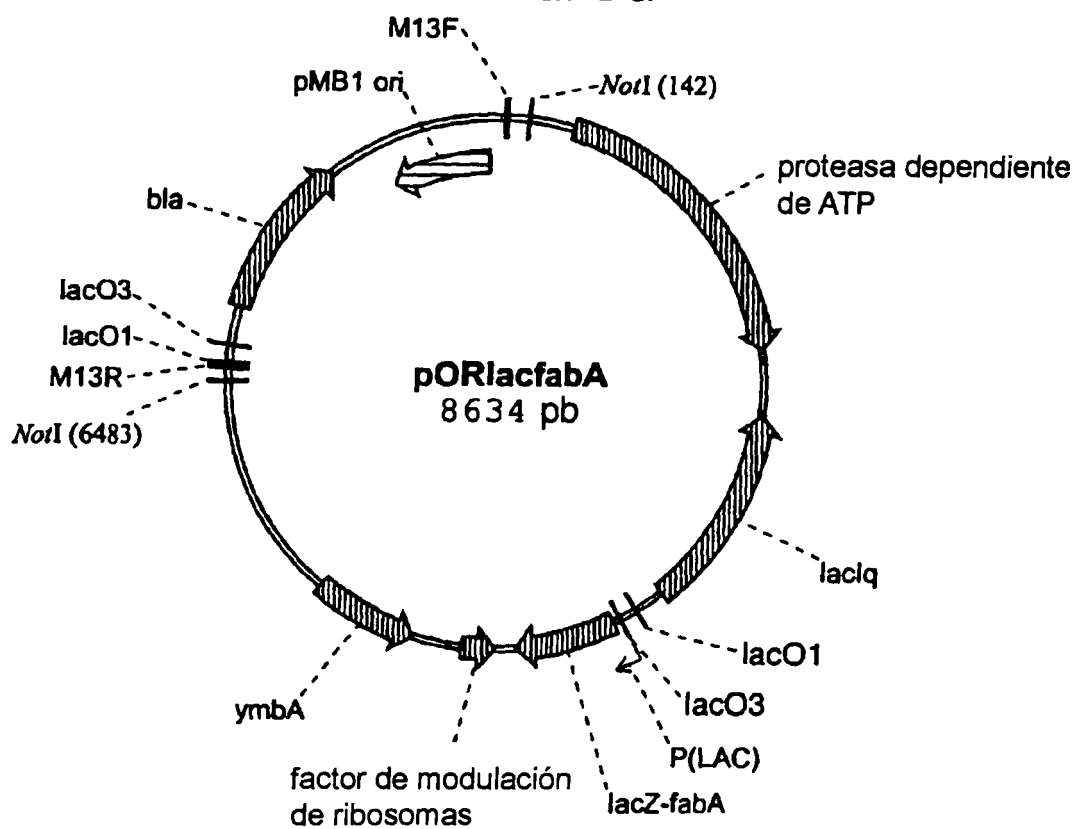
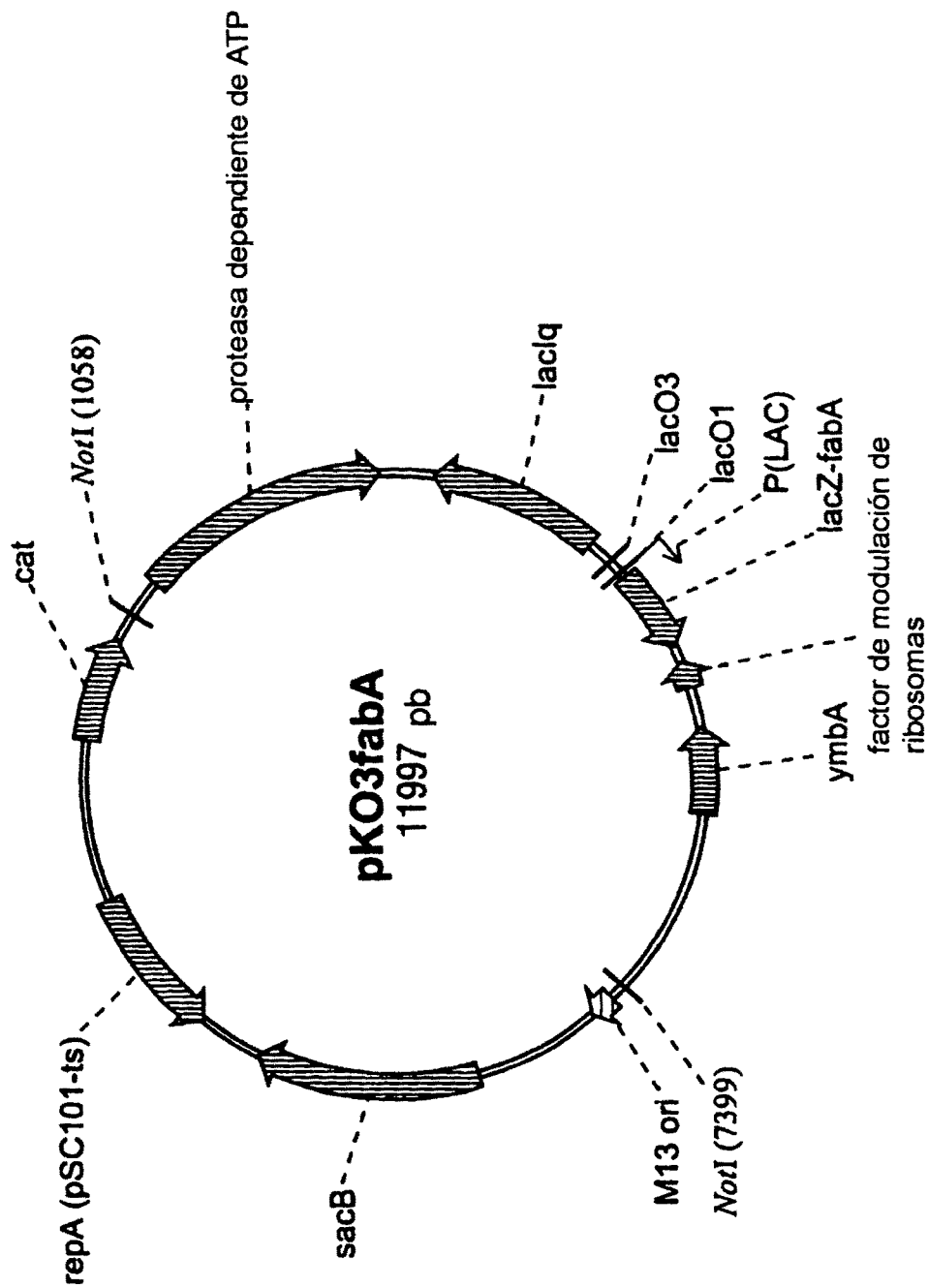


FIG. 5H



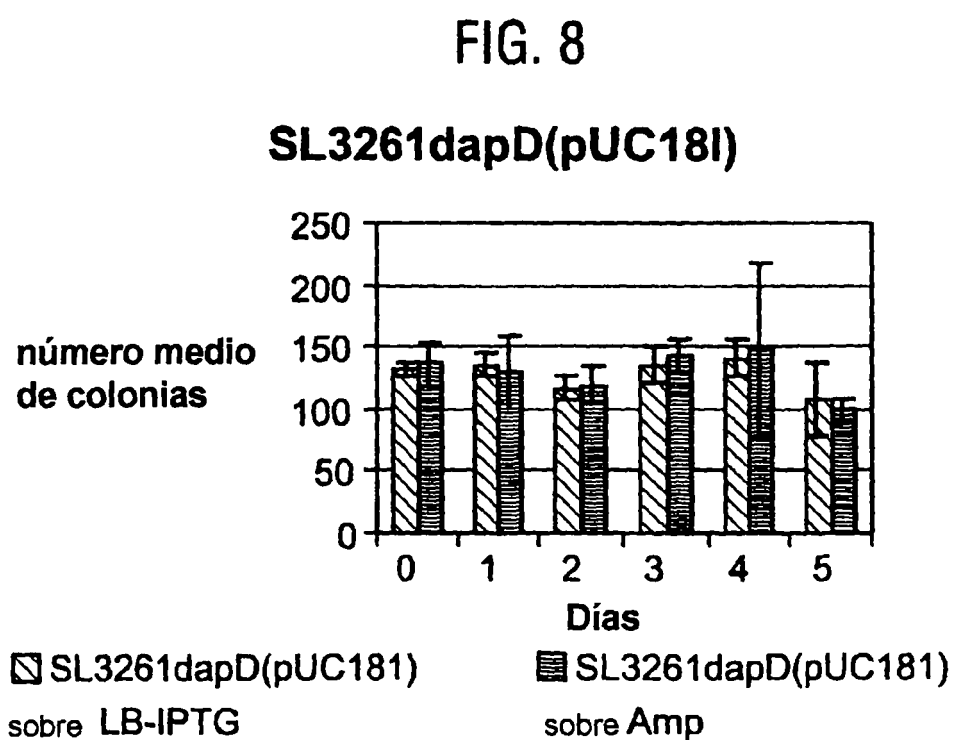
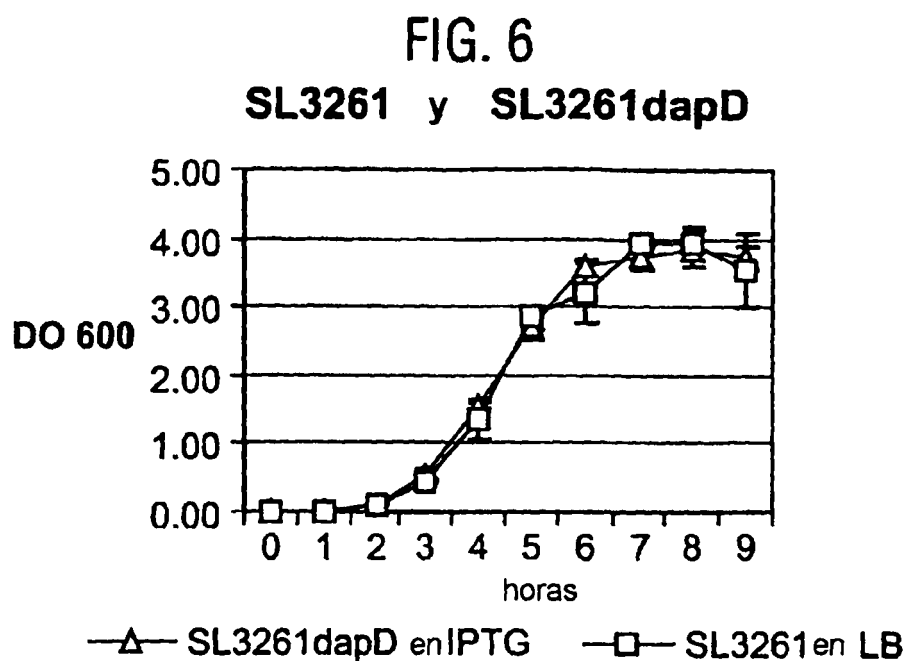


FIG. 7

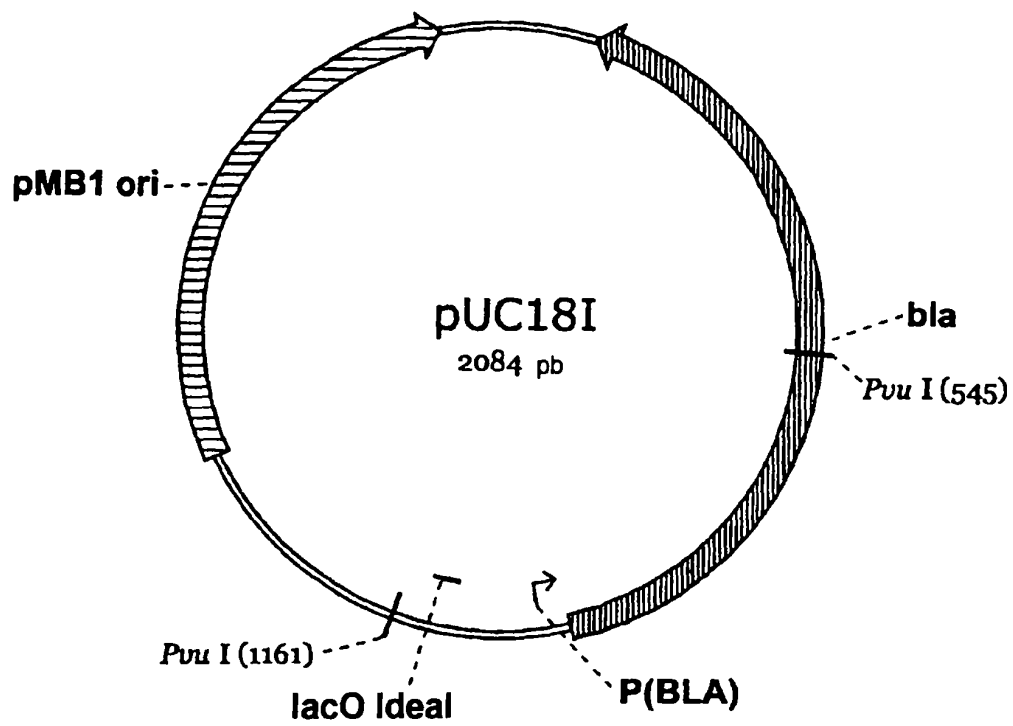


FIG. 11

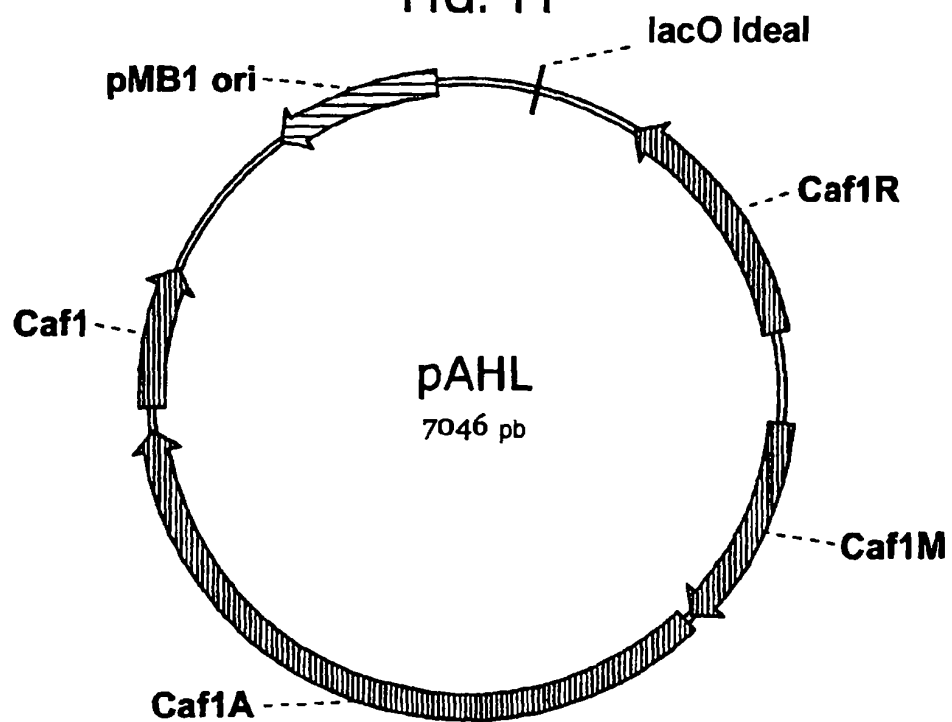
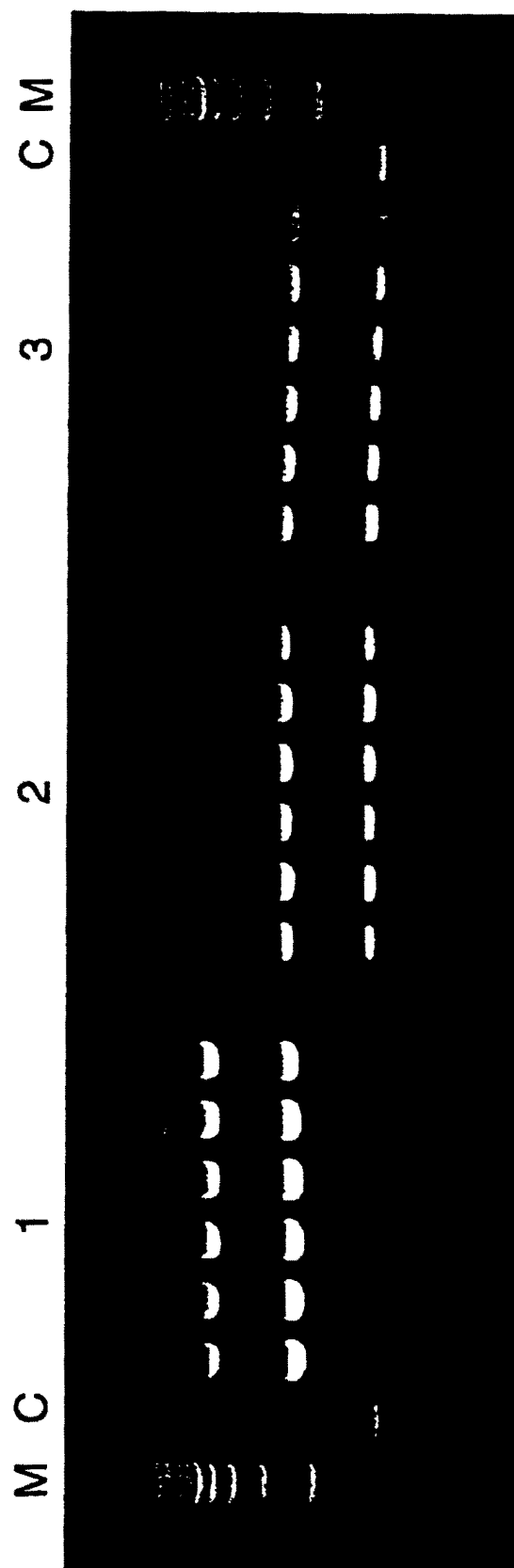


FIG. 9



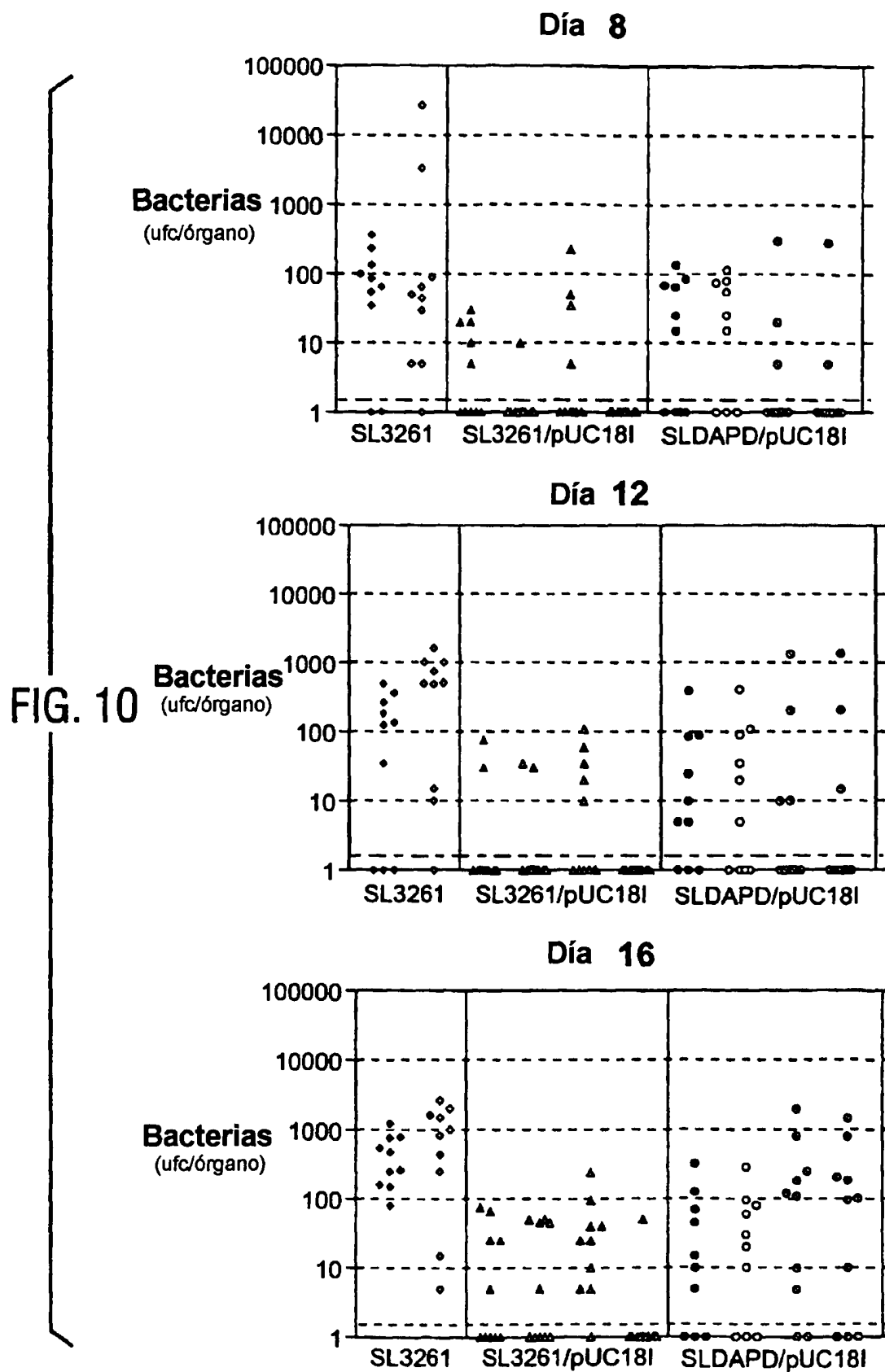


FIG. 12

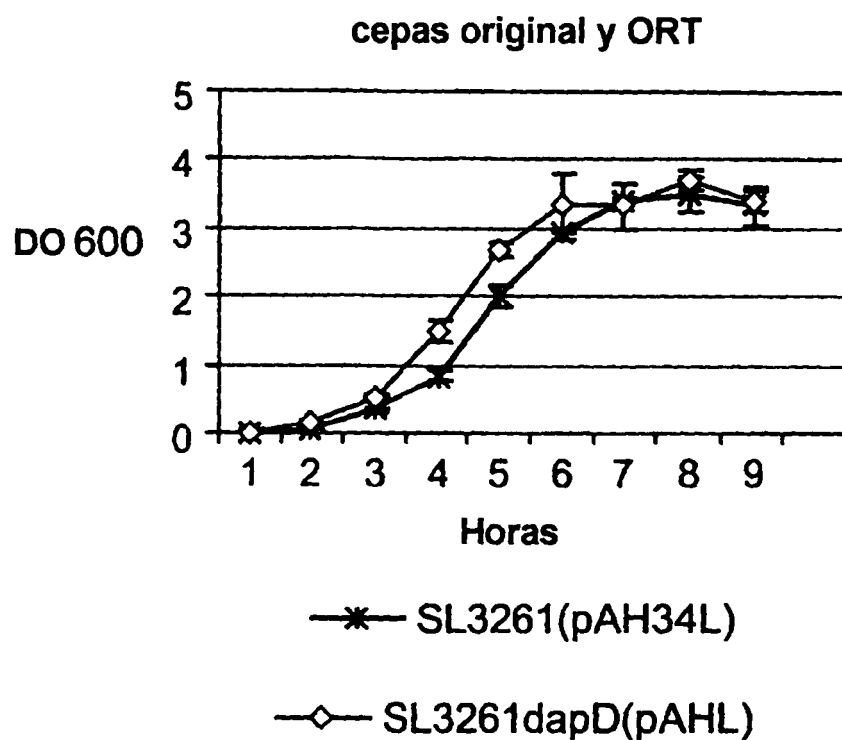


FIG. 13

Recuentos de colonias para SL3261dapD(pAHL)

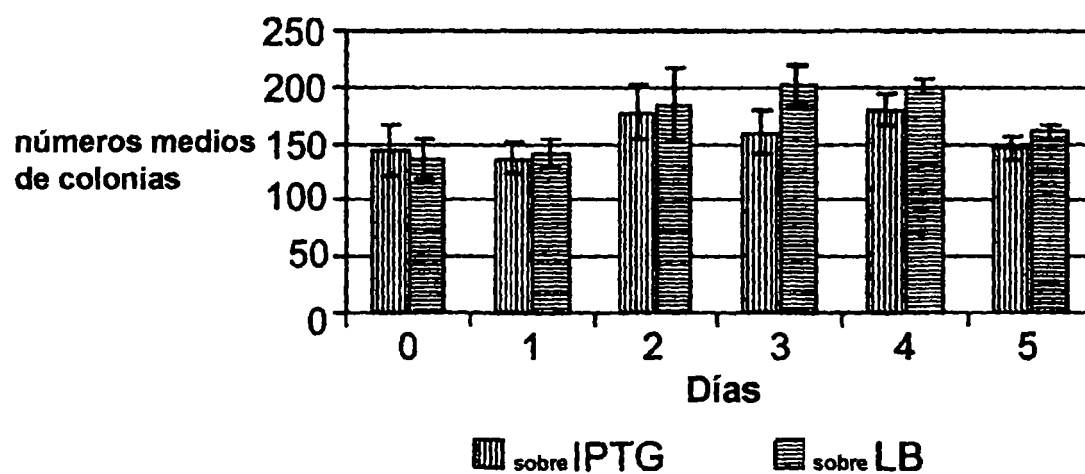
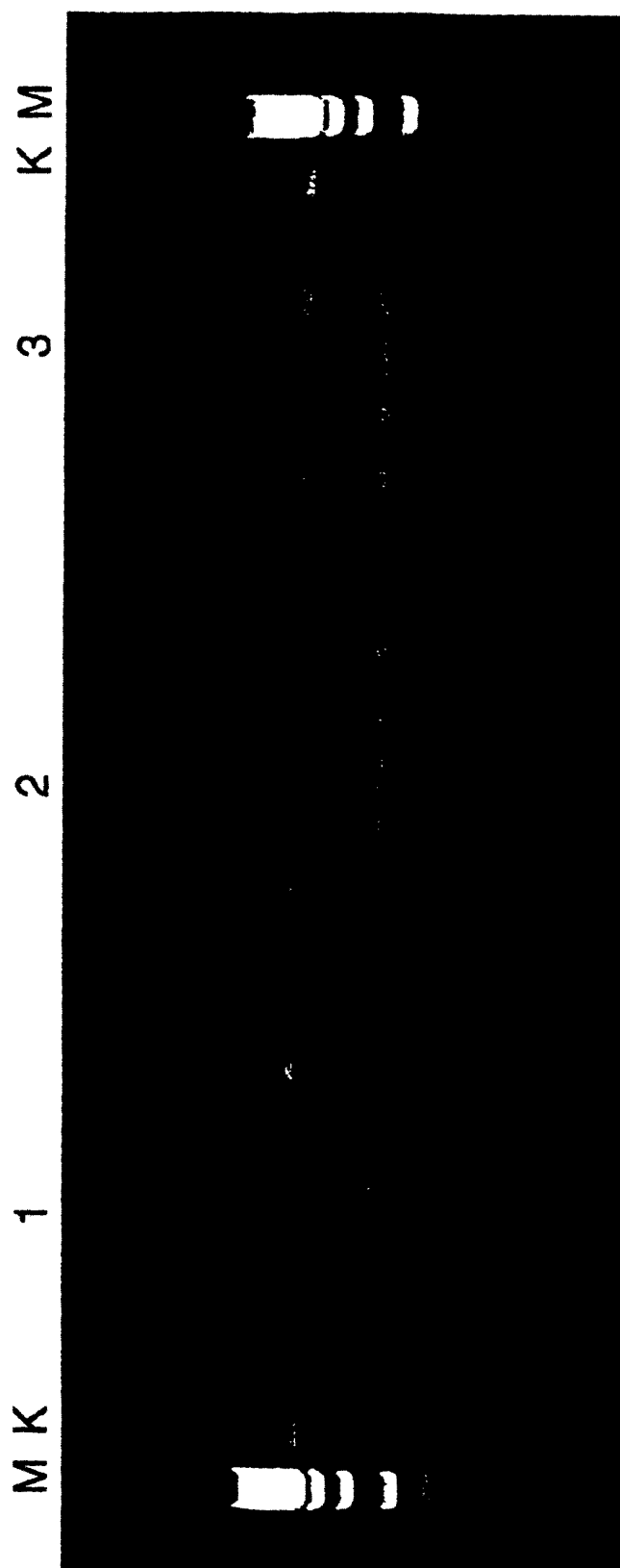


FIG. 14



ES 2 279 963 T3

LISTA DE SECUENCIAS

	<110> COBRA THERAPEUTICS LIMITED	
5	<120> ESTABILIZACIÓN DE PLÁSMIDO <i>IN VIVO</i>	
	<130> Documento P033103WO	
	<140> pct/gb03/02166	
	<141> 19-05-2003	
10	<150> Documento GB0211459.3	
	<151> 18-05-2002	
	<160> 6	
15	<170> SeqWin99, versión 1.02	
	<210> 1	
	<211> 39	
	<212> ADN	
20	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Secuencia artificial	
	<220>	
25	<223> Cebador 5STdapD	
	<400> 1	
30	cgaatggcat gcggccgcag ctattttat caggatttg	39
	<210> 2	
	<211> 35	
35	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
40	<223> Cebador LST2dapD	
	<400> 2	
45	gcgaatgcat agcgggggcg acagccccc ttg	35
	<210> 3	
	<211> 39	
50	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Secuencia artificial	
55	<220>	
	<221> Cebador 3STdapD	
	<400> 3	
60	tgtggggcat gcggccgcag tggtcgcaca tcgtcggac	39
	<210> 4	
65	<211> 46	
	<212> ADN	

ES 2 279 963 T3

	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Secuencia artificial	
5	<220>	
	<221> Cebador RSTdapD	
	<400> 4	
10	gcttttcaact cgatgcatct accctttatc gtttgattg agggcc	46
	<210> 5	
15	<211> 41	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
20	<220>	
	<223> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador 5STfabA	
25	<400> 5	
	caccgcgcac gcggccgccc gatgccaaag gtattcgtgt g	41
30	<210> 6	
	<211> 41	
	<212> ADN	
35	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Secuencia artificial	
40	<220>	
	<223> Cebador 3STfabA	
	<400> 6	
45	tttcagcat gcggccgcgt gtgcagcgtg acgggttagg c	41
50		
55		
60		
65		