



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 274 663**

② Número de solicitud: 200400475

⑤ Int. Cl.:
C12N 15/64 (2006.01)

⑫

PATENTE DE INVENCION

B1

⑫ Fecha de presentación: **03.07.2002**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **16.05.2007**

Fecha de la concesión: **14.03.2008**

⑮ Fecha de anuncio de la concesión: **01.04.2008**

⑯ Fecha de publicación del folleto de la patente:
01.04.2008

⑰ Número de la solicitud inicial: **200201553**

⑲ Titular/es:
**Consejo Superior de Investigaciones Científicas
c/ Serrano, 117
28006 Madrid, ES
Freie Universität Berlin. Institut Für
Kristallographie**

⑳ Inventor/es: **Camacho Páez, Ana G.;**
Ayora Hirsch, Silvia;
Saenger, Wolfran y
Alonso Navarro, Juan C.

㉑ Agente: **No consta**

㉒ Título: **Método de contención biológica basado en la expresión de los genes pertenecientes a las familias
génicas ζ y ϵ .**

㉓ Resumen:

Método de contención biológica basado en la expresión de los genes pertenecientes a las familias génicas ζ y ϵ . La presente invención consiste en un sistema de contención biológica basado en el confinamiento de un replicón extracromosómico en una población celular microbiana, la estabilización post-segregacional de un plásmido en una población de células hospedadoras y la limitación de la supervivencia de una población celular basado en la expresión de los genes pertenecientes a las familias génicas ζ y ϵ .

ES 2 274 663 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

DESCRIPCIÓN

Método de contención biológica basado en la expresión de los genes pertenecientes a las familias génicas ζ y ε .

5 Sector de la técnica

La invención se encuadra dentro del Área de Biotecnología. Esta invención se relaciona en general con los sistemas de contención biológica para evitar la diseminación de microorganismos genéticamente modificados y, en particular, se refiere a un sistema de muerte celular programada que se activa en determinadas condiciones.

10 Estado de la técnica

El uso de nuevos GEMs (genetic engineered microorganisms), los cuales son industrialmente y farmacológicamente útiles, han despertado el interés del público en general. El riesgo potencial involucrado es debido fundamentalmente a la eliminación unidireccional de tales GEMs desde su medio físico original (por ejemplo, laboratorios, fermentadores y/o plantas de producción) al medio ambiente donde son liberados. Los niveles de seguridad en el manejo de los GEMs puede ser incrementado por combinación de medidas de contención física con medidas de contención biológica, para de esta manera reducir la posibilidad de supervivencia de los GEMs si escapan de su medio físico original.

Inicialmente, los sistemas de contención biológica estaban basados en el uso de vectores “seguros” de donado (por ejemplo, vectores que carecen de funciones de transfección) y bacterias hospedadoras (por ejemplo, hospedadores mutantes exotrópicos para determinados nutrientes) incapaces de sobrevivir a las condiciones ambientales.

Recientemente, ha sido desarrollada una estrategia alternativa de contención biológica, en la cual el vector recombinante codifica una función celular que induce un estado “viable pero no cultivable” (VPNC) de aquellas células cuyos genes están bajo el control de un promotor que solo es capaz de expresar estos genes bajo ciertas condiciones ambientales. La incorporación en la célula hospedador primaria y/o en un entorno físico primario de esta función VPNC y la selección de una secuencia de regulación apropiada, genera un factor de contención biológica activo (Gerdes *et al.*, 1999). Si un mecanismo inducido de regulación de la expresión es seleccionado para este sistema de contención biológica, una población de GEMs conteniendo este sistema, podrá, una vez liberado en el entorno, ser sometido a un estado VPNC, favoreciendo la desaparición de estos organismos.

Existe una familia homogénea de genes codificadores de funciones proteicas que inducen un estado VPNC en las células. Este grupo incluye una proteína tóxica de bajo peso molecular y alta vida media (un polipéptido de 100 a 130 aminoácidos) que interacciona con otra proteína antídoto, aún más pequeña (polipéptido de 70 a 85 aminoácidos) y que antagoniza el efecto tóxico de la primera. La antitoxina es una proteína más lábil y es degradada por una proteasa específica de la bacteria (revisado por Engelberg-Kulka y Glaser, 1999; Gerdes, 2000). El primer sistema descrito fue el sistema Ccd del plásmido F (revisado en Gerdes, 2000). La función natural de este sistema es estabilizar la herencia de plásmidos al menos 100 veces y mediar la exclusión de plásmidos competidores (Gerdes *et al.*, 2000; Cooper y Heinemann, 2000).

Una estrategia alternativa de contención biológica incluye un grupo amplio de genes que codifican funciones proteicas como las bacteriocinas (Tan y Riley, 1996), determinantes de resistencia a antibióticos (Shaw *et al.*, 1993), determinantes de virulencia (Finlay y Falkow, 1997), o fosfotransferasa/anti-fosfotransferasa de bacterias Gram-positivas (Meinhart *et al.*, 2002). Este último grupo, que tiene una regulación similar al grupo de funciones que inducen el estado de VPNC, está constituido por una proteína tóxica de función fosfotransferasa y de larga vida media (de 275 a 295 aminoácidos) que interacciona con una proteína lábil de naturaleza anti-fosfotransferasa (de 85 a 95 aminoácidos) que antagoniza el efecto tóxico de la primera (antitoxina). La antitoxina lábil es degradada por una proteasa bacteriana específica. En este sistema de muerte celular programada, una fosfotransferasa codificada a partir de un plásmido, estabiliza en más de 10^6 veces la herencia de replicones tanto tipo theta como sigma, de bacterias Gram-positivas en las cuales los genes son expresados (Ceglowski *et al.*, 1993a). La función de muerte celular de la fosfotransferasa como se la define en esta sección se refiere al péptido citotóxico, que al fosforilar una proteína esencial en la duplicación bacteriana, induce la muerte celular y la actividad antifosfotransferasa a la antitoxina que bloquea la actividad de la toxina.

Un modelo de la función de muerte celular programada de la fosfotransferasa o familia ζ de factores de contención biológica activos es el operón $\omega\varepsilon\zeta$ del plásmido pSM19035 de *S. pyogenes*, el cual codifica tres genes: ω , ε y ζ (Ceglowski *et al.*, 1993b; de la Hoz *et al.*, 2000, Figura 1). El gen ζ codifica una citotoxina cuya producción es letal para las células hospedadoras, el gen ε codifica un antídoto que previene el efecto letal de ζ y el gen ω codifica una pequeña proteína que controla la expresión del operón (de la Hoz *et al.*, 2002; Murayama *et al.*, 2001). Sistemas similares son codificados por otros miembros del mismo grupo de incompatibilidad [*inc18*, incluyendo el plásmido pAM β 1 y pIP501 (Brantl *et al.*, 1990)] y otros plásmidos menos caracterizados de bacterias Gram-positivas y sistemas codificados cromosomalmente (por ejemplo, en el genoma de *S. pneumoniae* (Meinhart *et al.*, 2002)). Recientemente, el gen cromosómico *SP1051* de *S. pneumoniae* TIGR4 ha sido secuenciado, éste presenta una identidad de secuencia del 45% y una homología del 65% con el gen ζ (Figura. 2). *SP1051* es codificado a partir de un operón bicistrónico, junto con el gen *SP1050* que codifica un regulador transcripcional que es homólogo a la proteína Cro y no muestra semejanza con ε (Tettelin *et al.*, 2001). En investigaciones preliminares se ha podido ver que las proteínas codificadas

ES 2 274 663 B1

por los genes SP1050 y SP1051 forman *in vitro* un complejo muy estable, comportándose en *E. coli* como un sistema de muerte celular programada (PCD) (Meinhart *et al.*, 2002).

5 La presente invención describe la actividad funcional de las proteínas ζ y ε del operon $\omega\varepsilon\zeta$ del plásmido pSM19035 como citotoxina y como antídoto, respectivamente; la vida media menor del antídoto ε con respecto a la citotoxina ζ y la capacidad de la citotoxina ζ de reducir drásticamente la viabilidad de los microorganismos que la expresan.

10 Esta invención muestra el uso de una o dos citotoxinas de la familia que ζ presentan funciones de muerte celular programada como sistema(s) de contención biológica, tal como se describe a continuación. El uso de tales sistemas abre una nueva alternativa, un sistema de contención biológica extremadamente efectivo y versátil, en el cual la frecuencia de mutantes que surgieran de forma espontánea y que dieran lugar a microorganismos resistentes al efecto letal de estas dos citotoxinas, sería muy baja, implicando esto que tal sistema de contención biológica sería muy seguro.

15 La presente invención describe el uso de la expresión recombinante de polipéptidos citotóxicos de la familia ζ (la proteína procede del gen ζ del plásmido pSM19035, aislado originalmente de *Streptococcus pyogenes* o genes relacionados aislados de plásmidos de bacterias lácticas o procedente del genoma de *Streptococcus pneumoniae*), que o bien eliminaría de forma altamente efectiva y de manera controlada los microorganismos genéticamente modificados (GEMs) y liberados al medio ambiente, o bien drásticamente limitaría la función de los organismos GEMs a una situación en la cual se encontrarán en clara desventaja competitiva, siendo de esta manera eliminados del medio por la microflora natural del entorno en el cual estos microorganismos fueron liberados. Por lo tanto, este sistema puede ser definido como un sistema activo de contención biológica.

25 También se describe el uso del polipéptido citotóxico ζ para llevar a cabo la muerte selectiva y de manera controlada de microorganismos que tienen un desarrollo no deseado. Este desarrollo no deseado se refiere por ejemplo al caso de bacterias fermentadoras que contienen un profago lisogénico en su genoma, el cual puede ser inducido y pasar a un estado lítico. El polipéptido citotóxico ζ induciría la muerte selectiva de aquellas células donde estuviese desarrollado el ciclo lítico.

30 Así mismo, se describe el uso del polipéptido citotóxico ζ para inducir la muerte selectiva de aquellos microorganismos que han perdido su elemento extracromosómico, refiriéndose éste al plásmido que porta los genes de interés comercial en los organismos genéticamente modificados.

Descripción de la invención

35 - Breve descripción de la invención

Esta invención se refiere al uso en una población celular microbiana de un replicón extracromosómico el cual porta genes que codifican una citotoxina y su antídoto. El método consiste en (i) introducción en células Gram-positivas del replicón extracromosómico para ser confinado, conteniendo un gen que codifica el antídoto ε que, por unión con el péptido citotóxico ζ , actuaría como un antídoto para la citotoxina, (ii) cultivando las células en condiciones en las cuales el gen que codifica el antídoto y la citotoxina son expresados, en el caso de que una célula hija no reciba una copia del replicón extracromosómico, moriría debido a la acción citotóxica del polipéptido toxina, el cual es mantenido en la célula en ausencia del antídoto.

45 Esta invención también hace mención a sistemas utilizados para llevar a cabo un control condicional de la supervivencia de los GEMs en la población celular. El método comprende i) la introducción en bacterias Gram-positivas de genes que codifican los dos péptidos citotóxicos relacionados ζ , y que van a expresarse en esta población celular, los cuales por una parte están funcionalmente ligados a un gen que ejerce un control negativo sobre su expresión, y a una secuencia reguladora y regulable de ADN que permite este control de su expresión y (ii) el cultivo de esta población celular bajo condiciones en las cuales ambos genes ζ son expresados, dando lugar la sobreproducción de los péptidos citotóxicos a un fenómeno de PCD de las bacterias en la población celular.

55 Otro aspecto de la invención implicaría un método de muerte especializada sobre una bacteria dentro de una población celular. Este método supondría (i) la inserción por recombinación de un plásmido que portaría los genes que codifican estos péptidos citotóxicos, cuya expresión estaría regulada por una secuencia de ADN inducible por bacteriófagos; (ii) estas poblaciones serían cultivadas bajo condiciones que permitieran la inducción de profagos presentes en el genoma de estas células, de manera que la expresión de estos polipéptidos citotóxicos ζ induciría la muerte en aquellas células donde estos fagos replicativos estuvieran presentes.

60 - Descripción detallada de la invención

La presente invención describe el uso de citotoxinas ζ relacionadas entre sí, que producen una muerte celular efectiva y de forma controlada de los GEMs liberados al medio ambiente, o bien que limitan los GEMs liberados a una situación en la cual éstos presentarían una desventaja competitiva significativa, pudiendo ser eliminados por la microflora natural del entorno en el que son liberados. Por lo tanto puede ser definida esta invención como un factor activo de contención biológica.

ES 2 274 663 B1

Esta invención se refiere también al uso del polipéptido ζ en el control condicional de la supervivencia de células microbianas y/o la muerte selectiva y de manera controlada de microorganismos que experimentan un desarrollo no deseable. Además se refiere al uso de los polipéptidos ζ relacionados para llevar a cabo una muerte selectiva de los microorganismos que han perdido su elemento extracromosómico.

5 El sistema consiste en dos componentes, un polipéptido ζ citotóxico y su antídoto correspondiente, que por unión con la citotoxina inhibe su acción letal. Una característica general de estos sistemas “killer” de naturaleza proteica es que el componente antídoto, a diferencia del componente tóxico, es susceptible a la degradación por proteasas, dando lugar a una disminución en sus niveles intracelulares. Tal como aquí se define, el término “citotóxico” se refiere no
10 sólo a la pérdida de la capacidad de las células microbianas, que contienen el gen que codifica la toxina, de mantenerse viables (esto se determinaría comparando la capacidad de estas células de propagarse en un medio en el cual y bajo condiciones ambientales idénticas, se ha llevado a cabo el crecimiento de células que no portan este gen), sino también a la reducción de la capacidad replicativa de las células microbianas donde se produce la expresión de ζ o un péptido relacionado. Tal y como aquí se define, la expresión “célula microbiana” incluye aquellas bacterias Gram positivas
15 con bajo contenido en dG+dC en su ADN.

Las secuencias nucleotídicas de la citotoxina ζ y del antídoto ε localizados en el plásmido pSM19035 han sido depositadas en la base de datos EMBL, con el número de acceso X64695 y las secuencias de las proteínas están depositadas en la base de datos PIR con los números de acceso S45085 y S45083, respectivamente, y ambas secuencias
20 se muestran en la Figura 1. Las estructuras cristalinas del regulador transcripcional ω y del complejo toxina-antídoto codificados ambos por el plásmido pSM19035, han sido recientemente resueltas (Murayama *et al.*, 2001; Meinhart *et al.*, 2002).

Esta invención relata un sistema que controla de forma condicional la supervivencia de una población de células microbianas recombinantes, portando éstas los dos genes que codifican los polipéptidos citotóxicos ζ relacionados, los cuales están funcionalmente fusionados a un gen cuyo producto se une a una secuencia de ADN regulable y reguladora - promotor - que está controlando condicionalmente la expresión de estos polipéptidos citotóxicos. En el contexto presente, la expresión “controla de forma condicional” se refiere al hecho de que la construcción que portan estas células microbianas, permite que los polipéptidos citotóxicos puedan ser expresados bajo ciertas condiciones medioambientales pre-determinadas mientras que, bajo otras condiciones diferentes, los genes no se expresarían. Por lo tanto, la supervivencia de las células microbianas puede ser predeterminada para que se lleve a cabo bajo determinadas condiciones. La secuencia de ADN regulable y reguladora está funcionalmente ligada a la región 5' de los genes que codifican los polipéptidos citotóxicos. De acuerdo con la invención descrita, esta secuencia de ADN reguladora, puede ser una secuencia a la cual uno de los genes que codifica estas citotoxinas está naturalmente asociado (como la
30 secuencia que porta el sitio de unión de ω), o bien puede ser una secuencia a la cual estos genes no están naturalmente asociados.

Tal como aquí se define, la secuencia de ADN que funciona siendo regulada negativamente, puede consistir en una secuencia de ADN que esté regulando directamente la expresión de estos genes a nivel de la transcripción. De acuerdo con esta invención, la supervivencia de las células microbianas por tanto está controlada por la expresión en las células portadoras de estos polipéptidos citotóxicos ζ .

Los factores que regulen la actividad del promotor tal y como se define anteriormente, pueden ser seleccionados de entre una gran variedad de factores. De acuerdo con esta invención, el promotor sería regulado por factores ventajosos para los microorganismos, y de esta manera se estaría controlando la expresión de los polipéptidos citotóxicos por el estado fisiológico de las células, el medio en el que se encuentran las células y/o incluso mediante un evento inducible a partir de un elemento extracromosómico presente en las células.

En este contexto, el término “estado fisiológico de las células” denota la presencia o ausencia de ciertas sustancias químicas del entorno, tales como las que se encuentran en el medio de fermentación en el cual las células son propagadas, y que pueden no estar presentes en un segundo entorno en el cual estos organismos son liberados, también es posible que un factor que sea requerido para la supervivencia de las células, deje de encontrarse en el entorno donde se localizan las células, o bien que este factor requerido, se agote en el entorno de la célula, produciendo el efecto deseado, es decir, que el gen sea expresado.
55

Existe otro aspecto mencionado referente a la invención, en el cual se muestra como un método que controla condicionalmente la supervivencia de una población celular recombinante que contiene los genes que codifican los dos péptidos citotóxicos ζ . En este otro aspecto estos genes están funcionalmente ligados a una secuencia regulable de ADN que está bajo el control de otro evento o fenómeno inducible, siendo éste el que controla en última instancia la expresión de la toxina. En este contexto, la expresión “evento o fenómeno inducible” se refiere a factores, entre otros, que producen cambios en el estado lisogénico de los profagos presentes en las bacterias utilizadas, las cuales se propagan a través de procesos fermentativos. Por lo tanto, la expresión del gen estaría bajo el control de un producto codificado por el bacteriófago, permitiendo que los polipéptidos citotóxicos pudieran ser expresados al activarse el estado lítico del fago.
60

En el caso de que se diera una transcripción regulada de los genes que codifican estos péptidos citotóxicos, la secuencia de ADN reguladora puede ser un promotor aislado de operones bacterianos involucrados en la biosíntesis de aminoácidos, o de genes bacterianos cuya transcripción se active en estadios tardíos en la fase de crecimiento o
65

estadios tempranos de la fase estacionaria, y que estén involucrados en la síntesis de metabolitos secundarios, diferenciación celular y/o desarrollo (esporulación y/o inducción de la competencia natural), o inhibidores que actúen en determinados estados fisiológicos de la célula. La regulación de la expresión de los genes que codifican estos péptidos citotóxicos consiste en la excisión mediante recombinación de una secuencia de ADN que está regulando negativamente la expresión génica, lo cual ocurriría como un evento temprano en la inducción del profago o bien, la expresión estaría controlada directamente por un promotor temprano del bacteriófago, el cual a su vez estaría regulado por algún producto también codificado por el bacteriófago, constituyendo lo que conocemos como “evento inducible”.

Aunque para ciertas aplicaciones del método descrito sería preferible que tanto los genes que codifican los péptidos citotóxicos como los genes que codifican los antídotos estén bajo el control de la misma secuencia reguladora, en otros casos, sería ventajoso que los genes que están codificando estos péptidos citotóxicos estuvieran funcionalmente unidos a diferentes secuencias reguladoras de ADN, permitiendo de esta manera que la expresión de éstos fuese reprimida en las condiciones deseadas.

El promotor que en bacterias Gram-positivas está regulando la expresión de estos péptidos citotóxicos, puede también ser activado en un segundo entorno en el que se localicen estos microorganismos mediante una sustancia química presente en cantidades suficientes para activar al promotor y que no esté presente en el primer medio en el que se localizaban inicialmente las bacterias.

Tal y como se indica, la sustancia química referida tendría que encontrarse raramente en el medio ambiente o en tales concentraciones que el promotor no fuese activado. De manera similar, el promotor puede que fuese activado por un cambio de temperatura, como una disminución de temperatura desde su primer entorno (por ejemplo, un fermentador), al pasar al medio donde son diseminados. Las células microbianas referidas en esta invención son células que llevan información genética deseada y son liberadas al entorno de forma controlada, por ejemplo, a un área de tierra restringida o bien limitando la supervivencia en el entorno de los microorganismos genéticamente modificados cuyos productos actuarían como pesticidas activos, como es el caso de *Bacillus thuringiensis* o *B. sphaericus*. El promotor regulable puede serlo químicamente por la presencia o ausencia de esta sustancia en el medio donde se encuentran estos microorganismos como se explicó anteriormente.

En el caso de promotores químicamente regulables, la presencia o ausencia de esta sustancia química determinaría la activación del promotor. Los genes que regulan el estado fisiológico de las células suelen estar regulados por sustancias químicas (por ejemplo, fuentes de carbón o nitrógeno, metabolitos, aminoácidos). Tales sustancias deberían estar ausentes o ejercer su efecto a una concentración que no está presente en el ambiente natural. También, diversas condiciones de temperatura o iones metálicos pueden utilizarse para controlar la expresión génica.

Esta invención se refiere al uso de un método para confinamiento de GEMs dentro de un nicho medioambiental. Básicamente, este método consistiría en i) la introducción dentro de la célula de un replicón extracromosómico que contiene los genes ζ y ε . El efecto citotóxico el polipéptido ζ es antagonizado por el antídoto, ε , y ii) se lleva a cabo el cultivo de estas células en condiciones en las cuales ambos genes son expresados. En este caso las células serían viables puesto que el antídoto siempre está bloqueando la acción de la toxina, sin embargo, si una de las células hijas tras la división celular no recibe al menos una copia del replicón extracromosómico, muere por acción del polipéptido citotóxico al ser el antídoto degradado por las proteasas celulares, ya que ninguno de los dos genes va a ser nuevamente expresado por pérdida del elemento extracromosómico.

Las células microbianas donde el replicón extracromosómico es confinado y de acuerdo con la invención, incluyen dos toxinas ζ , una procedente de plásmidos de amplio-rango-de-hospedador, aislados de bacterias Gram-positivas con bajo contenido de dG+dC en su ADN (plásmidos que pertenecen a la familia *inc18*, llamados pSM19035, pAM β 1, pIP501, etc.), y la otra perteneciente a sistemas relacionados y procedentes de plásmidos aislados originalmente de *S. pneumoniae* o bien a otros plásmidos menos conocidos también pertenecientes a bacterias Gram-positivas (Meinhart *et al.*, 2002). Tal y como se define en esta invención, esta célula podría ser una bacteria seleccionada dentro de un grupo de diversas especies de bacterias lácticas, *Bacillaceae spp.*, *Listariaceae spp.*

Esta invención también se refiere al uso de un método de estabilización post-segregacional de un plásmido en una población de células microbianas hospedadoras. El método consiste en (i) inserción dentro del plásmido de los genes que codifican los dos polipéptidos citotóxicos relacionados y los genes que codifican los dos polipéptidos ε también relacionados que van a ser degradados en la célula hospedadora a una velocidad superior a la cual lo son ambas citotoxinas, y (ii), cultivando esta población celular bajo condiciones en las cuales los genes que codifican ambos complejos toxina-antídoto son expresados, aquella célula hija que tras la división celular no reciba al menos una copia del plásmido de interés, morirá como resultado de una más rápida degradación de ambos polipéptidos antídoto.

La invención también se refiere al uso de este método de estabilización post-segregacional del plásmido que porta los genes codificantes de ambos polipéptidos citotóxicos ζ , y que son negativamente regulados en la población celular microbiana hospedadora. Este método limitaría la supervivencia de una población celular al primer entorno donde se encuentra, en el cual la expresión de los genes citotóxicos está regulada negativamente. La supervivencia de la población estaría sin embargo restringida al ser estas células transferidas a un segundo entorno o bien cuando tuviera lugar un cambio físico o químico en el primer entorno, ya que ambos genes citotóxicos serían expresados. El método incluiría (i) la construcción de replicones que contuvieran ambos genes ζ , funcionalmente fusionados a una secuencia de ADN con un sitio de regulación y una sustancia represora y (ii) cuando las células fueran liberadas al

medio ambiente se llegaría hasta un grado en el cual la sustancia represora se convertirla en una forma no funcional, y hasta una nueva adición de esta sustancia química, los polipéptidos citotóxicos serían expresados y se iniciaría el proceso de muerte celular programada.

5 Descripción de figuras

Figura 1. Secuencia nucleotídica del operón $\omega\epsilon\zeta$ del plásmido pSM19035 y secuencias de aminoácidos de los péptidos deducidos a partir de las secuencias anteriores. En A se muestra la hebra no codificante de ADN, es decir, se muestra la hebra equivalente al ARNm. La secuencia de aas. deducida (código de una letra) se indica bajo la secuencia de nucleótidos, con los aminoácidos alineados con el primer nucleótido de cada codón y con un asterisco mostrando el codón de terminación. En B se muestran las secuencias aminoacídicas de los polipéptidos ζ y ϵ .

Figura 2. Alineamiento que muestra los residuos conservados entre la proteína R6 [SP1051] de *S pneumoniae*, con una longitud de 253 aminoácidos y el polipéptido ζ de *S. pyogenes*, con una longitud de 287 residuos. La homología se identifica dentro de los primeros 213 residuos, de estos 92 son idénticos (43%) y 142 (66%) similares.

Figura 3. La inhibición de la expresión continua del complejo $\epsilon\zeta$ afecta los niveles de la proteína ϵ . Carriles de 3 a 9 corresponden a: 0, 10, 20, 30, 50, 70 y 90 min. En el carril 2, se muestra células sin plásmido y en el 10, los niveles de ϵ y ζ a los 90 min sin adicionar antibiótico a las células portadoras del plásmido pBT233-7.

Figura 4. La inhibición de la expresión continua del complejo $\epsilon\zeta$ afecta a la viabilidad de las células. Células de *B. subtilis* portando los plásmidos pBT233-2, pBT233-7 o libres de plásmido fueron crecidas en medio LB hasta alcanzar la fase exponencial de crecimiento. A tiempo cero, 50 $\mu\text{g/ml}$ de Rif fueron añadidos al cultivo, determinando el número de UFC en los distintos tiempos mostrados tras adición del antibiótico. Los círculos llenos corresponden con células que contienen el plásmido pBT233-2, los círculos vacíos son las células que contienen el plásmido pBT233-7 y los cuadrados vacíos son las células libres de plásmido. Los datos mostrados corresponde a una experiencia entre varias que dieron similares resultados.

Figura 5. El efecto de la antitoxina es dependiente de una pauta abierta de lectura intacta de ϵ y el efecto tóxico de ζ es reversible al ser expresado el antídoto. Las células fueron crecidas con (círculos vacíos) y sin (círculos llenos) IPTG 1 mM, el cual permite la expresión del gen ϵ . Si IPTG es añadido después de estar el cultivo 3 horas sin expresarse el antídoto, no se detecta muerte celular. La flecha negra (de arriba hacia abajo) muestra el momento en el que IPTG fue eliminado del medio de cultivo, las flechas vacías (de abajo hacia arriba) muestran los puntos en los que IPTG fue nuevamente añadido a los cultivos.

35 Ejemplos de realización de la invención

Ejemplo 1

40 *Demostración de que el producto proteico del gen ζ localizado en el plásmido pSM19035 es una proteína de alta vida media de 32.4 kDa y que el antídoto c es un polipeptido de menor vida media de 10.7 kDa*

Se utilizó para ello el plásmido de bajo número de copias pBT233-7 que contiene el operón $\omega\epsilon\zeta$ y anticuerpos policlonales obtenidos frente a estas proteínas purificadas a homogeneidad (ver Figura 3). Así, células silvestres de *B. subtilis* YB886 que portan el plásmido pBT233-7 fueron crecidas en medio rico (Luria broth, LB), hasta alcanzar una densidad de 0.2×10^8 cels/ml. La transcripción por ARN polimerasa fue inhibida adicionando una concentración de 50 $\mu\text{g/ml}$ de rifampicina (Rif), se tomaron alícuotas a distintos intervalos de tiempo, las proteínas se separaron mediante electroforesis en un gel de poliacrilamida en presencia de SDS y se determinó la vida media de las proteínas visualizándolas por western blot. En ausencia de Rif, las células silvestres YB886 de *B. subtilis* que contienen pBT233-7, se duplican cada 30 min hasta alcanzar de 0.5 a $1.0 \cdot 10^9$ cels/ml y se encontró que presentaban una cantidad constante de complejo $\epsilon_2\zeta_2$ con un cociente $\zeta:\epsilon$ que se aproxima a 1 (Figura 3, carril 3). Bajo estas condiciones experimentales hay aproximadamente 700 complejos $\epsilon\zeta$ por célula en fase media de crecimiento logarítmico o una concentración 1 Mm de complejo (considerando $1.2 \cdot 10^{-15}$ L el volumen celular). Como era de esperar, en células libres del plásmido, los anticuerpos policlonales ϵ y ζ no dieron ninguna señal (Figura 3, carril 2). Cuando se añadió Rif a las células portadoras del plásmido pBT233-7, los niveles de la proteína ϵ se convirtieron en aproximadamente la mitad en los primeros 20 min y la señal no fue detectable transcurridos 40 min. Bajo estas condiciones, los niveles de la proteína ζ en células portadoras del plásmido pBT233-7 se mantuvieron constantes durante al menos 60 min (ver Figura 3, carril 9). Bajo condiciones similares, los niveles de ambas proteínas no están afectadas en ausencia de Rif (Figura 3, carril 10). La vida media de la proteína ϵ es aproximadamente de 18 min, mientras ζ es una proteína de larga vida media (> 60 min).

Ejemplo 2

65 *Demostración de que el producto del gen ζ localizado en el plásmido pSM19035 es una citotoxina*

Las células YB886 de *B. subtilis* que portan el plásmido pBT233-7 que contiene el operón $\omega\epsilon\zeta$ o que portan el plásmido pBT233-2 que contiene los genes $\omega\epsilon$ fueron crecidos en medio rico (LB) hasta alcanzar una fase media exponencial. La transcripción de la ARN polimerasa fue inhibida añadiendo a las células una concentración 50 $\mu\text{g/ml}$ de

Rif, se tomaron alícuotas en distintos intervalos de tiempo y se determinó la viabilidad de las células plaqueando en medio no selectivo. Cuando la viabilidad de las células no portadoras de plásmido o que contenían el plásmido pBT233-2 (conteniendo los genes ω y ε pero no ζ) fue comparada con las células portadoras del plásmido pBT233-7 tras su exposición a Rif (Figura 4), se vió claramente que la muerte celular fue mediada por la presencia de la proteína ζ en las células que portaban el plásmido pBT233-7. Cuando la transcripción por ARN polimerasa fue inhibida por adición de Rif en una concentración de 50 $\mu\text{g/ml}$, el número de células viables nunca incrementó, no así en el caso de las células sin plásmido o en las células portadoras del plásmido que carece del gen ζ (pBT233-2), que sobrevivieron, como se esperaba, al efecto bacteriostático de la Rif. Durante los primeros 90 min una disminución en la viabilidad de más de 100.000 veces fue observada, lo cual se correlacionaba con una reducción en las cantidades de proteína ε (Figura 4). En las condiciones experimentales usadas el número de supervivientes oscila entre las 100 a 1.000 bacterias. Se analizaron las causas de supervivencia de las células supervivientes. Más del 73% de las células supervivientes eran portadoras de re-ordenamientos genéticos (eliminación parcial o total del gen ζ), 26% de las células presentaban mutaciones en el gen ζ o en promotor que regulaba su expresión y 0.1% de las supervivientes no se identificó la razón de su supervivencia. Por esta razón consideramos que es necesaria la presencia de más de una copia del sistema toxina-antitoxina.

Ejemplo 3

Demostración de que el producto del gen ε del plásmido pSM19035 es un antídoto

Células YB886 de *B. subtilis* portadoras del plásmido pBT233-7 que contiene el operón $\omega\varepsilon\zeta$ o células XL1-Blue de *E. coli* portando el plásmido pCB298 de alto número de copias, que contiene los genes de ω y ζ (~200 copias por célula) bajo el control de un promotor constitutivo y el plásmido pCB297, de bajo número de copias (~7 copias por célula), que contiene el gen ε bajo el control de un promotor inducible por isopropiltiogalactosido (IPTG), fueron crecidas en medio rico (LB) hasta alcanzar una densidad de 0.2×10^8 cels/ml. El IPTG fue eliminado del medio tras centrifugar y lavar las células con medio LB-precalentado, permitiendo a las células seguir creciendo. Las muestras se recogieron a diferentes tiempos y se plaquearon en LB con y sin adición de una concentración final de IPTG de 1 mM (Figura 3). En el caso en el que la expresión del gen ε es dependiente de IPTG y la expresión de ω y de ζ está bajo el control de un promotor constitutivo en las células de *E. coli*, observamos que en las condiciones en las cuales E no está expresándose (en ausencia de IPTG), el crecimiento del cultivo se para. Bajo estas condiciones experimentales se observa una disminución de la viabilidad en más de 100.000 veces (Figura 5). El efecto del antídoto es dependiente de la presencia de un marco de lectura intacto de este gen, debido a que el efecto tóxico es revertido al añadir de nuevo IPTG al medio. Si IPTG es añadido transcurridos 120 min de parar el crecimiento celular, no se detecta muerte celular. El control con el plásmido pBT233-2 que contiene los genes $\omega\varepsilon$ también fue crecido en medio rico (LB) hasta alcanzar un punto intermedio en la fase exponencial de crecimiento.

Ejemplo 4

Determinación de la frecuencia de aparición espontánea de mutantes que son resistente al efecto tóxico del polipéptido ζ

Células YB886 de *B. subtilis* (portadoras del plásmido pBT322-7 con el operón $\omega\varepsilon\zeta$, crecieron hasta alcanzar una densidad de 0.2×10^8 cels/ml en medio rico (LB). La transcripción por ARN polimerasa fue inhibida por adición en el medio de cultivo de Rif a una concentración de 50 $\mu\text{g/ml}$ y 90 min más tarde, fue observada una disminución en la viabilidad de las células de más de 100.000 veces. De estas células supervivientes, menos del 0.1% fueron mutantes reales. Estos resultados muestran que la resistencia frente a la toxicidad de ζ es un fenómeno raro, basándonos en este resultado, donde obtenemos una aparición de mutantes menor de 10^{-8} , podemos predecir que la aparición de mutantes utilizando varios polipéptidos citotóxicos ζ relacionados será todavía menos probable.

Células XL1-Blue de *E. coli* que portan un plásmido de alto número de copias, pCB298, que contiene los genes ω y ζ bajo el control de un promotor constitutivo, y un plásmido con bajo número de copias, pCB297, que contiene el gen ε bajo el control de un promotor inducible por IPTG, fueron crecidas en medio rico (LB) hasta alcanzar una densidad de 0.2×10^8 cels/ml. El IPTG fue eliminado del medio centrifugando las células y lavándolas con medio LB precalentado y se dejaron las células seguir creciendo.

Bajo estas condiciones experimentales se observó una disminución en viabilidad de más de 100.000 veces.

Referencias

Brantl, S., Behnke, D. and Alonso, J.C. (1990) Functional analysis of the replication region of the conjugative plasmid pIP501, of *Streptococcus agalactiae*, in *Bacillus subtilis*. Comparative analysis to plasmids pAM β 1 and pSM19035. *Nucl. Acids Res.* 18, 4783-4790

Ceglowski, P., Boitsov, A., Karamyan, N., Chai, S. and Alonso, J.C. (1993a). Characterization of the effectors required for stable inheritance of *Streptococcus pyogenes* pSM19035-derived plasmids in *Bacillus subtilis*. *Mol. Gen. Genet.* 241, 579-585.

Ceglowski, P., Boitsov, A., Chai, S. and Alonso, J.C. (1993b) Analysis of the stabilization system of the pSM19035-derived plasmid pBT233 in *Bacillus subtilis*. *Gene* 136, 1-12.

- Cooper, T.f. and Heinemann, J.A. (2000)** Postsegregational killing does not increase plasmid stability but acts to mediate the exclusion of competing plasmids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 12643-12648.
- 5 **De la Hoz, A.B., Ayora, S., Sitkiewicz, I., Fernández, S., Pankiewicz, R., Alonso J.C. and Ceglowski, P. (2000)** Plasmid pSM19035 copy number control and better-than-random segregation genes share a common regulator. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 728-733.
- Engelberg-Kulka, H. and Glaser, G. (1999).** Addiction modules and programmed cell death and antideath in bacterial cultures. *Annu. Rev. Microbiol.* 53, 43-70.
- 10 **Gerdes, K., Gottfredsen, M., Pedersen, K., and Kristoffersen, P. (1999)** Cytotoxin-based biological containment. PCT WO 99/58652.
- Gerdes, K. (2000).** Toxin-antitoxin modules may regulate synthesis of macromolecules during nutritional stress. 15 *J. Bacteriol.* 182, 561-572.
- Gerdes, K., Ayora, S., Canosa, I., Ceglowski, P., Díaz-Orejas, R., Franch, T., Gulyaev, A.P., Bugge Jensen, R., Kobayashi, I., Macpherson, C., Summers, D., Thomas, C.M. and Zielenkiewicz, U. (2000).** Bacterial Plasmids and Gene Spread. In: The Horizontal Gene Pool, C.M. Thomas ed. (The Netherlands: Harwood Academic Publishers) 20 pp. 49-85.
- Finlay, B.B. and Falkow, S. (1997)** Common themes in microbial pathogenicity revisited. *Microbiol. Mol. Rev* 61, 136-169.
- 25 **Meinhart, A., Alonso, J.C., Sträter, N., and Saenger W. (2002)** Crystal Structure of the Plasmid Maintenance System ϵ/ζ : Functional Mechanism of toxin ζ and Inactivation by $\epsilon_2\zeta_2$ Complex Formation. Submitted for publication.
- Murayama, K., Orth, P., de la Hoz, A.B., Alonso, J.C. and Saenger, W. (2001)** The crystal structure of co 30 transcriptional repressor encoded on plasmid pSM19035 in *Streptococcus pyogenes* at 1.5Å resolution. *J. Mol. Biol.* 314, 789-796.
- Shaw, K.J., Rather, P.N., Hare, R.S. Miller, G.H. (1993)** Molecular genetics of aminoglycoside resistance genes and familial relationships of the aminoglycoside-modifying enzymes. *Microbiol. Rev.* 57, 138-163.
- 35 **Tan, Y. and Riley, M.A. (1996)** Rapid invasion by colicinogenic *Escherichia coli* with novel immunity functions. *Microbiol.* 142, 2175-2180.
- Tettelin, H., Nelson, K.E., Paulsen, I.T., Eisen, J.A., Read, T.D., Peterson, S., Heidelberg, J., DeBoy, R.T., Haft, D.H., Dodson, R.J., Durkin, A.S., Gwinn, M., Kolonay, J.F., Nelson, W.C., Peterson, J.D., Umayam, L.A., 40 White, O., Salzberg, S.L., Lewis, M.R., Radune, D., Holtzapple, E., Khouri, H., Wolf, A.M., Utterback, T.R., Hansen, C.L., McDonald, L.A., Feldblyum, T.V., Angiuoli, S., Dickinson, T., Hickey, E.K., Holt, I.E., Loftus, B.J., Yang, F., Smith, H.O., Venter, J.C., Dougherty, B.A., Morrison, D.A., Hollingshead, S.K. and Fraser, C.M. (2001).** Complete genome sequence of a virulent isolate of *Streptococcus pneumoniae*. *Science* 293, 498-506
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65

REIVINDICACIONES

1. Un método de confinamiento de un replicón extracromosómico en una población celular microbiana **caracterizado** porque comprende los siguientes pasos:
- (i) el aislamiento de dos o más genes que se encuentran de forma natural en una célula microbiana y que codifican los péptidos citotóxicos de la familia ζ , particularmente, los genes implicados en la función de muerte programada del operón ω - ζ - ε derivado del plásmido pSM19035, pIP501 o pAM β 1, que, cuando son expresados en una célula, conducen a su muerte celular,
 - (ii) la introducción dentro de la célula de un replicón extracromosómico que va a ser confinado en la población celular microbiana de interés, donde dicho replicón debe contener dos o más genes pertenecientes a la familia génica de ε que codifican los dos péptidos antídoto y dos o más genes pertenecientes a la familia génica de ζ que codifican los dos polipéptidos citotóxicos, y
 - (iii) el cultivo de las células bajo condiciones en las cuales todos estos genes van a ser expresados, de tal modo que en el momento en el que alguna célula hija en la división celular no recibe una copia del replicón extracelular muere por la acción de estos polipéptidos citotóxicos puesto que el antídoto deja de expresarse.
2. Un método según la reivindicación 1 **caracterizado** porque el replicón extracromosómico en las células microbianas se encuentra en bajo número de cuentas, en un rango de 1 a 15 y comprende, además de los genes de las familias ε y ζ , un gen(es) que codifica para una o más proteína de interés.
3. Un método según la reivindicación 2 **caracterizado** porque la proteína de interés es seleccionada de entre un grupo de enzimas, productos alimenticios activos, proteínas activas como pesticidas o proteínas activas farmacológicamente.
4. Un método según la reivindicación 1 **caracterizado** porque el replicón es un plásmido.
5. Un método según la reivindicación 1 **caracterizado** porque el replicón es un plásmido que se encuentra en las células microbianas en bajo número de cuentas, en un rango de 1 a 15.
6. Un método según la reivindicación 1 **caracterizado** porque las células microbianas pertenecen a especies bacterianas Gram positivas con bajo contenido de dC+dG en su ADN.
7. Un método de estabilización post-segregacional de un plásmido en una población de hospedadores celulares bacterianos **caracterizado** porque comprende los siguientes pasos:
- (i) la inserción por recombinación en el plásmido de (a) los genes que pertenecen a la familia ζ que codifica los péptidos citotóxicos, particularmente, los genes implicados en la función de muerte programada del operón ω - ζ - ε derivado del plásmido pSM19035, pIP501 o pAM β 1, o bien otros funcionalmente equivalentes, es decir, otros polipéptidos citotóxicos (de origen cromosómico, por ejemplo *S. neumonie* (SP1051)) que son capaces de ejercer un efecto tóxico sobre las células hospedadoras y (b) los genes pertenecientes a la familia E de polipéptidos antídoto, particularmente, los genes implicados en la función de muerte programada del operón ω - ζ - ε derivado del plásmido pSM19035, pIP501 o pAM β 1 o bien otros funcionalmente equivalentes, es decir, otros polipéptidos antídoto (de origen cromosómico, por ejemplo *S. neumoniae* (SP 1050), los cuales actúan como antitoxina y son degradados por la célula hospedadora más rápidamente que la citotoxina, y
 - (ii) el cultivo de la población celular bajo condiciones en las cuales estos genes son expresados, de manera que si una célula hija no recibe en la división celular una copia del plásmido, muere como resultado de una más rápida degradación del polipéptido antídoto.
8. Un método según la reivindicación 7 **caracterizado** porque los genes que codifican polipéptidos equivalentes derivan de bacterias Gram-positivas con bajo contenido dC+dG en su ADN.
9. Un método según la reivindicación 7 **caracterizado** porque el plásmido contiene un gen que codifica una proteína de interés.
10. Un método según la reivindicación 9 **caracterizado** porque la proteína de interés es un producto(s) biotecnológicamente activo(s).
11. Un método según la reivindicación 9 **caracterizado** porque la proteína de interés es un producto(s) activo como pesticida(s).
12. Un método según la reivindicación 11 **caracterizado** porque el producto activo como pesticida deriva de *B. thuringiensis*.

ES 2 274 663 B1

13. Un método según la reivindicación 7 **caracterizado** porque el plásmido se encuentra en las células microbianas en bajo número de cuentas, en un rango de 1 a 15.

5 14. Un método que limita la supervivencia de una población celular en un primero y un segundo entorno **caracterizado** porque comprende las siguientes etapas:

10 (i) la transformación de las células con genes pertenecientes a la familia génica ζ que codifican polipéptidos citotóxicos, particularmente, los genes implicados en la función de muerte programada del operón ω - ζ - ϵ derivado del plásmido pSM19035, pIP501 o pAM β 1, o bien otros funcionalmente equivalentes, es decir, otros polipéptidos citotóxicos (de origen cromosómico, por ejemplo *S. neumoniae* (SP1051), que son expresados en las células de la población y que están funcionalmente unidos a otro gen, una secuencia de ADN reguladora que es regulada a su vez por factores medioambientales y la cual regula la expresión de dichos genes, y

15 (ii) el cultivo de esta población celular bajo condiciones en las cuales los péptidos citotóxicos sean expresados, de tal forma que esta expresión de lugar, al menos, a la muerte parcial de esta población.

20 15. Un método según la reivindicación 14 **caracterizado** porque la supervivencia de la población celular está limitada en un primer entorno en el cual los genes antídoto son expresados de tal forma que dicha población celular es contenida en dicho primer entorno.

16. Un método según la reivindicación 14 **caracterizado** porque la supervivencia de la población celular está limitada debido a la expresión de los polipéptidos citotóxicos.

25 17. Un método de contención de un replicón recombinante extracromosómico **caracterizado** porque dicho replicón se transfiere de forma natural a un segundo tipo de célula que recibe, en primer lugar, con este replicón recombinante los genes codificantes de la familia ζ que expresan los polipéptidos citotóxicos bajo el control de una secuencia nucleotídica reguladora cuyo producto génico inhibe la expresión de los polipéptidos citotóxicos y por lo tanto protege dicho tipo de célula y, en segundo lugar, los genes codificantes de las citoxinas inductoras de muerte celular de este tipo de célula (células durante procesos de fermentaciones infectadas por bacteriófagos) reguladas por la expresión de un gen activador que no existe en este segundo tipo de célula (por ejemplo, un gen activador viral en células gram positivas infectadas) y cuya presencia en la célula induciría la expresión de las citoxinas y la muerte celular.

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 274 663 B1

A

```
AATCACAAATCACAAAGTGATTAATCACAAATCACTTGTGATTTGTGATTGTTGATGATAA
-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 60
TTAGTGTTTAGTGTTCACTAATTAGTGTTTAGTGAACACTAAACACTAACAACACTACTATT

AATAAGAGTAAGAAGAAATAGAAAGAAGTGAGTGATTGTGGGAAATTTAGGCCACAAAA
-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 120
TTATTCTCATTCTTCTTTATCTTTCTTCACTCACTAACACCCTTTAAATCCGCGTGTTTT
M I V G N L G A Q K -

AGCAAAACGAAATGATACACCAATCAGTGCAAAAAAGATATAATGGGAGATAAGACGGT
-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 180
TCGTTTTGCTTTACTATGTGGTTAGTCACGTTTTTTTCTATATTACCCTCTATTCTGCCA
A K R N D T P I S A K K D I M G D K T V -

TCGTGTTGCTGCTGACTTGCACCATATCATAAAAATCGAAACAGCAAAGAATGGCGGAAA
-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 240
AGCACAAGCAGCACTGAACGTGGTATAGTATTTTGTAGCTTTGTCGTTTCTTACCGCCTTT
R V R A D L H H I I K I E T A K N G G N -

CGTAAAAGAAGTTATGGATCAAGCCTTAGAAGAATATATACGAAATATTTACCTGACAA
-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 300
GCATTTTCTTCAATACCTAGTTTCGGAATCTTCTTATATATGCCTTTATAAATGGACTGTT
V K E V M D Q A L E E Y I R K Y L P D K -

ACTTTAAAAGGAGTGAAAATGAAATGGCAGTTACGTATGAAAAACATTTGAAATAGAGA
-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 360
TGAAATTTTCTCACTTTTACTTTACCGTCAATGCATACTTTTTTGTAACCTTTATCTCT
L * -
M A V T Y E K T F E I E I -

TCATTAACGAATTATCGGCAAGCGTTTATAATCGAGTATTAACTATGTTTTGAACCATG
-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 420
AGTAATTGCTTAATAGCCGTTTCGCAAATATTAGCTCATAATTTGATACAAAACCTTGGTAC
I N E L S A S V Y N R V L N Y V L N H E -
```

Figura 1 (cont.)

ES 2 274 663 B1

AATTAATAAAAAATGACTCTCAATTATTGGAAGTCAATTTATTAAACCAATTAAAGCTTG
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 480
TTAATTTATTTTTACTGAGAGTTAATAACCTTCAGTTAAATAATTTGGTTAATTTCGAAC
L N K N D S Q L L E V N L L N Q L K L A -

CAAAACGTGTAATCTTTTTGATTATTCTTTAGAAGAATTACAAGCCGTTTCATGAGTATT
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 540
GTTTTGCACATTTAGAAAACTAATAAGAAATCTTCTTAATGTTCCGGCAAGTACTCATAA
K R V N L F D Y S L E E L Q A V H E Y W -

GGCGGTCAATGAATCGTTACTCAAACAAGTTTTGAATAAAGAGAAAGTGGCTTAATATG
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 600
CCGCCAGTTACTTAGCAATGAGTTTTGTTCAAACCTTATTTCTCTTTCACCGAATTATAC
R S M N R Y S K Q V L N K E K V A * -
M -

GCAAATATAGTCAATTTTACTGACAAACAATTTGAGAATCGCTTAAATGATAATTTAGAA
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 660
CGTTTATATCAGTTAAAATGACTGTTTGTAAACTCTTAGCGAATTTACTATTAATCTT
A N I V N F T D K Q F E N R L N D N L E -

GAATTGATTCAAGGAAAAAAGCGGTTGAATCGCCAACCGCTTTTTTACTTGGTGGGCAA
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 720
CTTAACTAAGTTCCTTTTTTTTCGCCAAGTTAGCGGTTGGCGAAAAAATGAACCACCCGTT
E L I Q G K K A V E S P T A F L L G G Q -

CCAGGGTCAGGAAAACAGTTTGCATCAGCAATTTTGAAGAAACACAAGGGAATGTT
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 780
GGTCCCAGTCCCTTTTGGTCAAACGCTAGTCGTTAAAAACTTCTTTGTGTCCCTTACAA
P G S G K T S L R S A I F E E T Q G N V -

ATTGTCATTGATAATGATACCTTTAAACAACAGCACCTAATTTTGTGATGAACTAGTGAAA
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 840
TAACAGTAACTATTACTATGAAATTTGTTGTCGTGGGATTAACCTACTTGATCACTTT
I V I D N D T F K Q Q H P N F D E L V K -

Figura 1 (cont.)

ES 2 274 663 B1

```
CTTTATGAAAAAGACGTAGTAAAACACGTTACCCCTTATTCTAATCGCATGACAGAAGCG
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 900
GAAATACTTTTTCTGCATCATTTTGTGCAATGGGGAATAAGATTAGCGTACTGTCTTCGC
L Y E K D V V K H V T P Y S N R M T E A -
ATCATAAGCCGTTTGAGCGATCAAGGGTATAATTTGGTGATCGAAGGTACAGGACGAACA
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 960
TAGTATTCGGCAAACCTCGCTAGTCCCATATTAACCCTAGCTTCCATGTCCTGCTTGT
I I S R L S D Q G Y N L V I E G T G R T -
ACAGACGTTCCCTATTCAAACCGCAACAATGCTTCAAGCCAAAGGTTATGAAACAAAATG
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1020
TGTCTGCAAGGATAAGTTTGGCGTTGTACGAAGTTCGGTTTCCAATACTTTGTTTTTAC
T D V P I Q T A T M L Q A K G Y E T K M -
TATGTCATGGCAGTACCTAAAATCAACTCATATTTAGGAACAATTGAACGATATGAAACC
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1080
ATACAGTACCGTCATGGATTTTAGTTGAGTATAAATCCTTGTTAACTTGCTATACTTTGG
Y V M A V P K I N S Y L G T I E R Y E T -
ATGTATGCAGATGATCCAATGACAGCCAGGGCAACACCAAAAACAAGCGCATGATATTGTT
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1140
TACATACGTCTACTAGGTTACTGTCCGTTCCCGTTGTGGTTTTGTTTCGCGTACTATAACAA
M Y A D D P M T A R A T P K Q A H D I V -
GTCAAAAACCTTACCGACCAATTTAGAAACCCTTCATAAAACGGGCTTATTTAGCGATATA
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1200
CAGTTTTTGAATGGCTGGTTAAATCTTTGGGAAGTATTTTGCCCGAATAAATCGCTATAT
V K N L P T N L E T L H K T G L F S D I -
AGGCTATATAACAGAGAAGGAGTAAAACCTTATTCAAGTTTGGAAACACCTTCTATTAGT
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1260
TCCGATATATTGTCTCTTCCCTCATTTTGAGATAAGTTCAAACCTTTGTGGAAGATAATCA
R L Y N R E G V K L Y S S L E T P S I S -
```

Figura 1 (cont.)

ES 2 274 663 B1

CCAAAAGAAACCTTAGAAAAAGAATTGAATCGTAAAGTATCAGGGAAAGAAATTCAACCG
-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1320
GGTTTTCTTTGGAATCTTTTTCTTAACTTAGCATTTCATAGTCCCTTTCTTTAAGTTGGC
P K E T L E K E L N R K V S G K E I Q P -

ACTTTAGAACGAATAGAGCAAAAAATGGTTCTAAATAAACACCAAGAGACACCTGAATTT
-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1380
TGAAATCTTGCTTATCTCGTTTTTTTACCAAGATTTATTTGTGGTTCTCTGTGGACTTAAA
T L E R I E Q K M V L N K H Q E T P E F -

AAAGCAATTCAACAAAAATTGGAAAGCTTGCAGCCACCTACACCACCAATACCCAAAAACA
-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1440
TTTCGTTAAGTTGTTTTTAACTTTTCGAACGTCGGTGGATGTGGTGGTTATGGGTTTTGT
K A I Q Q K L E S L Q P P T P P I P K T -

CCTAAACTTCCAGGTATTTAAACCTTAAAAAAGGAAAAGAGTAGTTACCAAAAAACGGTA
-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1500
GGATTTGAAGGTCCATAAATTTGGAATTTTTTCTTTTCTCATCAATGGTTTTTTGCCAT
P K L P G I * -

ACTACTCTTTTTTTATAAAAAACATTTCCCTCATGTTGGGGTCCCGAGCGCCTACGAGGAAT
-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1560
TGATGAGAAAAAATATTTTTGTAAAGGAGTACAACCCCAGGGCTCGCGGATGCTCCTTA

B

ε

Molecular mass= 10,721.17 Da Residues= 90

Average Residue Weight = 119.12

MAVTYEKTFE IEIINELSAS VYNRVLNLYVL NHELKNDSQ LLEVNLLNQL

KLAKRVNLFY YSLEELQAVH EYWRSMNRYS KQVLNKEKVA

Figura 1 (cont.)

ES 2 274 663 B1

ξ

Molecular mass= 32403.82 Da Residues= 287

Average Residue Weight = 112.90

MANIVNFTDK QFENRLNDNL EELIQGKKAV ESPTAFLLGG QPGSGKTSLR
SAIFEETQGN VIVIDNDFK QHPNFDELV KLYEKDVVKH VTPYSNRMTE
AIISRLSDQG YNLVIEGTGR TTDVPIQTAT MLQAKGYETK MYVMAVPKIN
SYLGTIERYE TMYADDPMTA RATPKQAHDV VVKNLPTNLE TLHKTGLFSD
IRLYNREGVK LYSSLETPSI SPKETLEKEL NRKMSGKEIQ PTLERIEQKM
VLNKHQETPE FKAIQKLES LQPPTPIPK TPKLPGI

Figura 1

ES 2 274 663 B1

ζ 4 IVNFTDKQFENRLNDNLEELIQGKKAVESPTAFLLGGQPGSGKTSLRSAIPEETQGNVIV 63
I ++TD +F++ L NL L +GKK+ + P A LLGGQ G+GKT++ +E QGN+++
SP1051 3 IQDYTDSEFKHALARNLRSLTRGKKSSKQPIAILLGGQSGAGKTTIHRKQKEFQGNIVI 62

ζ 64 IDNDTFKQQHPNFDELVKLYEKDVVKHVTPYSNRMTEAIIISRLSDQGYNLVIEGTGRITD 123
ID D+F+ QHP++ EL + Y KD V++ ++ +M E+++++LS YNL+IEGT RT D
SP1051 63 IDGDSFRSQHPHYLELQOEYKDSVEYTKDFAGKMVESLVTKLSSLRYNLLIEGTLRTVD 122

ζ 124 VPIQTATMLQAKGYETKMYVMAVPKINSYLGTIERYETMYADDPMTARATPKQAHDIVVK 183
VP +TA +L+ KGYE ++ ++A SYL T+ RYE +Y +P ARATPK+ HD +V
SP1051 123 VPKKTAQLLKNKGYEVQLALIAATKPELSYLSLIRYEELYIINPNQARATPKEHHDIVVN 182

ζ 184 NLPTNLETLHKTGLFSDIRLYNREGVKLYSSLE 216
+L N L + +F I++Y R+ +Y S E
SP1051 183 HLVDNTRKLEELAIFERIQIYQRDRSCVYDSKE 215

Figura 2

Figura 3

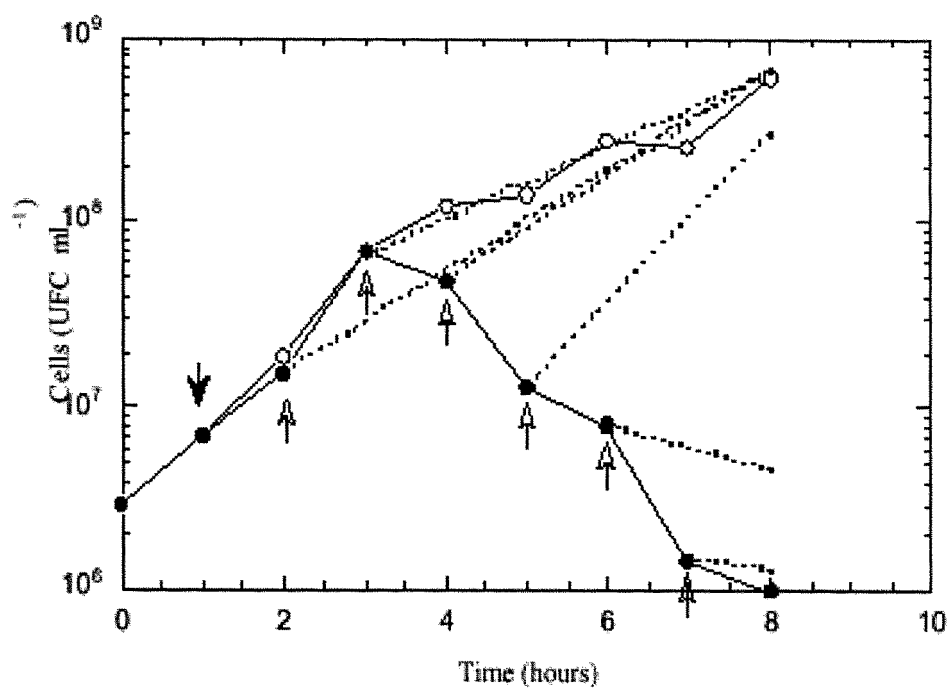


Figura 4

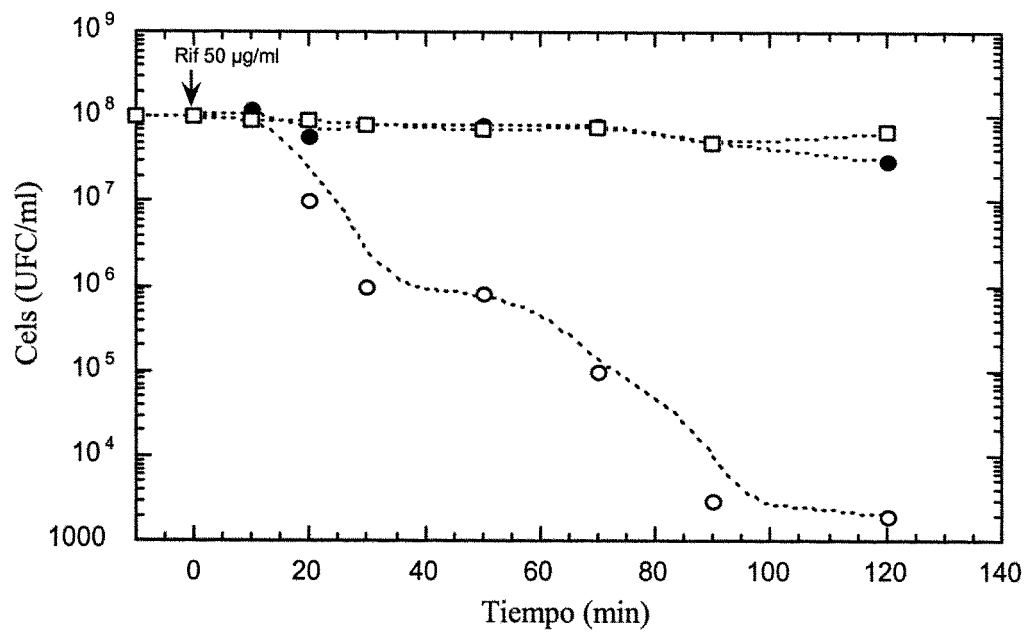
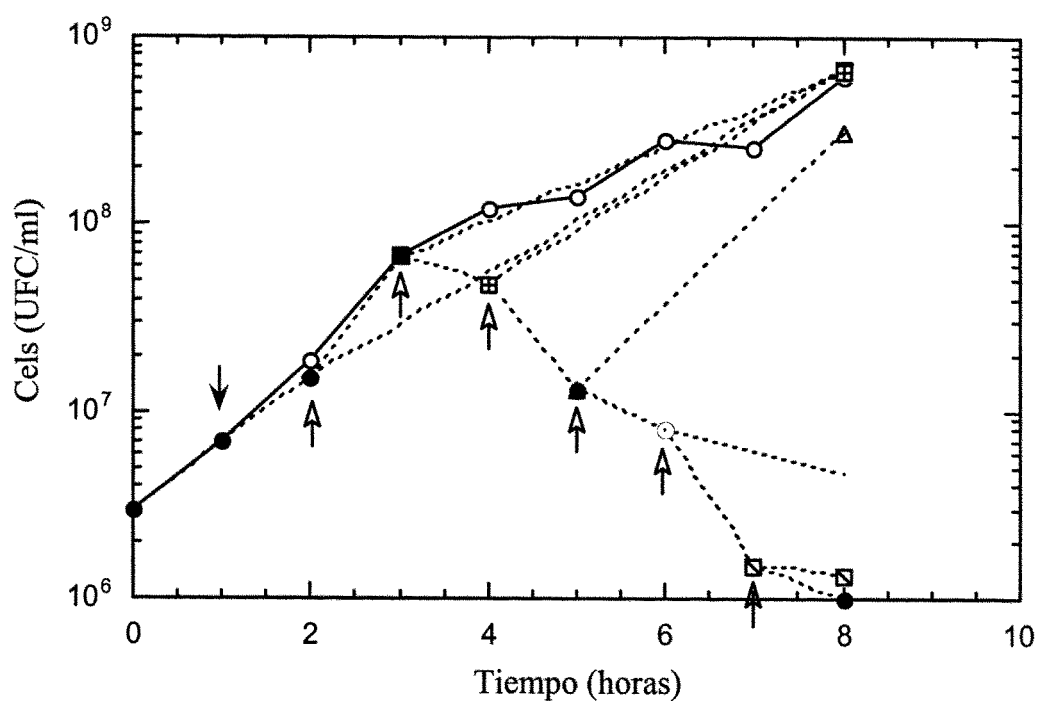


Figura 5



ES 2 274 663 B1

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> Consejo Superior de Investigaciones Científicas Freie Universitat Berlin. Institut Für Kristallographie
- 5 <120> METODO DE CONTENCIÓN BIOLÓGICA BASADO EN LA EXPRESIÓN DE LOS GENES PERTENECIENTES A LAS FAMILIAS GÉNICAS ζ Y ϵ .
- 10 <130> Sistema de contención biológica
<160> 6
<170> PatentIn versión 3.1
<210> 1
- 15 <211> 1380
<212> DNA
<213> *Streptococcus pyogenes*
<220>
- 20 <221> CDS
<222> (84)..(353)
<223>
- 25 <220>
<221> CDS
<222> (358)..(1380)
<223>
- 30
- 35
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65

ES 2 274 663 B1

5 gga gta aaa ctc tat tca agt ttg gaa aca cct tct att agt cca aaa 1026
 Gly Val Lys Leu Tyr Ser Ser Leu Glu Thr Pro Ser Ile Ser Pro Lys
 300 305 310

10 gaa acc tta gaa aaa gaa ttg aat cgt aaa gta tca ggg aaa gaa att 1074
 Glu Thr Leu Glu Lys Glu Leu Asn Arg Lys Val Ser Gly Lys Glu Ile
 315 320 325

15 caa ccg act tta gaa cga ata gag caa aaa atg gtt cta aat aaa cac 1122
 Gln Pro Thr Leu Glu Arg Ile Glu Gln Lys Met Val Leu Asn Lys His
 20 330 335 340 345

25 caa gag aca cct gaa ttt aaa gca att caa caa aaa ttg gaa agc ttg 1170
 Gln Glu Thr Pro Glu Phe Lys Ala Ile Gln Gln Lys Leu Glu Ser Leu
 350 355 360

30 cag cca cct aca cca cca ata ccc aaa aca cct aaa ctt cca ggt att 1218
 Gln Pro Pro Thr Pro Pro Ile Pro Lys Thr Pro Lys Leu Pro Gly Ile
 365 370 375

35 taa acc tta aaa aag gaa aag agt agt tac caa aaa acg gta act act 1266
 Thr Leu Lys Lys Glu Lys Ser Ser Tyr Gln Lys Thr Val Thr Thr
 40 380 385 390

45 ctt ttt tta taa aaa cat ttc ctc atg ttg ggg tcc cga gcg cct acg 1314
 Leu Phe Leu Lys His Phe Leu Met Leu Gly Ser Arg Ala Pro Thr
 395 400 405

50 agg aat ttg tat cga taa gaa ata gat tta aaa att tcg ctg ttt ttt 1362
 Arg Asn Leu Tyr Arg Glu Ile Asp Leu Lys Ile Ser Leu Phe Phe
 410 415 420

55 tct aat ttc att ttg agg 1380
 Ser Asn Phe Ile Leu Arg
 60 425

<210> 2

<211> 90

65 <212> PRT

<213> *Streptococcus pyogenes*

ES 2 274 663 B1

<400> 2

5 Met Ala Val Thr Tyr Glu Lys Thr Phe Glu Ile Glu Ile Ile Asn Glu
1 5 10 15
Leu Ser Ala Ser Val Tyr Asn Arg Val Leu Asn Tyr Val Leu Asn His
10 20 25 30
Glu Leu Asn Lys Asn Asp Ser Gln Leu Leu Glu Val Asn Leu Leu Asn
35 40 45
15 Gln Leu Lys Leu Ala Lys Arg Val Asn Leu Phe Asp Tyr Ser Leu Glu
50 55 60
Glu Leu Gln Ala Val His Glu Tyr Trp Arg Ser Met Asn Arg Tyr Ser
20 65 70 75 80
Lys Gln Val Leu Asn Lys Glu Lys Val Ala
85 90

25

<210> 3

<211> 287

<212> PRT

30

<213> *Streptococcus pyogenes*

<400> 3

35 Met Ala Asn Ile Val Asn Phe Thr Asp Lys Gln Phe Glu Asn Arg Leu
1 5 10 15
Asn Asp Asn Leu Glu Glu Leu Ile Gln Gly Lys Lys Ala Val Glu Ser
40 20 25 30
Pro Thr Ala Phe Leu Leu Gly Gly Gln Pro Gly Ser Gly Lys Thr Ser

45

50

55

60

65

ES 2 274 663 B1

<210> 5

<211> 17

<212> PRT

5 <213> *Streptococcus pyogenes*

<400> 5

10 Lys His Phe Leu Met Leu Gly Ser Arg Ala Pro Thr Arg Asn Leu Tyr
1 5 10 15
Arg

15 <210> 6

<211> 16

<212> PRT

<213> *Streptococcus pyogenes*

20 <400> 6

Glu Ile Asp Leu Lys Ile Ser Leu Phe Phe Ser Asn Phe Ile Leu Arg
1 5 10 15

25

30

35

40

45

50

55

60

65



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 274 663

② Nº de solicitud: 200400475

③ Fecha de presentación de la solicitud: **03.07.2002**

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.: **C12N 15/64** (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	ZIELENKIEWICZ, U., et al. "The postsegregational killing system of the streptococcal plasmid pSM19035.", PLASMID, 2001, Volumen 45, Número 2, página 156. Todo el documento.	1-17
X	De la HOZ, A.B., et al., "Plasmid copy-number control and better-than-random segregation genes of pSM19035 share a common regulator", PROC. NATL. ACAD. SCI. USA, 2000, Volumen 97, páginas 728-733. Todo el documento.	1-17
X	ZIELENKIEWICZ, U., et al. "Mechanisms of plasmid stable maintenance with special focus on plasmid addiction systems.", ACTA BIOCHIMICA POLONICA, 2001, Volumen. 48, Número 4, páginas 1003-1023. Todo el documento; en particular, páginas 1014 y 1015.	1-17
X	CEGLOWSKI, P. et al. Characterization of the effectors required for stable inheritance of Streptococcus pyogenes pSM19035-derived plasmids in Bacillus subtilis.", MOL. GEN. GENET., 1993, Volumen 241, páginas 579-585. Todo el documento.	1-17
X	CEGLOWSKI, P. et al. "Analysis of the stabilization system of pSM19035-derived plasmid pBT233 in Bacillus subtilis.", GENE, 1993, Volumen 136, páginas 1-12. Todo el documento.	1-17

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe

16.04.2007

Examinador

J.L. Vizán Arroyo

Página

1/1