

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 430 861**

51 Int. Cl.:

C07K 14/255 (2006.01)

C12N 15/74 (2006.01)

C12N 1/21 (2006.01)

A61K 38/00 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

A61K 39/02 (2006.01)

C12R 1/42 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.02.2010 E 10713040 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.06.2013 EP 2406277**

54 Título: **Nueva cepa de Salmonella enterica s. Typhimurium, su uso y un procedimiento para obtener un vector de vacuna terapéutico**

30 Prioridad:

23.02.2009 PL 38731909

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

22.11.2013

73 Titular/es:

**UNIWERSYTET JAGIELLONSKI (100.0%)
Ul. Golebia 24
31-007 Krakow, PL**

72 Inventor/es:

**BERETA, MICHAL y
CHOROBK, PAULINA**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 430 861 T3

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

Nueva cepa de *Salmonella enterica* s. Typhimurium, su uso y un procedimiento para obtener un vector de vacuna terapéutico

5 La presente invención se refiere al campo de farmacia, en particular la preparación de vacunas, en especial de vacunas terapéuticas bacterianas antineoplásicas.

Las bacterias que pertenecen al género *Salmonella* son bacterias Gram-negativas de la familia *Enterobacteriaceae* que provocan enfermedades en seres humanos y animales, y representan un problema médico y veterinario serio.

10 La vacunación con cepas atenuadas, vivas, de *Salmonella* es una forma eficaz para evitar la infección. Se obtuvieron cepas atenuadas de *Salmonella* introduciendo mutaciones irreversibles específicas en determinados genes en el cromosoma de *Salmonella*, tales como: *aroA* (1), *aroC* (2), *surA* (3), *htrA* (4), *rpoS* (5), y *galE* (6).

Los procedimientos actuales de atenuación de *Salmonella* que se usan para obtener material de vacuna se basan en la introducción de deleciones genéticamente estables que reducen o eliminan la virulencia de las bacterias, aunque no cambian ni intensifican su inmunogenicidad.

15 Por medio de la atenuación de la cepa natural *Salmonella typhi*, se creó una nueva Ty21a y se usó para la vacunación contra la fiebre tifoidea. La atenuación de esta cepa se ha logrado por medio de varias mutaciones inducidas por mutágenos químicos. Esto ha dado como resultado una cepa que es sensible a la galactosa (una mutación en el gen *galE*), auxotrófica para isoleucina y valina (mutaciones en genes *UvD*), tiene una resistencia al estrés reducida (una mutación en *rpoS*), y además no puede producir el polisacárido Vi. La pluralidad de las mutaciones hace que la cepa sea genéticamente estable y segura. No se observaron mutaciones revertidas dentro de los genes con virulencia ni *in vitro* ni *in vivo* (7, 8).

La cepa CVD908 tiene mutaciones claramente definidas en los genes *aroC* y *aroD*, pero provoca fiebre y otras reacciones adversas en voluntarios vacunados con dosis altas. Una atenuación adicional de esta cepa por la deleción del gen *htrA*, que codifica una serina proteasa esencial para la supervivencia bacteriana en macrófagos, condujo a la cepa CVD908-htrA, que es bien tolerada incluso a dosis altas y muestra una alta inmunogenicidad (9).

25 Los mutantes de *Salmonella enterica* serovariedad Typhimurium, que carecen del regulador de la transcripción RfaH evitan eficazmente la salmonelosis cuando se usan para vacunar ratones. La carencia de RfaH afecta a la expresión de genes implicados en la síntesis del núcleo de lipopolisacárido y O-antígeno. Dichos mutantes no difieren en su capacidad de proliferar, pero muestran un incremento en la susceptibilidad a péptidos antibacterianos (10).

30 Debido a la especificidad de las vacunas preventivas, destinadas a provocar una memoria inmunitaria después de la administración, se actividad se puede basar en la capacidad de las bacterias atenuadas para estimular una respuesta inmunitaria humoral (producción de anticuerpos neutralizantes). La generación de una respuesta humoral eficaz no requiere la capacidad para invadir células huésped por las vacunas de *Salmonella* sp. Esto significa que incluso las deleciones relativamente grandes en el cromosoma de *Salmonella* sp. se pueden tolerar en el material de vacunación preparado para su uso como vacuna preventiva. Sin embargo, la relativa facilidad de atenuación no siempre coincide con la retención de la inmunogenicidad original (eficaz).

35 Un vector de vacuna terapéutico debe estar altamente atenuado y ser posiblemente poco inmunogénico para proporcionar eficacia de administración repetida en un paciente. En el caso de antígenos (epítopos) heterogéneos (alio- o xenogénicos) conjugados, el vector debe demostrar propiedades adyuvantes (mientras mantiene su baja inmunogenicidad). Un vector terapéutico debe ser capaz de estimular un tipo específico de respuesta inmunitaria, esto es de inducir una respuesta humoral (Th2) o celular (Th1) según sea necesario.

40 La cepa VNP20009 se desarrolló como un vector de vacuna cuyo cometido era el de enviar precursores de fármaco citostático no tóxicos (profármacos) al tejido tumoral (9, 10). Las deleciones dentro de los genes *purl* y *msbB* dan como resultado un auxotrofismo de la cepa con una capacidad reducida para estimular TNF en el organismo infectado. Estudios preliminares han mostrado la capacidad de acumulación preferente de VNP20009 sin tumores en ratones (11). También se descubrió que VNP20009 tiene un efecto inhibitor sobre el desarrollo tumoral. Estudios clínicos en fase I no han confirmado los efectos en mamíferos pequeños. Hasta el momento, no existen estudios sobre la inmunogenicidad de VNP20009 en ratones ni en seres humanos (12).

45 La expresión en superficie del fragmento variable de un anticuerpo específico de CEA (T84,66) mejoró la capacidad de acumulación selectiva de las bacterias en tumores malignos (13). Sin embargo, la tensión provocada por la sobreexpresión de la proteína de fusión OmpA-scFv (específica de CEA) redujo sustancialmente (100 veces) la invasividad de VNP20009 transformado (designado VNP/scFv). A pesar de la reducción en la invasividad, se observó un incremento en los efectos terapéuticos para VNP/scFv frente a VNP20009 en modelos murinos de tumores trasplantables transfectados de forma estable con el gen *CEA* humano (adenocarcinomas MC38CEA y CT26CEA). Otro motivo para la reducción en la eficacia de VNP/scFv probablemente es la inestabilidad genética de la cepa lo que implica la pérdida del plásmido (y por tanto la pérdida de capacidad para expresar OmpA-scFv) en ausencia de presión de selección de antibiótico. La reversión a VNP20009 natural en el paciente no promovería la dirección de las bacterias

hacia sitios ricos en CEA (tejido tumoral).

En el caso de un vector de *Salmonella* sp., es importante retener las características invasoras de las bacterias, lo que está relacionado con la calidad de los mecanismos inmunitarios estimulados por esas bacterias.

- 5 Aun existe una gran necesidad de desarrollar los conocimientos en el campo de las vacunas terapéuticas. Una cuestión particularmente importante es el impacto de los efectos relacionados con la atenuación sobre la resistencia y el tipo de respuesta inmunitaria dependiente del tipo de microorganismo.

El propósito de la presente invención es el de proporcionar un vector de vacuna eficaz, en particular eficaz para el tratamiento de cáncer.

- 10 Por lo tanto, el objetivo de la presente invención es el de obtener la cepa apropiada de *Salmonella* sp., de conformidad con la demanda en el campo de las vacunas terapéuticas como un vector para la administración de material terapéutico de células objetivo, en particular células cancerosas, células infectadas con un virus, etc., con inmunogenicidad que resulta de la localización intracelular fisiológica de las bacterias. El objetivo de la presente invención es una cepa de *Salmonella enterica* serovariedad Typhimurium VNP20009 depositada en la Polish Collection of Microorganisms con el n.º de referencia B/00024. Otro objetivo de la presente invención es el uso de la
- 15 cepa de *Salmonella enterica* serovariedad Typhimurium VNP20009 depositada en el Polish Collection of Microorganisms con el n.º de referencia B/00024 para producir una vacuna, en especial una vacuna antineoplásica.

- Otro objetivo de la presente invención es un procedimiento de obtención de un vector de vacuna terapéutica, caracterizado porque se introduce una modificación genética en la cepa de vector *Salmonella enterica* serovariedad Typhimurium VNP20009 específica para células cancerosas, lo que da como resultado una sobreexpresión retardada
- 20 de un gen que codifica una proteína responsable de las características invasivas de esta cepa, en el que se obtiene un casete de expresión, que contiene el gen *sipB* bajo el control del promotor *PsifB* que controla su sobreexpresión retardada, y después se integra el casete dentro del cromosoma bacteriano.

Preferentemente, se integra el casete de expresión dentro de un cromosoma bacteriano es el casete *PsifB-sipB* de acuerdo con SEQ ID 1 o el casete *ushA-5'-PsifB-sipB-ushA-3'* de acuerdo con SEQ ID 2.

- 25 En una realización preferente de la presente invención, el procedimiento incluye una etapa final adicional de retirada de un gen para determinar la resistencia antibiótica del genoma bacteriano.

El objetivo de la presente invención en un modo de realización se deja claro en las figuras, en las que:

- La figura 1A muestra la separación electroforética de un producto de PCR en gel de agarosa al 1 % en presencia de bromuro de etidio para la secuencia del gen *sipB* (1782 pb) obtenida a partir del ADN genómico de una cepa de
- 30 referencia, *S. typhimurium* SL5319;

La figura 1B muestra los resultados obtenidos usando transferencia de bandas western que confirman la funcionalidad del gen *sipB* clonado;

La figura 2 muestra los resultados obtenidos como resultado del aislamiento del promotor del gen *sifB* y los resultados de ensayos de funcionalidad de la construcción *PsifB-GFP*;

- 35 La figura 2A muestra la imagen de la separación electroforética del producto de PCR en gel de agarosa al 1,2 % en presencia de bromuro de etidio;

La figura 2B muestra una imagen microscópica de la línea celular de macrófago RAW264,7 infectada con VNP20009 transformada con el plásmido pBR322-*PsifB-GFP*;

- La figura 2C muestra los resultados del análisis citofluorimétrico de cultivos bacterianos. VNP20009/*PsifB-sipB-GFP*: inducción de la expresión de la proteína de fusión SipB-GFP (panel derecho), bacterias GFP-negativas (panel izquierdo);
- 40

La figura 3 muestra un diagrama de la integración del plásmido en el genoma y el intercambio del fragmento de ADN, estimulado por la escisión de ambas hebras de ADN;

- La figura 4 muestra la posición relativa de la secuencia del gen *sipB*, promotor *PsifB* y el sitio de inserción del casete *PsifB-sipB* (gen *ushA*) en el genoma de *Salmonella typhimurium* LT2;
- 45

La figura 5 muestra un diagrama del plásmido pSG76C que incluye el casete clonado *ushA-y-PsifB-sipB-ushA-y*;

La figura 6 muestra un diagrama de la secuencia genómica generada por medio de la recombinación del gen *ushA* con una región homóloga 5'-*ushA* del plásmido. Las secuencias cebadoras usadas para el análisis de clones resistentes a cloramfenicol se indicaron en la figura;

- 50 La figura 7 muestra la separación electroforética de productos de RT-PCR en gel de agarosa al 1 % en presencia de

bromuro de etidio: Se amplificó el ADN del clon mutado con los siguientes cebadores: 1 - A y B (2350 pb) 2 - A y G (3755 pb) 3 - A y F (4560 pb) 4 - A y D, 5 - C y D (2411 pb); M - patrón de masa;

La figura 8 muestra las imágenes obtenidas por separación electroforética de productos de RT-PCR en gel de agarosa al 1 % en presencia de bromuro de etidio:

5 - En la figura 8A, la imagen del producto de la amplificación de ADNc con cebadores específicos para *PsifB-sipB* (1222 pb): 1 - VNP20009, 2 - VNP20009 modificado, M - patrón de masa;

- en la figura 8B la imagen del producto de amplificación de ADNc con cebadores específicos para *sipB* (389 pb); en el panel superior): 1 - VNP20009, 2 - VNP20009 modificado; producto de amplificación de ADNc de ARNr 16S (350 pb; en el panel inferior); M - patrón de masa;

10 La figura 9 muestra la imagen de separación electroforética del producto de PCR con secuencias cebadoras complementarias a las secuencias que flanquean el gen *ushA* realizada en el ADN genómico de un clon obtenido por medio del procedimiento de integración de *PsifB-sipB* en el cromosoma VNP20009; 1 - producto de amplificación con los cebadores E y D (1526 pb), 2 - producto de amplificación con el cebador A y D (4709 pb), M - patrón de masa;

15 La figura 10 muestra una gráfica que representa los resultados de la invasión de células RAW264 por VNP20009 y VNP/sipB;

20 La figura 11 muestra los resultados de un experimento realizado en un modelo de metástasis de pulmón CT26CEA en ratones Balb/c. La fila superior muestra los pulmones de los ratones de control aislados el día 15 después de la administración intravenosa de 5×10^5 células CT26CEA. Las manchas blancas visibles en el fondo oscuro son pequeños focos tumorales. La fila inferior muestra pulmones explantados de ratones, a los que se les administraron bacterias VNP/sipB de *Salmonella typhimurium* por vía intranasal en la cantidad de 2×10^7 CFU/ratón 48 horas después de la inyección de células cancerosas;

25 La figura 12 presenta el resultado de un experimento realizado sobre el modelo de metástasis de pulmón CT26CEA en ratones Balb/c. La fila superior muestra los pulmones de los ratones de control aislados el día 15 después de la administración intravenosa de 5×10^5 células CT26CEA. Las manchas blancas visibles en el fondo oscuro son pequeños focos tumorales. La fila inferior muestra pulmones tomados de ratones, a los que se les administraron varias modificaciones de *Salmonella typhimurium* por vía intranasal en la cantidad de 2×10^7 CFU/ratón 96 horas después de la inyección de células cancerosas; la media de los números de focos tumorales en los pulmones se muestran en la gráfica en la parte inferior de la figura.

30 La figura 13 muestra los resultados de un experimento realizado en un modelo de metástasis de pulmón B16F10 en ratones C57B1/6. La fila superior muestra los pulmones de los ratones de control aislados el día 28 después de la administración intravenosa de 5×10^5 células B16F10. Los sitios de tumor son visibles como manchas oscuras. Las filas media e inferior muestran pulmones aislados de ratones, a los que se les administraron bacterias VNP (fila media) o VNP/sipB (fila inferior) por vía intranasal en la cantidad de 2×10^7 CFU/ratón 96 horas después de la inyección de células cancerosas;

35 La figura 14 muestra el efecto del sesgo de isotipo de anticuerpo provocado por la estimulación selectiva de una respuesta inmunitaria de tipo Th1 por VNP/sipB. Los resultados se produjeron por la vacunación de ratones Swiss (exogámicos) con cepas VNP20009: ratones vacunados con VNP20009 "natural" (panel superior), ratones vacunados con VNP/sipB (panel inferior);

40 La figura 15 muestra el resultado de la secuenciación de ADN realizada en un fragmento genómico de ADN recombinante de la cepa modificada de *Salmonella enterica* s. Typhimurium VNP20009;

La figura 15A muestra una secuencia de ADN, que incluye secuencias flanqueantes del gen *ushA* y una secuencia completa de la construcción *PsifB-sipB* integrada que en las bacterias VNP/sipB está situada dentro del gen *ushA*.

45 La figura 15B presenta los resultados que confirman la identidad de la secuencia de VNP/sipB con molde de ADN de una cepa modelo de *Salmonella typhimurium* LT2. Hebra inferior: molde (hebra inferior de ADN), la localización de cada elemento de la construcción está indicada (promotor *sifB*, *sipB* ORF, sitio de integración de *ushA*) de acuerdo con la numeración de la cepa LT2 depositada en GenBank (NCBI). Hebra superior: marcada como "Consulta", muestra la secuencia obtenida de VNP/sipB.

50 La figura 16 muestra las secuencias de cebadores usadas en la secuenciación de ADN genómico. Una localización esquemática de los cebadores está indicada en la figura 15 dentro de las secuencias flanqueantes y la construcción integrada.

La figura 17 muestra la apoptosis células MC38CEA infectadas con VNP20009- o VNP/sipB, medida como un porcentaje de célula con unión a anexina V. Las bacterias usadas para la infección expresaban RFP. Se analizó la fluorescencia de anexina V-APC en una población positiva para RFP de células MC38CEA.

En la presente invención, se obtuvo el vector VNP/sipB con una retención total de la capacidad invasiva (fig. 10).

El vector de vacuna preparada utilizó la capacidad natural de la *Salmonella* sp. para infectar células huésped. La invasividad de *Salmonella* sp. es un proceso multifactorial, que implica componentes tanto de células bacterianas como de células huésped (14). La adhesión de bacterias a una célula huésped provoca la activación de genes del sistema de secreción de tipo III (TTSS) agrupados en la "isla 1 de patogenicidad de *Salmonella*" (SPI-1). Los productos de esos genes, incluyendo la proteína SipB, permiten que las bacterias penetren en la célula (15). La expresión de otro conjunto de genes se activa dentro de la célula huésped. Esos genes están situados dentro de SPI-2 y sus productos facilitan la proliferación de las bacterias dentro del citoplasma. La expresión de genes SPI-2 está regulada por la interacción de factores endoplásmicos con los promotores SPI-2. El promotor del gen *sifB* es uno de esos promotores (16).

La proliferación de las bacterias en el citoplasma da lugar a la apoptosis de la célula huésped, que a su vez permite que las bacterias escapen y posteriormente infecten otras células. Uno de los factores que inducen la apoptosis es la ya mencionada proteína SipB (14).

Se asumió que la sobreexpresión retardada (usando el promotor del gen *sifB*) de SipB (*PsifB-sipB*) dará como resultado la eliminación intracelular de bacterias infecciosas con apoptosis/necrosis simultánea de las células infectadas. Mientras tanto, la infección formará una señal fuerte para la migración de leucocitos al sitio de la infección, pero no dará como resultado la infección de la población de células inmunitarias recién emigradas.

El resultado producido por un vector de vacuna de este tipo será la erradicación de tumores por medio de la acción concertada de las bacterias y el sistema inmunitario.

La presente invención se ilustra por los siguientes modos de realización:

Ejemplo 1: Clonación del gen *sipB*

Se obtuvo la secuencia del gen *SipB* (1782 pb) (fig. 1 A) del ADN genómico de una cepa de referencia *S. typhimurium* SL5319 usando una técnica de PCR con los siguientes cebadores:

5'AACTGCAGAACCAATGCATTGGTTTCTCCCTTTATTTTGGCA

3'CGGGATCCCGAAGTAGCATTAGCCGTAGCG,

que contienen el sitio de restricción *Pst*II *Bam*HI.

Se clonó ADNc para *sipB* en el casete de expresión del plásmido pQE30 para obtener una secuencia que codifica la proteína de fusión RGS-6His-SipB. Se confirmó la exactitud de la secuencia *sipB* por secuenciación de ambas hebras de ADNc *sipB*.

Se confirmó la funcionalidad del gen *sipB* clonado usando una técnica de transferencia de bandas western estándar (fig. 1B) realizada sobre lisados de M15 de *E. coli* incubados en presencia de IPTG (0,5 mM), usando anticuerpos anti-marca His.

Los resultados del análisis de bandas western mostró que la expresión de SipB con un promotor inducible era tóxica para bacterias, como se indujo en la cepa M15 de *E. coli* (que contenía el plásmido *pREP-4* con el gen *lacI* codificando la proteína de expresión). Se indujo la expresión de la proteína con IPTG 0,5 mM en M15 de *E. coli* crecido en medio TB a 25 °C hasta una densidad óptica de OD600=1,0. Se preparó el lisado bacteriano a partir de 120 ml de cultivo después de una inducción de 2,5 horas y se purificó en una resina de cromatografía IMAC, TALON BD. Se separaron las fracciones recogidas con SDS-PAGE en gel al 10 % y se sometieron a sonda las bandas con anticuerpos α -RGS-6His (Qiagen).

El peso molecular del producto obtenido correspondía a la masa de la proteína SipB (62 kDa).

Ejemplo 2: Aislamiento del promotor del gen *sifB* y construcción del gen *sipB* controlada por *PsifB*

Se obtuvo la secuencia codificante de la región promotora del gen *sifB* a través de PCR en ADN genómico de *Salmonella typhimurium* VNP20009, usando los siguientes cebadores: "directo" **CCCAAGCTTGGGCCTTAGCCATTCTGACTG** con un sitio de restricción *Hind*III e "inverso" **GAAGATCTTCACTTCATTACTGGAATAGGTGGT** con un sitio de restricción *Bgl*II. Al mismo tiempo, se obtuvo una secuencia que codifica GFP a partir del plásmido pGFPuv (Clontech) usando PCR y los siguientes cebadores: "directo" **GAAGATCTTCTCACACAGGAACAGCTATGAC** con un sitio de restricción *Bgl*II e "inverso" **GAAGATCTTCGCGCTCAGTTGGAATTCA**, también con un sitio de restricción *Bgl*II. Se clonaron los productos de PCR en el plásmido pGEM-TEasy (Promega) y se propagó en DH5a de *Escherichia coli*. Después de la confirmación de la identidad de secuencia con una secuencia obtenida de la base de datos GenBank, se clonó el gen *gfp* en el sitio de restricción *Bgl*II del plásmido pGEM-TEasy-PsifB, que se había obtenido previamente del plásmido pGEM-TEasy-gfp. Se confirmó la inducción intracelular del promotor *PsifB* *in vitro* por infección de la línea celular de macrófago RAW264.7 con bacterias VNP20009 que contenían el plásmido pGEM-TEasy-PsifB-gfp, con la secuencia *gfp* clonada en orientación directa o inversa con relación al promotor. Se obtuvo la secuencia codificante de *sipB* con las secuencias RBS y 6His a partir del plásmido *pQE-sipB* usando PCR y los siguientes cebadores:

directo **GGAAGATCTTCCAGAGGAGAAATTA**ACTATGAGA,

inverso **GAAGATCTTCGGAGTCCAAGCTCAGCTA**

(ambos cebadores con un sitio de restricción *Bgl*II).

Se clonó el producto de PCR en el plásmido pGEM-TEasy-PsifB en el sitio *Bgl*II. Se escindió el casete *PsifB-sipB* del plásmido pGEM-TEasy-PsifB-sipB con la restrictasa *Nod* y después de rellenar los extremos cohesivos, se clonó en un plásmido pBR322 de número de copias bajo (en el sitio de clonación *EcoRV-Nru*I) y en el plásmido *pMoPac2-lpp-ompA-scFv*.

La figura 2 presenta los resultados del aislamiento del promotor del gen *sifB* y las pruebas funcionales de la construcción *PsifB-GFP*.

La figura 2A muestra una imagen electroforética de la separación del producto de PCR en gel de agarosa al 1,2 % en presencia de bromuro de etidio. Se obtuvo la secuencia codificante de la región promotora del gen (603 pb) usando PCR del ADN genómico de *Salmonella typhimurium*. Se confirmó la identidad de la secuencia con la secuencia obtenida de GenBank (*Salmonella typhimurium* LT2, 1 691 572 - 1 692 152 pb). Para confirmar la funcionalidad de la secuencia promotora obtenida, se produjo una proteína de fusión transcripcional *PsifB-GFP* (secuencia *gfp* amplificada del plásmido pGFPuv (Clontech) usando PCR). Al mismo tiempo, se obtuvo la secuencia *RBS-RGS-6His-sipB* del plásmido *pQE30-sipB* por medio de PCR. La figura 2B muestra una imagen microscópica obtenida de la línea celular de macrófago RAW264.7 infectada con VNP20009 transformada con el plásmido *pBR322-PsifB-gfp*. La inducción del promotor *PsifB* en bacterias intracelulares se evaluó microscópicamente. VNP20009 transformado con el plásmido con número de copias bajo (pBR322) o plásmido con número de copias alto (pGEM-TEasy), incluyendo ambos el casete *PsifB-gfp*, no demostró ninguna expresión de GFP microscópicamente detectable cuando creció en medio TB.

La figura 2C presenta los resultados del análisis citofluorimétrico realizado en el cultivo bacteriano. VNP20009/*PsifB-sipB-gfp* (pero no *DH5a/PsifB-sipB-gfp E. coli*), cultivado durante 12 horas a 30 °C con agitación (180 rpm) en medio de cultivo de células eucariotas OPTIMEM (Invitrogen), mostró la expresión inducida de la proteína de fusión SipB-GFP (panel derecho). Las mismas bacterias cultivadas en TB eran negativas para GFP (panel izquierdo).

El uso de construcciones de plásmido está limitada *in vivo* debido a la pérdida frecuente de plásmidos de las bacterias en ausencia de presión de selección (antibióticos). Hasta ahora la estabilidad genética es una de las características fundamentales de las bacterias que permite su uso como material de vacuna. Un procedimiento de obtención de cepas bacterianas genéticamente estables es la integración de casetes funcionales (promotor-gen) en el cromosoma bacteriano.

Ejemplo 3: Integración del casete de expresión *PsifB-sipB* en el cromosoma VNP20009

Para obtener una cepa atenuada, genéticamente estable, de *Salmonella typhimurium* con la sobreexpresión de la proteína SipB endógena inducida dentro de una célula infectada, se integró el casete de expresión *PsifB-sipB* en el genoma de VNP20009. Se realizó la integración por el procedimiento de recombinación homóloga, basado en la recombinación natural y el sistema de reparación de las bacterias (actividad de proteína Rec-A) y usando un plásmido condicionalmente replicante como vector para administrar un alelo mutante en el ADN genómico (17). A una temperatura que no permita la multiplicación del plásmido, los clones que integraron el plásmido (como resultado de la recombinación con copias naturales y mutantes del gen) y que adquirieron resistencia cromosómica se seleccionan en presencia de un antibiótico. En esta fase, se duplican en el genoma regiones homólogas del gen modificado. En la siguiente fase, se produce un intercambio entre las secuencias duplicadas, estimuladas por la escisión de secuencias de ADN dentro de la secuencia del plásmido presente en el genoma. Es resultado es un retorno al alelo natural o el reemplazo en la forma mutada, con escisión simultánea del gen con resistencia al antibiótico. En la figura 3 se muestra un diagrama de intercambio génico por recombinación de segmentos homólogos estimulados por escisión de ADN.

Se eligió la región del gen *ushA* (STM0494) como el sitio objetivo para la integración, ya que tiene una alta homología con el gen *ushA* de *Escherichia coli*, pero muy baja expresión y baja actividad de la enzima codificada en *Salmonella typhimurium* (UDP-glucosa hidrolasa con una mutación puntual, "gen silencioso"). El gen *ushA* se ha inactivado en cepas de *S. typhimurium* y su homólogo funcional activo es *ushB*. Las secuencias de ADN de estos genes no muestran una homología significativa (18, 19). La distancia considerable entre *ushA* y las secuencias de *PsifB* y *sipB* en el genoma de *S. typhimurium* (fig. 4) debe reducir la inestabilidad de la cepa modificada, asociado con la introducción de copias adicionales de esas secuencias, que pueden ser un sustrato para recombinación homogénea.

Para la integración se usó un plásmido condicionalmente replicante, pSG76-C. Se clonó la secuencia *PsifB-sipB* en el plásmido, se flanqueó con regiones de homología, es decir, segmentos de secuencia idénticos a la secuencia objetivo de integración dentro del cromosoma bacteriano (5'-*ushA* y 3'-*ushA*); gen de resistencia a cloramfenicol para la selección de clones, en donde se produjo el entrecruzamiento; *ori* R6Kγ y un sitio de restricción extremadamente raro para endonucleasa 1-*Sce*I (Fig. 4).

La replicación del plásmido pSG76-C requiere la proteína Π, suministrada con un plásmido auxiliar pPIR-A (con *ori*

pSCIOI termosensible). El plásmido *pSG76C-ushA-PsifB-sipB* se puede construir en el genoma por un único entrecruzamiento que implica una región de homología y la correspondiente región cromosómica. A una temperatura que previene la replicación del plásmido pPIR-A (37-42 °C), y por tanto también el plásmido pSG76C, en presencia del antibiótico, hay una selección de clones con la secuencia de plásmido integrada en el genoma. En esta fase, las regiones flanqueantes de homología se duplican en el genoma. A continuación, se induce la expresión de *1-SceI* meganucleasa a partir del plásmido auxiliar pSTKST. La escisión de ambas hebras de ADN dentro de la secuencia del plásmido integrada estimula la recombinación intramolecular dependiente de Rec-A (reemplazo de gen estimulado por rotura bicatenaria) - se produce una reparación de la rotura del ADN, con el uso de regiones flanqueantes adyacentes de homología. Se podría producir un entrecruzamiento individual con la participación de las regiones de *5'-ushA* o *3'-ushA*. En el primer caso, la región de integración vuelve a la forma natural (restitución de la integridad de secuencia del gen *ushA*); en el segundo caso, se produce un reordenamiento productivo, con retirada simultánea del gen de resistencia al antibiótico. Como resultado se obtiene una cepa bacteriana modificada, sin ningún marcador de selección en forma de gen de resistencia a antibiótico o cualquier otra secuencia exógena.

Ejemplo 4: Clonación del casete *ushA-5'-PsifB-sipB-ushA-3'* en el plásmido pSG76-C

Se obtuvo ADN complementario para *ushA* a partir del ADN genómico de VNP20009 usando PCR y los siguientes cebadores:

directo FushA GGGGTACCCCGCGATGTTGGAGATAGTAGG,

inverso RushA GGGGTACCCCTACAGCCAGCTCACCTCA,

conteniendo ambos un sitio de restricción para la enzima *KpnI*. Se clonó el producto de PCR (1825 pb) en el plásmido *pGEM-TEasy* (Promega) y se propagó en DH5a de *Escherichia coli*. Tras la confirmación de la identidad de secuencia con una secuencia obtenida de la base de datos de GenBank, se clonó la secuencia *PsifB-sipB* (obtenida de *pGEM-TEasy-PsifB-sipB*) en el sitio de restricción *HpaI*, situado dentro de *ushA*. La orientación de la secuencia *PsifB-sipB* era la inversa de la orientación del gen *ushA*.

Por lo tanto, en la construcción obtenida, se flanquea la secuencia *PsifB-sipB* con un fragmento de 1091 pb de *ushA* en el extremo 5' y un fragmento de 732 pb en el extremo 3'. A continuación, se cortó el casete *ushA-5'-PsifB-sipB-ushA-3'* con la enzima *KpnI* y se clonó en pSG76-C en el sitio *KpnI*, proporcionando pSG76C-USS (Fig. 5).

Ejemplo 5: Integración del plásmido pSG76C-USS en el cromosoma VNP20009

Se amplificó el plásmido en DH5α.pir de *Escherichia coli* (con codificando la copia genómica del gen *pir*, la proteína Π) y se transformó en la cepa VNP20009 (por electroporación), que se había transformado previamente con el plásmido pPIR-A. A continuación, se cultivaron las bacterias VNP20009 en medio sólido como sigue: 40 horas a 30 °C con ampicilina y cloramfenicol, 5 horas a 30 °C con cloramfenicol, 17 horas a 42 °C con cloramfenicol y 7 horas a 37 °C con cloramfenicol, para la selección de clones que han adquirido la resistencia antibiótica cromosómica. Entre los transformantes resistentes a cloramfenicol, se seleccionaron 5 grandes colonias de bacterias, se transfirieron a medio sólido con cloramfenicol y se cultivaron durante 20 horas adicionales a 37 °C. A continuación, se sometieron a prueba los clones seleccionados para determinar la integración del plásmido en el cromosoma, esto es, si se insertó el plásmido en el gen *ushA*. Se consiguió la PCR con un par de cebadores complementarios a las secuencias que flanquean el sitio de inserción y a la secuencia del plásmido y *PsifB-sipB* (Fig 5, tabla 1), con las siguientes condiciones: 94 °C 90 s, 94 °C 45 s, 58 °C 30 s, 72 °C durante 2 min 30 s, 28 ciclos.

En consecuencia, en la figura 6 se muestra un diagrama de secuencia genómica generado por recombinación entre el gen *ushA* y la región de homología *5'-ushA* del plásmido. También se indica la posición de los cebadores usados para el análisis de clones resistentes a cloramfenicol.

Los cebadores usados en el experimento se enumeran en la tabla 1:

Tabla 1. Secuencias cebadoras usadas para el análisis de clones recombinantes y la masa de productos de PCR que confirman la integración del plásmido en el genoma dentro de la secuencia del gen *ushA*.

SECUENCIA CEBADORA (5' - 3')	PRODUCTO - NATURAL	PRODUCTO DESPUÉS DE LA DESINTEGRACIÓN
FushA GGGGTACCCCGCGATGTTGGAGATAGTAGG	1825 pb	8366 pb
RushA GGGGTACCCCTACAGCCAGCTCACCTCA		4366 pb (después de la retirada del gen de resistencia)
A GCGACTGGATCATATCGT B CGCCTCACTATGCTCATG	—	2350 pb

C CTGAACGGTCTGGTTATAGG	—	2411 pb
D CTGGATATTGAACTGGCG		— (después de la retirada del gen de resistencia)
A GCGACTGGATCATATCGT	2168 pb	8709 pb
D CTGGATATTGAACTGGCG		4709 pb (después de la retirada del gen de resistencia)
E CCCAAGCTTGGGCCTTAGCCATTCTGACTG	—	5140 pb
D CTGGATATTGAACTGGCG		1526 pb (después de la retirada del gen de resistencia)
A GCGACTGGATCATATCGT	—	4560 pb
F GCAGGTCGACTCTAGAGGAT		— (después de la retirada del gen de resistencia)
A GCGACTGGATCATATCGT	—	3755 pb
G CCCAAGCTTGGGCCTTAGCCATTCTGACTG		

En el caso de la integración del plásmido en el gen *ushA* en PCR con los cebadores A y B, se obtuvo un producto de 2350 pb y con los cebadores C y D - un producto de 2411 pb, mientras que la PCR estándar con los cebadores A y D no proporcionó ningún producto (Fig. 7).

- 5 La figura 7 muestra una imagen electroforética de la separación de PCR en un gel de agarosa al 1 % en presencia de bromuro de etidio. Se amplificó el ADN del clon mutado usando los siguientes cebadores: 1 - A y B (2350 pb) 2 - A y G (3755 pb) 3 - A y F (4560 pb) 4 - A y D, 5 - C y D (2411 pb).

- 10 Se aisló el ARN total de bacterias VNP20009 naturales y un clon positivo para la integración, se cultivó en condiciones que indujeron la actividad promotora de *PsifB*. En una RT-PCR con cebador específico para la copia *sipB* introducida nuevamente en el genoma (complementario a la secuencia que incluye la secuencia de RBS sintética) realizada en un molde derivado del clon mutante, se obtuvo un producto con masa molecular correspondiente a 1222 pb (Fig. 8).

- 15 La figura 8 muestra las imágenes obtenidas por separación electroforética de productos de RT-PCR en gel de agarosa al 1 % en presencia de bromuro de etidio. Se aisló ARN de las bacterias cultivadas en condiciones de inducción del promotor de *PsifB*. (A) Producto de amplificación de ADNc con cebadores específicos para *PsifB-sipB* (1222 pb): 1 - VNP20009, 2 - VNP20009 modificado; (B) producto de amplificación de ADNc con cebadores específicos para *sipB* (389 pb): 1 - VNP20009, 2 - VNP20009 modificado y producto de la amplificación de ADNc para ARNr 16S (350 pb).

Ejemplo 6: Retirada del gen de resistencia a antibiótico del genoma de VNP20009

- 20 Las manipulaciones genéticas mencionadas anteriormente requirieron la presencia de un gen de resistencia a antibiótico, lo que no es deseable en el material de vacuna final. Por lo tanto, se eliminó este gen en la siguiente fase. La escisión de ADN genómico en el sitio de restricción para la enzima *I-SceI*, que se había introducido en el genoma junto con la secuencia de plásmido, estimuló la recombinación con la participación de regiones vecinas de homología y selección de los clones, en donde se reparó la rotura de ADN. Los clones con integración confirmada del plásmido pSG76C-USS se transformaron posteriormente con el plásmido pSTKST (con secuencia *ori* termosensible pSCIOI) que contiene un gen para meganucleasa *I-SceI* bajo el control del promotor tetraciclina. Se cultivaron los clones en medio sólido con kanamicina a 30 °C. A continuación, se transfirieron colonias individuales en medio LB líquido con kanamicina (20 µg/ml) y se autoclavó con clortetraciclina (cTc, 30 µg/ml, induce la expresión de *I-SceI* inactivando el represor de tetraciclina) y se incubó durante 24 horas a 30 °C. Se diluyó el cultivo 1:10⁶, se transfirió a medio sólido con kanamicina y cTc y se cultivó a 30 °C durante 20 horas. Después, se sometieron a prueba los clones para la delección del gen de resistencia para la recombinación planeada con un PCR usando el par de cebadores E y D - en este caso el producto obtenido tuvo 1526 pb (Fig. 9, carril 1). Se realizó la PCR usando los cebadores A y D y un programa como sigue: 94 °C 2 min, 94 °C 30 s, 58 °C 30 s, 70 °C 4 min, 10 ciclos; 94 °C 30 s, 58 °C 30 s, 70 °C 4 min + 10 s/ciclo, 20 ciclos. El producto resultante fue mayor de 4500 pb y correspondió a la longitud de la secuencia *ushA* con el casete *PsifB-sipB* integrado (Fig. 9, ruta 2).

- 35 La figura 9 muestra la separación electroforética del producto de PCR secuencia cebadoras complementarias a secuencias que flanquean el gen *ushA* realizada en el ADN genómico de un clon obtenido con el procedimiento de integración de *PsifB-sipB* en el cromosoma VNP20009. Se obtuvieron productos de amplificación con cebadores E y D (1526 pb) y con cebadores A y D (4709 pb).

La integración del casete funcional *PsifB-sipB* en el cromosoma VNP20009 es una modificación genética tan significativa que da como resultado la obtención de una nueva cepa bacteriana.

Ejemplo 7: Prueba de la funcionalidad VNP/sipB (INT)**Ejemplo 7A: Comparación de la capacidad invasiva de las bacterias VNP20009 y VNP/sipB**

Se sometió a prueba la invasividad de las cepas VNP20009 y VNP/sipB en células RAW264.7. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la invasividad entre cepas "naturales" y recombinantes de VNP. Se cultivó la línea celular de macrófago RAW264.7 en placas de 48 pocillos a la densidad de $2,5 \times 10^4$ en medio DMEM con suero al 10 % durante 24 horas. Se infectaron las células con VNP20009 y VNP/sipB en 100 μ l de medio OPTIMEM (Invitrogen) sin suero a MOI 5, se determinó midiendo la densidad óptica a 600 nm. Después de 1 hora de co-incubación de las células con bacterias (37 °C, CO₂ al 5 %), se añadieron otros 100 μ l de suero suplementado con OPTIMEM y gentamicina (suero al 2 %, 100 μ g/ml de gentamicina) y se incubó durante 3 horas (37 °C, CO₂ al 5 %) para eliminar las bacterias extracelulares. A continuación, se recogieron las células y se transfirieron a placas de LB/agar. Se evaluó el número de bacterias intracelulares vivas basándose en el número de células bacterianas presentes después de 24 horas de incubación y se refirió al número de células en el pocillo específico.

Al mismo tiempo, se determinó el número de CFU por pocillo del inicio de la infección, basándose en la cantidad de colonias bacterianas después de 24 horas de cultivo en placas de LB/agar, obtenidas a partir de una suspensión bacteriana apropiadamente diluida usada para la infección. Se definió la invasividad de las bacterias como la fracción de bacterias intracelulares del número de bacterias usadas para la infección (Fig. 10).

Ejemplo 7B: Efectos terapéuticos de VNP/sipB en un modelo tumoral de ratón

Se realizó el experimento en el modelo de metástasis de pulmón de CT26CEA en ratones Balb/c. Se tiñeron los pulmones con tinta china. La figura 11 (fila superior) muestra pulmones de los ratones de control aislados el día 15 después de la administración intravenosa de 5×10^5 células CT26CEA. Las manchas blancas visibles sobre el fondo oscuro son pequeños focos tumorales y su número (> 300 por pulmón) y volumen evaluado aleatoriamente ilustran la eficacia de la metástasis. La fila inferior muestra pulmones tomados de ratones, a los que se les administraron bacterias VNP/sipB de *Salmonella typhimurium* por vía intranasal en la cantidad de 2×10^7 CFU/ratón 48 horas después de la inyección de células cancerosas. En esos pulmones, se encontró un promedio de <20 tumores/pulmón. En el grupo de ratones que se vacunaron con VNP/sipB, no se encontraron tumores detectables en el 50 % de los pulmones examinados.

Ejemplo 7C: Comparación de los efectos terapéuticos de varias modificaciones de VNP20009 en un modelo tumoral de ratón

Se realizó el experimento en el modelo de metástasis de pulmón de CT26CEA en ratones Balb/c. Se tiñeron los pulmones con tinta china. La figura 12 (fila superior) muestra pulmones de los ratones de control aislados el día 15 después de la administración intravenosa de 5×10^5 células CT26CEA. Las manchas blancas visibles sobre el fondo oscuro son pequeños focos tumorales y su número (> 300 por pulmón) y volumen evaluado aleatoriamente ilustran la eficacia de la metástasis. La fila inferior muestra pulmones tomados de ratones, a los que se les administraron varias modificaciones de bacterias *Salmonella typhimurium* por vía intranasal en la cantidad de 2×10^7 CFU/ratón 96 horas después de la inyección de células cancerosas. En los pulmones de animales vacunados con VNP/sipB se encontró un promedio de 54 tumores/pulmón y el 50 % de los pulmones examinados no tuvieron tumores detectables; la media de los números de focos tumorales se muestra en la gráfica en la parte inferior de la figura.

Ejemplo 7D: Comparación de los efectos terapéuticos de VNP20009 y VNP/sipB en un modelo tumoral de ratón de melanoma de B16F10

Se realizó el experimento en el modelo de metástasis de pulmón de B16F10 en ratones C57B1/6 (Fig. 13). Se tiñeron los pulmones con ácido pícrico. La figura 13 (fila superior) muestra los pulmones de los ratones de control aislados el día 28 después de la administración intravenosa de 5×10^5 células B16F10. Los tumores se muestran como puntos oscuros y su número y tamaño evaluado aleatoriamente ilustran la eficacia de la metástasis. Las filas media e inferior muestran pulmones aislados de ratones, a los que se les administraron bacterias VNP (fila media) o VNP/sipB (fila inferior) por vía intranasal en la cantidad de 2×10^7 CFU/ratón 96 horas después de la inyección de células cancerosas. En estos pulmones, se encontraron menos de 2 tumores/pulmón en promedio. En el grupo de ratones que se vacunaron con VNP/sipB, no se encontraron tumores detectables en el 75 % de los pulmones examinados.

Ejemplo 7E: Estimulación selectiva de la respuesta de tipo Th1 por VNP/sipB

Como efecto de la vacunación de ratones Swiss (exogámicos) con las cepas de VNP20009 modificadas, se encuentra un sesgo en la respuesta inmunitaria hacia una respuesta de tipo Th1 en la mitad de los animales vacunados (Fig. 14). Aunque la administración en el tipo "natural" VNP20009 (panel superior) provocó todos los isotipos de anticuerpos analizados (IgG1, IgG2a e IgM), sólo se encontraron niveles altos de IgG2a y la ausencia casi completa de IgG1 en el suero de ratones vacunados con VNP/sipB (panel inferior). Es muy probable que el sesgo en el isotipo observado forme un enlace importante en la cadena de respuestas inmunitarias estimuladas por VNP/sipB, lo que da como resultado, entre otros, la inhibición del crecimiento (o eliminación) de tumores en los ratones vacunados.

Ejemplo 7F: Apoptosis de células MC38CEA infectadas con VNP/sipB

Se analizó la inducción de apoptosis en células de adenocarcinoma MC38CEA infectadas con VNP20009 o VNP/sipB por citometría de flujo de células teñidas con anexina V. Se usaron bacterias transformadas con el plásmido pDsRed2 que codifica RFP (proteína fluorescente roja) para la infección.

- 5 Se sembraron células en una placa de 24 pocillos a $7,5 \cdot 10^4$ por pocillo en DMEM que contenía FBS al 10 % y se cultivó a 37 °C en CO₂ al 5 %. Se llevó a cabo la infección con bacterias suspendidas en 200 µl de Opti-MEM a la multiplicidad de infección igual a 20 bacterias por célula. Se dejó que las bacterias invadieran las células durante 45 min a 37 °C en CO₂ al 5 %. A continuación, se añadieron 200 µl de Opti-MEM que contenía gentamicina para matar las bacterias extracelulares (la concentración final de gentamicina fue de 100 µg/ml). Se continuó la incubación durante 1,5 h (37 °C, CO₂ al 5 %). A continuación, se reemplazó el medio con 0,5 ml de Opti-MEM con 20 µg/ml de gentamicina. Después de 20 h de incubación, se recogieron las células, se tiñeron con anexina V marcada con APC durante 15 min a temperatura ambiente y se analizó por citometría de flujo. La fig. 17 muestra el porcentaje de células unidas a anexina V encerradas en una población infectada con bacterias positivas para RFP. Había alrededor de un 10 % más de células MC38CEA positivas para anexina V después de la infección con VNP/sipB que con VNP20009.

15 **Ejemplo 8: Secuenciación del fragmento recombinante de ADN genómico de la cepa VNP20009 de *Salmonella enterica* s. *Typhimurium***

- Se analizaron las siguientes secuencias de ADN: el gen *ushA* con sus secuencias flanqueantes y toda la secuencia de la construcción *PsifB-sipB* integrada que en bacterias VNP/sipB está situada dentro del gen *ushA* (Fig. 15). La identidad de la secuencia de VNP/sipB con ADN de molde de una cepa modelo de *Salmonella typhimurium*, LT2, se confirmó usando el programa informático BLAST (NCBI). En el molde (hebra inferior de ADN) en la figura 15B, la localización de cada elemento de la construcción está indicado (promotor *sifB*, *sipB* ORF, sitio de integración de *ushA*) de acuerdo con la numeración de la cepa LT2 depositada en GenBank (NCBI). Hebra superior: marcada como "Consulta", muestra la secuencia obtenida de VNP/sipB. La secuencia *PsifB* en el genoma de *Salmonella typhimurium* LT2 está situada en la posición 1 691 578 - 1 692 147 pb. La secuencia *sipB* en el genoma de *Salmonella typhimurium* LT2 está situada en la posición de 3 029 114-3 030 895 pb. La secuencia *ushA* en el genoma de *Salmonella typhimurium* LT2 está situada en la posición 553 634 - 555 286 pb.

Los oligonucleótidos usados para la secuenciación de ADN genómico se enumeran en la figura 16. La localización esquemática de los cebadores está indicada en la figura 15 dentro de las secuencias flanqueantes y la construcción integrada.

- 30 Como resultado de la producción de una cepa apropiadamente modificada de *Salmonella enterica* s. *Typhimurium*, se produjo una vacuna terapéutica favorable, lo que es particularmente adecuada para su uso como vector de vacuna bacteriana antineoplásica.

Bibliografía

- 35 1. Hoiseth, S.K., y B.A. Stocker. 1981. Aromatic-dependent *Salmonella typhimurium* are non-virulent and effective as live vaccines. *Nature* 291:238-239.
2. Dougan, C, S. Chatfield, D. Pickard, J. Bester, D. O'Callaghan, y D. Maskell. 1988. Construction and characterization of vaccine strains of *Salmonella* harboring mutations in two different *aro* genes. *J Infect Dis* 158:1329-1335.
- 40 3. Sydenham, M., G. Douce, F. Bowe, S. Ahmed, S. Chatfield, y G. Dougan. 2000. *Salmonella enterica* serovar typhimurium *surA* mutants are attenuated and effective live oral vaccines. *Infect Immun* 68:1109-1115.
4. Chatfield, S.N., K. Strahan, D. Pickard, I.G. Charles, C.E. Hormaeche, y G. Dougan. 1992. Evaluation of *Salmonella typhimurium* strains harbouring defined mutations in *htrA* and *aroA* in the murine salmonellosis model. *Microb Pathog* 12:145-151.
- 45 5. Coynault, C, V. Robbe-Saule, y F. Norel. 1996. Virulence and vaccine potential of *Salmonella typhimurium* mutants deficient in the expression of the RpoS (sigma S) regulon. *Mol Microbiol* 22:149-160.
6. Dougan, G., C.E. Hormaeche, y D.J. Maskell. 1987. Live oral *Salmonella* vaccines: potential use of attenuated strains as earners of heterologous antigens to the immune system. *Parasite Immunol* 9:151-160.
7. Gentshev, I., S. Spreng, H. Sieber, J. Ures, F. Mollet, A. Collioud, J. Pearman, M.E. Griot-Wenk, J. Fensterle, U.R. Rapp, W. Goebel, S.A. Rothen, y G. Dietrich. 2007. Vivotif--a 'magic shield' for protection against typhoid fever and delivery of heterologous antigens. *Chemotherapy* 53:177-180.
- 50 8. Cheminay, C, y M. Hensel. 2008. Rational design of *Salmonella* recombinant vaccines. *Int J Med Microbiol* 298:87-98.
9. Bermudes, D., L.M. Zheng, y I.C. King. 2002. Live bacteria as anticancer agents and tumor-selective protein

delivery vectors. *Curr Opin Drug Discov Devel* 5:194-199.

10. Pawelek, J.M., K.B. Low, y D. Bermudes. 1997. Tumor-targeted Salmonella as a novel anticancer vector. *Cancer Res* 57:4537-4544.
- 5 11. Clairmont, C, K.C. Lee, J. Pike, M. Ittensohn, K.B. Low, J. Pawelek, D. Bermudes, S.M. Brecher, D. Margitich, J. Tumier, Z. Li, X. Luo, I. King, y L.M. Zheng. 2000. Biodistribution and genetic stability of the novel antitumor agent VNP20009, a genetically modified strain of Salmonella typhimurium. *J Infect Dis* 181:1996-2002.
- 10 12. Toso, J.F., V.J. Gill, P. Hwu, F.M. Marincola, N.P. Restifo, D.J. Schwartzentruber, R.M. Sherry, S.L. Topalian, J.C. Yang, F. Stock, L.J. Freezer, K.E. Morton, C. Seipp, L. Haworth, S. Mavroukakis, D. White, S. MacDonald, J. Mao, M. Sznol, y S.A. Rosenberg. 2002. Phase I study of the intravenous administration of attenuated Salmonella typhimurium to patients with metastatic melanoma. *J Clin Oncol* 20:142-152.
13. Bereta, M., A. Hayhurst, M. Gajda, P. Chorobik, M. Targosz, J. Marcinkiewicz, y H.L. Kaufman. 2007. Improving tumor targeting and therapeutic potential of Salmonella VNP20009 by displaying cell surface CEA-specific antibodies. *Vaccine* 25:4183-4192.
- 15 14. Cossart, P., y P.J. Sansonetti. 2004. Bacterial invasion: the paradigms of enteroinvasive pathogens. *Science* 304:242-248.
15. Hersh, D., D.M. Monack, M.R. Smith, N. Ghorri, S. Falkow, y A. Zychlinsky. 1999. The Salmonella invasin SipB induces macrophage apoptosis by binding to caspase-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:2396-2401.
16. Freeman, J.A., M.E. Ohl, y S.I. Miller. 2003. The Salmonella enterica serovar typhimurium translocated effectors SseJ and SifB are targeted to the Salmonella-containing vacuole. *Infect Immun* 71:418-427.
- 20 17. Posfai, G., V. Kolisnychenko, Z. Bereczki, y F.R. Blattner. 1999. Markerless gene replacement in Escherichia coli stimulated by a double-strand break in the chromosome. *Nucleic Acids Res* 27:4409-4415.
18. Burns, D.M., y I.R. Beacham. 1986. Identification and sequence analysis of a silent gene (ushAO) in Salmonella typhimurium. *J Mol Biol* 192:163-175.
- 25 19. Innes, D., I.R. Beacham, C.A. Beven, M. Douglas, M.W. Laird, J.C. Joly, y D.M. Burns. 2001. The cryptic ushA gene (ushA(c)) in natural isolates of Salmonella enterica (serotype Typhimurium) has been inactivated by a single missense mutation. *Microbiology* 147:1887-1896.

LISTADO DE SECUENCIAS

- 30 <110> Uniwersytet Jagiellorski
Bereta, Michal
Chorobik, Paulina
- <120> Nueva cepa de Salmonella enterica s. Typhimurium, su uso y un procedimiento para obtener un vector de vacuna terapéutico
- <130> PZ/643/RW/PCT
- <150> PL387319
- 35 <151> 2009-02-23
- <160> 21
- <170> PatentIn versión 3.3
- <210> 1
- <211> 2414
- 40 <212> ADN
- <213> artificial
- <220>
- <223> Secuencia codificante del casete PsifB-sipB
- <400> 1

ES 2 430 861 T3

ccttagccat	tctgactgca	aaatgcccc	ggatgctgtc	tttctgtgaa	tttcaccatc	60
tgattttcttc	attttgagcc	tcctcgagc	tttttataat	tttatcgccc	aactggaaac	120
aaagccgtca	gctaactggt	acaacaaata	taattaagac	aaaaactaaa	gagtaagata	180
tttatatcat	aagcactatc	agtattggcc	ttctgccc	ccgctaaaca	tctcattggt	240
gttagccctaa	taatactttt	agttaactt	cttataagac	aatttctaca	cggttgagca	300
actattttact	ttctctaaaa	ataatatagt	gcgtaattaa	tcattactca	tagtacatga	360
tgatgtgaga	attaagaaaa	ccgttttact	ttcattcggt	ttatctgaca	tatttcatgg	420
ccaggaggcg	tgggcatgac	taaagctacg	ggtcgatttg	aacaattgaa	caataatggt	480
gacgggtcag	gacaaagcaa	aatcagggtg	tttcaccgat	aggcaaaccg	atgggcaaca	540
tgggataata	tttgaatac	cacctattcc	agtaatgaag	tgaagatctt	ccaggaggaga	600
aattaactat	gagaggatcg	catcaccatc	accatcacgg	atcccgaagt	agcattagcc	660
gtagcggata	tacccaaaat	ccgcgcctcg	ctgaggcggc	ttttgaaggc	gttcgtaaga	720
acacggactt	tttaaaagcg	gcggataaa	cttttaaaaga	tgtggtggca	acgaaagcgg	780
gcgaccttaa	agccggaaca	aagtccggcg	agagcgctat	taatacgggtg	ggtctaaagc	840
cgcctacgga	cgcgcgcccg	gaaaaactct	ccagcgaagg	gcaattgaca	ttactgcttg	900
gcaagttaat	gacctactg	ggcgatgttt	cgctgtctca	actggagtct	cgtctggcgg	960
tatggcaggc	gatgattgag	tcacaaaaag	agatggggat	tcagggtatcg	aaagaattcc	1020
agacggctct	gggagaggct	caggaggcga	cggatctcta	tgaagccagt	atcaaaaaga	1080
cggataccgc	caagagtgtt	tatgacgctg	cgacaaaaaa	actgacgcag	gcgcaaaata	1140
aattgcaatc	gctggaccgc	gctgaccccg	gctatgcaca	agctgaagcc	gcggtagaac	1200
aggccgga	agaagcgaca	gaggcgaaag	aggccttaga	taaggccacg	gatgcgacgg	1260
ttaaagcagg	cacagacgcc	aaagcgaaag	ccgagaaagc	ggataacatt	ctgaccaa	1320
tccagggaac	ggctaattgc	gcctctcaga	atcagggtttc	ccagggtgag	caggataatc	1380
tgtcaaatgt	cgcgcgctc	actatgctca	tggccatgtt	tattgagatt	gtgggcaaaa	1440
atacggaga	aagcctgcaa	aacgatcttg	cgtttttcaa	cgccttgca	gaaggcgctc	1500
aggcggagat	ggaaaagaaa	tcggctgaat	tccagggaaga	gacgcgcaaa	gccgaggaaa	1560
cgaaccgcat	tatgggatgt	atcgggaaa	tcctcggcgc	gctgctaacc	attgtcagcg	1620
ttgtggccgc	tgtttttacc	ggtggggcga	gtctggcgct	ggctgcgggtg	ggacttgccg	1680
taatggtggc	cgatgaaatt	gtgaaggcgg	cgacgggagt	gtcgtttatt	cagcaggcgc	1740
taaacccgat	tatggagcat	gtgctgaagc	cgttaatgga	gctgattggc	aaggcgatta	1800
ccaaagcgct	ggaaggatta	ggcgtcgata	agaaaacggc	agagatggcc	ggcagcattg	1860
ttggtgcgat	tgctgcgcgt	attgccatgg	tggcggtcat	tgtggtggtc	gcagttgtcg	1920
ggaaaggcgc	ggcggcgaaa	ctgggtaacg	cgtgagcaa	aatgatgggc	gaaacgatta	1980
agaagttggt	gcctaacgtg	ctgaaacagt	tggcgcaaaa	cggcagcaaa	ctctttaccc	2040
aggggatgca	acgtattact	agcggctctg	gtaatgtggg	tagcaagatg	ggcctgcaaa	2100
cgaatgcctt	aagtaaagag	ctggtaggt	ataccctaaa	taaagtggcg	ttgggcatgg	2160
aagtcacgaa	taccgcagcc	cagtcagccg	gtggtgttgc	cgagggcgta	tttattaaaa	2220
atgccagcga	ggcgcttgct	gattttatgc	tcgcccgttt	tgccatggat	cagattcagc	2280
agtggcttaa	acaatccgta	gaaatatgtg	gtgaaaacca	gaaggtaacg	gcggaactgc	2340
aaaaagccat	gtcttctgcg	gtacagcaaa	atgcggatgc	ttcgcgtttt	attctgcgcc	2400
agagtcgcgc	ataa					2414

<210> 2
 <211> 4352
 <212> ADN
 <213> artificial

5 <220>

<223> Secuencia de la construcción ushA-5'-PsifB-sipB-ushA-3'

<400> 2

```
gcgatgttgg agatagtagg atgtgtaatt attacttgcc taacatacct gtgaaatgtg      60
tttgaaggaa gtctcaattc tgaaaacata tttgtctatt attgcaagga aaggtaattt      120
ctgcggttga tattgagtca gggagagaaa gatgaaattt ttgaaacggg gtgtggcgct      180
ggcgttactg gcggcgcttcg cgctgacgac tcagcctgca caggcttacg aaaaagataa      240
aacctataaa attactatcc tgcataccaa cgatcaccac ggtcacttct ggcgcagcga      300
atatggcgaa tatggtctgg cggcgcaaaa aacgctgggtg gacagtatcc gtaaagaggt      360
ggcgcaagag gggggaagcg tcctgttggt atccggcggc gacattaata ccggggtgcc      420
ggaatccgat ctccaggatg cgagagcccga tttccgcggg atgaatctga ttggctacga      480
cgctatggcc gtcggtaatc atgaatttga taatccgctc accgtattgc gccagcagga      540
aaagtgggcg aagtttcctt ttctttacgc caatatattat caaaaaagta ccggcgagcg      600
tctgtttaag ccgtgggcta tttttacacg ccaggatata aaaatcgcgg taatcggtt      660
aaccaccgat gacacggcga aaataggcaa cccggaatat ttcaccgata ttgagtttcg      720
taaacctgct gaagaagcaa aggtggtgat tcaggaactt aatatgaatg aaaaaccgga      780
cgtgattatc gcgaccacgc atatgggaca ttatgacaac ggcgatcacg gttcgaacgc      840
```

```

gccgggacgac gttgagatgg cgcgtagcct gcctgccggg tcgttgggcga tgattgtggg 900
cggtcactca caagaccccg tatgcatggc gtcggaaaat aaaaaacagg tgaattacgt 960
accgggaacg cctgcgcgcg cggataagca aaatggcatc tggatcgtgc aggcgcatga 1020
gtggggtaaa tatgtggggc gtgcggaatt cgaattccgt aacggcgaga tgaaaatggg 1080
tggccgcggg aattcgatga agatcttcgg agtccaagct cagctaatta agcttggctg 1140
cagaaccaat gcattgggtt ctccctttat tttggcagtt tttatgcgcg actctggcgc 1200
agaataaaac gcgaagcatc cgcattttgc tgtaccgcag aagacatggc tttttgcagt 1260
tccgcgcgta ccttctgggt ttcaccaa atttctacgg attgtttaag ccactgctga 1320
atctgatcca tggcaaaacg ggcgagcata aaatcagcaa gcgcctcgtt ggcattttta 1380
ataaatacgc cctcggcaac accaccggt gactgggctg cggtatctgt gacttccatg 1440
cccaacgcca ctttatttag ggtattacct accagctctt tacttaaggc attcgtttgc 1500
aggcccatct tgctaccac attaccaga cgcgtagtaa tacgttgcac ccctgggta 1560
aagagtttgc tgcggttttg cgccaactgt ttcagcacgt taggcacca cttcttaatc 1620
gtttcgccca tcattttgct cagcgcggtt ccagtttctg ccgcccgcgc tttcccgaca 1680
actgcgacca ccacaatgac cgccaccatg gcaatagcgg cgacaatcgc accaacaatg 1740
ctgcgggcca tctctgcggt tttcttatcg acgcctaate cttccagcgc tttggtaate 1800
gccttgccaa tcagctccat taacggcttc agcacatgct ccataatcgg gtttagcgcc 1860
tgctgaataa acgacactcc cgtcgcccgc ttcacaattt catcggccac cattaccgca 1920
agtccaccg cagccagcgc cagaetcgcc ccaccggtaa aaacagcggc cacaacgctg 1980
acaatgggta gcagcgcgcc gaggaacttc ccgatacatc ccataatcgg gttcgtttcc 2040
tcggctttgc gcgtctcttc ctggaattca gccgatttct tttccatctc cgctgacgc 2100
ccttctgca aggcgttgaa aagcgcaaga tcgttttgca ggctttcttc cgtatttttg 2160
cccacaatct caataaacat ggccatgagc atagtgaggc gggcgacatt tgacagatta 2220
tctgtctcac cctgggaaac ctgattctga gaggcggcat tagccgttcc ctggaatttg 2280
gtcagaatgt tatccgcttt ctgggctttc gctttggcgt ctgtgcctgc tttaacgctc 2340
gcatccgtgg ccttatctaa ggccctcttc gcctctgtcg cttcttttcc ggccgtgtct 2400
accgcggctt cagcttgtgc atagccgggg tcagccgggt ccagcgattg caattttatt 2460
tgcgcttgcg tcagtttttt ggtcgcagcg tcataaacac tcttgccggt atccgtcttt 2520
ttgatactgg cttcatagag atccgtcgcc tcctgagcct ctcccagagc cgtctggaat 2580
tctttcgata cctgaatccc catctctttt tgtgactcaa tcatcgctg ccataccgcc 2640
agacgagact ccagttgaga cagcgaaaca tcgcccagta gggtcattaa cttgccaaagc 2700
agtaatgtca attgcccttc gctggagagt ttttccggg cgccgtccgt aggcggcttt 2760
agaccaccg tattaatagc gctctcgccg gactttgttc cggctttaag gtcgccgct 2820
ttcgttgcca ccacatcttt aaaagcttta tccgcgctt ttaaaaagtc cgtgttctta 2880
cgaacgcctt caaaagccgc ctacgcgagg cgcggatttt gggatatatc gctacggcta 2940
atgctacttc gggatccgtg atgggtgatg tgatgcgcat ctctcatagt taatttctcc 3000
tctggaagat cttcacttca ttaactggaat aggtggtatt cgaaatatta tcccatgttg 3060
cccatcggtt tgccatcgg tgaaacacct gatttttgct ttgtcctgaa ccgtcaacat 3120
tattgttcaa ttgttcaa atcgaccgtag ctttagtcat gccacgcct cctggccatg 3180
aaatatgtca gataaaacga atgaaagtaa aacggttttc ttaattctca catcatcatg 3240
tactatgagt aatgattaat tacgcactat attattttta gagaaagtaa atagttgctc 3300

```

aaccgtgtag aaattgtctt ataagaagtt aaactaaaag tattattagg ctaacaacaa 3360
 tgagatgttt agcggtaggg cagaaggcca atactgatag tgcttatgat ataaatatct 3420
 tactcttttag tttttgtctt aattatatatt gttgtaacga ttagctgacg gctttgtttc 3480
 cagttgggcg ataaaattat aaaaacctgc gaggaggctc aaaatgaaga aatcagatgg 3540
 tgaaattcac gaaaagacag catcctgggg cattttgcag tcagaatggc taaggcccaa 3600
 gcttggggaat cactagttaa ttcgcggcca actaccagct tattccggtg aatctcaaga 3660
 aaaaagtgc ctgggataac gggaaaagcg agcgtgtact ttacacgccg gaaatcgag 3720
 aaaatccgca aatgctctcg ttattaacgc cgttccagaa taaaggtaaa gcgcaactgg 3780
 aggtgaaaaat tggtagcgtg aatggccttc ttgaaggcga tcgcagtaag gtcagatttg 3840
 tccagaccaa tatgggacgg gtgattctgg ctgcgcagat cgcgcgcacc ggcgcggatt 3900
 ttggcgtgat gagcggcggc ggtattcgcg actcgattga ggcgggagat attacctata 3960
 aaagcgtgct caaggtagac ccgttcggca acattgtggt gtatgccgat atgagcggca 4020
 aagaggtggt tgattatctc accgccgtag cacagatgaa accggactcc ggcgcctatc 4080
 cacagctcgc caatgtgagc tttgtcgcca aagagggcaa gctcaccgat ctgaaaatca 4140
 aaggcgagcc tgttgatccg gctaaaacct atcgcatggc gacgctgagt ttcaacgcca 4200
 cgggcggcga tggttatccg cgcattgata acaaaccggg ctacgtgaat accgggttta 4260
 ttgacgcgga agtgctgaaa gagtttatcc agcaaaattc accgctggat gcggcggcgt 4320
 ttacgcaaaa tggtagagtg agctggctgt ag 4352

<210> 3

<211> 42

<212> ADN

5 <213> artificial

<220>

<223> Cebador del gen SipB

<400> 3

aactgcagaa ccaatgcatt gggttctccc ttattttg ca

42

10 <210> 4

<211> 30

<212> ADN

<213> artificial

<220>

15 <223> Cebador inverso del gen SipB

<400> 4

gcgatgccga ttacgatgaa gccctagggc

30

<210> 5

<211> 30

20 <212> ADN

<213> artificial

<220>

	<223>	Cebador directo del gen <i>sifB</i>	
	<400>	5	
		cccaagcttg ggccttagcc attctgactg	30
	<210>	6	
5	<211>	33	
	<212>	ADN	
	<213>	artificial	
	<220>		
	<223>	Cebador inverso del gen <i>sifB</i>	
10	<400>	6	
		gaagatcttc acttcattac tggaataggt ggt	33
	<210>	7	
	<211>	32	
	<212>	ADN	
15	<213>	artificial	
	<220>		
	<223>	Cebador directo de GFP	
	<400>	7	
		gaagatcttc tcacacagga aacagctatg ac '	32
20	<210>	8	
	<211>	28	
	<212>	ADN	
	<213>	artificial	
	<220>		
25	<223>	Cebador inverso de GFP	
	<400>	8	
		gaagatcttc gcgctcagtt ggaattca	28
	<210>	9	
	<211>	34	
30	<212>	ADN	
	<213>	artificial	
	<220>		
	<223>	Cebador directo de <i>sipB</i>	
	<400>	9	
35		ggaagatctt ccagaggaga aattaactat gaga	34
	<210>	10	
	<211>	28	

	<212>	ADN	
	<213>	artificial	
	<220>		
	<223>	Cebador inverso de sipB	
5	<400>	10	
		gaagatcttc ggagtccaag ctcagcta	28
	<210>	11	
	<211>	30	
	<212>	ADN	
10	<213>	artificial	
	<220>		
	<223>	Cebador directo FushA	
	<400>	11	
		ggggtacccc gcgatgttgg agatagtagg	30
15	<210>	12	
	<211>	28	
	<212>	ADN	
	<213>	artificial	
	<220>		
20	<223>	Cebador inverso RushA	
	<400>	12	
		ggggtacccc tacagccagc tcacctca	28
	<210>	13	
	<211>	30	
25	<212>	ADN	
	<213>	artificial	
	<220>		
	<223>	Cebador FushA	
	<400>	13	
30		ggggtacccc gcgatgttgg agatagtagg	30
	<210>	14	
	<211>	28	
	<212>	ADN	
	<213>	artificial	
35	<220>		
	<223>	Cebador RushA	
	<400>	14	

	ggggtacccc tacagccagc tcacctca	28
	<210> 15	
	<211> 18	
	<212> ADN	
5	<213> artificial	
	<220>	
	<223> Cebador A	
	<400> 15	
	gcgactggat catatcgt	18
10	<210> 16	
	<211> 18	
	<212> ADN	
	<213> artificial	
	<220>	
15	<223> Cebador B	
	<400> 16	
	cgctcacta tgctcatg	18
	<210> 17	
	<211> 20	
20	<212> ADN	
	<213> artificial	
	<220>	
	<223> Cebador C	
	<400> 17	
25	ctgaacggtc tgggtatagg	20
	<210> 18	
	<211> 18	
	<212> ADN	
	<213> artificial	
30	<220>	
	<223> Cebador D	
	<400> 18	
	ctggatattg aactggcg	18
	<210> 19	
35	<211> 30	
	<212> ADN	
	<213> artificial	

ES 2 430 861 T3

	<220>		
	<223>	Cebador E	
	<400>	19	
		cccaagcttg ggccttagcc attctgactg	30
5	<210>	20	
	<211>	20	
	<212>	ADN	
	<213>	artificial	
	<220>		
10	<223>	Cebador F	
	<400>	20	
		gcaggtcgac tctagaggat	20
	<210>	21	
	<211>	30	
15	<212>	ADN	
	<213>	artificial	
	<220>		
	<223>	Cebador G	
	<400>	21	
20		cccaagcttg ggccttagcc attctgactg	30

REIVINDICACIONES

1. Una cepa de *Samonella enterica* serovariedad Typhimurium VNP/sipB depositada en la Polish Collection of Microorganisms con el n.º de referencia B/00024.
- 5 2. Aplicación de la cepa *Samonella enterica* serovariedad Typhimurium VNP/sipB depositada en la Polish Collection of Microorganisms con el n.º de referencia B/00024 para obtener una vacuna, en especial una vacuna antineoplásica.
3. Procedimiento de obtención de un vector de vacuna terapéutica, caracterizado porque se introduce una modificación genética en la cepa de vector de *Salmonella enterica* serovariedad Typhimurium VNP20009 específica para células cancerosas, lo que da como resultado la sobreexpresión retardada de un gen que codifica una proteína responsable de la capacidad invasiva de esta cepa, en el que se obtiene un casete de expresión, 10 que contiene el *sipB* bajo el control del promotor *PsifB* que controla su sobreexpresión retardada, y después se integra el casete dentro del cromosoma bacteriano.
4. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 3, caracterizado porque el casete de expresión integrado en el cromosoma bacteriano es el casete *PsifB-sipB* de acuerdo con SEQ ID 1 o el casete *ushA-5'-PsifB-sipB-ushA-3'* 15 de acuerdo con SEQ ID 2.
5. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 4, caracterizado porque el procedimiento incluye una etapa final adicional de retirada de un gen para determinar la resistencia antibiótica del genoma bacteriano.

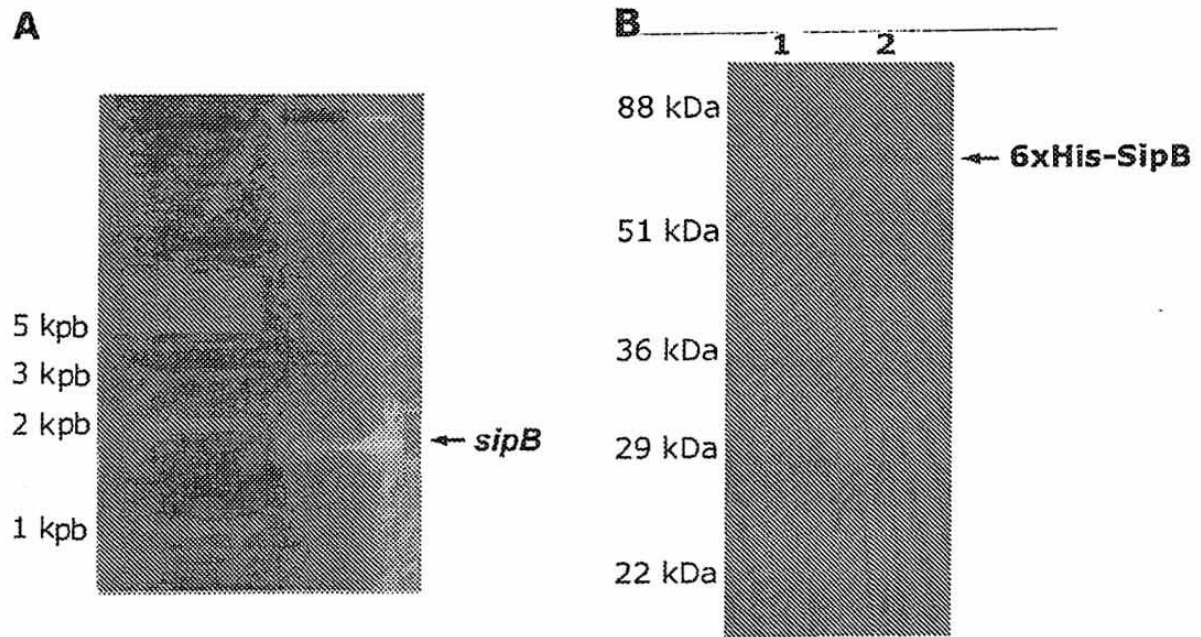


Fig. 1

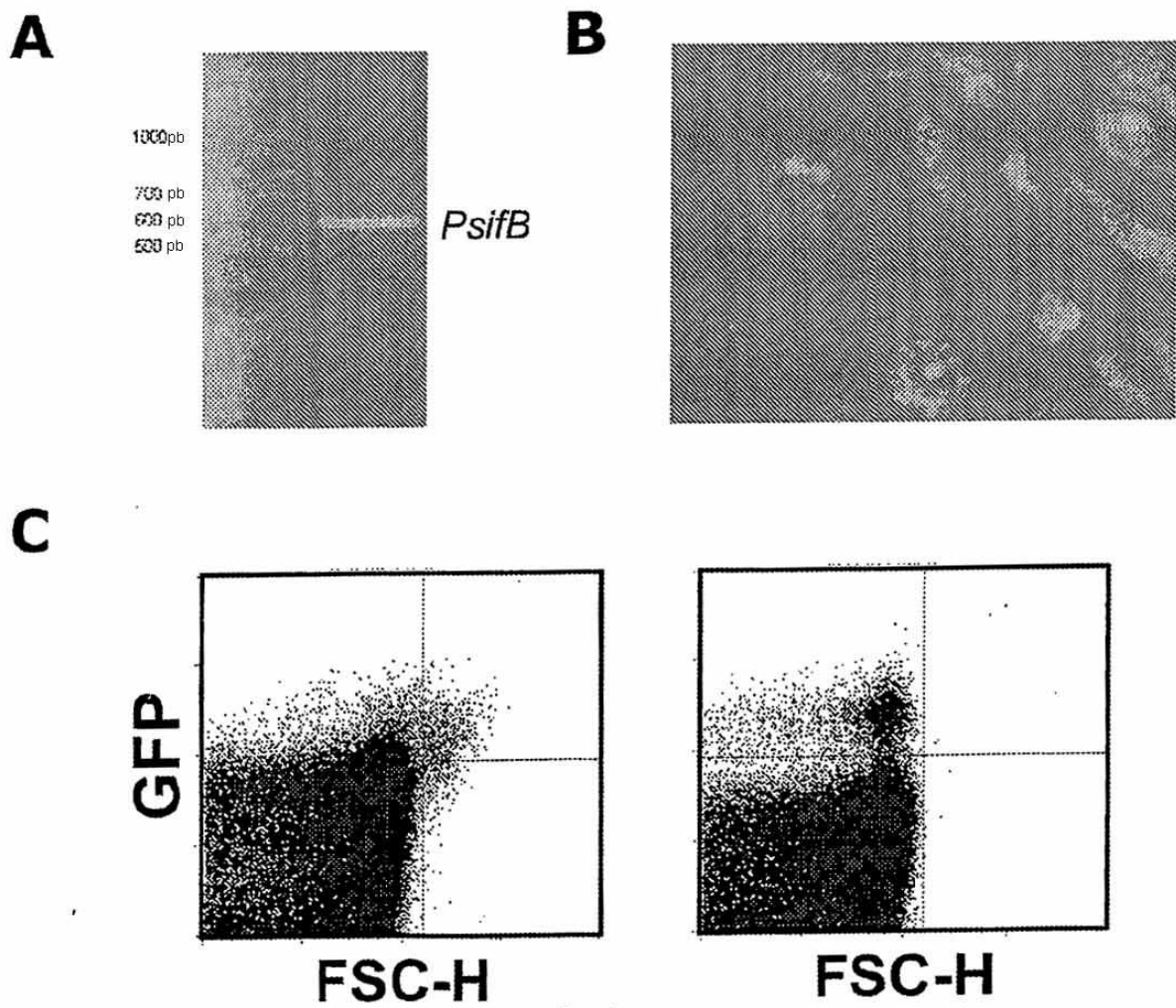


Fig. 2

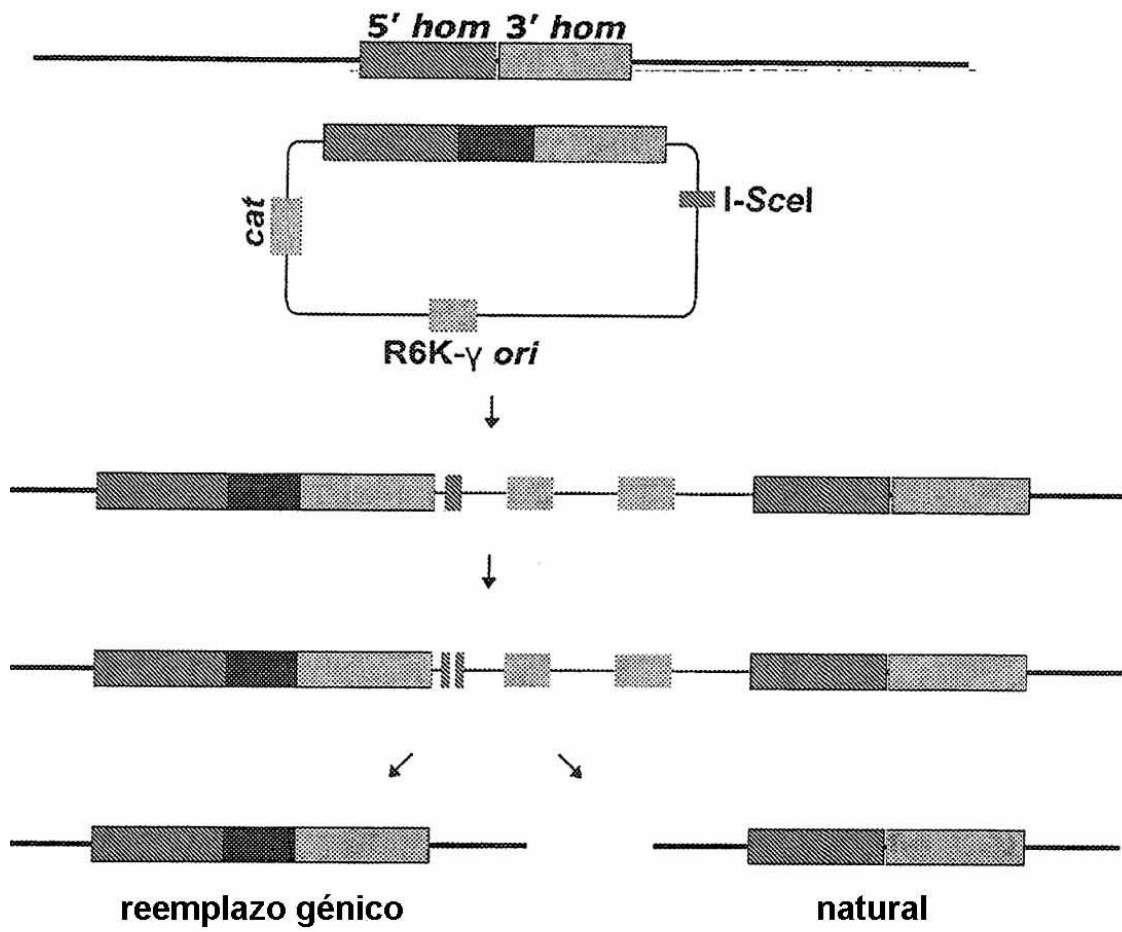


Fig. 3

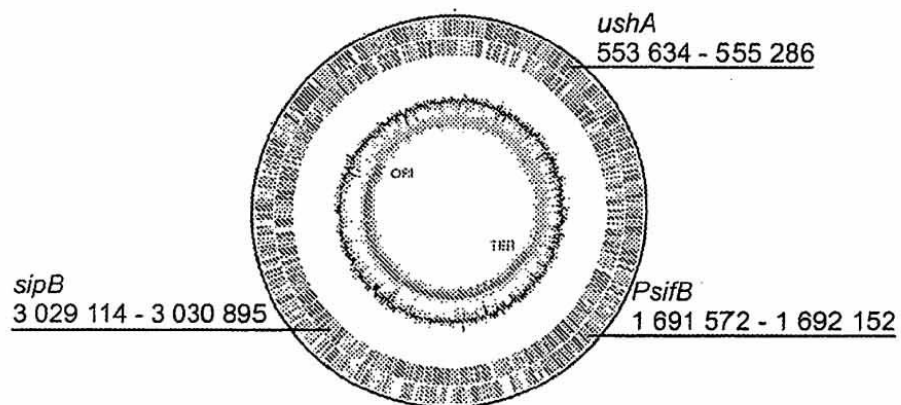


Fig. 4

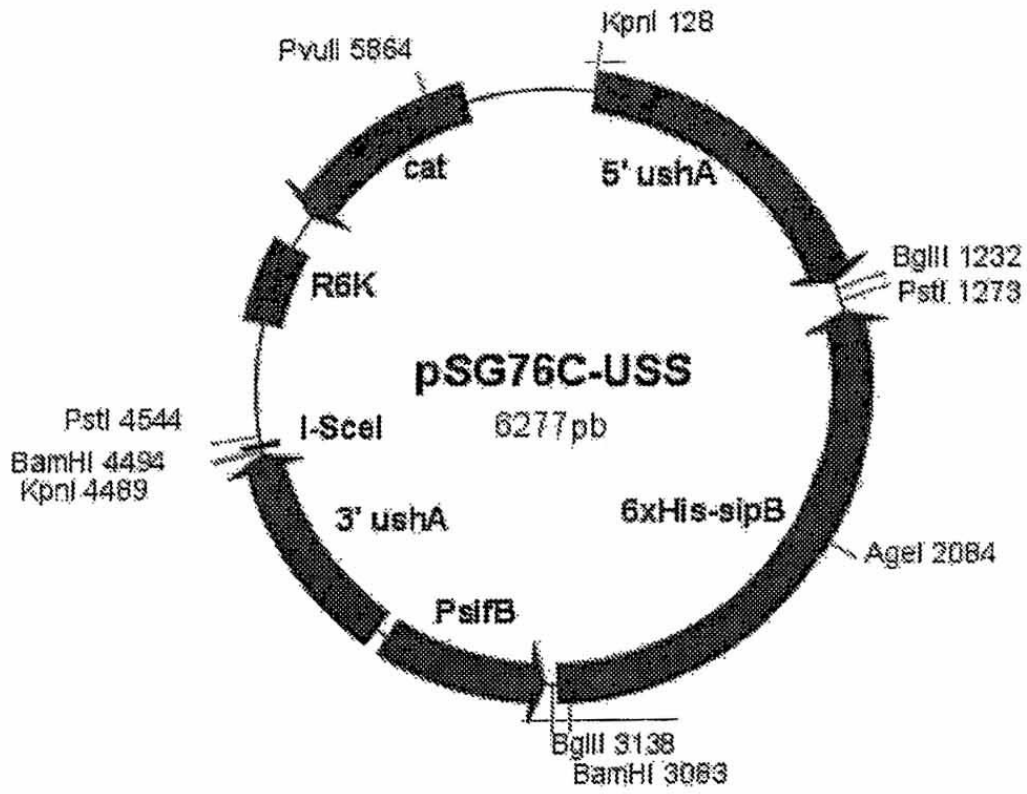


Fig. 5

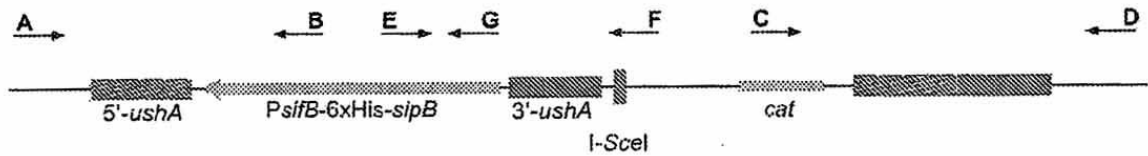


Fig. 6

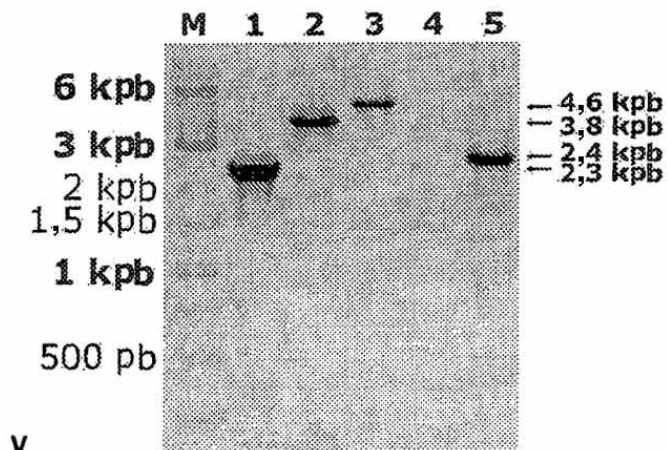


Fig. 7

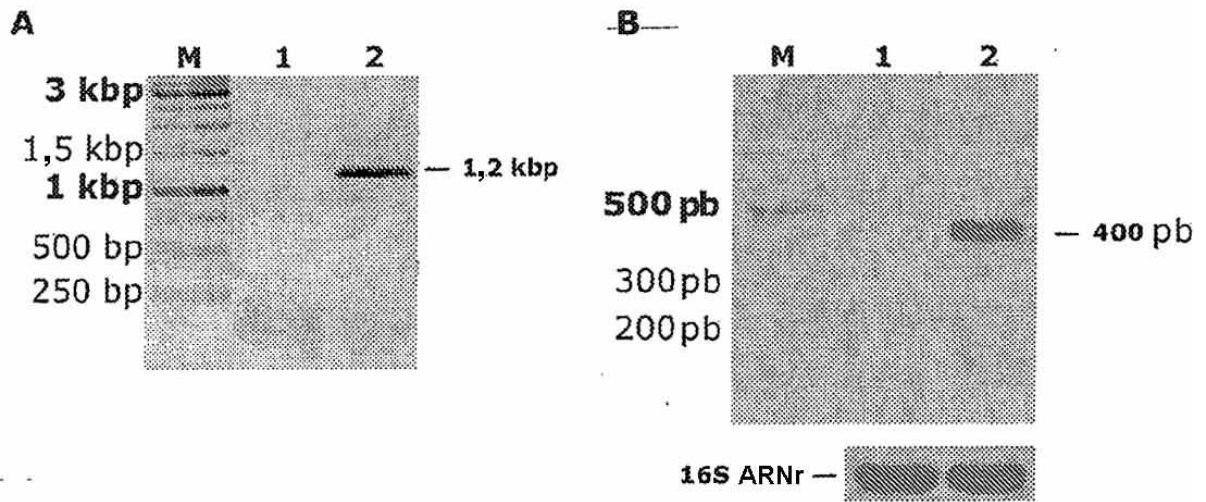


Fig. 8

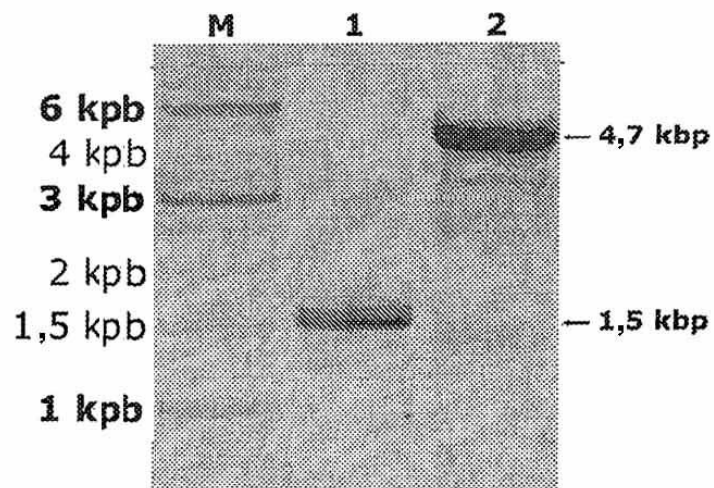


Fig. 9

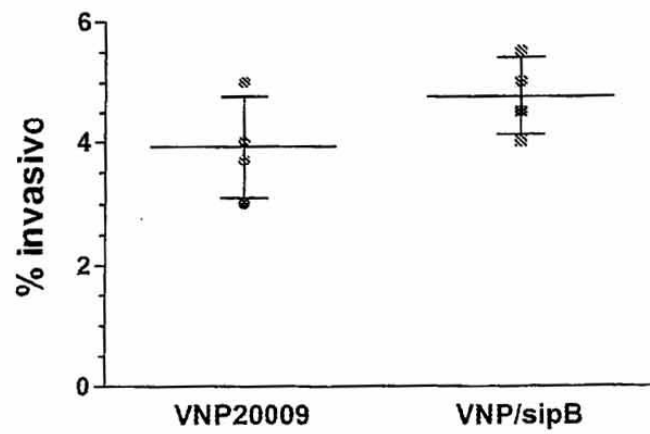


Fig. 10

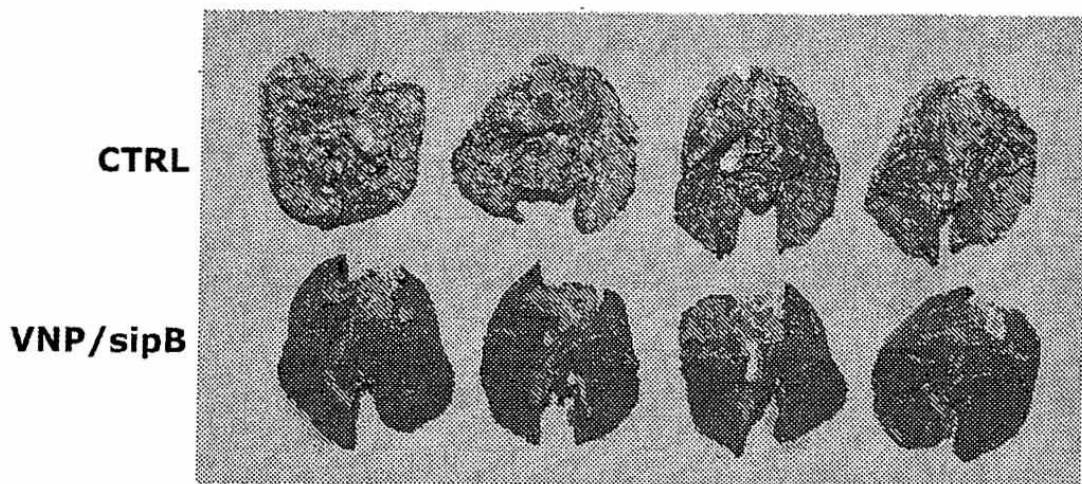
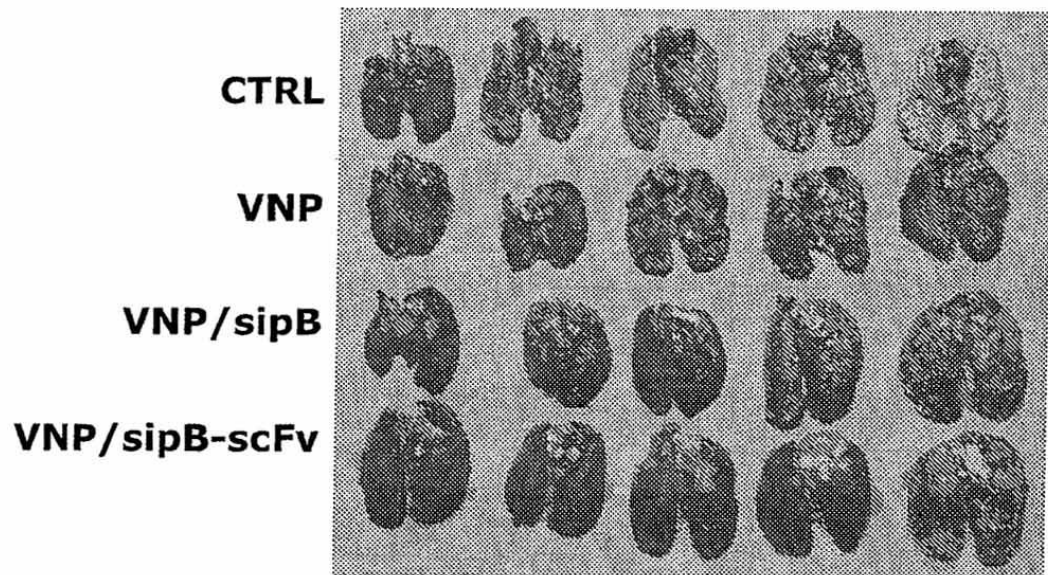


Fig. 11

A



B

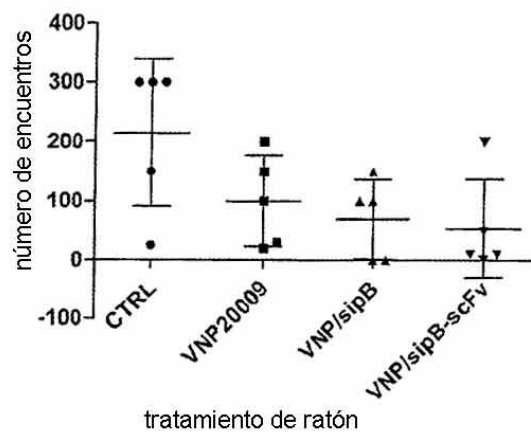


Fig. 12

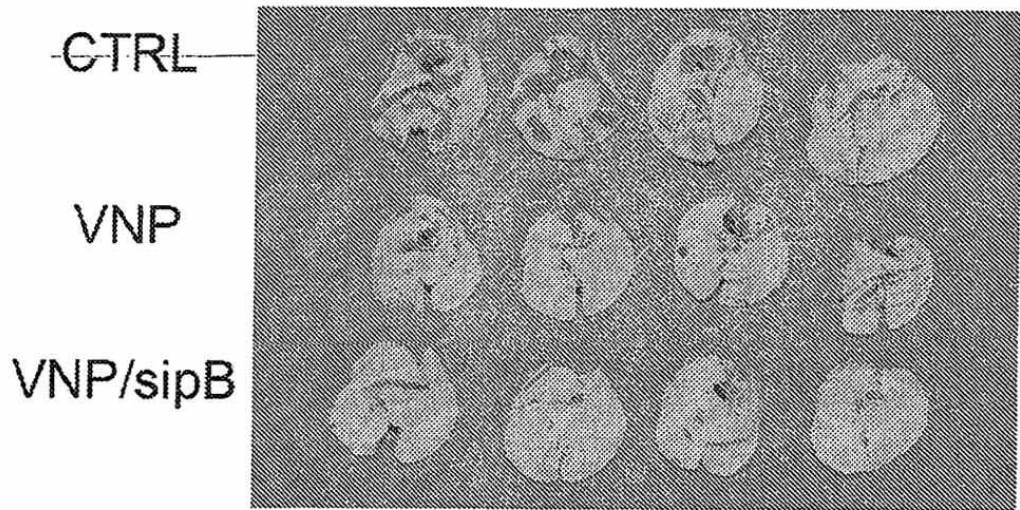


Fig. 13

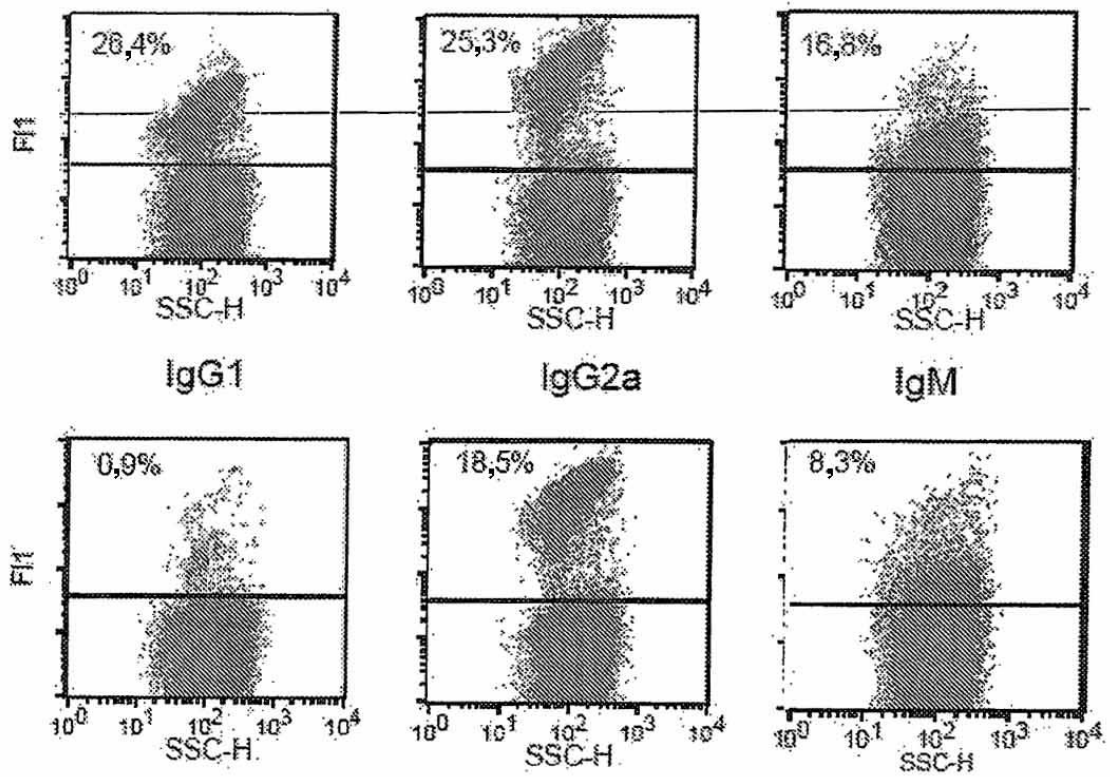


Fig. 14

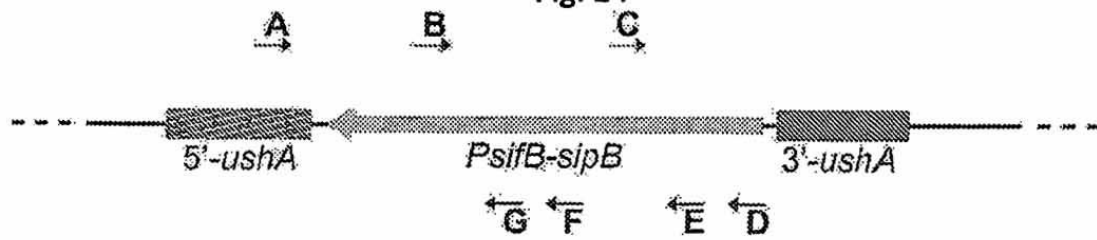


Fig. 15 A

Cebador D (siff):			
>ref NC_003197.1 <i>Salmonella typhimurium</i> LT2, todo el genoma			
gb AE006468.1 <i>Salmonella typhimurium</i> LT2, todo el genoma			
longitud = 4857432			
Query	4	AATGCCC-AGGATGCTGCTCTTTTCGTTGGAATTCACCATCTGATTTCATTCTTGGAGCCT	62
Objeto	1691594	AATGCCCAGGATGCTGCTCTTTTCGTTGGAATTCACCATCTGATTTCATTCTTGGAGCCT	1691653
Consulta	63	CCTCGCAGGTTTTATAATTTTATCGCCCAACTGGAAACAAAGCCGTCAGCTAATCGTTA	122
Objeto	1691654	CCTCGCAGGTTTTATAATTTTATCGCCCAACTGGAAACAAAGCCGTCAGCTAATCGTTA	1691713
Consulta	123	CAACAAATATAATTAAGACAAAACATAAGAGTAAGATATTTATATCATAGCACTATCA	182
Objeto	1691714	CAACAAATATAATTAAGACAAAACATAAGAGTAAGATATTTATATCATAGCACTATCA	1691773
Consulta	183	GTATTGGCCTCTGCCCCACCGCTAAACATCTCATTTGTTAGCCTAATAACTTTTA	242
Objeto	1691774	GTATTGGCCTCTGCCCCACCGCTAAACATCTCATTTGTTAGCCTAATAACTTTTA	1691833
Consulta	243	GTTTAACCTCTTATAAGACAAATTTCTACCGTTGAGCAACTATTACTTTCTCTAAAAA	302
Objeto	1691834	GTTTAACCTCTTATAAGACAAATTTCTACCGTTGAGCAACTATTACTTTCTCTAAAAA	1691893
Consulta	303	TAATATAGTGGTAATTAATCACTACTCATAGTACATGATGATGAGAATTAAGAAAC	362
Objeto	1691894	TAATATAGTGGTAATTAATCACTACTCATAGTACATGATGATGAGAATTAAGAAAC	1691953
Consulta	363	CGTTTTACTTTTCATTCGTTTTATCTGACATATTTTCATGGCCAGGAGCGTGGGCATGACT	422
Objeto	1691954	CGTTTTACTTTTCATTCGTTTTATCTGACATATTTTCATGGCCAGGAGCGTGGGCATGACT	1692013
Consulta	423	AAAGCTACGGGTCGATTGAAACAATTGAACAATAATGTTGACGGTTAGGACAAAGCAAA	482
Objeto	1692014	AAAGCTACGGGTCGATTGAAACAATTGAACAATAATGTTGACGGTTAGGACAAAGCAAA	1692073
Consulta	483	AAACAGGGGTTTCCCGATAGGCAACCGATGGGGCAACATGGGATAATATTTCCGAAT	542
Objeto	1692074	AAACA-GGTGTTTACCGATAGGCAACCGAT-GGGCAACATGGGATAATATTT-CGAAT	1692130
Consulta	543	ACCACTCTATCCCGTAATGAA 566	
Objeto	1692131	ACCA-CCTATTCC--AGTAATGAA 1692151	
Cebador C (sipseq4):			
>ref NC_003197.1 <i>Salmonella typhimurium</i> LT2, todo el genoma			
gb AE006468.1 <i>Salmonella typhimurium</i> LT2, todo el genoma			
longitud = 4857432			
Consulta	3	CCAGTAGGGCTCT--ACTTGCCA-CGAGTAATGTCAATTGCCCTTCGCTGGAGAGTTTT	59
Objeto	3030607	CCAGTAGGGCTCTTACTTCCCAAGCAGTAATGTCAATTGCCCTTCGCTGGAGAGTTTT	3030666
Consulta	60	CCCGGGCGGCGTCCGTAGGCGGCTTTAGACCCACCGTATTAAATAGCGCTCTGCCGGACT	119
Objeto	3030667	CCCGGGCGGCGTCCGTAGGCGGCTTTAGACCCACCGTATTAAATAGCGCTCTGCCGGACT	3030726
Consulta	120	TTGTTCGGCTTTAAGGTCGCCCGCTTTGCTTGCCACCACATCTTTAAAGCTTTATCCG	179
Objeto	3030727	TTGTTCGGCTTTAAGGTCGCCCGCTTTGCTTGCCACCACATCTTTAAAGCTTTATCCG	3030786
Consulta	180	CCGCTTTTAAAGTCCGTGTTCTTACGAACGCCTTCAAAAGCCGCTCAGCGAGGCGCG	239
Objeto	3030787	CCGCTTTTAAAGTCCGTGTTCTTACGAACGCCTTCAAAAGCCGCTCAGCGAGGCGCG	3030846
Consulta	240	GATTTTGGGTATATCCGCTACGGCTAATGCTACTT 274	
Objeto	3030847	GATTTTGGGTATATCCGCTACGGCTAATGCTACTT 3030881	
Consulta	340	ACTTCATTACTGGAATAGTGGTATTCGAA-TATTATCCCATGTTGCCATCGGTTTGC	398
Objeto	1692153	ACTTCATTACTGGAATAGTGGTATTCGAA-TATTATCCCATGTTGCCATCGGTTTGC	1692095
Consulta	399	CTATCGGTGAAACACCTGATTTTGTCTT-GTCTGAACCGTCAACATTATTGTCAATTG	457
Objeto	1692094	CTATCGGTGAAACACCTGATTTTGTCTTGTCTGAACCGTCAACATTATTGTCAATTG	1692035
Consulta	458	TTCAATCCGACCCGTAGCTTTAGTCATGCCCCCTCTTGGGCCATGAAATATGTCGA	517

```

Objeto 1692034 TTCAAATCGACCCGTAGCTTTAGTCATGCCACGCCCTCCT-GGCCATGAAATATGTCAG- 1691977
Consulta 518 ATAAACGAATGGAAGTAAACGGGTTTCTTAATCCCCAATCCATCCGGGACCATGTA 577
|||||
Objeto 1691976 ATAAACGAATGAAAGTAAAC-GGTTTCTTAATCTCACAT-CATCATGTACTA-TGA 1691920
Consulta -578-GTAAGGATTAA-588-
|||||
Objeto 1691919 GTAATGATTAA 1691909

Cebador E (FsiBgl):
>ref|NC_003197.1| Salmonella typhimurium LT2, todo el genoma
gb|AE006468.1| Salmonella typhimurium LT2, todo el genoma
longitud = 4857432

Consulta 31 AAGTAGCATTAGCCGTCCCGGATATACCCAAAATCCGCCCTCGCTGAGGCGGCTTTTGA 90
|||||
Objeto 3030881 AAGTAGCATTAGCCGTAGCCGATATACCCAAAATCCGCCCTCGCTGAGGCGGCTTTTGA 3030822
Consulta 91 AGGCGTTCGTAAGACACGGACTTTTAAAGCGGCGGATAAAGCTTTTAAAGATGTGGT 150
|||||
Objeto 3030821 AGGCGTTCGTAAGACACGGACTTTTAAAGCGGCGGATAAAGCTTTTAAAGATGTGGT 3030762
Consulta 151 GGCAACGAAAGCGGGCGACCTTAAAGCCGGAACAAAGTCCGGCGAGAGCGCTATTAAATAC 210
|||||
Objeto 3030761 GGCAACGAAAGCGGGCGACCTTAAAGCCGGAACAAAGTCCGGCGAGAGCGCTATTAAATAC 3030702
Consulta 211 GGTGGGTCTAAAGCGGCTACGGACGCCGCCGGGAAAACCTCCAGCGAAGGGCAATT 270
|||||
Objeto 3030701 GGTGGGTCTAAAGCGGCTACGGACGCCGCCGGGAAAACCTCCAGCGAAGGGCAATT 3030642
Consulta 271 GACATTACTGCTTGGCAAGTTAATGACCCCTACGGGCGATGTTTCGCTGTCTCAACTGGA 330
|||||
Objeto 3030641 GACATTACTGCTTGGCAAGTTAATGACCCCTACGGGCGATGTTTCGCTGTCTCAACTGGA 3030582
Consulta 331 GTCTCGTCTGGCGGTATGGCAGGCGATGATTGAGTCACAAAAGAGATGGGGATTACGGT 390
|||||
Objeto 3030581 GTCTCGTCTGGCGGTATGGCAGGCGATGATTGAGTCACAAAAGAGATGGGGATTACGGT 3030522
Consulta -391-ATCGAAAGAAATTCAGACGGGTGTGGGAGAGGCTCAGGAGGCGACGGATCTCTATGAAGC-450-
|||||
Objeto 3030521 ATCGAAAGAAATTCAGACGGGTCTGGGAGAGGCTCAGGAGGCGACGGATCTCTATGAAGC 3030462
Consulta 451 CAGTATCAAAAAGACGGATACCGCCAGAGTGTTTATGACGCTGCGACCAaaaaCTGA 510
|||||
Objeto 3030461 CAGTATCAAAAAGACGGATACCGCCAGAGTGTTTATGACGCTGCGACC-AAAAAAGTGA 3030403
Consulta 511 CGCAGGCGCAAAATTAATTGCAATCGCTGGGACCCGGGCTGACCCCGGCTATGCCCAAGC 570
|||||
Objeto 3030402 CGCAGGCGCAAAATTAATTGCAATCGCT-GGACCC-GGCTGACCCCGGCTATGCCAAGC 3030345
Consulta 571 TGAACCCACGCTAAACCAGGGCCGGAAGAAAGACGACAGAGGNCGAAAGAGGCCCTTT 630
|||||
Objeto 3030344 TG-AAGCCGCGGTAGAAC--AGGCCGAAAAGAGCGA-CAGAGG-CGAAAGAGGCCCTT- 3030291
Consulta 631 anaanaaGGNCCNGGAAGGCNACCGGGTTAAAGCCAGGCNennaaccccaangcnaa 690
|||||
Objeto 3030290 -AGATAAGGCCACGG--ATGCGAC--GGTTAAG-CAGGCACAGA--CGCCAAA-GCGAA 3030240
Consulta 691 angccnnanaaGGCGGAATAACATT 716
|||||
Objeto 3030239 A-GCC-GAGAAA-GCGG-ATAACATT 3030218

Cebador A (FushaI):

```

```

>ref|NC_003197.1| Salmonella typhimurium LT2, todo el genoma
gb|AE006468.1| Salmonella typhimurium LT2, todo el genoma

longitud = 4857432

Consulta 12 TGTGGGCCGTGCGGATTTTCGAATTCGGTAACGGCGAGATG-AAATGGTT 59
|||||
Objeto 554515 TGTGGGCCGTGCGGATTTTCGAATTCGGTAACGGCGAGATGAATGGTT 554563
Consulta 138 TTTCGCCCTTATTTTGGCAGTTTTATGCGCGACTCTGGCGCAGATAAAACCGGAAGC 197
|||||
Objeto 3029090 TTTCGCCCTTATTTTGGCAGTTTTATGCGCGACTCTGGCGCAGATAAAACCGGAAGC 3029149
Consulta 198 ATCCGCATTTTGTCTACCGCAGAAACATGGCTTTTTCAGTTCGCCGTTACCTTCG 257
|||||
Objeto 3029150 ATCCGCATTTTGTCTACCGCAGAAACATGGCTTTTTCAGTTCGCCGTTACCTTCG 3029209
Consulta 258 GTTTTCACCAAATATTTCACGGATTGTTTAAGCCACTGCTGAATCTGATCCATGGCAA 317
|||||
Objeto 3029210 GTTTTCACCAAATATTTCACGGATTGTTTAAGCCACTGCTGAATCTGATCCATGGCAA 3029269
Consulta 318 ACGGGCGAGCATAAAATCAGCAAGCGCCTCGCTGGCACTTTTAAATAAATACGCCCTCGG 377
|||||
Objeto 3029270 ACGGGCGAGCATAAAATCAGCAAGCGCCTCGCTGGCACTTTTAAATAAATACG-CCCTCGG 3029328
Consulta 378 CAACACCAACCGGCTGACTGGGGCTGCGGTATTCTGTGACTTCCATGCCCAAGCCACTTTA 437
|||||
Objeto 3029329 CAACACCAACCGGCTGACT-GGGCTGCGGTATTCTGTGACTTCCATGCCCAAGCCACTTTA 3029387
Consulta 438 TTTAGGGTATTACCTACCAGCTCTTACTTAAGGCAATCGTITGCAAGGCCCATCTTGCTA 497
|||||
Objeto 3029388 TTTAGGGTATTACCTACCAGCTCTTACTTAAGGCAATCGTITGCAAGGCCCATCTTGCTA 3029447
Consulta 498 CCCACATTACCCAGACCGCTAGTAATACGTTGCATCCCCCTGGGGTAAAAAGTTGGCTG 557
|||||
Objeto 3029448 CCCACATTACCCAGACCGCTAGTAATACGTTGCAT-CCCCCTGGG--TAAAGAGTTTGGCTG 3029504
Consulta 558 CCGTTTTCGCCCAACTGTTTCAGCCACGTTAGGCCAACCAACTCTTAAATCCGTTTCGCCC 617
|||||
Objeto 3029505 CCGTTTTCGCCCAACTGTTTCAG-CACGTTAGGCCACC-AACTTCTTAAT-CGTTTCGCCC 3029561
Consulta 618 ATCAATTTTGGCTCAAGCNGCGTTACCCAGTTT 651
|||||
Objeto 3029562 ATCA--TTTGTCTC-AGC-GCGTTA-CCCAAGTTT 3029590

```

Fig. 15 B

A Fusha1 AATGGCATCTGGATCGTG
 B sipseq3 GTAATCGCCTTGCCAATC
 C sipseq4 -AGACGAGACTCCA GTTGAGA-
 D sipF CCCAAGCTTGGGCCTTAGCCATTCTGACTG
 E FsipBgl GGAAGATCTTCCAGAGGAGAAATTA ACTATGAGA
 F sipseq1 GAGGCGACGGATCTCTAT
 G sipseq2 CGCCTCACTATGCTCATG

Fig. 16

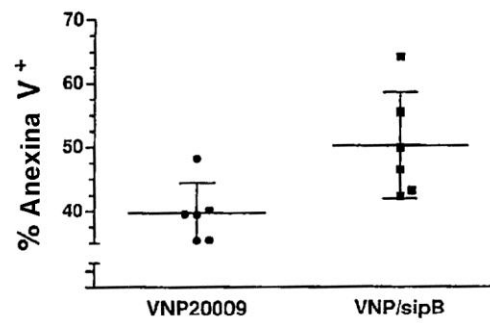


Fig. 17