

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 431 327**

51 Int. Cl.:

C12N 1/36 (2006.01)

C12N 1/20 (2006.01)

A61K 39/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.10.2006** **E 06844230 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.07.2013** **EP 1941024**

54 Título: **Salmonella entérica serotipo Paratyphi A atenuada y usos de la misma**

30 Prioridad:

28.10.2005 US 731349 P

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

26.11.2013

73 Titular/es:

**UNIVERSITY OF MARYLAND, BALTIMORE
(100.0%)
520 WEST LOMBARD STREET
BALTIMORE MD 21201, US**

72 Inventor/es:

**VINDURAMPULLE, CHRISTOFER;
BARRY, EILEEN M. y
LEVINE, MYRON M.**

74 Agente/Representante:

AZNÁREZ URBIETA, Pablo

ES 2 431 327 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

Salmonella entérica serotipo Paratyphi A atenuada y usos de la misma.

SOLICITUDES RELACIONADAS

- 5 La presente solicitud reivindica el beneficio de la Solicitud Provisional US nº 60/731.349 presentada el 28 de octubre de 2005.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

- 10 La fiebre entérica causada por miembros del género *Salmonella*, incluyendo las fiebres tifoidea y paratifoidea, sigue constituyendo una importante carga de morbilidad y mortalidad entre las poblaciones de los países en vías de desarrollo (Lancet 2005; 366: 749-762) y representa un riesgo notable para los viajeros (Lancet Infect Dis. 2005; 5(10): 623-628). Las incidencias de fiebre entérica causada por *Salmonella enteric* serotipo Typhi y Paratyphi A (S. Typhi y S. Paratyphi A) están aumentando debido a la aparición y propagación de variantes resistentes a los antibióticos (Lancet Infect Dis. 2005 5(10): 623-8). Aunque en general la enfermedad clínica causada por S. Paratyphi A es algo más leve que la debida a S. Typhi, la primera puede resultar en una fiebre entérica en su estado más avanzado con toda una serie de complicaciones y, si no se trata o se trata incorrectamente, puede tener como consecuencia la muerte. Existe la necesidad de disponer de vacunas que sean seguras y eficaces para combatir infecciones por *Salmonella*.

SUMARIO DE LA INVENCION

- 20 La presente invención se refiere a una cepa de S. Paratyphi A atenuada, donde dicha cepa A tiene una mutación atenuante en los loci *guaBA* y una mutación atenuante en el gen *clpX*. En realizaciones preferentes, la cepa S. Paratyphi A tiene una mutación atenuante en el gen *guaB*, el gen *guaA* y el gen *clpP*. En una realización especialmente preferente, la cepa de *Salmonella* Paratyphi A tiene una mutación atenuante en el gen *guaB*, el gen *guaA* y el gen *clpX*. En otra realización preferente, la cepa de *Salmonella* Paratyphi A tiene una mutación atenuante en el gen *guaB*, el gen *guaA*, el gen *clpP* y el gen *clpX*.
- 25 En una realización, la mutación atenuante es una mutación atenuante que reduce el nivel de expresión de los loci o los genes o bloquea la expresión de los loci o los genes.
- En otra realización, la mutación atenuante es una mutación atenuante que reduce la actividad de un polipéptido codificado por los loci o los genes o inactiva un polipéptido codificado por los loci o los genes.
- En una realización preferente, la cepa de *Salmonella* Paratyphi A es la cepa S. Paratyphi A 9150.
- 30 La presente invención incluye también cepas de S. Paratyphi A según la presente invención que comprenden además un sistema de expresión plasmídico estabilizado.
- En una realización preferente, el sistema de expresión plasmídico estabilizado comprende un vector de expresión que tiene (a) un casete de origen de replicación de número de copias restringido, (b) como mínimo un casete de destrucción postsegregacional, (c) como mínimo un casete de partición y (d) un casete de expresión.
- 35 En realizaciones preferentes, el casete de origen de replicación de número de copias restringido comprende (i) una secuencia de nucleótidos que codifica un origen de replicación que limita el vector de expresión a un número medio de copias plasmídicas de aproximadamente 2 a 75 copias por célula, (ii) un primer sitio de corte de enzima de restricción único situado en 5' de la secuencia de nucleótidos que codifica el origen de replicación y (iii) un segundo sitio de corte de enzima de restricción único situado en 3' de la secuencia de nucleótidos que codifica el origen de replicación.
- 40 En las mismas realizaciones, el casete de destrucción postsegregacional comprende (i) una secuencia de nucleótidos que codifica como mínimo un locus de destrucción postsegregacional, (ii) un tercer sitio de corte de enzima de restricción único situado en 5' de la secuencia de nucleótidos que codifica el locus de destrucción postsegregacional y (iii) un cuarto sitio de corte de enzima de restricción único situado en 3' de la secuencia de nucleótidos que codifica el locus de destrucción postsegregacional.
- 45 En las mismas realizaciones, el casete de partición comprende (i) una secuencia de nucleótidos que codifica como mínimo una función de partición, (ii) un quinto sitio de corte de enzima de restricción único situado en 5' de la secuencia de nucleótidos que codifica la función de partición y (iii) un sexto sitio de corte de enzima de restricción único situado en 3' de la secuencia de nucleótidos que codifica la función de partición.
- 50 En las mismas realizaciones, el casete de expresión comprende (i) una secuencia de nucleótidos que codifica un antígeno seleccionado unido de manera operable a un promotor, (ii) un séptimo sitio de corte de enzima de

restricción único situado en 5' de la secuencia de nucleótidos que codifica el antígeno seleccionado unido de manera operable a un promotor y (iii) un octavo sitio de corte de enzima de restricción único situado en 3' de la secuencia de nucleótidos que codifica el antígeno seleccionado unido de manera operable a un promotor.

5 En realizaciones preferentes, la secuencia de nucleótidos que codifica el origen de replicación es una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo consistente en la secuencia *oriE1* de SEQ ID n°: 28, la secuencia *ori101* de SEQ ID n°: 30 y la secuencia *ori15A* de SEQ ID n°: 29.

10 En realizaciones preferentes, la secuencia de nucleótidos que codifica el locus de destrucción postsegregacional es una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo consistente en una secuencia de nucleótidos que codifica el sistema letal equilibrado *ssb*, una secuencia de nucleótidos que codifica el sistema letal equilibrado *asd*, una secuencia de nucleótidos que codifica el sistema proteico *phd-doc* y una secuencia de nucleótidos que codifica el sistema antisentido *hok-sok*. Con especial preferencia, el locus de destrucción postsegregacional es una secuencia de nucleótidos que codifica el sistema letal equilibrado *ssb* seleccionada del grupo consistente en el locus *ssb* de *Shigella flexneri*, el locus *ssb* de *Salmonella Typhi* y el locus *ssb* de *E. coli*. Aun más preferentemente, el sistema letal equilibrado *ssb* es un locus *ssb* que comprende un promotor inducible de *ssb*, un promotor constitutivo de *ssb* y una región codificadora de *ssb* de la cepa de *S. flexneri* 2a CVD 1208s mostrada en la SEQ ID n°: 34.

15 En realizaciones preferentes, la secuencia de nucleótidos que codifica la función de partición es una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo consistente en el locus *parA* de *E. coli* de SEQ ID n°: 31 y el locus *pSC101 par* de *E. coli* de en SEQ ID n°: 32.

20 En realizaciones preferentes, el promotor es un promotor inducible, en especial un promotor de *ompC* y con mayor preferencia el promotor de *ompC* mostrado en la SEQ ID n°: 33.

En una realización, la secuencia de nucleótidos que codifica un antígeno seleccionado es una secuencia de nucleótidos que codifica un antígeno homólogo. En otra realización, la secuencia de nucleótidos que codifica un antígeno seleccionado es una secuencia de nucleótidos que codifica un antígeno heterólogo.

25 En realizaciones preferentes, la secuencia de nucleótidos que codifica un antígeno seleccionado es una secuencia de nucleótidos que codifica un antígeno heterólogo seleccionado del grupo consistente en un antígeno vírico, bacteriano, un antígeno de cáncer y un antígeno autoinmune.

La presente invención incluye también una formulación farmacéutica que comprende una o más de las cepas de *Salmonella Paratyphi A* atenuadas de la presente invención. Las formulaciones farmacéuticas son preferentemente formulaciones farmacéuticas orales.

30 La presente invención incluye además las formulaciones farmacéuticas de la presente invención para el uso en un método para inducir una respuesta inmunitaria en un sujeto, que comprende la administración de una cantidad inmunológicamente eficaz de una formulación farmacéutica de la presente invención a un sujeto. La respuesta inmunitaria es preferentemente una respuesta inmunitaria protectora.

35 La cantidad inmunológicamente eficaz de la formulación farmacéutica contiene entre aproximadamente 10^2 cfu y aproximadamente 10^{10} cfu, con mayor preferencia entre aproximadamente 10^6 cfu y aproximadamente 10^9 cfu, de la cepa de *S. Paratyphi A* atenuada dentro de la formulación farmacéutica.

En una realización, la respuesta inmunitaria es una respuesta a *Salmonella Paratyphi A*. En otra realización, la respuesta inmunitaria es una respuesta al antígeno seleccionado. En otra realización más, la respuesta inmunitaria es una respuesta tanto a *Salmonella Paratyphi A* como al antígeno seleccionado.

40 Para mutar o delecionar diversos genes y loci cromosómicos de las cepas *S. Paratyphi* de la presente invención puede utilizarse el sistema de mutagénesis mediada por Lambda Red.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

45 Figura 1: muestra los productos de amplificación por PCR de *guaBA* y *guaBA::cml*. La línea 1 es *guaBA* de tipo salvaje; las líneas 2 y 3 son *guaBA::cml*. Las flechas indican bandas de marcador de peso molecular de 3 kb (arriba) y 1,5 kb (abajo).

Figura 2: muestra los productos de amplificación por PCR de delecciones de *guaBA::cml* y *guaBA*. La línea 1 es *guaBA::cml*; las líneas 2 a 5 son delecciones de *guaBA*. Las flechas indican bandas de marcador de peso molecular de 1,5 kb (arriba) y 0,5 kb (abajo).

50 Figura 3: muestra los resultados de un estudio de complementación de la delección de *guaBA*. La placa 1 es el mutante de *guaBA* transformado con pLowBlu 184; la placa 2 es el mismo mutante transformado con pATGguaBA.

Figura 4: muestra los productos de amplificación por PCR de *S. Paratyphi A* atenuada con wt, *clpX* y *clpX-guaBA*. El panel A muestra productos de PCR producidos empleando cebadores específicos para *clpX*, mientras que el panel B muestra productos de PCR producidos empleando cebadores específicos para *guaBA*. Las flechas indican bandas de marcador de peso molecular de 1,5 kb (arriba) y 0,5 kb (abajo) en el panel A, y de 3 kb (arriba) y 0,5 kb (abajo) en el panel B.

Figura 5: muestra los productos de amplificación por PCR de *S. Paratyphi A* atenuada con wt, *clpP* y *clpP-guaBA*. El panel A muestra productos de PCR producidos empleando cebadores específicos para *clpP*, mientras que el panel B muestra productos de PCR producidos empleando cebadores específicos para *guaBA*. Las flechas indican bandas de marcador de peso molecular de 1 kb (arriba) y 0,5 kb (abajo) en el panel A, y de 3 kb (arriba) y 0,5 kb (abajo) en el panel B.

Figura 6: representación gráfica de datos de ensayos de LD₅₀ en ratones a los que se les inyectó wt, *S. Paratyphi A* con delección de *guaBA*, con delección de *guaBA* complementada con pLowBlu 184 y con delección de *guaBA* complementada con pATGguaBA.

Figura 7: representación gráfica de datos de ensayos LP₅₀ en ratones a los que se les inyectó wt, *S. Paratyphi A* con delección de *clpX*, *S. Paratyphi A* con delección de *guaBA*, o *S. Paratyphi A* con delección de *clpX-guaBA*. Los datos incluyen ratones a los que se les inyectó *S. Paratyphi A* con delección de *clpX* complementada con pLowBlu 184 o pATGclpX, así como *S. Paratyphi A* con delección de *clpX-guaBA* complementada con pLowBlu 184 o pATGclpXATGguaBA.

Figura 8: representación gráfica de datos de ensayos de LD₅₀ en ratones a los que se les inyectó wt, *S. Paratyphi A* con delección de *clpP*, *S. Paratyphi A* con delección de *guaBA*, o *S. Paratyphi A* con delección de *clpP-guaBA*. Los datos incluyen ratones a los que se les inyectó *S. Paratyphi A* con delección de *clpP* complementada con pLowBlu 184 o pATGclpP, así como *S. Paratyphi A* con delección de *clpP-guaBA* complementada con pLowBlu 184 o pATGclpPATGguaBA.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

A. Cepas de *S. Paratyphi A* atenuadas

La presente invención se refiere a una cepa de *S. Paratyphi A* atenuada, teniendo dicha cepa una mutación atenuante en los loci *guaBA* y una mutación atenuante en el gen *clpX*. Tales cepas de *S. Paratyphi A* atenuadas pueden emplearse para inducir una respuesta inmunitaria en un sujeto sin provocarle una enfermedad.

La cepa de *S. Paratyphi A* empleada como material de partida de la presente invención puede ser cualquier cepa de *S. Paratyphi A*, no siendo crítica la identidad de la cepa. Entre las cepas de *S. Paratyphi A* preferidas se incluye la cepa de *S. Paratyphi A* 9150.

Las cepas de *S. Paratyphi A* de la presente invención están atenuadas. En el presente documento, las cepas de *S. Paratyphi A* atenuadas son aquellas que tienen una capacidad reducida, disminuida o reprimida para provocar una enfermedad en un sujeto, o aquellas que carecen por completo de la capacidad para provocar una enfermedad en un sujeto. Las cepas atenuadas pueden presentar una expresión reducida o no presentar ninguna expresión de uno o más genes, pueden expresar una o más proteínas con una actividad reducida o sin actividad, pueden presentar una capacidad reducida para crecer y dividirse, o una combinación de dos o más de estas características. Las cepas atenuadas de la presente invención pueden estar vivas o muertas.

Además de las cepas de *S. Paratyphi A* atenuadas de la presente invención, dentro del alcance de la invención se incluyen también cepas atenuadas de otros patógenos entéricos (por ejemplo *Salmonella Typhi*, *Salmonella Paratyphi B*, *Shigella*, *Vibrio cholerae*), comensales (por ejemplo *Lactobacillus*, *Streptococcus gordonii*) y cepas utilizadas en vacunas autorizadas (por ejemplo BCG). Estas cepas adicionales tienen todas las mutaciones atenuantes de las cepas de *S. Paratyphi A* de la presente invención, pueden transformarse con el sistema de expresión plasmídico estabilizado de la presente invención y pueden utilizarse como composición inmunizadora según se describe en el presente documento.

En realizaciones preferentes, las cepas de *S. Paratyphi A* atenuadas de la presente invención tienen un atenuante en los loci *guaBA* y una mutación atenuante en el gen *clpX* de *S. Paratyphi*. Por ejemplo, las cepas de *S. Paratyphi A* atenuadas de la presente invención pueden tener una mutación (i) en el gen *guaB* y el gen *clpP*, (ii) en el gen *guaA* y el gen *clpP*, (iii) en el gen *guaB*, el gen *guaA* y el gen *clpP*, (iv) en los loci *guaBA* y el gen *clpP*, (v) en el gen *guaB* y el gen *clpX*, (vi) en el gen *guaA* y el gen *clpX*, (vii) en el gen *guaB*, el gen *guaA* y el gen *clpX*, (viii) en los loci *guaBA* y el gen *clpX*, (ix) en el gen *guaB*, el gen *clpP* y el gen *clpX*, (x) en el gen *guaA*, el gen *clpP* y el gen *clpX*, (xi) en el gen *guaB*, el gen *guaA*, el gen *clpP* y el gen *clpX*, o (xii) en los loci *guaBA*, el gen *clpP* y el gen *clpX*.

Las mutaciones de los loci y genes aquí descritas pueden ser cualesquiera mutaciones, tales como delecciones, inserciones o sustituciones de uno o más ácidos nucleicos. Las mutaciones pueden ser cualquier delección, inserción

o sustitución de los loci o genes que resulte en una reducción o ausencia de la expresión de los loci o genes, o una reducción o ausencia de la actividad de un polipéptido codificado por los loci o genes. Las mutaciones pueden estar en las regiones codificadoras o no codificadoras de los loci o genes.

Preferentemente, en la presente invención, el genoma cromosómico de la cepa de *S. Paratyphi A* se modifica por eliminación u otra modificación de los loci *guaBA*, bloqueando así la biosíntesis *de novo* de nucleótidos de guanina. Con especial preferencia, una mutación en los loci *guaBA* inactiva las enzimas IMP deshidrogenasa (codificada por *guaB*) y GMP sintetasa (codificada por *guaA*) de la vía metabólica de la purina. A consecuencia de estas mutaciones, las *S. Paratyphi A* son incapaces de sintetizar *de novo* GMP y, por consiguiente, los nucleótidos GDP y GTP, lo que limita seriamente el crecimiento bacteriano en tejidos de mamífero. *In vitro*, los mutantes Δ *guaBA* de *S. Paratyphi A* de la presente invención son incapaces de crecer en un medio mínimo, a no ser que se complemente con guanina. En un cultivo tisular se comprobó que los mutantes Δ *guaBA* de *S. Paratyphi A* de la presente invención muestran una importante reducción en su capacidad para la invasión. Los mutantes Δ *guaBA* de *S. Paratyphi A* pueden eliminar nucleótidos de guanina de los tejidos del huésped mamífero. Sin embargo, su asimilación en *S. Paratyphi A* requiere antes una desfosforilación a nucleósidos mediante nucleotidasas periplásmicas para ser incorporados como precursores de nucleótido en la vía de rescate de la guanina. Por tanto, dado que los nucleótidos están fácilmente disponibles en el entorno intracelular del huésped mamífero, la atenuación debida a la síntesis *de novo* de nucleótidos de guanina se debe bien a la ineficacia de la vía de rescate o a razones ocultas para los conocimientos actuales.

El gen *guaA* de *S. Paratyphi A* 9150, que codifica la GMP sintetasa, tiene un tamaño de 1.578 pb (SEQ ID nº: 36) y es en un 98% homólogo al gen *guaA* de *S. Typhi* Ty2, según se ha determinado mediante comparación de nucleótidos por NCBI BLAST. Pueden producirse mutantes de delección eliminando porciones de la región codificadora del gen *guaA* de *S. Paratyphi A*, de modo que se impida una actividad o un plegado adecuados de GuaA. Por ejemplo pueden deleccionarse de la región codificadora entre aproximadamente 25 y aproximadamente 1.500 pb, entre aproximadamente 75 y aproximadamente 1.400 pb, entre aproximadamente 100 y aproximadamente 1.300 pb, o todos ellos. Como alternativa, los mutantes de delección pueden producirse eliminando, por ejemplo, un fragmento de 1 a 100 pb del gen *guaA* de *S. Paratyphi A*, de modo que se desplace el marco de lectura adecuado del gen. En el último caso, puede producirse un polipéptido sin sentido o puede abortarse la síntesis del polipéptido debido a un codón de terminación inducido por desplazamiento del marco. El tamaño preferido de la delección es de aproximadamente 75 a 750 pb. También pueden realizarse delecciones que se extiendan más allá del gen *guaA*, es decir delecciones en los elementos que controlan la traducción del gen *guaA*, por ejemplo en un sitio de unión ribosómica.

El gen *guaB* de *S. Paratyphi A* 9150, que codifica la IMP deshidrogenasa, tiene un tamaño de 1.467 pb (SEQ ID nº: 35) y es en un 98% homólogo al gen *guaB* de *S. Typhi* Ty2, según se ha determinado mediante comparación de nucleótidos por NCBI BLAST. Pueden producirse mutantes de delección eliminando porciones de la región codificadora del gen *guaB* de *S. Paratyphi A*, de modo que se impida una actividad o un plegado adecuados de GuaB. Por ejemplo pueden deleccionarse de la región codificadora entre aproximadamente 25 y aproximadamente 1.400 pb, entre aproximadamente 75 y aproximadamente 1.300 pb, entre aproximadamente 100 y aproximadamente 1.200 pb, o todos ellos. Como alternativa, los mutantes de delección pueden producirse eliminando, por ejemplo, un fragmento de 1 a 100 pb del gen *guaB* de *S. Paratyphi A*, de modo que se desplace el marco de lectura adecuado del gen. En el último caso, puede producirse un polipéptido sin sentido o puede abortarse la síntesis del polipéptido debido a un codón de terminación inducido por desplazamiento del marco. El tamaño preferido de la delección es de aproximadamente 75 a 750 pb. También pueden realizarse delecciones que se extiendan más allá del gen *guaB*, es decir delecciones en los elementos que controlan la traducción del gen *guaB*, por ejemplo en un promotor.

El gen *clpP* de *S. Paratyphi A* 9150, que codifica una serina proteasa, tiene un tamaño de 624 pb (SEQ ID nº: 37) y es en un 99% homólogo al gen *clpP* de *S. Typhi* Ty2, según se ha determinado mediante comparación de nucleótidos por NCBI BLAST. Pueden producirse mutantes de delección eliminando porciones de la región codificadora del gen *clpP* de *S. Paratyphi A*, de modo que se impida una actividad o un plegado adecuados de ClpP. Por ejemplo pueden deleccionarse de la región codificadora entre aproximadamente 25 y aproximadamente 600 pb, entre aproximadamente 75 y aproximadamente 500 pb, entre aproximadamente 100 y aproximadamente 400 pb, o todos ellos. Como alternativa, los mutantes de delección pueden producirse eliminando, por ejemplo, un fragmento de 1 a 100 pb del gen *clpP* de *S. Paratyphi A*, de modo que se desplace el marco de lectura adecuado del gen. En el último caso, puede producirse un polipéptido sin sentido o puede abortarse la síntesis del polipéptido debido a un codón de terminación inducido por desplazamiento del marco. El tamaño preferido de la delección es de aproximadamente 25 a 600 pb. También pueden realizarse delecciones que se extiendan más allá del gen *clpP*, es decir delecciones en los elementos que controlan la traducción del gen *clpP*, por ejemplo en un promotor.

El gen *clpX* de *S. Paratyphi A* 9150, que codifica una chaperona ATPasa, tiene un tamaño de 1.272 pb (SEQ ID nº: 38) y es en un 99% homólogo al gen *clpX* de *S. Typhi* Ty2, según se ha determinado mediante comparación de nucleótidos por NCBI BLAST. Pueden producirse mutantes de delección eliminando porciones de la región codificadora del gen *clpX* de *S. Paratyphi A*, de modo que se impida una actividad o un plegado adecuados de ClpX. Por ejemplo pueden deleccionarse de la región codificadora entre aproximadamente 25 y aproximadamente 1.200 pb, entre aproximadamente 75 y aproximadamente 1.100 pb, entre aproximadamente 100 y aproximadamente 1.000 pb,

o todos ellos. Como alternativa, los mutantes de delección pueden producirse eliminando, por ejemplo, un fragmento de 1 a 100 pb del gen *clpX* de *S. Paratyphi A*, de modo que se desplace el marco de lectura adecuado del gen. En el último caso, puede producirse un polipéptido sin sentido o puede abortarse la síntesis del polipéptido debido a un codón de terminación inducido por desplazamiento del marco. El tamaño preferido de la delección es de aproximadamente 75 a 750 pb. También pueden realizarse delecciones que se extiendan más allá del gen *clpX*, es decir delecciones en los elementos que controlan la traducción del gen *clpX*, por ejemplo en un promotor.

Las delecciones pueden realizarse en cualquiera de los loci o genes aquí incluidos, utilizando sitios de restricción convenientes situados dentro de los loci o genes, o mediante una mutagénesis de sitio dirigido con oligonucleótidos (Sambrook y col., en: Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Ed., Cold Spring Harbor Publications (1989)).

Puede realizarse también una inactivación de los loci o genes mediante una inserción de ADN extraño, utilizando cualquier sitio de restricción conveniente, o mediante una mutagénesis de sitio dirigido con oligonucleótidos (Sambrook y col., *supra*), de modo que se interrumpa la transcripción correcta de los loci o genes. El tamaño típico de una inserción que pueda inactivar los loci o genes está entre 1 par de bases y 100 kpb, aunque son preferibles las inserciones inferiores a 100 kpb. La inserción puede realizarse en cualquier lugar dentro de las regiones codificadoras de los loci o genes o entre las regiones codificadoras y los promotores.

Otros métodos para la inactivación de los loci y los genes incluyen la transferencia a *Salmonella* de delecciones o inserciones realizadas en loci *guaBA*, genes *guaA*, *guaB*, *clpP* o *clpX* de otras enterobacterias, delecciones generadas por transposón, y la excisión imprecisa de inserciones de ADN.

Preferentemente, los loci y genes bacterianos se mutan empleando mutagénesis mediada por Lambda Red (Datsenko y Wanner, PNAS USA 97: 6640-6645 (2000)). Resumiendo, en la etapa 1 las bacterias huésped a las que va dirigida la mutación se transforman con un plásmido sensible a la temperatura que codifica λ , Red recombinasa. Estas bacterias se cultivan en presencia de arabinosa para inducir la producción de λ , Red. Se realiza una mutagénesis cromosómica de una secuencia diana mediante electroporación del huésped con ADN lineal en el que el gen diana se sustituye por un marcador de resistencia a los antibióticos. Este ADN codifica también regiones cortas de secuencias cromosómicas flanqueantes para permitir una integración cromosómica del marcador de resistencia mediante recombinación homóloga mediada por λ Red. Se seleccionan los recombinantes en un medio sólido que contiene el antibiótico adecuado y se incuban a una temperatura que facilita la pérdida del plásmido que codifica la λ Red recombinasa. Para la etapa 2, la retirada del marcador de resistencia cromosómico se facilita transformando las bacterias con un plásmido sensible a la temperatura que codifica FLP recombinasa y que se dirige a secuencias únicas dentro del marcador de resistencia a los antibióticos ahora presentes en el cromosoma huésped. Se cultivan transformantes a temperaturas permisivas para la presencia de la FLP recombinasa, que se expresa de manera constitutiva. Se criban los mutantes mediante PCR, se cultivan a una temperatura que facilita la pérdida del plásmido que codifica FLP recombinasa y se seleccionan para su almacenamiento.

Las cepas de *S. Paratyphi A* atenuadas de la presente invención pueden contener mutaciones en uno o más genes adicionales. Aunque la patente US nº 6.682.729 incluye una extensa discusión sobre mutaciones atenuantes adicionales de *Salmonella* spp., entre los ejemplos de genes se incluyen los que codifican diversas vías bioquímicas, sistemas reguladores globales, proteínas de choque térmico, otros genes reguladores y propiedades de virulencia putativas. Entre los ejemplos específicos de tales mutaciones atenuantes se incluyen, sin limitarse a las mismas: (i) mutaciones auxotróficas, tales como mutaciones de *aro*, *gua*, *nad*, *thy* y *asd*; (ii) mutaciones que inactivan funciones reguladoras globales, tales como mutaciones de *cya*, *crp*, *phoP/phoQ*, *phoP^c* y *ompR*; (iii) mutaciones que modifican la respuesta al estrés, tales como mutaciones de *recA*, *htrA*, *htrP*, *hsp* y *groEL*; (iv) mutaciones en factores de virulencia específicos, tales como mutaciones de *pag* y *prg*; (v) mutaciones que afectan a la topología del ADN, tales como mutaciones de *topA*; (vi) mutaciones que bloquean la biogénesis de polisacáridos de superficie, tales como mutaciones de *rfa*, *galE* y *via*; (vii) mutaciones que modifican sistemas suicidas, tales como mutaciones de *sacB*, *nuc*, *hok*, *gef*, *kil* y *phlA*; (viii) mutaciones que introducen sistemas suicidas, tales como lisógenos codificados por *P22*, λ murein transglicosilasa y gen *S*; y (ix) mutaciones que alteran o modifican el ciclo celular correcto, tales como mutaciones de *minB*.

B. Sistema plasmídico de expresión estabilizado

Las cepas de *S. Paratyphi A* atenuadas según la reivindicación 1 de la presente invención incluyen las cepas diseñadas por ingeniería para expresar polipéptidos seleccionados (antígenos). Tales cepas de *S. Paratyphi A* atenuadas pueden utilizarse para inducir una respuesta inmunitaria en la *S. Paratyphi* misma o para inducir una respuesta inmunitaria en los antígenos seleccionados expresados por las cepas de *S. Paratyphi A* atenuadas, o ambas respuestas.

Tales cepas de *S. Paratyphi A* atenuadas se transforman con un sistema plasmídico de expresión estabilizado. El sistema plasmídico de expresión estabilizado codifica un antígeno seleccionado.

El sistema plasmídico de expresión estabilizado comprende un vector de expresión que comprende un sistema de mantenimiento plasmídico (PMS) y una secuencia de nucleótidos que codifica un antígeno seleccionado.

El sistema plasmídico de expresión estabilizado optimiza el mantenimiento del vector de expresión en las bacterias en dos niveles independientes, mediante: (1) eliminación de la dependencia exclusiva de los sistemas de mantenimiento letales equilibrados y (2) incorporación de un sistema de partición plasmídica para impedir la segregación aleatoria de vectores de expresión, mejorando así su herencia y estabilidad.

- 5 El PMS incluye (a) un origen de replicación, (b) como mínimo una función de destrucción postsegregacional y (c) como mínimo una función de partición. Cada uno de los elementos del PMS mencionados puede ser un casete individual del sistema plasmídico de expresión estabilizado. Cada uno de los casetes puede comprender sitios de corte de enzima de restricción únicos situados en los extremos 5' y 3' de los casetes.

- 10 Los sistemas plasmídicos de expresión estabilizados preferentes son los descritos en la solicitud de patente US nº 11/542.264 en trámite.

1. Origen de replicación

- 15 El PMS incluye un origen de replicación de número de copias restringido que limita el vector de expresión a un margen de copias plasmídicas por célula. Debido a los diversos grados de toxicidad asociados a los diferentes antígenos seleccionados (por ejemplo toxicidad elevada para antígenos derivados de organismos parasitarios tales como el *Plasmodium falciparum* contra la ausencia prácticamente total de toxicidad para el fragmento C de la toxina del tétanos), el sistema plasmídico de expresión estabilizado de la presente invención está basado en un vector de expresión (plásmido) de número de copias bajo o medio. El técnico en la materia comprenderá que la selección de un origen de replicación dependerá del grado de toxicidad, es decir que el número de copias debería disminuir según aumenta la toxicidad con respecto a la cepa bacteriana.

- 20 Es preferible que el origen de replicación confiera un número medio de copias entre aproximadamente 2 y aproximadamente 75 copias por célula, entre aproximadamente 5 y aproximadamente 60 copias por célula, entre aproximadamente 5 y aproximadamente 30 copias por célula o entre aproximadamente 5 y aproximadamente 15 copias por célula. Los orígenes de replicación aquí incluidos se derivan del plásmido pAT153 de *E. coli* (*oriE1*, ~60 copias por equivalente cromosómico), el plásmido pACYC184 de *E. coli* (*ori15A*, ~15 copias por equivalente cromosómico) y el plásmido pSC101 de *Salmonella typhimurium* (*ori101*, ~5 copias por equivalente cromosómico). Las organizaciones estructurales de los casetes de origen de replicación obtenidos por ingeniería para pSC101, pACYC184 y pAT153 son análogas en estructura y función.

- 30 Los orígenes de replicación de la presente invención incluyen no sólo orígenes de replicación presentes en la naturaleza, sino también orígenes de replicación codificados por secuencias de nucleótidos que son esencialmente homólogas a secuencias de nucleótidos que codifican orígenes de replicación presentes en la naturaleza y que conservan la función de aquellas de los orígenes de replicación presentes en la naturaleza.

En realizaciones preferentes, la secuencia de nucleótidos que codifica el origen de replicación es una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo consistente en la secuencia *oriE1* de SEQ ID nº: 28, la secuencia *ori101* de SEQ ID nº: 30 y la secuencia *ori15A* de SEQ ID nº: 29.

- 35 En una realización especialmente preferente, el origen de replicación es el locus *oriE1* de pSC101 que confiere un número de copias de aproximadamente 5 copias por equivalente genómico, de SEQ ID nº: 28.

2. Función de partición

- 40 El PMS incluye también una función de partición, también conocida en la técnica y en el presente documento como "sistema de segregación" y "sistema de partición". La función de partición es cualquier función mejoradora de la estabilidad plasmídica que actúe aumentando la frecuencia de suministro exitoso de un plásmido a cada célula bacteriana recién dividida, en comparación con la frecuencia de suministro de un plásmido correspondiente sin dicha función. Entre los sistemas de partición se incluyen, por ejemplo, sistemas de equipartición, sistemas de partición par-sitio y los sistemas facilitados en la Tabla 1 del Capítulo 5, Partition Systems of Bacterial Plasmids, B.E. Funnell y R.A. Slavcev, en Plasmid Biology. 2004, BE Funnell y GJ Phillips, ed. ASM Press, Washington, DC.

- 45 Los sistemas de partición de la presente invención incluyen no sólo sistemas de partición presentes en la naturaleza, sino también sistemas de partición codificados por secuencias de nucleótidos que son esencialmente homólogas a las secuencias de nucleótidos que codifican sistemas de partición presentes en la naturaleza y que conservan la función de los sistemas de partición naturales.

- 50 Ejemplos de funciones de partición incluyen, sin limitación, sistemas de pSC101, el factor F, el profago P1 y los plásmidos de resistencia a los fármacos IncFII.

En particular puede utilizarse el locus de partición pasivo *par*. La función del locus *par* parece estar relacionada con el sobre enrollado plasmídico creciente en el origen de replicación, que también es el sitio de unión para ADN girasa. Un ejemplo de secuencia *par* es la de *E. coli*, de SEQ ID nº: 32 (Miller y col., Nucleotide sequence of the partition

locus of *Escherichia coli* plasmid pSC101, Gene 24:309-15 (1983); n° de registro GenBank X01654, nucleótidos 4524 - 4890).

También puede emplearse el locus *parA* de partición activa. En SEQ ID n°: 31 se expone un ejemplo de secuencia de locus *parA*.

5 3. Función de destrucción postsegregacional

El PMS incluye además como mínimo una función de destrucción postsegregacional (PSK). La función PSK es una función que resulta en la muerte de toda célula bacteriana recién dividida que no herede el plásmido de interés, e incluye específicamente sistemas letales equilibrados tales como *asd* o *ssb*, sistemas proteicos tales como *phd-doc* y sistemas antisentido tales como *hok-sok*.

10 La función PSK de la presente invención incluye no sólo funciones PSK presentes en la naturaleza, sino también funciones PSK codificadas por secuencias de nucleótidos que son esencialmente homólogas a las secuencias de nucleótidos que codifican funciones PSK presentes en la naturaleza y que conservan la función presentada por las funciones PSK naturales.

15 En realizaciones preferentes, la función PSK es el sistema letal equilibrado *ssb*. Se utiliza la proteína de unión a cadena simple (SSB) de *S. Typhi* para transcomplementar una mutación de otro modo letal introducida en el gen *ssb* cromosómico. Los papeles bioquímico y metabólico de la proteína SSB de *E. coli* se han analizado extensamente en Lohman y col., Annual Reviews in Biochemistry 63:527, 1994 y Chase y col., Annual Reviews in Biochemistry 55:103, 1986.

20 En las cepas de *S. Paratyphi A* de la presente invención que comprenden un sistema plasmídico de expresión estabilizado donde la función PSK es el sistema letal equilibrado *ssb*, el locus *ssb* nativo de las bacterias se inactiva. El locus *ssb* nativo puede inactivarse por cualquier medio conocido en la técnica, tal como un vector suicida que comprenda un origen de replicación sensible a la temperatura o por mutagénesis mediada por Lambda-Red (Datsenko y Wanner, PNAS USA 97:6640-6645 (2000)). En un aspecto preferente, la mutagénesis mediada por Lambda Red se utiliza para inactivar el locus *ssb* de las cepas de *S. Paratyphi A* atenuadas de la presente invención.

25 En otro aspecto de la invención, la función PSK es el locus *ssb* en el que, como promotores de la función PSK de *ssb*, se utilizan tanto el promotor del gen *ssb* inducible como el promotor del gen *ssb* constitutivo. En una realización preferente, la función PSK comprende un promotor inducible de *ssb*, un promotor constitutivo de *ssb* y una región codificadora de *ssb*. El locus *ssb* es preferentemente el locus *ssb* de *Shigella flexneri*, de *Salmonella Typhi* o de *E. coli*. En una realización, el locus *ssb* es el locus *ssb* de la cepa CVD 1208s de *S. flexneri* 2a mostrado en la SEQ ID n°: 34.

30 En un aspecto relacionado de la invención pueden incorporarse al sistema plasmídico de expresión estabilizado alelos mutados tales como *ssb-1* (o cualquier mutación funcionalmente equivalente a este alelo, tal como W54S; Carlini y col., Mol. Microbiol. 10:1067-1075 (1993)), con el fin de mejorar los plásmidos de número de copias elevado mediante una sobreexpresión de proteínas afines a SSB1 para formar los tetrámeros biológicamente activos de SSB requeridos.

En otra realización, el PMS comprende dos funciones PSK.

4. Antígeno seleccionado

40 El sistema plasmídico de expresión estabilizado comprende también un polinucleótido que codifica el antígeno seleccionado bajo el control de un promotor.

El promotor es preferentemente un promotor regulable con respecto al entorno, controlado por una señal biológicamente relevante tal como la osmolaridad. En una realización preferente, el promotor es el promotor *ompC*. El gen *ompC* codifica una proteína porina que se inserta en forma de trímero en la membrana exterior de una célula bacteriana. La expresión y el control de *ompC* se han analizado en detalle en Pratt y col., Molecular Microbiology 20:911, 1996 y Egger y col., Genes to Cells 2: 167, 1997. En una realización preferente, el fragmento del promotor *ompC* de *E. coli* se muestra en la SEQ ID n°: 33. Véase la patente US n° 6.703.233. La transcripción de este casete puede terminarse en la región 3'-distal mediante un terminador transcripcional *trpA*.

En un aspecto, el promotor inducible es el promotor P_{ompC3} o P_{ompC1} mutado. El promotor puede emplearse para controlar exclusivamente la transcripción del antígeno seleccionado aguas abajo.

50 La invención abarca la expresión de cualquier antígeno que no destruya la cepa de *S. Paratyphi A* atenuada que lo expresa y que provoque una respuesta inmunitaria cuando se administra al sujeto la cepa de *S. Paratyphi A*

atenuada que expresa el antígeno. Los antígenos seleccionados pueden ser homólogos (de *S. Paratyphi* A) o heterólogos.

Entre los ejemplos, no limitativos, del antígeno seleccionado se incluyen: antígeno de toxina Shiga 1 (Stx1), antígeno de toxina Shiga 2 (Stx2), hepatitis B, *Haemophilus influenzae* tipo b, hepatitis A, pertussis acelular (_{ac}P), varicela, rotavirus, *Streptococcus pneumoniae* (neumocócico) y *Neisseria meningitidis* (meningocócico). Véase Ellis y col., *Advances in Pharm.*, 39:393423, 1997. Si el antígeno es un antígeno de toxina Shiga 2, el antígeno de toxina Shiga 2 puede, por ejemplo, ser un pentámero de subunidad B o bien una Stx 2 genéticamente destoxificada. Entre otros antígenos de relevancia para la biodefensa se incluyen: 1) uno o más dominios de la parte del antígeno protector PA83 de la toxina carbuncosa, incluyendo, pero sin limitarse al mismo, el dominio 4 (el dominio de unión celular eucariota; D4), la forma biológicamente activa de 63 kDa procesada de PA83, o el PA83 en toda su longitud; y 2) antígenos de *Clostridium botulinum* que comprenden el fragmento de cadena pesado de unión celular eucariota de cualquier neurotoxina serotipo A, B, C, D, E, F o G, en cualquier combinación. Entre otros antígenos seleccionados se incluyen todos los descritos en la patente US nº 6.190.669.

En un aspecto, el antígeno seleccionado es un antígeno que induce una respuesta inmunitaria al cáncer. En otro aspecto, el antígeno seleccionado está diseñado para provocar una respuesta inmunitaria a autoantígenos, receptores de células B y/o receptores de células T implicados en enfermedades autoinmunes o inmunológicas. Por ejemplo, en los casos en que se provoquen respuestas inmunitarias inadecuadas contra tejidos corporales o antígenos ambientales, las composiciones inmunizadoras de la presente invención pueden utilizarse para inducir una respuesta inmunitaria a los autoantígenos, receptores de células B y/o receptores de células T para modular las respuestas y mejorar las enfermedades. Por ejemplo, tales técnicas pueden resultar eficaces para tratar la miastenia grave, el lupus eritematoso, la artritis reumatoide, la esclerosis múltiple, alergias y el asma.

En otro aspecto de la presente invención, el sistema plasmídico de expresión estabilizado puede incluir un polinucleótido que codifique un marcador seleccionable o un marcador sensible a la temperatura, tal como un marcador de resistencia a los fármacos. Un ejemplo no limitativo de marcador de resistencia a los fármacos es *aph*, del que en la técnica actual se sabe que confiere resistencia a los aminoglucósidos kanamicina y/o neomicina.

En el presente documento, los términos "en esencia homólogo" o "esencialmente homólogo" en relación con una secuencia de nucleótidos o una secuencia de aminoácidos indican que la secuencia de ácidos nucleicos o la secuencia de aminoácidos tiene suficiente homología con respecto a la secuencia de referencia (por ejemplo una secuencia nativa o presente en la naturaleza) para permitir a la secuencia realizar la misma función básica que la secuencia de referencia correspondiente; en general, una secuencia esencialmente homóloga es al menos aproximadamente en un 70 por ciento idéntica a la secuencia de referencia, en general como mínimo aproximadamente en un 85 por ciento idéntica, con preferencia como mínimo aproximadamente en un 90 o un 95 por ciento idéntica y con la máxima preferencia aproximadamente en un 96, 97, 98 o 99 por ciento idéntica, a dicha secuencia de referencia. Se entiende que, en esta memoria descriptiva, cuando se haga referencia a secuencias de nucleótidos y/o secuencias de aminoácidos específicas, tales secuencias de nucleótidos y/o secuencias de aminoácidos pueden sustituirse por secuencias esencialmente homólogas.

C. Métodos para inducir una respuesta inmunitaria

La presente invención incluye también una formulación farmacéutica según las reivindicaciones 19 y 20 para su uso en métodos para inducir en un sujeto una respuesta inmunitaria a la cepa de *S. Paratyphi* A atenuada misma, a un antígeno seleccionado expresado por una cepa de *S. Paratyphi* A atenuada transformada con un sistema plasmídico de expresión estabilizado, o a ambos.

En una realización, el empleo de una formulación farmacéutica según las reivindicaciones 19 y 20 para su uso en métodos para inducir una respuesta inmunitaria comprende la administración a un sujeto de una o más de las cepas de la presente invención en una cantidad suficiente para inducir una respuesta inmunitaria en él. En el presente documento, la cepa de la presente invención incluye cepas de *S. Paratyphi* A atenuadas tanto transformadas como no transformadas.

En otra realización, el empleo de una formulación farmacéutica según las reivindicaciones 19 y 20 para su uso en métodos para inducir una respuesta inmunitaria comprende la administración a un sujeto de la formulación farmacéutica que comprende una o más de las cepas de la presente invención en una cantidad suficiente para inducir una respuesta inmunitaria en el sujeto (una cantidad inmunológicamente eficaz).

Por conveniencia, en el presente documento nos referiremos a las cepas de la presente invención y a las formulaciones farmacéuticas que comprenden las cepas como "composiciones inmunizadoras". El técnico en la materia comprenderá que composiciones inmunizadoras es sinónimo de vacunas.

En el presente documento, una "respuesta inmunitaria" es la respuesta fisiológica del sistema inmunitario del sujeto a la composición inmunizadora. Una respuesta inmunitaria puede incluir una respuesta inmunitaria innata, una respuesta inmunitaria adaptativa, o ambas.

En una realización preferente de la presente invención, la respuesta inmunitaria es una respuesta inmunitaria protectora. Una respuesta inmunitaria protectora confiere memoria celular inmunológica al sujeto, con el efecto de que una exposición secundaria al mismo antígeno o a uno similar está caracterizada por una o más de las siguientes características: fase de latencia más corta que la fase de latencia resultante de la exposición al antígeno seleccionado en ausencia de una exposición previa a la composición inmunizadora; producción de anticuerpos que continúa durante un periodo más largo que la producción de anticuerpos resultante de la exposición al antígeno seleccionado en ausencia de una exposición previa a la composición inmunizadora; un cambio en el tipo y la calidad de los anticuerpos producidos en comparación con el tipo y la calidad de los anticuerpos producidos con una exposición al antígeno seleccionado en ausencia de una exposición previa a la composición inmunizadora; un desplazamiento en la respuesta de clase, con una aparición de anticuerpos IgG en mayores concentraciones y con una mayor persistencia que IgM, en relación con lo que ocurre en respuesta a una exposición al antígeno seleccionado en ausencia de una exposición previa a la composición inmunizadora; una afinidad media (constante de unión) entre los anticuerpos y el antígeno mayor que la afinidad media entre los anticuerpos y el antígeno resultante de una exposición al antígeno seleccionado en ausencia de una exposición previa a la composición inmunizadora; y/u otras características de las que conocidas en el estado actual de la técnica por caracterizar una respuesta inmunitaria secundaria.

El sujeto al que pueden administrarse las composiciones inmunizadoras es preferentemente un humano, pero también puede ser otro mamífero, por ejemplo simios, perros, gatos, caballos, vacas o cerdos, o aves, por ejemplo gallinas.

En una realización, el sujeto es un sujeto con riesgo de desarrollar una infección por *S. Paratyphi A*. En otra realización, el sujeto es inmunológicamente *naïve* o, como alternativa, presenta una inmunidad preexistente a la infección por *S. Typhi* o la infección por *S. Paratyphi A*.

En otra realización, el sujeto al que se administran las cepas de la presente invención desarrolla una respuesta inmunitaria protectora contra la fiebre paratifoidea.

D. Formulaciones, dosis y modos de administración

Las cepas atenuadas de la presente invención, tanto las no transformadas como las transformadas con un sistema plasmídico de expresión estabilizado, pueden administrarse a un sujeto para inducir una respuesta inmunitaria. En una realización preferente, las cepas de la presente invención se administran en una formulación farmacéutica.

Las formulaciones farmacéuticas de la presente invención pueden incluir vehículos, excipientes y otros ingredientes, tales como adyuvantes, farmacéuticamente aceptables. Los vehículos, excipientes y otros ingredientes farmacéuticamente aceptables son compuestos, soluciones, sustancias o materiales que son compatibles con las cepas de la presente invención y no son indebidamente perjudiciales para su destinatario. En particular, los vehículos, excipientes y otros ingredientes de la presente invención son aquellos que resultan útiles para preparar una formulación farmacéutica que, en líneas generales, sea segura, no sea tóxica, no sea indeseable desde el punto de vista biológico ni desde otro punto de vista y pueda presentar perfiles farmacológicamente favorables, e incluyen vehículos, excipientes y otros ingredientes aceptables tanto para el uso veterinario como para el uso farmacéutico en humanos.

En el estado actual de la técnica son bien conocidos vehículos y excipientes farmacéuticamente aceptables adecuados, que el técnico en la materia puede determinar según lo justifique la situación clínica. El técnico en la materia entenderá que los diluyentes están incluidos en el alcance de los términos "vehículos" y "excipientes". Entre los ejemplos de vehículos y excipientes adecuados se incluyen: solución salina, solución salina tamponada, dextrosa, agua, glicerol, etanol y más en particular: (1) solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco, pH aproximadamente 7,4, que contiene aproximadamente 1 mg/ml a 25 mg/ml de seroalbúmina humana, (2) solución salina al 0,9% (0,9% p/v NaCl), (3) dextrosa al 5% (p/v) y (4) agua.

El modo de administración de las composiciones inmunizadoras de la presente invención puede ser cualquier método y/o medio de suministro adecuado que tenga como resultado la inducción de una respuesta inmunitaria en el sujeto. Los medios de suministro pueden incluir, sin limitación, métodos de administración parenteral, tales como inyección subcutánea (SC), inyección intravenosa (IV), transdérmica, intramuscular (IM), intradérmica (ID), así como de administración no parenteral, por ejemplo oral, nasal, intravaginal, pulmonar (inhalación), oftálmica, rectal, o cualquier otro método que tenga como resultado un contacto de la composición inmunogénica con los tejidos mucosos. La administración es preferentemente vía oral.

En una realización de la presente invención, las composiciones inmunizadoras existen en forma de una dispersión atomizada para el suministro por inhalación. Mediante métodos convencionales pueden prepararse diversas formulaciones líquidas y en polvo para su inhalación en los pulmones del sujeto a tratar. En general, la dispersión atomizada de las composiciones inmunizadoras contiene vehículos habituales para dispersiones atomizadas o en aerosol, tales como solución salina tamponada y/u otros compuestos bien conocidos por el técnico en la materia. El suministro de las composiciones inmunogénicas mediante inhalación tiene el efecto de dispersar rápidamente las

composiciones inmunizadoras en una gran área de los tejidos mucosos, así como de una rápida absorción por la sangre para la circulación de las composiciones inmunizadoras.

Adicionalmente, las composiciones inmunizadoras existen también en forma líquida. El líquido puede ser para la administración vía oral, vía oftálmica o nasal en forma de gotas, o para el uso como enema o irrigación. Si la composición inmunizadora está formulada en forma de líquido, el líquido puede ser bien una solución o bien una suspensión de la composición inmunizadora. Existen diversas formulaciones adecuadas para la solución o suspensión de la composición inmunizadora ya conocidas por el técnico en la materia, que dependen del uso previsto para las mismas. Las formulaciones líquidas para la administración vía oral preparadas en agua u otros vehículos acuosos pueden contener diversos agentes de suspensión, por ejemplo metilcelulosa, alginatos, tragacanto, pectina, kelgina, carragenina, goma arábiga, polivinilpirrolidona y alcohol polivinílico. Las formulaciones líquidas pueden incluir también soluciones, emulsiones, jarabes y elixires que contengan, junto con las composiciones inmunizadoras, agentes humectantes, edulcorantes, colorantes y aromatizantes.

El suministro de las composiciones inmunizadoras descritas en forma líquida mediante la administración vía oral expone la mucosa de los tractos gastrointestinal y urogenital a las composiciones inmunizadoras. Una dosis adecuada, estabilizada para resistir los valores pH extremos del estómago, suministra la composición inmunizadora en todas las zonas del tracto gastrointestinal, especialmente sus partes superiores. Para el uso con las composiciones inmunizadoras aquí descritas se contemplan cualesquiera métodos adecuados para estabilizar la composición inmunizadora en una dosificación oral líquida de manera que el suministro efectivo de la composición se distribuya a lo largo del tracto gastrointestinal, incluyendo cápsulas y una solución salina tamponada resuspendida para proteger las bacterias atenuadas contra el pH ácido. Los vehículos o diluyentes farmacéuticamente aceptables empleados en concreto no son críticos para la presente invención y son habituales en la técnica actual. Entre los ejemplos de diluyentes se incluyen: tampones para el tamponado contra el ácido gástrico del estómago, tales como tampón citrato (pH 7,0) con contenido en sacarosa, tampón bicarbonato (pH 7,0) solo o tampón bicarbonato (pH 7,0) con contenido en ácido ascórbico, lactosa y opcionalmente aspartamo (Levine y col., Lancet, II:467-470 (1988)). Entre los ejemplos de vehículos se incluyen: proteínas, por ejemplo aquellas se hallan en la leche desnatada; azúcares, por ejemplo sacarosa; o polivinilpirrolidona.

El suministro de las composiciones inmunizadoras descritas en forma líquida por medio de gotas oftálmicas expone la mucosa de los ojos y los tejidos asociados a las composiciones inmunizadoras. Un vehículo líquido típico para las gotas oculares está tamponado y contiene otros compuestos ya conocidos y fácilmente identificables para el técnico en la materia.

El suministro de las composiciones inmunizadoras descritas en forma líquida por medio de aerosol o gotas nasales expone la mucosa de la nariz y los senos y los tejidos asociados a las composiciones inmunizadoras. En general, los vehículos líquidos para las gotas nasales son diversas formas de solución salina tamponada.

Las formulaciones inyectables de las composiciones inmunizadoras pueden contener diversos vehículos, tales como aceites vegetales, dimetilacetamida, dimetilformamida, lactato de etilo, carbonato de etilo, miristato de isopropilo, etanol, polioles (glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido) y similares. Los excipientes fisiológicamente aceptables pueden incluir, por ejemplo, dextrosa al 5%, solución salina al 0,9%, solución de Ringer u otros excipientes adecuados. Las preparaciones intramusculares pueden disolverse y administrarse en un excipiente farmacéutico tal como agua para inyección, solución salina al 0,9% o solución de glucosa al 5%.

Las cepas de *S. Paratyphi A* atenuadas de la presente invención pueden administrarse a un sujeto junto con otros agentes farmacológica o fisiológicamente activos, por ejemplo sustancias antigénicas y/u otras sustancias biológicamente activas.

Las cepas de *S. Paratyphi A* atenuadas que comprenden un sistema plasmídico de expresión estabilizado pueden administrarse a un sujeto antes, durante o después de que haya comenzado la expresión del antígeno seleccionado. Por ejemplo, la cepa de *S. Paratyphi A* atenuada que comprende un sistema plasmídico de expresión estabilizado puede cultivarse durante cierto tiempo antes de su administración a un sujeto, para permitir a las bacterias producir cantidades suficientes del antígeno seleccionado, de manera que al administrarse las bacterias se provoque una respuesta inmunitaria al antígeno seleccionado.

La cantidad y la velocidad de administración de las composiciones inmunizadoras de la presente invención pueden ser fácilmente determinadas por el técnico en la materia sin una excesiva experimentación, por ejemplo utilizando técnicas de determinación por titulación de anticuerpos convencionales y protocolos de bioeficacia/biocompatibilidad convencionales. La cantidad y la velocidad de administración variarán en función de factores tales como el peso y la salud del sujeto, la identidad de las bacterias que se están administrando al sujeto, la identidad del polipéptido expresado en las cepas diseñadas por ingeniería para expresar un antígeno seleccionado, el efecto terapéutico deseado, el intervalo de tiempo de bioactividad deseado y el modo de administración de la composición inmunizadora.

En general, la cantidad de una composición inmunizadora administrada a un sujeto es una cantidad suficiente para inducir en el sujeto una respuesta inmunitaria a una cepa de *S. Paratyphi A* o al antígeno seleccionado expresado por la cepa de *S. Paratyphi A* (una cantidad inmunológicamente eficaz). La respuesta inmunitaria es preferentemente una respuesta inmunitaria protectora.

- 5 En general, la dosis empleada contendrá entre aproximadamente 10^2 cfu y 10^{10} cfu de la cepa de *S. Paratyphi A*, con preferencia entre aproximadamente 10^2 cfu y 10^7 cfu, o entre aproximadamente 10^6 cfu y 10^9 cfu. Las formulaciones para la administración oral comprenden entre aproximadamente 10^2 cfu y 10^{10} cfu de la cepa de *S. Paratyphi A*, con preferencia entre aproximadamente 10^6 cfu y 10^9 cfu, y la formulación se halla en una cápsula o resuspendida en una solución tampón para proteger las bacterias atenuadas contra el pH ácido del estómago. Las
10 formulaciones para la administración nasal comprenden entre aproximadamente 10^2 cfu y 10^{10} cfu de la cepa de *S. Paratyphi A*, con preferencia entre aproximadamente 10^2 cfu y 10^7 cfu, y se utilizan para una administración intranasal donde las bacterias se suministran en forma de gotas o aerosol.

- 15 Las composiciones inmunizadoras pueden administrarse en una única dosis o en múltiples dosis a lo largo de periodos de tiempo prolongados. En particular, las composiciones inmunizadoras pueden administrarse durante un periodo de una semana, dos semanas, tres semanas, un mes, seis semanas, dos meses, diez semanas, tres meses, cuatro meses, seis meses, un año, o durante periodos prolongados de más de un año.

- 20 Las composiciones inmunizadoras pueden suministrarse en una unidad de dosificación para lograr una dosificación uniforme y facilitar la administración. Cada forma de unidad de dosificación contiene una cantidad predeterminada de las cepas de la presente invención calculada para producir una respuesta inmunitaria deseada, junto con un vehículo, excipiente u otro ingrediente farmacéuticamente aceptable.

La presente solicitud describe también un kit no reivindicado, que comprende una o más de las composiciones inmunizadoras de la presente solicitud y opcionalmente medios para administrar las composiciones e instrucciones para ello.

E. EJEMPLOS

25 1. Cepas bacterianas y condiciones de cultivo

- Para todas las construcciones plasmídicas se utilizó la cepa de *Escherichia coli* DH5 alfa. La cepa de *S. Typhi* viva atenuada CVD 908-*htrA* contiene mutaciones de delección en *aroC* y *aroD*, que interrumpen la vía de biosíntesis de compuesto aromático, y *htrA*, que codifica una proteína de respuesta al estrés (véase Infect Immun. 60:2 (1992), pp. 536-541 y J. Biotechnol. 44:1-3 (1996), pp. 193-196). Se adquirió el lote # 11848 de *S. Paratyphi A* 9150 de
30 American Type Culture Collection (Manassas, VA), que se almacenó como CV 223 y CV 224. En todos los experimentos se utilizó el CV 223.

- Se cultivó la *E. coli* DH5 alfa utilizando medio líquido Luria Bertani (LB) o agar (Difco, Detroit, Mich), complementado con los antibióticos carbenicilina (carb; 50 µg/ml), kanamicina (kan; 50 µg/ml) o cloranfenicol (cml; 25 µg/ml) cuando era necesario. Se cultivaron la CVD 908-*htrA* y la *S. Paratyphi A* 9150 y sus derivados con 2x medio de soja (20 g de
35 peptona Hy-soy, 10 g de extracto de levadura Hy-soy, 3 g de NaCl, ± 15 g de agar granulado (Difco) por litro) con guanina (0,001% v/v) y antibióticos añadidos cuando era necesario. Los cultivos líquidos se incubaron a 30°C o 37°C, a 250 rpm, durante 16-24 horas, a no ser que se indique otra cosa.

- El medio mínimo modificado (MMM) utilizado para el análisis de complementación estaba compuesto de sales M9 (K₂HPO₄, 7 g/l; KH₂PO₄, 3 g/l; (NH₄)₂SO₄, 1 g/l (pH 7,5)), 0,5% (p/v) de casaminoácidos (Difco), 0,5% (p/v) de
40 glucosa, 0,01% (p/v) de MgSO₄·7H₂O, 15 g de agar granulado (Difco) por litro y 1 µg/ml de vitamina B1.

2. Plásmidos y técnicas de genética molecular

- Para la construcción de los plásmidos aquí representados se utilizaron técnicas estándar (véase, por ejemplo, Sambrook y col., 1989). La extracción de plásmidos y la purificación con gel de los fragmentos de ADN se realizaron empleando los kits QIAprep Spin Miniprep y QIAquick Gel Extraction, respectivamente, según las instrucciones del
45 fabricante (Qiagen Inc., Valencia, CA). Se utilizaron los plásmidos pCR-Blunt II-TOPO (Invitrogen, Carlsbad, CA), pGEM®-T o pGEM®-T Easy (Promega, Madison, WI) como productos intermedios para clonar productos de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de extremo romo generados con Vent™ DNA Polymerase (New England Biolabs, Ipswich, MA). El plásmido pLowBlu 184 (E.M. Barry, datos no publicados; CVD, University of Maryland, Baltimore) es un plásmido de bajo número de copias que está basado en pACYC184 (ATCC), pero que contiene la
50 secuencia del operón lactosa de pGEM®-5Zf(+) (2767 - 273 pb; Promega, Madison, WI) en lugar del gen de resistencia a la tetraciclina entre *Aval* y *HindIII*. Se utilizó ADN polimerasa Taq-Pro™ (Denville Sci., Metuchen, NJ) para una mutagénesis mediada por lambda Red, y para una PCR de diagnóstico utilizando 5 µl de una única colonia bacteriana diluida en 20 µl de agua estéril. La ADN polimerasa Taq-Pro™ se utilizó también para añadir a la PCR de
tratamiento previo fragmentos generados mediante ADN polimerasa Vent™ antes de clonar en pGEM®-T o pGEM®-T Easy. Todas las enzimas de restricción se adquirieron de New England Biolabs. Se utilizó ADN polimerasa T4
55

(NEB) para crear fragmentos de ADN de extremo romo. Se realizó una electroporación de cepas en un aparato Gene Pulser (Bio-Rad) ajustado a 2,5 kV, 200 Ω y 25 μ F. Los marcadores de peso molecular empleados en la electroforesis en gel de ADN son O'GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder, ready-to-use (#SM1163, Fermentas, Hanover, MD).

5 3. Mutagénesis mediada por Lambda Red

Esta técnica se realizó según describen Datsenko y Wanner (Proc Natl Acad Sci USA, 6 de junio de 2000; 97(12):6640-50), con ciertas modificaciones. Resumiendo, se añadieron 10 colonias de bacterias que llevaban el plásmido auxiliar de Red pKD46 (remitimos al lector a la referencia de Datsenko y Wanner para más información sobre este plásmido) a 20 ml de 2x medio de soja, complementado con carbenicilina y L-arabinosa (0,2%), y se cultivaron a 30°C, 250 rpm, durante 3 horas (OD 600 nm de ~ 0,6). Se volvieron las bacterias electrocompetentes lavando 3 veces con agua estéril fría y concentrando en un factor de 100. Se sometieron las células competentes a una electroporación con 100 ng - 1 μ g de producto de PCR purificado en gel. Después de la electroporación, se repararon las bacterias utilizando 2x medio de soja con o sin guanina. Se incubaron las células en 2x medio de soja a 37°C, durante 3 horas, antes de cultivarlas en placas de 2x agar de soja con contenido en guanina y cml durante la noche. Se seleccionaron colonias resistentes a los antibióticos y se cribaron mediante PCR en cuanto a alteraciones en las regiones cromosómicas de interés. Las colonias positivas se extendieron de nuevo en líneas sobre 2x medio de soja que contenía cml, pero no contenía carbenicilina, para asegurar la pérdida de pKD46. La retirada del casete de resistencia a cml se realizó según describen Datsenko y Wanner e implicó la utilización de pCP20. Las colonias que presentaban el genotipo deseado se extendieron de nuevo en líneas sobre 2x medio de soja sin antibióticos para asegurar la pérdida del fenotipo de resistencia a los antibióticos. Las seleccionadas para el almacenamiento se cribaron de nuevo mediante PCR antes de congelarlas a -70°C en 2x medio de soja que contenía glicerol al 20% (v/v).

4. Aglutinación

Se ensayaron cepas de *S. Paratyphi* A con sueros comerciales (Difco™ Salmonella O Antiserum Group A, Becton Dickson, Sparks, MD, lote # 4092221). Resumiendo, un pequeño inóculo de bacterias tomado de una placa fresca se emulsionó en 20 μ l de PBS en un portaobjetos de cristal. Se añadieron 5 μ l de antisueros y se agitó el portaobjetos suavemente hasta observarse aglutinación. Como bacterias de control negativo se utilizó la cepa vacunal de *S. flexneri* CVD 1208 (J Infect Dis. 15 de noviembre de 2004; 190(10):1745-54) o *E. coli* DH5 alfa.

5. Evaluación de virulencia mediante inoculación intraperitoneal de ratones

Se evaluó la virulencia de la *Salmonella* según se ha descrito previamente en Infect Immun. agosto de 2001; 69(8):4734-41. Resumiendo, a ratones BALB/c hembra (Charles River Breeding Laboratories, Inc., Wilmington, Mass.), de 6 a 8 semanas de edad (tres ratones por grupo, tres grupos por cepa vacunal), se les inyectaron vía intraperitoneal (i.p.) diversas diluciones en un factor de 10 de las bacterias (cultivadas en presencia de guanina y antibióticos cuando era necesario, y resuspendidas en solución salina tamponada con fosfato PBS), mezcladas con mucina gástrica de cerdo al 10% (peso/volumen) (Difco, lote #4092018) en un volumen final de 0,5 ml. Los ratones se observaron en cuando a una cercanía extrema a la muerte o la muerte, cada 24 horas durante 72 horas después de la inoculación. La dosis 50% letal (LD50) para cada grupo de ratones se calculó mediante análisis de regresión lineal.

6. Construcción de una delección en *guaBA*.

La secuenciación del genoma de *S. Paratyphi* A estaba incompleta al comienzo de este proyecto. Por tanto, todos los cebadores de oligonucleótidos y moldes de ADN subsiguientes para la mutagénesis mediada por Lambda Red se construyeron en base a la secuencia genómica de *S. Typhi* Ty2 anotada (número de registro Genbank NC_004631, versión del 16 de diciembre de 2004). La comparación de las secuencias de las regiones mutadas en *S. Paratyphi* A con las de *S. Typhi* reveló más de un 99% de identidad de la secuencia de ADN.

Los genes que codifican inosina-5'-monofosfato deshidrogenasa (*guaB*) y guanosina monofosfato sintetasa (*guaA*) forman un operón y están situados en los pb 414059 a 417178 en el genoma de *S. Typhi* Ty2 (SEQ ID n°: 26; véase también la patente US n° 6.190.669 para información detallada con relación a los loci *guaBA*). Los cebadores CVOL 13 y CVOL 15 (tabla 1) se unen a secuencias fuera de la región designada para la mutación. Se diseñaron los cebadores CVOL 28 y CVOL 32 para la unión a las regiones del plásmido molde de Lambda Red pKD3. El producto de PCR resultante codificaba un cartucho de resistencia a cml flanqueado a cada lado por 100 pb de secuencia homóloga a *guaBA* en las posiciones 413846 a 413945 (CVOL 28) y 417109 a 417010 (CVOL 32) en el genoma de *S. Typhi* Ty2, respectivamente.

Tabla 1

Nombre ^a	Secuencia ^a	SE ID NO:	Diana get	Región ^b
CVOL 13	CTGCAGTCATTCCCCTCAATGGTAGC	4	Ty2	417176 - 417158
CVOL 15	GGAACATCGCACAGCGCA	5	Ty2	413715 - 413732
CVOL 26	GTGTAGGAGCTGCTTCG	6	pKD3	31 - 50
CVOL 27	<u>CATATGA</u> AATATCCTCCTTAG	7	pKD3	1044 - 1025
CVOL 28	CGAACCGTCTGGTTAAGGCGGCTTACGGTAAAAAT TGAGGAAGTTTGAGAGGATAACATGTGAGCGGGAT CAAATTCTAAATCAGCAGGTTATTCAATCGTGTAG GCTGGAGCTGCTTC	8	pKD3	31 - 50
CVOL 32	TTCATTGATGATGCGGTTGGAAACACGACCCAGGA AGTCATACGGCAGGTGCGCCAGTGCGCGGTCATA AAGTCGATGGTTTCGACAGCACGCAGAGAGCATAT GAATATCCTCCTTAG	9	pKD3	1044 - 1025
CVOL41	GAAGGAGTATTGCCCATGCTACGTATCG	10	Ty2	414057 - 414077
CVOL 64	<u>CATATGA</u> AGGAGTATTGCCCATGCT ACGTATCGCTAAAGAAG	11	Ty2	414057 - 414086
CVOL 65	<u>ATGCATCT</u> GCAAGTCATTCCCCTCAA TGGTAGCCGG	12	Ty2	417176-417155
CVOL 85	ACAGATAAACGCAAAGATGGCTCGGGCAAA	13	Ty2	2484865 - 2484836
CVOL 86	TTATTCGCCAGAAGCCTGCGCTTCCGGTTT	14	Ty2,	2483597 - 2483626
CVOL 87	CCTGAGAATGGCATTTCGCTCGTCGTGTGC	15	Ty2	2484929 - 2484900
CVOL 88	ACGGCGTGTTTACAGGAAAAACGAAAGGGG	16	Ty2	2483520 - 2483549
CVOL89	TCATACAGCGGAGAACGAGATAATTTGGCC	17	Ty2	2485740 - 2485711
CVOL 90	TTACATAAGTAAGTCACTGGGAGGCGCGCT	18	Ty2	2485027 - 2485056
CVOL 91	TCCATCAGGTTACAATCAGTACAGCAGATT	19	Ty2	2485800 - 2485771
CVOL 92	TCATTAGTATATACACAAAATCATTGAGC	20	Ty2	2484961 - 2484990
CVOL 122	<u>GCGGCCGCG</u> AAGGAGAGACGGAAA TGTCATACAGCGGAGAACGAG	21	Ty2	2485752 - 2485722

CVOL 123	<u>TCGCGAGAATTCTTACATAAGTAAG</u> TCACTGGGAGGCGCGCT	22	Ty2	2485024 - 2485056
CVOL 124	<u>GCGGCCGCGAAGGAGTTTGACTCATG</u> ACAGATAAACGCAAAGATG	23	Ty2	2484876 - 2484847
CVOL 125	<u>CATATGTTATTTCGCCAGAAGCC</u> TGCGCTTCCGGTTT	24	Ty2	2483597 - 2483626
CVOL 128	<u>GCGGCCGCTTACATAAGTAAGT</u> CACTGGGAGGCGCGCT	25	Ty2	2485024 - 2485056

a. Los cebadores son en la dirección 5' > 3' con los sitios de corte de enzima de restricción subrayados. b. Indica región de homología con genoma de *S. Typhi* Ty2 (nº reg. genbank NC_004631) o plásmido pKD3 (nº reg. genbank AY048742).

La cepa *S. Paratyphi* A 9150 se hizo electrocompetente y se transformó con pKD46, lo que tuvo como resultado la cepa CV 250. Se realizó una mutagénesis por Lambda Red en CV 250 utilizando el producto de PCR generado empleando los cebadores CVOL 28 y CVOL 32 con el molde pKD3 que contenía un marcador de resistencia a cml (véase la referencia de Datsenko y Wanner para más información sobre este plásmido). Los transformantes se cultivaron en placas a 37°C y los que presentaban resistencia a cml se cribaron mediante PCR utilizando CVOL 13 y CVOL 15. Se descubrió que el *guaBA* no modificado amplificado de *S. Paratyphi* A 9150 era ~ 3,5 kb (Figura 1, línea 1), mientras que se halló un fragmento de ~1,4 kb en dos clones con una región *guaBA* mutada (Figura 1, líneas 2 y 3). Estos mutantes se denominaron CV 411 y CV 412, respectivamente. Un tratamiento de estos mutantes con pCP20 (véase la referencia de Datsenko y Wanner para más información sobre este plásmido) liberó el cartucho de resistencia a cml. Se analizaron cuatro elementos de delección mediante PCR con los cebadores CVOL 13 y CVOL 15 y se descubrió que tenían una banda de ~ 0,5 kb (Figura 2, líneas 2 - 4) en comparación con un progenitor de *guaBA::cml* (Figura 2, línea 1). Los elementos de delección de *guaBA* de *S. Paratyphi* A 9150 resultantes se denominaron CV 415 - CV 418. La región *guaBA* mutada en CV 415 se amplificó por PCR con CVOL 15 y CVOL 13 y el producto secuenciado (secuencia de polinucleótidos SEQ ID nº: 1); las regiones 5' y 3' de SEQ ID nº: 1 son homólogas a *guaBA*, mientras que la región central es homóloga a pKD3. Se eligió la cepa CV 415 para todos los estudios subsiguientes.

7. Complementación *in vitro* de la delección en *guaBA*

S. Paratyphi A 9150 contiene una auxotrofia indefinida, lo que la hace incapaz de crecer en un medio mínimo sin la adición de casaminoácidos. La cepa 11511 de ATCC y una CVD *S. Paratyphi* A aislado 516 también son incapaces de crecer en un medio mínimo, lo que sugiere que contienen la misma auxotrofia encontrada en *S. Paratyphi* A 9150.

Para demostrar que la mutagénesis mediada por Lambda Red tenía como diana sólo *guaBA* en CV 415, se diseñó un plásmido basado en pLowBlu 184 (bajo número de copias) que contenía un fragmento mínimo que codificaba *guaBA* bajo el control del promotor lactosa (*P_{lacZ}*). Se utilizaron los cebadores CVOL 13 y CVOL 14 para amplificar un fragmento de ~ 3,1 kb que codificaba *guaBA* con un sitio de unión ribosómica optimizado (GAAGGAG) 8 pb corriente arriba del codón de inicio, utilizando el cromosoma de CVD 908-*htrA* como molde. Este fragmento se subclonó en pGEM®-T Easy y se escindió con *EcoRI*, se enromó con ADN polimerasa T4 y se clonó en el sitio *NotI* de pLowBlu 184, creando pATGguaBA (almacenado en CV 295).

Se sometió CV 415 a electroporación bien con pATGguaBA o bien con pLowBlu 184 (control) y se cultivó en placas sobre 2x medio de soja que contenía guanina y cml, creando las cepas CV 486 y CV 487, respectivamente. El 2x medio de soja sin guanina es capaz de soportar el crecimiento de *S. Paratyphi* A con delección de *guaBA*. Unas colonias individuales de cada una se extendieron de nuevo en líneas sobre MMM que contenía cml y se incubaron a 37°C durante la noche. Como se muestra en la Figura 3, CV 486 era capaz de crecer en MMM (placa 2), a diferencia del control (CV 487; placa 1), lo que indica que el fragmento mínimo clonado en pATGguaBA era capaz de complementar la delección de *guaBA* del cromosoma de CV 415.

8. Construcción de delecciones secundarias en CV 415

Con el fin de minimizar la reversión de *S. Paratyphi* A 9150 con delección de *guaBA* a un genotipo de tipo salvaje (wt), se fijaron como diana genes adicionales como marcadores de atenuación secundarios. Estos genes eran *clpP* y *clpX*, que codifican una serina proteasa y una chaperona ATPasa, respectivamente (analizados en Structure (Camb). febrero de 2004; 12(2):175-83). Se ha comprobado que la interrupción de *clpP* y/o *clpX* reduce considerablemente el potencial de colonización de *Salmonella* Typhimurium en ratones (Infect Immun. mayo de 2001; 69(5):3164-74). En *S. Typhi* Ty2, *clpX* (SEQ ID nº: 39) y *clpP* (SEQ ID nº: 40) están ambos situados entre 2483597 y 2485743 (SEQ ID nº: 27) en la cadena complementaria del cromosoma, respectivamente, y son expresados por promotores individuales. Se sometió *S. Paratyphi* A 9150 wt también a una mutagénesis, de manera

que pudiera evaluarse en ratones la virulencia de mutantes que contenían delecciones individuales bien en *clpX* o bien en *clpP*.

Para deleccionar *clpX*, se diseñaron los cebadores CVOL 85 y 86 con el fin de amplificar un fragmento de ~ 1,3 kb que codifica *clpX* sin un codón de inicio de CVD 908-htrA. Este fragmento se purificó en una columna, se trató con ADN polimerasa Taq-Pro™ y se clonó en pGEM®-T (almacenado en CV 472). El vector resultante, pGEM®-T::clpX, se digirió con *NruI* y *EcoRI* para eliminar un fragmento de ~ 0,9 kb y se trató con ADN polimerasa T4 para crear extremos romos. Un cartucho de cml aislado de pCR-Blunt II-TOPO como un fragmento de *EcoRI* se enromó y se insertó en pGEM®-T::clpX. Este cartucho de cml se había creado previamente mediante PCR utilizando CVOL 25 y CVOL 26 con pKD3 como molde (almacenado en CV 134). Después de una ligación y una transformación, se empleó una PCR con los cebadores CVOL 26 y CVOL 85 para confirmar la inserción del cartucho de cml en la orientación correcta para la mutagénesis por Lambda Red. Se identificó un clon positivo, denominado pGEM®-T::clpX::cml y almacenado como CV 481.

Se transformó *S. Paratyphi* A con delección de *guaBA* (CV 415) con pKD46 y se almacenó como CV 421. Se sometieron CV 421 y CV 250 (*S. Paratyphi* A 9150 wt transformada con pKD46) a una mutagénesis por Lambda Red con un producto de PCR de ~ 1,4 kb amplificado a partir de pGEM®-T::clpX::cml utilizando CVOL 85 y CVOL 86. Se aislaron mutantes resistentes a cml y se cribaron por PCR con CVOL 87 y CVOL 88, que se unen a regiones fuera de las homólogas a CVOL 85 y CVOL 86. Los mutantes que presentaban un perfil PCR correcto se seleccionaron para un tratamiento con pCP20 con el fin de eliminar el cartucho de cml. La Figura 4 muestra que los mutantes que contenían un gen *clpX* alterado presentaban una banda más pequeña de ~ 0,6 kb por PCR (panel A, líneas 1 - 6), comparada con la hallada en *S. Paratyphi* A 9150 inalterada (panel A, línea 7). Un análisis por PCR de las mismas cepas con CVOL 13 y 15 confirmó que *guaBA* se había deleccionado sólo de las cepas derivadas de CV 415 y no de CV 250 (panel B, líneas 4 - 6, comparadas con las líneas 1 - 3 y 7). Los mutantes que carecían de *clpX*, y tanto *clpX* como *guaBA*, se almacenaron como CV 532 y CV 534, respectivamente. La región *clpX* mutada en CV 532 y CV 534 se amplificó por PCR con los cebadores CVOL 87 y CVOL 88 y el producto se secuenció (SEQ ID n°: 2); las regiones 5' y 3' de SEQ ID n°: 2 son homólogas a *clpX*, mientras que la región central es homóloga a pKD3.

Para deleccionar *clpP*, se diseñaron CVOL 89 y 90 con el fin de amplificar un fragmento de ~ 0,7 kb que codifica *clpP* sin un codón de inicio de CVD 908-htrA. Este fragmento se purificó en una columna y se clonó en pGEM®-T, creando pGEM®-T::clpP (almacenado como CV 470). Se digirió pGEM®-T::clpP con *PstI* y *NsiI*, se trató con ADN polimerasa T4 y se ligó de nuevo (creando pGEM®-T::clpPm, almacenado como CV 484) con el fin de eliminar los sitios *NdeI* y *HincII* de la estructura principal del vector. A continuación se digirió pGEM®-T::clpPm con *NdeI* y *HincII* para eliminar fragmentos de ADN con un tamaño total de ~ 0,5 kb, y se trató con ADN polimerasa T4. De manera similar a lo arriba mencionado, un cartucho de cml aislado de pCR-Blunt II-TOPO como un fragmento de *EcoRI* se trató con ADN polimerasa T4 y se utilizó para sustituir los fragmentos eliminados de pGEM®-T::clpPm. Después de una ligación y una transformación, se empleó una PCR con los cebadores CVOL 26 y CVOL 85 para confirmar la inserción del cartucho de cml en la orientación correcta para la mutagénesis por Lambda Red. Se identificó un clon positivo, denominado pGEM®-T::clpPm::cml y almacenado como CV 501.

Se sometieron *S. Paratyphi* A 9150 wt y con delección de *guaBA* que contenían pKD46 (CV 250 y CV 421, respectivamente) a una mutagénesis por Lambda Red con un producto de PCR de ~ 1,4 kb amplificado de pGEM®-T::clpPm::cml utilizando CVOL 89 y CVOL 90. Se aislaron mutantes resistentes a cml y se cribaron por PCR con CVOL 91 y CVOL 92, que se unen a regiones fuera de las homólogas a CVOL 89 y CVOL 90. Los mutantes que presentaban un perfil PCR correcto se seleccionaron para un tratamiento con pCP20 con el fin de eliminar el cartucho de cml.

La Figura 5 muestra que los mutantes que contenían un gen *clpP* alterado presentaban una banda más pequeña de ~ 0,4 kb por PCR (panel A, líneas 1 - 6), comparada con la hallada en *S. Paratyphi* A 9150 inalterada (panel A, línea 7). Un análisis por PCR de las mismas cepas utilizando los cebadores CVOL 13 y 15 confirmó que *guaBA* se había deleccionado sólo de las cepas derivadas de CV 415 y no de las basadas en CV 250 (panel B, líneas 4 - 6, comparadas con las líneas 1 - 3 y 7). Los mutantes que carecían de *clpP*, y tanto *clpP* como *guaBA*, se almacenaron como CV 528 y CV 530, respectivamente. La región *clpP* mutada en CV 528 y CV 530 se amplificó por PCR con los cebadores CVOL 87 y CVOL 88 y el producto se secuenció (secuencia de polinucleótidos SEQ ID n°: 3); las regiones 5' y 3' de SEQ ID n°: 3 son homólogas a *clpP*, mientras que la región central es homóloga a pKD3.

9. Construcción de plásmidos de bajo número de copias para análisis de complementación

Como se ha hecho más arriba, para confirmar que la mutagénesis mediada por Lambda Red tenía como diana sólo loci específicos, se diseñaron plásmidos monocistrónicos o bicistrónicos basados en pLowBlu 184 (bajo número de copias) que contenían fragmentos mínimos que codificaban *clpX* o *clpP*, o *guaBA* inmediatamente corriente abajo de *clpX* o *clpP*. La expresión constitutiva de los genes en estos plásmidos se dirigió mediante *P_{lacZ}*.

Se utilizaron los cebadores CVOL 64 y CVOL 65 para amplificar por PCR *guaBA* de CVD 908-htrA que contenía un sitio de unión ribosómica mejorado, con los sitios de restricción *NdeI* y *NsiI* en los extremos 5' y 3', respectivamente. El producto se purificó en una columna y se ligó en pCR-Blunt II-TOPO (almacenado como CV 394), se extrajo como

un fragmento de ~ 3,5 kb *NdeI* - *NsiI* y se clonó en los sitios *NdeI* - *NsiI* en pLowBlu 184, creando p*guaBAV.2* (almacenado como CV 482).

Con el fin de crear un plásmido de bajo número de copias que codificara *clpP*, se utilizaron los cebadores CVOL 122 y CVOL 123 para amplificar *clpP* con un sitio de unión ribosómica mejorado de CVD 908-*htrA*, con sitios *NotI* y *NruI* en los extremos 5' y 3', respectivamente. El producto de ~ 0,7 kb se purificó en una columna y se ligó en pCR-Blunt II-TOPO (almacenado como CV 567), se extrajo como un fragmento *NotI* - *NruI* y se ligó en pLowBlu 184, previamente cortado con *NotI* y *NdeI*, creando pATGclpP (almacenado como CV 584). Con el fin de construir un plásmido bicistrónico que contuviera *clpP* y *guaBA*, se diseñaron los cebadores CVOL 122 y CVOL 128 para amplificar *clpP* con un sitio de unión ribosómica mejorado de CVD 908-*htrA*, con sitios *NotI* tanto en el extremo 5' como en el extremo 3'. El producto de 0,7 kb se purificó en una columna y se ligó en pCR-Blunt II-TOPO (almacenado como CV 600), se extrajo como un fragmento *NotI* y se ligó en p*guaBAV.2*, previamente cortado con *NotI*, creando pATGclpPATGguaBA (almacenado como CV 603).

Con el fin de crear un plásmido de bajo número de copias que codificara *clpX*, se utilizaron los cebadores CVOL 124 y CVOL 125 para amplificar *clpX* con un sitio de unión ribosómica mejorado de CVD 908-*htrA*, con sitios *NotI* y *NdeI* en los extremos 5' y 3', respectivamente. El producto de ~ 1,3 kb se purificó en columna y se ligó en pCR-Blunt II-TOPO (almacenado como CV 569), se extrajo como un fragmento *NotI* - *NdeI* y se ligó bien en pLowBlu 184 o bien en p*guaBAV.2*, ambos previamente cortados con *NotI* y *NdeI*, creando pATGclpX (almacenado como CV 582) y pATGclpXATGguaBA (almacenado como CV 573).

10. Evaluación de la virulencia de *S. Paratyphi A* y mutantes en ratones

Se realizaron estudios LD₅₀ para comparar la virulencia de *S. Paratyphi A* 9150 wt con la de cada mutante en ratones inyectados por vía intraperitoneal.

La Figura 6 muestra los datos LD₅₀ obtenidos al inyectar a ratones *S. Paratyphi A* wt y con delección de *guaBA*. *S. Paratyphi A* wt tiene un valor LD₅₀ < 10 bacterias por ratón. En cambio, *S. Paratyphi A* con delección de *guaBA* tenía un valor LD₅₀ - 4,5 log. mayor. La complementación del mutante *guaBA* con pLowBlu 184 no alteró el valor LD₅₀, mientras que la transformación con pATGguaBA restauró la virulencia similar a la del tipo salvaje.

La Figura 7 muestra los datos LD₅₀ obtenidos al inyectar a ratones *S. Paratyphi A* wt, *S. Paratyphi A* con delección de *clpX* o *S. Paratyphi A* con delección de *clpX-guaBA*. Los valores LD₅₀ de *S. Paratyphi A* wt y con delección de *guaBA* concordaban con los obtenidos anteriormente. *S. Paratyphi A* con delección de *clpX* mostró un valor LD₅₀ ~ 1 log mayor que los mutantes *guaBA*, lo que indicaba que una delección en *clpX* no era tan atenuante como la efectuada en *guaBA*. La complementación de las cepas con delección de *clpX* o las cepas con delección de *clpX-guaBA* con pLowBlu 184 no tuvo efecto alguno, mientras que la transformación con pATGclpX y pATGclpXATGguaBA, respectivamente, restauró la virulencia similar a la del tipo salvaje.

La Figura 8 muestra los datos LD₅₀ obtenidos de ratones a los que se les había inyectado *S. Paratyphi A* wt, *S. Paratyphi A* con delección de *clpP* o *S. Paratyphi A* con delección de *clpP-guaBA*. Los valores LD₅₀ de *S. Paratyphi A* wt y con delección de *guaBA* concordaban con los obtenidos anteriormente. Al igual que la cepa con delección de *clpX*, *S. Paratyphi A* con delección de *clpP* mostró una virulencia aumentada en relación con el mutante *guaBA*. Esto indicaba que una delección en *clpP* no era tan atenuante como la efectuada en *guaBA*. La complementación de las cepas con delección de *clpX* o las cepas con delección de *clpX-guaBA* con pLowBlu 184 no tuvo efecto alguno en la virulencia. La transformación de estas cepas con pATGclpP y pATGclpPATGguaBA, respectivamente, no restauró por completo la virulencia del tipo salvaje. Sin ceñirse a ninguna teoría, la expresión regulada de *clpP*, a diferencia de la expresión no regulada como la codificada por pATGclpP y pATGclpPATGguaBA, se requiere para complementar totalmente la mutación *clpP*.

Documentos citados

Las descripciones de las siguientes referencias son todas las publicaciones, patentes, libros, artículos y otros documentos mencionados y expuestos a lo largo de toda esta solicitud.

Levine MM, Herrington D, Murphy JR, Morris JG, Losonsky G, Tall B, Lindberg A, Svenson S, Baqar S, Edwards MF, Stocker B. Safety, infectivity, immunogenicity and in vivo stability of two attenuated auxotrophic mutant strains of *Salmonella Typhi*, 541Ty and 543Ty, as live oral vaccines in man. *J Clin Invest* 79:888-902, 1987.

Levine MM, Ferreccio C, Black RE, Chilean Typhoid Committee, Germanier R. Large-scale field trial of Ty21a live oral typhoid vaccine in enteric-coated capsule formulation. *Lancet* I:1049-1052, 1987.

Ferreccio C, Levine MM, Rodriguez H, Contreras R, Chilean Typhoid Committee. Comparative efficacy of two, three, or four doses of Ty21a live oral typhoid vaccine in enteric-coated capsules: a field trial in an endemic area. *J Infect Dis* 159:766-769, 1989.

Levine MM, Ferreccio C, Black RE, Tacket CO, Germanier R. Progress in vaccines against typhoid fever. *Rev Infect Dis* 2 (supplement 3):S552-S567, 1989.

Van de Verg L, Herrington DA, Murphy JR, Wasserman SS, Formal SB, Levine MM. Specific IgA secreting cells in peripheral blood following oral immunization with bivalent Salmonella Typhi/Shigella sonnei vaccine or infection with pathogenic S. sonnei in humans. *Infect Immun* 58:2002-2004, 1990.

Levine MM, Hone D, Heppner DG, Noriega F, Sriwathana B. Attenuated Salmonella as carriers for the expression of foreign antigens. *Microecology and Therapy* 19:23-32, 1990.

Herrington DA, Van De Verg L, Formal SB, Hale TL, Tall BD, Cryz SJ, Tramont EC, Levine MM. Studies in volunteers to evaluate candidate Shigella vaccines: further experience with a bivalent Salmonella Typhi-Shigella sonnei vaccine and protection conferred by previous Shigella sonnei disease. *Vaccine* 8:353-357, 1990.

Cryz SJ, Levine MM, Kaper JB. Randomized double-blind placebo-controlled trial to evaluate the safety and immunogenicity of the live oral cholera vaccine strain CVD 103-HgR in adult Swiss. *Vaccine* 8:577-580, 1990.

Levine MM, Ferreccio C, Cryz S, Ortiz E. Comparison of enteric-coated capsules and liquid formulation of Ty21a typhoid vaccine in a randomized controlled field trial. *Lancet* 336:891-894, 1990.

Servos S, Chatfield S, Hone D, Levine MM, Dimitriadis G, Pickard D, Dougan G, Fairweather N, Charles I. Molecular cloning and characterization of the *aroD* gene encoding 3-dehydroquinate from Salmonella Typhi. *J Gen Micro* 137:147-152, 1990.

Levine MM, Hone D, Tacket C, Ferreccio C, Cryz S. Clinical and field trials with attenuated Salmonella Typhi as live oral vaccines and as "carrier vaccines". *Res Microbiol* 141:807-816, 1990.

Black RE, Levine MM, Ferreccio C, Clements ML, Lanata C, Rooney J, Germanier R, y el Chilean Typhoid Committee. Efficacy of one or two doses of Ty21a Salmonella Salmonella Typhi vaccine in enteric-coated capsules in a controlled field trial. *Vaccine* 8:81-84, 1990.

Tacket CO, Losonsky G, Taylor DN, Baron L, Kopeck D, Cryz S, Levine MM. Lack of immune response to the Vi component of a Vi-positive variant of the Salmonella Typhi live oral vaccine strain Ty21a in volunteer studies. *J Infect Dis* 163:901-904, 1991.

Hone DM, Harris AM, Chatfield S, Dougan G, Levine MM. Construction of genetically-defined double *aro* mutants of Salmonella Typhi. *Vaccine* 9:810-816, 1991.

Tacket CO, Hone DM, Curtiss R III, Kelly SM, Losonsky G, Guers L, Harris AM, Edelman R, Levine MM. Comparison of the safety and immunogenicity of Δ aroC Δ aroD and Δ cydA Δ crp Salmonella typhi strains in adult volunteers. *Infect Immun* 60:536-541, 1992.

Tacket CO, Hone DM, Losonsky G, Guers L, Edelman R, Levine MM. Clinical acceptability and immunogenicity of CVD 908 Salmonella Typhi vaccine strain. *Vaccine* 10:443-446, 1992.

Hone DM, Tacket CO, Harris AM, Kay B, Losonsky G, Levine MM. Evaluation in volunteers of a candidate live oral attenuated Salmonella Typhi vaccine. *J Clin Invest* 90:412-420, 1992.

Olanratmanee T, Levine MM, Losonsky GA, Thisyakom U, Cryz SJ Jr. Safety and immunogenicity of Salmonella Typhi Ty21 a liquid formulation vaccine in 4- to 6-year-old Thai children. *J Infect Dis* 166:451-452, 1992.

Chatfield SN, Fairweather N, Charles I, Pickard D, Levine MM, Hone D, Posada M, Strugnell RA, Dougan G. Construction of a genetically defined Salmonella Typhi Ty2 *aroA*, *aroC* mutant for the engineering of a candidate live oral typhoid-tetanus vaccine. *Vaccine* 10:8-11, 1992.

Cryz SJ Jr, Vanprapar N, Thisyakom U, Olanratmanee T, Losonsky G, Levine MM, Chearskul S. Safety and immunogenicity of Salmonella Typhi Ty21a vaccine in young children. *Infect Immun* 61:1149-115, 1993.

Gonzalez C, Hone D, Noriega F, Tacket CO, Davis JR, Losonsky G, Nataro JP, Hoffman S, Malik A, Nardin E, Sztein MB, Heppner DG, Fouts TR, Isibasi A, Levine MM. Salmonella Typhi strain CVD 908 expressing the circumsporozoite protein of Plasmodium falciparum: strain construction, safety and immunogenicity. *J Infect Dis* 169:927-931, 1994.

Sztein MB, Wasserman SS, Tacket CO, Edelman R, Hone D, Lindberg AA, Levine MM. Cytokine production patterns and lymphoproliferative responses in volunteers orally immunized with attenuated vaccine strains of Salmonella Typhi. *J Infect Dis* 170:1508-1517, 1994.

Hone DM, Harris AM, Lim V, Levine MM. Construction and characterization of isogenic O-antigen variants of Salmonella Typhi. *Molec Microbiol* 13:525-530, 1994.

Pickard D, Li J, Roberts M, Maskell D, Hone D, Levine M, Dougan G, Chatfield S. Characterization of defined *ompR* mutants of Salmonella Typhi: *ompR* is involved in the regulation of Vi polysaccharide expression. *Infect Immun* 62:3984-3993, 1994.

Noriega FR, Wang JY, Losonsky G, Maneval DR, Hone DM, Levine MM. Construction and characterization of attenuated Δ aroA Δ virG Shigella flexneri 2a strain CVD 1203, a prototype live oral vaccine. *Infect Immun* 62:5168-5172, 1995.

Gómez-Duarte, OG, Galen J, Chatfield SN, Rappuoli R, Eidels L, Levine MM. Expression of fragment C of tetanus toxin fused to a carboxyl-terminal fragment of diphtheria toxin in Salmonella Typhi CVD 908 vaccine strain. *Vaccine* 13:1596-1602, 1995.

Cryz SJ Jr, Que JU, Levine MM, Wiedermann G, Kollaritsch H. Safety and immunogenicity of a live oral bivalent typhoid fever (Salmonella Typhi-Ty21a) cholera (Vibrio cholerae CVD 103-HgR) vaccine in healthy adults. *Infect Immun* 63:1336-1339, 1995.

Sztein MB, Tanner MK, Polotsky Y, Orenstein JM, Levine MM. Cytotoxic T lymphocytes after oral immunization with attenuated strains of Salmonella Typhi in humans. *J Immunol* 155:3987-3993, 1995.

Levine MM, Galen J, Barry E, Noriega F, Chatfield S, Dougan G, Tacket C. Attenuated Salmonella as live oral vaccines against typhoid fever and as live vectors. *J Biotechnology* 44:193-196, 1995.

- Noriega FR, Losonsky G, Wang JY, Formal SB, Levine MM. Further characterization of Δ aroA, Δ virG *Shigella flexneri* 2a strain CVD 1203 as a mucosal *Shigella* vaccine and as a live vector for delivering antigens of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* 64:23-27, 1996.
- 5 Noriega FR, Losonsky G, Lauderebaugh C, Liao FM, Wang JY, Levine MM. Engineered Δ guaBA Δ virG *Shigella flexneri* 2a strain CVD 1205: construction, safety, immunogenicity, and potential efficacy as a mucosal vaccine. *Infect Immun* 64:3055-3061, 1996.
- Kotloff K, Noriega F, Losonsky G, Sztein MB, Nataro JP, Levine MM. Safety, immunogenicity and transmissibility in humans of CVD 1203, a live oral *Shigella flexneri* 2a vaccine candidate attenuated by deletions in *aroA* and *virG*. *Infect Immun* 64:4542-4548, 1996.
- 10 Barry EM, Gomez-Duarte O, Chatfield S, Rappuoli R, Losonsky GA, Galen JE, Levine MM. Expression and immunogenicity of pertussis toxin S1 subunit-tetanus toxin fragment C fusions in *Salmonella Typhi* vaccine strain CVD 908. *Infect Immun* 64:4172-4181, 1996.
- Tacket CO, Sztein MB, Losonsky GA, Wasserman SS, Nataro JP, Edelman R, Galen JE, Pickard D, Dougan G, Chatfield SN, Levine MM. Safety of live oral *Salmonella Typhi* vaccine strains with deletions in *htrA* and *aroC aroD* and immune response in humans. *Infect Immun* 65:452-456, 1997.
- 15 Levine MM, Galen J, Barry E, Noriega F, Tacket C, Sztein M, Chatfield S, Dougan G, Losonsky G, Kotloff K. Attenuated *Salmonella Typhi* and *Shigella* as live oral vaccines and as live vectors. *Behring Inst Mitt* 98:120-123, 1997.
- Tacket CO, Kelly SM, Schödel F, Losonsky G, Nataro JP, Edelman R, Levine MM, Curtiss R III. Safety and immunogenicity in humans of an attenuated *Salmonella Typhivaccine* vector strain expressing plasmid-encoded hepatitis B antigens stabilized by the Asd-balanced lethal system. *Infect Immun* 65:3381-3385, 1997.
- González CR, Noriega FR, Huerta S, Santiago A, Vega M, Paniagua J, Ortiz-Navarrete V, Isibasi A, Levine MM. Immunogenicity of a *Salmonella Typhi* CVD 908 candidate vaccine strain expressing the major surface protein gp63 of *Leishmania mexicana mexicana*. *Vaccine* 16:9/10 1043-1052, 1998.
- 25 Orr N, Galen JE, Levine MM. Expression and immunogenicity of a mutant diphtheria toxin molecule, CRM197, and its fragments in *Salmonella Typhi* vaccine strain CVD 908-*htrA*. *Infect Immun* 67:4290-4294, 1999.
- Levine MM, Ferreccio C, Abrego P, San Martin O, Ortiz E, Cryz SC. Duration of efficacy of Ty21a, attenuated *Salmonella Typhi* live oral vaccine. *Vaccine* 17:2 Supplement S22-527, 1999.
- Pasetti MF, Anderson RJ, Noriega FR, Levine MM, Sztein MB. Attenuated Δ guaBA *Salmonella Typhi* vaccine strain CVD 915 as a live vector utilizing prokaryotic or eukaryotic expression systems to deliver foreign antigens and elicit immune responses. *Clin Immun* 92:76-89, 1999.
- 30 Galen JE, Nair J, Wang JY, Tanner MK, Sztein MB, Levine MM. Optimization of plasmid maintenance in the attenuated live vector vaccine *Salmonella Typhi* strain CVD 908-*htrA*. *Infect Immun* 67:6424-6433, 1999.
- Kotloff KL, Noriega FR, Samandari T, Sztein MB, Losonsky GA, Nataro JP, Picking WD, Levine MM. *Shigella flexneri* 2a strain CVD 1207 with specific deletions in *virG*, *sen*, *set* and *guaBA* is highly attenuated in humans. *Infect Immun* 68:1034-39, 2000.
- Tacket CO, Sztein MB, Wasserman SS, Losonsky G, Kotloff KL, Wyant TL, Nataro JP, Edelman R, Perry J, Bedford P, Brown D, Chatfield S, Dougan G, Levine MM. Phase 2 clinical trial of attenuated *Salmonella enterica* serovar *Typhi* oral live vector vaccine CVD 908-*htrA* in U.S. volunteers. *Infect Immun* 68:1196-1201, 2000.
- 40 Anderson RJ, Pasetti MF, Sztein MB, Levine MM, Noriega FR. Δ guaBA attenuated *Shigella flexneri* 2a strain CVD 1204 as a *Shigella* vaccine and as a live mucosal delivery system for fragment C of tetanus toxin. *Vaccine* 18: 2193-2202, 2000.
- Tacket CO, Galen J, Sztein MB, Losonsky G, Wyant TL, Nataro J, Wasserman SS, Edelman R, Chatfield S, Dougan G, Levine MM. Safety and immune responses to attenuated *Salmonella enterica* serovar *Typhi* oral live vector vaccines expressing tetanus toxin fragment C. *Clin Immunol* 97:146-153, 2000.
- 45 Pasetti MF, Tanner MK, Pickett TE, Levine MM, Sztein M. Mechanisms and cellular events associated with the priming of mucosal and systemic immune responses to *Salmonella enterica* serovar *Typhi* live vector vaccines delivered intranasally in the murine model. *Vaccine* 18:3208-3213, 2000.
- Wu S, Beier M, Sztein M, Galen JE, Pickett T, Holder AA, Gómez-Duarte O, Levine MM. Construction and immunogenicity in mice of attenuated *Salmonella Typhi* expressing *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein (MSP-1) fused to tetanus toxin fragment C. *J Biotechnol*. 83:125-135, 2000.
- 50 Wang JY, Noriega FR, Galen JE, Barry E, Levine MM. Constitutive expression of the Vi polysaccharide capsular antigen in attenuated *Salmonella enterica* serovar *Typhi* oral vaccine strain CVD 909. *Infect Immun* 68:4647-4652, 2000.
- Koprowski H II, Levine MM, Anderson RA, Losonsky G, Pizza M, Barry EM. Attenuated *Shigella flexneri* 2a vaccine strain CVD 1204 expressing colonization factor antigen I and mutant heat-labile enterotoxin of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* 68:4884-92, 2000.
- Gómez-Duarte O, Pasetti M, Santiago A, Sztein MB, Hoffman SL, Levine MM. Expression, secretion and immunogenicity of the *Plasmodium falciparum* SSP-2 protein in *Salmonella* vaccine strains by a type I secretion system. *Infect Immun* 69:1192-1198, 2001.
- 60 Orr N, Galen JE, Levine MM. Novel use of an anaerobically induced promoter, *dmsA*, for controlled expression of Fragment C of tetanus toxin in live attenuated *Salmonella enterica* serovar *Typhi* strain CVD 908-*htrA*. *Vaccine* 19:1694-1700, 2001.
- Altboum Z, Barry EM, Losonsky G, Galen JE, Levine MM. Attenuated *Shigella flexneri* 2a Δ guaBA strain CVD 1204 expressing ETEC CS2 and CS3 fimbriae as a live mucosal vaccine against *Shigella* and enterotoxigenic *Escherichia coli* infection. *Infect Immun* 69:3150-8, 2001.

- Wang JY, Pasetti MF, Noriega FR, Anderson RS, Wasserman SS, Galen JE, Sztein MB, Levine MM. Construction, genotypic and phenotypic characterization, and immunogenicity of attenuated Δ guaBA *Salmonella enterica* serovar Typhi strain CVD 915. *Infect Immun* 69:4734-4741, 2001.
- Galen JE, Levine MM. Can a "flawless" live vector vaccine strain be engineered? *Trends Microbiol* 9:372-376, 2001.
- 5 Kotloff KL, Taylor DN, Sztein MB, Wasserman SS, Losonsky GA, Nataro JP, Venkatesan M, Hartman A, Picking WD, Katz DE, Campbell JD, Levine MM, Hale TL. Phase I evaluation of Δ virG *Shigella sonnei* live, attenuated, oral vaccine strain WRSS1 in healthy adults. *Infect Immun* 70:2016-21, 2002.
- Pasetti, M, Levine MM, Sztein MB. Animal models paving the way for clinical trials of attenuated *Salmonella enterica* serovar Typhi live oral vaccines and live vectors. *Vaccine*. 21:401-18, 2003.
- 10 Pasetti MF, Barry EM, Losonsky G, Singh M, Medina-Moreno, SM, Polo JM, Robinson H, Sztein MB, Levine MM. Attenuated *Salmonella enterica* serovar Typhi and *Shigella flexneri* 2a strains mucosally deliver DNA vaccines encoding measles virus hemagglutinin, inducing specific immune responses and protection in cotton rats. *J Virol* 77:5209-5217, 2003.
- Salerno-Goncalves R, Wyant TL, Pasetti MF, Fernandez-Vina M, Tacket CO, Levine MM, Sztein MB. Concomitant
- 15 Induction of CD4(+) and CD8(+) T Cell Responses in Volunteers Immunized with *Salmonella enterica* Serovar Typhi Strain CVD 908-htr A. *J Immunol*. 170:2734-2741, 2003.
- Tacket CO, Pasetti MF, Sztein, MB, Livio S, Levine MM. Immune responses to an oral Typhoid vaccine strain modified to constitutively express Vi capsular polysaccharide. *J Infect Dis*, 190:565-570, 2004.
- Vindurampulle CJ, Cuberos LF, Barry EM, Pasetti MF, Levine MM. Recombinant *Salmonella enterica* serovar Typhi
- 20 in a prime-boost strategy. *Vaccine* 22(27-28):3744-3750, 2004.
- Capozzo AV, Cuberos L, Levine MM, Pasetti MF. Mucosally delivered *Salmonella* live vector vaccines elicit potent immune responses against a foreign antigen in neonatal mice born to naive and immune mothers. *Infect Immun* 72:4637-4646, 2004.
- Kotloff KL, Pasetti MF, Barry EM, Nataro JP, Wasserman SS, Sztein MB, Picking WD, Levine MM. Deletion in the
- 25 *Shigella* enterotoxin genes further attenuates *Shigella flexneri* 2a bearing guanine auxotrophy in a Phase 1 trial of CVD 1204 and CVD 1208. *J Infect Dis* 190:1745-1754, 2004.
- Galen JE, Zhao L, Chinchilla M, Wang JY, Pasetti MF, Green J, Levine MM. Adaptation of the endogenous *Salmonella enterica* serovar Typhi clyA-encoded hemolysin for antigen export enhances the immunogenicity of anthrax protective antigen domain 4 expressed by the attenuated live vector vaccine strain CVD 908-htrA. *Infect Immun* 72: 7096-7106, 2004.
- 30

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> VINDURAMPULLE, Christofer BARRY, Eileen LEVINE, Myron
- <120> SALMONELLA ENTERICA SEROVARIEDAD PARATYPHI A ATENUADA Y USOS DE LA MISMA
- <130> F208122
- 35 <150> US 60/731,349
- <151> 2005-10-28
- <160> 40
- <170> PatentIn versión 3.3
- <210> 1
- 40 <211> 489
- <212> ADN
- <213> Secuencia Artificial
- <220>
- <223> región guaBA mutada sintetizada químicamente
- 45 <400> 1

ggaacatcgc acagcgcacc tgagcggat cgtctttgag cgtaaagtac cagtggcccg 60
 acgcaggctg cgtgaaatta gaaatctcgc cgctgatcca tacctgtccc atctcctgtt 120
 ctaacagcag acgaaccgtc tggtaagggc ggcttacggg aaaaattgag gaagtttgag 180
 aggataacat gtgagcggga tcaaattcta aatcagcagg ttattcaatc ggtgtaggct 240
 ggagcctgct tcgaagttcc tatactttct agagaatagg aacttcggaa taggaactaa 300
 ggaggatatt catatgctct ctctctgcgt gctgtcgaaa ccatcgactt tatgaccgcy 360
 cactggggcgc acctgccgta tgacttcctg ggtcgtgttt ccaaccgcat catcaatgaa 420
 gtcaacggga tttcccggtg ggtgtatgac atcagcggta aaccaccggc taccattgag 480
 tgggaatga 489

<210> 2
 <211> 634
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

5

<220>
 <223> región clpX mutada sintetizada químicamente
 <400> 2

cctgagaatg gcatttgctg cgtcgtgtgc ggcacaaaga acaaagaaga ggttttgact 60
 catgacagat aaacgcaaag atggctcggg caaattgttg tactgctctt tttgcggcaa 120
 aagccagcat gaagtgcgca agctgattgc cggccatcc gtgtatatct gcgacgaatg 180
 cgtcgattta tgtaacgaca ttattcgcgc ccttatatat atgcggccgc tgtaggctgg 240
 agctgcttcg aagttcctat actttctaga gaataggaac ttcggaatag gaactaagga 300
 ggatattcat atggcgcgcc tataagggcg aattccgtga cgaagcgtg aacgctatcg 360
 ccaggaaagc aatggcgcgt aaaaccggcg cccgtggtct gcgttctatc gtcgaagcgg 420
 cgctgctgga taccatgtac gatttgccat ctatggaaga cgtcgaaaaa gtggatgatcg 480
 acgagtcctg tattgccggt cagagtaagc cgttgctgat ttacggcaaa ccggaagcgc 540
 aggcttctgg cgaataatta aacattcata caatcagtta gccaaaaaag gggggatttt 600
 atctcccctt tcgtttttcc tgtaaacacg ccgt 634

10

<210> 3
 <211> 370
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

15

<220>
 <223> región clpP mutada sintetizada químicamente
 <400> 3

tccatcaggt tacaatcagt acagcaggtt ttttcaattt ttatccagga gacggaaatg 60
 tcatacagcg gagaacgaga taatttggcc cctcatatat gaatatcctc cttagtctct 120
 attccgaagt tcctattctc tagaaagtat aggaacttcg aagcagctcc agcctacacg 180
 ctaggactca attttgaccc atcgtaattg atgccctgga cgcaagtgtg ccgctataca 240
 cttcatcctt cacgctacct cgggtgttggg tgccagcgcg cctcccgggtg acttacttat 300
 gtaagcgctt gcggagtcgc cgagttgccg ccttgatgta gctcgaaatga ttttgtgtat 360
 atactaatga 370

<210> 4

<211> 27

<212> ADN

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> cebador de oligonucleótido sintetizado químicamente

<400> 4

ctgcagtcac tccactcaa tggtagc 27

10 <210> 5

<211> 18

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223> cebador de oligonucleótido sintetizado químicamente

<400> 5

ggaacatcgc acagcgca 18

<210> 6

<211> 17

20 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> cebador de oligonucleótido sintetizado químicamente

<400> 6

25 gtgtaggagc tgcttcg 17

<210> 7

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

30 <220>

<223> cebador de oligonucleótido sintetizado químicamente

<400> 7

catatgaata tctccttag 20

<210> 8
 <211> 119
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>

<223> cebador de oligonucleótido sintetizado químicamente

<400> 8

cgaaccgtct ggttaaggcg gcttacggta aaaattgagg aagtttgaga ggataacatg 60
 tgagcgggat caaattctaa atcagcaggt tattcaatcg ttaggctgg agctgcttc 119

10 <210> 9
 <211> 120
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> cebador de oligonucleótido sintetizado químicamente

15 <400> 9

ttcatatgatg atgcgggttg aaacacgacc caggaagtca tacggcaggt gcgcccagtg 60
 cgcgggtcata aagtcgatgg ttctgacagc acgcagagag catatgaata tcctccttag 120

20 <210> 10
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> cebador de oligonucleótido sintetizado químicamente

<400> 10

gaaggagtat tgccatgct acgtatcg 28

25 <210> 11
 <211> 42
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>

30 <223> cebador de oligonucleótido sintetizado químicamente

<400> 11

catatgaagg agtattgccc atgctacgta tcgctaaaga ag 42

35 <210> 12
 <211> 36
 <212> ADN
 <220>

<223> cebador de oligonucleótido sintetizado químicamente

<400> 12

atgcatctgc agtcattccc actcaatggt agccgg 36

<210> 13

<211> 30

<212> ADN

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> cebador de oligonucleótido sintetizado químicamente

<400> 13

acagataaac gcaaagatgg ctggggcaaa 30

10 <210> 14

<211> 30

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223> cebador de oligonucleótido sintetizado químicamente

<400> 14

ttattcgcca gaagcctgcg ctccggttt 30

<210> 15

<211> 30

20 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> cebador de oligonucleótido sintetizado químicamente

<400> 15

25 cctgagaatg gcatttgcgt cgtcgtgtgc 30

<210> 16

<211> 30

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

30 <220>

<223> cebador de oligonucleótido sintetizado químicamente

<400> 16

acggcgtgtt tacaggaaaa acgaaagggg 30

<210> 17

35 <211> 30

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> cebador de oligonucleótido sintetizado químicamente

40 <400> 17

	tcatacagcg gagaacgaga taattggcc	30
	<210> 18	
	<211> 30	
	<212> ADN	
5	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> cebador de oligonucleótido sintetizado químicamente	
	<400> 18	
	ttacataagt aagtcactgg gaggcgcgt	30
10	<210> 19	
	<211> 30	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
15	<223> cebador de oligonucleótido sintetizado químicamente	
	<400> 19	
	tccatcaggt tacaatcagt acagcagatt	30
	<210> 20	
	<211> 30	
20	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> cebador de oligonucleótido sintetizado químicamente	
	<400> 20	
25	tcattagtat atacacaaaa tcattcgagc	30
	<210> 21	
	<211> 45	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
30	<220>	
	<223> cebador de oligonucleótido sintetizado químicamente	
	<400> 21	
	gcggccgcga aggagagacg gaaatgtcat acagcggaga acgag	45
	<210> 22	
35	<211> 42	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> cebador de oligonucleótido sintetizado químicamente	
40	<400> 22	

	tcgcgagaat tottacataa gtaagtcact gggaggcgcg ct	42
	<210> 23	
	<211> 45	
	<212> ADN	
5	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> cebador de oligonucleótido sintetizado químicamente	
	<400> 23	
	gcgccgcga aggagttga ctcacgacag ataaacgcaa agatg	45
10	<210> 24	
	<211> 36	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
15	<223> cebador de oligonucleótido sintetizado químicamente	
	<400> 24	
	catatgttat tcgccagaag cctgcgcttc cggttt	36
	<210> 25	
	<211> 38	
20	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> cebador de oligonucleótido sintetizado químicamente	
	<400> 25	
25	gcgccgcgtt acataagtaa gtcactggga ggcgcgct	38
	<210> 26	
	<211> 3120	
	<212> ADN	
	<213> Salmonella Typhi Ty2	
30	<400> 26	
	ttgcccatgc tacgtatcgc taaagaagcc ctgacgtttg acgacgtcct ccttggtccc	60
	gtcactcca ccgtttttgcc gaatactgct gatctcagca cgcagttgac gaaaactatt	120
	cgtctgaata ttcctatgct ttctgcggcg atggacaccg tgacggaagc gcgcctggca	180
	attgccctgg ccaggaagg cggcatcggt tttatccaca aaaacatgtc tattgagcgc	240
	caggcggaag aagttcgccg cgtgaagaaa cacgagtccg gcgtagtgc cgacccgcag	300
	accgtcctgc caaccaccac gttgcatgaa gtgaaagccc tgaccgagcg taacgggtttt	360
	gcgggctatc cgggtggtgac tgaagataac gagctggtgg gtatcatcac cggtcgtgac	420
	gtgcggttttg tgactgacct gaaccagccg gtgagtgttt acatgacgcc gaaagagcgt	480

ctggtgaccg ttcgtgaagg cgaagcccg	gaagtcgtgc tggcaaaaat gcacgaaaaa	540
cgcgtagaaa aagcgcctggt cgttgatgat	aacttccatc tgcttggcat gattaccgta	600
aaagatttcc agaaagcgga acgtaaacca	aactcctgta aagatgagca gggcgcgttta	660
cgtgtcggcg cggcggtcgg cgcaggcgcg	ggcaacgaag agcgcgttga cgcgcctggtg	720
gcggcaggcg ttgacgtcct gctgatcgac	tcttctcacg gtcaactctga aggcgtgttg	780
caacgtatcc gtgaaaccog tgctaaatat	cctgacctgc aaatcatcgg cggcaacgtc	840
gcgacggggc caggcgcctcg cgcactggcg	gaagccggtt gcagcgcggt gaaagtcggt	900
atcgcccgcg gttccatctg taccactcgt	atcgtgactg gcgtgggcgt tccgcagatt	960
accgctgttt ctgacgcagt tgaagcgcctg	gaaggcaccg ggattccggt tatcgcctgac	1020
ggcggatatcc gtttctccgg cgacatcgcc	aaagccatcg ccgcaggcg gcgcgcctg	1080
atggtcgggt ctatgctggc ggggtaccga	gaatccccgg gcgaaatcga actctaccag	1140
ggcgcgttctt acaaattctta ccgcggcatg	ggctcgcctg gcgcgatgtc caaaggttcc	1200
tctgaccggt acttccagag cgacaacgcc	gccgacaaac tgggtgccga aggtatcgaa	1260
ggccgcgtag cctataaagg tcgcctgaaa	gagatcattc accagcagat gggcggcctg	1320
cgctcctgta tggggctgac cgggtgtgct	accatcgacg aactgcgtac taaagcggag	1380
tttgtgcgta tcagcgggtgc ggggtatccag	gaaagccacg ttcacgacgt gaccatcacc	1440
aaagagtccc cgaactaccg tctgggctcc	tgattttctt cggccgacct tcgcgtcggg	1500
cgatttatatt aatctgtttc acttgcctcg	gaataagcgt caatgacgga aaacattcat	1560
aagcatcgca tcttcattct ggacttcggt	tctcagtaca ctcaactggt tgcgcgcgcg	1620
gtgcgtgagc tgggtgttta ctgcgaactg	tgggcgtggg atgtgacaga agcacaaatt	1680
cgtgacttca acccaagcgg cattattctt	tccggcggcc cggaaagcac caccgaagaa	1740
aacagcccgc gcgcgcgcga gtatgtcttt	gaagcaggcg tgccggtatt tggcgtctgc	1800
tacgggatgc agaccatggc gatgcagctt	ggcggtcatg tagaagggtc taatgagcgt	1860
gaatttggtt acgcgcaggt cgaagtgtg	accgacagcg cgctgggttc cggatttgaa	1920
gattccctga ccgccgacgg caaacgcgtg	ctggacgtgt ggatgagcca cggcgataaa	1980
gtgacggcga ttccgtccga cttcgtgacc	gtagccagca ccgaaagctg cccgttcgcc	2040
atcatggcta acgaagaaaa acgcttctac	ggcgtacagt tccacccgga agtgactcac	2100
accgcgccagg gtatgcgcat gctggagcgt	tttgtgcgtg atatctgcca gtgtgaagcc	2160
ctgtggacgc cggcgaagat catcgacgac	gccgtggcgc gcattcgca gcaggtaggc	2220
gacgataaag tgatcctcgg tctctccggc	ggcgtggatt cttccgtaac cgcaatgctg	2280
ctgcaccgcg cgatcggtaa aaatctgacc	tgtgtattcg tcgacaacgg cctgctgcgt	2340
ctcaacgaag ccgagcaggt gatggacatg	tttggcgacc attttgggtc gaacatcggt	2400

ES 2 431 327 T3

```

cacgtaccgg cagaagatcg cttcctgtcc gcgttggtcg gcgaaaacga tccggaagcg 2460
aagcgtaaga tcattggccg tgtttttgtg gaagtgttcg acgaagaagc gttgaaactg 2520
gaagacgtga aatggctggc gcagggcacc atctaccctg acgtcatcga atctgcggcg 2580
tctgcaaccg gtaaagcgca cgtcatcaaa tctcaccaca atgttggtcg cctgccgaaa 2640
gagatgaaga tggggctggt tgaaccgctg aaagagctgt tcaaagacga agtgcgtaag 2700
attggtcttg agctgggcct gccgtacgac atgctgtacc gtcattccgtt cccggggccg 2760
ggcctcgggc tacgtgtact ggggtgaagtg aagaaagagt actgcgacct gctgcgccgt 2820
gctgatgcca tcttcattga agagctgctg aaggcggatc tgtacgacaa agtcagccag 2880
gcgttcaccg tcttcctgcc agtacgctcc gttggcgtaa tgggcgatgg tcgtaagtac 2940
gattgggttg tctctctgcg tgctgtcgaa accatcgact ttatgaccgc gcaactggcg 3000
cacctgcctg atgacttcct gggctcgtgtt tccaaccgca tcatcaatga agtcaacggg 3060
atttcccggt tgggtgatga catcagcggg aaaccaccgg ctaccattga gtgggaataa 3120

```

<210> 27

<211> 2147

<212> ADN

5 <213> Salmonella Typhi Ty2

<400> 27

```

ttattcgcca gaagcctgcg cttccggttt gccgtaaatc agcaacggct tactctgacc 60
ggcaataacg gactcgtcaa tcaccacttt ttcgacgtct tccatagatg gcaaatcgta 120
catggtatcc agcagcgccg cttcgacgat agaacgcagg ccacgggcac cagttttacg 180
cgccatcgct ttcctggcga tagcggtcag cgcttcgtca cggaattcca gatcgacgcc 240
ttccagggtta aacagcgctt gatactgctt ggtcagcgca tttttcggct ctttcaggat 300
ttgaaccagc gcttcttcgc tgagttcgtt cagcgtcgcc accactggca gacgaccgat 360
aaactcagga atcagaccaa atttgatcaa atcttcgggt tcaacctgcg acaacagctc 420
gccttcactg gctttgtcgg acttcgcttt caccgtcgcg ccaaaaccaa tgccggagcc 480
ggtttcaaca cggttagcga tcactttatc cagaccggca aacgcgccgc cgcagataaa 540
cagaatctta gaggtatcta cctgtaagaa ctctgctgc ggatgtttgc gaccgcctg 600

```

ES 2 431 327 T3

```

cggtggaacc gcggcgacgg tgccttcgat cagtttcagc aacgcctgct gtacgccttc 660
gccggaaaca tcgcgggtaa tggacggatt gtctgattta cgcgaaatct tctcgatttc 720
atcaatgtag acaatccac gctgcgcttt ttgcacgtcg tagtcgcatt tctgcaaag 780
tttctgaatg atattctcga cgtcttcccc cagctaaccg gcttcgggtca gcgtgggtcg 840
atccgccata gtgaacggca catccagcaa gcgcgccagc gtttcgccca gcagcgtttt 900
accggaaccg gtcgggtccag tcagcagaat gttgcttttg cctaactcga cgccattgct 960
ggatcgcgg ttacgcagac gcttgtagtg gttatagacc gccaccgcca gcactttttt 1020
cgctgctcc tggccgataa cgtaatcgtc caggtgagta cgaatttcatt gcggcgctcg 1080
cagcgcacta cgttcacggg gcggagcaac ttctttaatt tcttcgcgaa taatgtcggt 1140
acataaatcg acgcattcgt cgcagatata cagggatgga cgggcaatca gcttgcgcac 1200
ttcatgctgg cttttgccgc aaaaagagca gtacaacaat ttgcccgagc catctttgcg 1260
tttatctgtc atgagtcaaa acctcttctt tgttctttgt gccgcacagc acgacgcaaa 1320
tgccattctc aggcgcaagc cgctaatacag cgttggtgcc ccttcatta gtatatacac 1380
aaaatcattc gagctacatc aaggcggcaa ctacgcgact ccgcaggcgc ttacataagt 1440
aagtcactgg gaggcgcgct ggcaaccaac accgaggtag cgtgaaggat gaagtgtata 1500
gcggcacact tgcgtccagg gcatcaatta cgatgggtca aaattgagtc aaccaaaccg 1560
tactctaccg cttcaggcgc ggagaggaag cgatcgcgct cagtatcacg ttcaatctgc 1620
tcaagagatt gacccgtatg atgcgccata agttcattca tgcgcccttt tactttcaaa 1680
atttcgcggg cgtgaatttc aatatccgtc gcctggccct gatagccgcc cagcggctgg 1740
tggatcatga cgcgagagtt cggcaagcag aaacgtttgc ctttcgcccc ggcagtcagc 1800
agaaacgccc ccatagaggc cgctgtccc atacaaatgg tgctgacgtc tggcttaata 1860
aactgcatgg tgtcatagat ggacatccc gcagtaatta cgcgccagg agaattaatg 1920
tacagataga tatctttttc cgggttttcc gcttcaggga acagcatctg cgccacgatc 1980
aggtttagcca tatggtcttc gacctggccg gtcagaaata tgacgcgttc cttaagtaga 2040
cgagaataga tatcaaaaga gcgtcacccg cgtgaggtct gttcaatgac catcggcacc 2100
agcgccatat gaggggcaaa attatctcgt tctccgctgt atgacat 2147

```

<210> 28
 <211> 687
 <212> ADN
 <213> E. coli

<400> 28

```

cctagggcca gcaaaaggcc aggaaccgta aaaaggccgc gttgctggcg tttttccata    60
ggctccgccc ccctgacgag catcacaaaa atcgacgctc aagtcagagg tggcgaaacc    120
cgacaggact ataaagatac caggcgtttc cccctggaag ctccctcgtg cgctctcctg    180
ttccgaccct gccgcttacc ggatacctgt ccgcctttct cccttcggga agcgtggcgc    240
tttctcatag ctacgctgt aggtatctca gttcgggtgta ggtcgttcgc tccaagctgg    300
gctgtgtgca cgaaccccc gttcagcccg accgctgcgc cttatccggt aactatcgtc    360
ttgagtccaa cccggtgaaga cagacttat cgccactggc agcagccact ggtaacagga    420
ttagcagagc gaggtatgta ggcgggtgcta cagagtctct gaagtgggtg cctaactacg    480
gctacactag aaggacagta tttggtatct gcgctctgct gaagccagtt accttcggaa    540
aaagagttgg tagctcttga tccggcaaac aaaccaccgc tggtagcggg ggtttttttg    600
tttgcaagca gcagattacg cgcagaaaaa aaggatctca agaagatcct ttgatctttt    660
ctacggggtc tgacgctcag tagatct                                     687

```

<210> 29

<211> 635

<212> ADN

5 <213> Salmonella typhimurium

<400> 29

```

cctaggagat acttaacagg gaagtgagag ggccgcggca aagccgtttt tccataggct    60
ccgccccct gacaagcatc acgaaatctg acgctcaa at cagtgggtggc gaaacccgac    120
aggactataa agataccagg cgtttccccc tggcggtctc ctctgctgct ctctgttcc    180
tgcctttcgg tttaccggtg tcattccgct gttatggccg cgtttgtctc attccacgcc    240
tgacactcag ttccgggtag gcagttcgtc ccaagctgga ctgtatgcac gaaccccccg    300
ttcagtccga ccgctgcgcc ttatccggtg actatcgtct tgagtccaac ccggaaagac    360
atgcaaaaagc accactggca gcagccactg gtaattgatt tagaggagtt agtcttgaag    420
tcatgcgccg gttaaggcta aactgaaagg acaagttttg gtgactgcgc tcctccaagc    480
cagttacctc ggttcaaaga gttggtagct cagagaacct tcgaaaaacc gccctgcaag    540
gcggtttttt cgttttcaga gcaagagatt acgcgcagac caaaacgatc tcaagaagat    600
catcttatta atcagataaa atattttctag gatct                                     635

```

<210> 30

<211> 1955

<212> ADN

10 <213> E. coli

<400> 30

cctagggtttc acctgttcta ttaggtgtta catgctgttc atctgttaca ttgtcgatct	60
gttcatgggtg aacagcttta aatgcaccaa aaactcgtaa aagctctgat gtatctatct	120
tttttacacc gttttcatct gtgcatatgg acagttttcc ctttgatata taacgggtgaa	180
cagttgttct acttttgttt gttagtcttg atgcttcact gatagataca agagccataa	240
gaacctcaga tcttccgta tttagccagt atgttctcta gtgtgggttcg ttgtttttgc	300
gtgagccatg agaacgaacc attgagatca tgcttacttt gcatgtcact caaaaatttt	360
gcctcaaaac tggtagagctg aatttttgca gttaaagcat cgtgtagtgt ttttcttagt	420
ccgttacgta ggtaggaatc tgatgtaatg gttgttggtt ttttgtcacc attcattttt	480
atctggttgt tctcaagttc ggttacgaga tccatttgtc tatctagttc aacttggaaa	540
atcaacgtat cagtcggggcg gcctcgctta tcaaccacca atttcatatt gctgtaagtg	600
tttaaattctt tacttatttg tttcaaaacc cattgggttaa gcctttttaa ctcatggtag	660
ttattttcaa gcattaacat gaacttaa at tcatcaaggc taatctctat atttgccttg	720
tgagttttct tttgtgttag ttctttta at aaccactcat aaatcctcat agagtatttg	780
ttttcaaaag acttaacatg ttccagatta tattttatga atttttttaa ctggaaaaga	840
taaggcaata tctcttcact aaaaactaat tctaattttt cgcttgagaa cttggcatag	900
tttgtccact ggaaaatctc aaagccttta accaaaggat tcttgatttc cacagttctc	960
gtcatcagct ctctggttgc tttagcta at acaccataag ctttttccct actgatgttc	1020
atcatctgag cgtattgggt ataagtgaac gataccgtcc gttctttcct tgtagggttt	1080
tcaatcgtgg ggttgagtag tgccacacag cataaaatta gcttgggttc atgctccgtt	1140
aagtcatagc gactaatcgc tagttcattt gctttgaaaa caactaatc agacatacat	1200
ctcaattgggt ctaggtgatt ttaatcacta taccaattga gatgggctag tcaatgataa	1260
ttactagtcc ttttcctttg agttgtgggt atctgtaaat tctgctagac ctttgctgga	1320
aaacttgtaa attctgctag accctctgta aattccgcta gacctttgtg tgtttttttt	1380
gtttatattc aagtgggtat aatttataga ataaagaaag aataaaaaaa gataaaaaga	1440
atagatccca gccctgtgta taactcacta ctttagtcag ttccgcagta ttacaaaagg	1500
atgtcgcaaa cgctgtttgc tctctacaa aacagacctt aaaaccctaa aggcttaagt	1560
agcaccctcg caagctcggg caaatcgtg aatattcctt ttgtctccga ccatcaggca	1620
cctgagtcgc tgtctttttc gtgacattca gttcgtgcg ctcacggctc tggcagtgaa	1680

ES 2 431 327 T3

tggggggtaaa tggcactaca ggcgcctttt atggattcat gcaaggaaac taccataat 1740
acaagaaaag cccgtcacgg gcttctcagg gcgttttatg gcgggtctgc tatgtggtgc 1800
tatctgactt tttgctgttc agcagttcct gccctctgat tttccagtct gaccacttcg 1860
gattatcccg tgacaggtca ttcagactgg ctaatgcacc cagtaaggca gcggtatcat 1920
caacaggctt acccgtctta ctgtcaaccg gatct 1955

<210> 31

<211> 1686

<212> ADN

5 <213> Escherichia coli

<400> 31

cacttttgtt acccgccaaa caaaacccaa aaacaacca tacccaacc aataaaacac 60
caaaacaaga caaataatca ttgattgatg gttgaaatgg ggtaaacttg acaaacaac 120
ccacttaaaa cccaaaacat acccaaacac acaccaaaaa aacaccataa ggagttttat 180
aatgtttggt attcattgat gacggttcaa caaacatcaa actacagtgg caggaaagcg 240
acggaacaat taaacagcac attagcccgga acagcttcaa acgcgagtgg gcagtctctt 300
ttggtgataa aaaggtcttt aactacacac tgaacggcga acagtattca tttgatccaa 360
tcagcccgga tgctgtagtc acaaccaata tcgcatggca atacagcgac gttaatgtcg 420
ttgcagtgca tcacgcctta ctgaccagtg gtctgccggt aagcgaagtg gatattgttt 480
gcacacttcc tctgacagag tattacgaca gaaataacca acccaatacg gaaaatattg 540
agcgtaagaa agcaaacttc cggaaaaaaa ttacattaaa tggcggggat acattcacia 600
taaaagatgt aaaagtcag cctgaatcta taccggcagg ttatgaagtt ctacaagaac 660
tggtatgagtt agattcttta ttaattatag atctcggggg caccacatta gatatttctc 720
aggtaatggg gaaattatcg gggatcagta aaatatacgg agactcatct cttggtgtct 780
ctctggttac atctgcagta aaagatgcc tttctcttgc gagaacaaaa ggaagtagct 840
atcttgctga cgatataatc attcacagaa aagataataa ctatctgaag caacgaatta 900
atgatgagaa caaaatatca atagtcaccg aagcaatgaa tgaagcactt cgtaaacttg 960
agcaacgtgt attaaatacg ctcaatgaat tttctgggta tactcatggt atgggttatag 1020

ES 2 431 327 T3

gcggtggcgc agaattaata tgcgatgcag taaaaaaca cacacagatt cgtgatgaac 1080
gttttttcaa aaccaataac tctcaatatg atttagttaa cggtatgtat ctcataggta 1140
attaatgatg gacaagcgca gaaccattgc cttcaaacta aatccagatg taaatcaaac 1200
agataaaatt gtttgtgata cactggacag tatcccgcaa ggggaacgaa gccgccttaa 1260
ccgggccgca ctgacggcag gtctggcctt atacagacaa gatccccgga cccctttcct 1320
tttatgtgag ctgctgacga aagaaaccac attttcagat atcgtgaata tattgagatc 1380
gctattttcca aaagagatgg ccgattttta ttcttcaata gtcactcaat cctcttcaca 1440
acaagagcaa aaaagtgatg aagagaccaa aaaaaatgcg atgaagctaa taaattaatt 1500
caattattat tgagttccct ttatccacta tcaggctgga taaagggaac tcaatcaagt 1560
tattttctta ccagtcatta cataatcggt attatgaaat aatcgtttgc actgtctctg 1620
ttattcaggc aatttcaata aaggcacttg ctcacgctct gtcattttct gaaactcttc 1680
atgctg 1686

<210> 32
<211> 367
<212> ADN
5 <213> Escherichia coli

<400> 32
gacagtaaga cgggtaagcc tgttgatgat accgctgcct tactgggtgc attagccagt 60
ctgaatgacc tgtcacggga taatccgaag tggtcagact ggaaaatcag agggcaggaa 120
ctgctgaaca gcaaaaagtc agatagcacc acatagcaga cccgccataa aacgccctga 180
gaagcccgtg acgggctttt cttgtattat gggtagtttc cttgcatgaa tccataaaaag 240
gcgcctgtag tgccatttac cccattcac tgccagagcc gtgagcgcag cgaactgaat 300
gtcacgaaaa agacagcgac tcagggtgcct gatggtcgga gacaaaagga atattcagcg 360
atttgcc 367

<210> 33
10 <211> 459
<212> ADN
<213> Escherichia coli

<400> 33

ES 2 431 327 T3

```

ttctgtggta gcacagaata atgaaaagtg tgtaaagaag ggtaaaaaaa accgaatgcg      60
aggcatccgg ttgaaatagg ggtaaacaga cattcagaaa tgaatgacgg taataaataa      120
agttaatgat gatagcggga gttattctag ttgcgagtga aggttttggt ttgacattca      180
gtgctgtcaa atacttaaga ataagttatt gattttaacc ttgaattatt attgcttgat      240
gttaggtgct tatttcgcca ttccgcaata atcttaaaaa gtcccttgc atttacattt      300
tgaaacatct atagcgataa atgaaacatc ttaaagttt tagtatcata ttcgtgttgg      360
attattctgc atttttgggg agaatggact tgccgactga ttaatgaggg ttaatcagta      420
tgcagtggca taaaaaagca aataaaggca tataacaga      459

```

<210> 34

<211> 734

<212> ADN

5 <213> Shigella flexneri 2a cepa CVD 1208s

<400> 34

```

catatgattg acctgaatga atatacagta ttggaatgca ttatccggag tggtgtgtaa      60
caatgtctgg ccaggtttgt ttcccggaac cgaggtcaca acatagtaaa agcgctattg      120
gtaatggtac aatcgcgctg ttacacttat tcagaacgac aggagacacg aacatggcca      180
gcagaggcgt aaacaagggt attctcgttg gtaatctggg tcaggaccgg gaagtacgct      240
acatgccaaa tgggtggcgca gttgccaaca ttacgctggc tacttccgaa tcttggcgtg      300
ataaagcgac cggcgagatg aaagaacaga ctgaatggca ccgcggtgtg ctgttcggca      360
aactggcaga agtggcgagc gaatatctgc gtaaagggtc tcaggtttat atcgaaggtc      420
agctgcgtac ccgtaaattg accgatcaat ccggtcagga tcgctacacc acagaagtcg      480
tgggtgaacgt tggcggcacc atgcagatgc tgggtggtcg tcagggtggt ggcgctccgg      540
cagggtggcaa tatcgggtgg ggtcagccgc agggcggttg gggtcagcct cagcagccgc      600
aggggtggcaa tcagttcagc ggcggcgcg cgtctcgccc gcagcagtc gctccggcag      660
cgccgtctaa cgagccggcg atggactttg atgatgacat tccgttctga tttgtcatta      720
aaacaatagc tagc      734

```

<210> 35

<211> 1467

<212> ADN

10 <213> Salmonella Paratyphi A 9150

<220>

<221> misc_feature

15 <223> guaB

<400> 35

ES 2 431 327 T3

```

atgctacgta tcgctaaaga agccctgacg tttgacgacg tcctccttgt tcccgcctcac      60
tccaccggttt tgccgaatac tgccgatctc agcacgcagt tgacgaaaac tattcgtctg      120
aatattccta tgctttctgc ggcgatggac accgtgacgg aagcgcgccct ggcaattgcc      180
ctggcccagg aaggcggcat tggttttatc cacaaaaaca tgtccattga gcgccaggcg      240
gaagaagttc gccgcgtgaa gaaacacgag tccggcgtag tgaccgaccc gcagaccgtc      300
ctgccaacca ccacgttgca tgaagtgaag gccctgaccg agcgtaaacgg ttttgcgggc      360
tatccggttg tgactgaaga taacgagctg gtggggatca tcaccggtcg tgacgtgcgt      420
tttgtgactg acctgaacca gccggttaagt gtctacatga cgccgaaaga gcgtctggtg      480
accgttcgtg aaggcgaagc ccgtgaagtc gtgctggcaa aaatgcacga aaaacgcgta      540
gaaaaagcgc tggtcgttga tgataacttc catctgcttg gcatgattac cgtaaaagat      600
ttccagaaag cggaacgtaa accaaactcc tgtaaagatg agcagggccg tttacgtgtc      660
ggcgcgggcg tcggcgcgag cgcgggcaac gaagagcgcg ttgacgcgct ggtggcgcca      720
ggcgttgacg tactgctgat cgactcctct cacggtcact ctgaaggcgt gttgcaacgt      780
atccgtgaga cgcgtgctaa atatcctgac ctgcaaatca tcggcgggcaa cgttgcgacg      840
ggcgcgaggc ctcgcgcact ggcggaagcc ggttgccagc cggtgaaagt gggatatcggc      900
ccgggctcca tctgtaccac tcgtatcgtg actggtgtgg gcgttccgca gatcaccgct      960
gtttccgacg cggtagaagc gctggaaggc accggaattc cggttatcgc tgacggcggt      1020
atccgtttct ccggcgacat cgccaaagcc atcgccgcag gcgcgagcgc cgtgatgggtg      1080
ggctctatgc tggccgggtac cgaagaatcc ccgggcgaaa tcgaactcta ccagggccgt      1140
tcgtacaaat cttaccgcgg catgggctcg ctgggcgcga tgtccaaagg ttccctccgac      1200
cgttacttcc agagcgacaa cgccgctgac aaactggtgc cgggaaggat cgaaggccgc      1260
gtagcctata aaggtcgcct gaaagagatc attcaccagc agatgggcgg cctgcgctcc      1320
tgtatggggc tgaccggttg tgctaccatc gacgaactgc gtactaaagc ggagtttgtg      1380
cgtatcagcg gtgcgggtat ccaggaaagc cacgttcacg acgtgaccat caccaaagag      1440
tccccgaact accgtctggg ctccctga      1467

```

<210> 36
 <211> 1578
 <212> ADN
 <213> Salmonella Paratyphi A 9150

<220>

<221> misc_feature

<223> guaA

<400> 36

```

atgacggaaa acattcataa gcacgcacac ctcatctctg acttcgggtc tcagtaacact    60
caactgggtg cgcgcgcgtg ggcgtgagctg ggtgtttact gcgaactgtg ggcgtgggat    120
gtgacagaag cacaattcgt tgacttcaac ccaagcggca ttattctttc cggcggcccg    180
gaaagcacca ccgaagaaaa cagcccgcgc gcgcgcgagt atgtctttga agcaggcgtg    240

ccggtatttg gcgtttgcta tggatatgcag accatggcga tgcagcttgg cggtcattgta    300
gaaggttcta atgagcgtga atttgggtat gcgcaggctg aagtgttgac cgacagcgcg    360
ctggttcgcg gtattgaaga ttccctgacc gcagacggca aaccgctgct ggacgtgtgg    420
atgagccacg gcgataaagt gacggcgatt ccgtccgact tcgtgaccgt cgccagcacc    480
gagagctgcc cgttcgccat catggctaac gaagaaaaac gcttctacgg cgtacagttc    540
cacccggaag tgaccacac cgcgcagggg atgcgcacgc tggagcgttt tgtgcgtgat    600
atctgccagt gtgaagcgtt gtggacgcgc gcgaagatca tcgacgacgc cgtggcgcgc    660
attcgcgagc aggtaggcga cgataaagt atcctcggtc tctcgggcgg cgtggattct    720
tccgtcaccg caatgctgct gcaccgcgcg atcggtaaaa atctgacctg tgtattcgtc    780
gacaacggcc tgctgcgtct caacgaagcc gagcaggatga tggacatgtt tggcgaccat    840
tttggcctga atatcggtca cgttcgcggc gaagagcgtc tctgtccgc gttggctggc    900
gaaaacgata cggaaagcga gcgtaagatc attggcgcgt tttttgtgga agtgttcgac    960
gaagaagcgt tgaaactgga agacgtgaaa tggctggcgc agggcaccat ctaccctgac   1020
gtcatcgagt ctgcggcgtc tgcaaccggt aaagcgcacg tcatcaaata tcaccacaat   1080
gttggcggcc tgccgaaaga gatgaagatg gggctgggtg aaccgctgaa agagctgttc   1140
aaagacgaag tgcgtaagat tggctctggg ctgggcctgc cgtacgacat gctgtaccgt   1200
catccgttcc cggggcgcgg cctcggcgta cgtgtactgg gtgaagtga gaaagagtac   1260
tgcgacctgt tgcgccgtgc tgacgccatc ttcatgaaag agctgcgtaa ggcggatctg   1320
tacgacaaag tcagccaggc gttcaccgtc ttctgccag tacgctccgt tggcgtaatg   1380
ggcgatggtc gtaagtacga ttgggtggtc tccctgcgtg ctgtcgaaac catcgacttt   1440
atgactgcgc actgggcgca tctgccgtat gaattcctgg gtcgtgtttc caaccgcac   1500
atcaatgaag tcaacgggat ttcccggtg gtgtatgaca tcagcggtaa accaccggct   1560
accattgagt gggaataa

```

<210> 37

<211> 624

<212> ADN

<213> Salmonella Paratyphi A 9150

<220>

<221> misc_feature

ES 2 431 327 T3

<223> clpP

<400> 37

```

atgtcataca gcggaagaacg agataatttg gccctcata tggcgctggg gccgatgggc 60
attgaacaga cctcacgcgg tgagcgctct ttgatatact attctcgtct acttaaggaa 120

cgcgtcatat ttctgaccgg ccagggtcgaa gaccatatgg ctaacctgat cgtggcgag 180
atgctgttcc tggaagcgga aaaccggaa aaagatatct atctgtacat taattctcct 240
ggcgggcgtaa ttactgcggg gatctccatc tatgacacca tgcagtttat taagccagac 300
gtcagcacca ttgtatggg acaggcgggc tctatggggg cgtttctgct gactgccggg 360
gcgaaaggca aacgtttctg cttgcggaac tctcgctca tgatccacca gccgctgggc 420
ggctaccagg gccaggcgac ggatattgaa attcacgcc gccgaaatttt gaaagtaaaa 480
ggcgcatga atgaacttat ggcgcatcat acgggtcaat ctcttgagca gattgaacgt 540
gatactgagc gcgatcgctt cctctccgcg cctgaagcgg tagagtacgg ttgggttgac 600
tcaattttga cccatcgtaa ttga 624

```

- 5 <210> 38
- <211> 1272
- <212> ADN
- <213> Salmonella Paratyphi A 9150

<220>

- 10 <221> misc_feature

<223> clpX

<400> 38

ES 2 431 327 T3

```

atgacagata aacgcaaaga tggctcgggc aaattgttgt actgctcttt ttgcggcaaa      60
agccagcatg aagtgcgcaa gctgattgcc ggtccatccg tgtatatctg cgacgaatgc      120
gtcgatttat gtaacgacat tattcgcgaa gaaattaaag aagttgctcc gcaccgtgaa      180
cgtagtgcgc tgccgacgcc gcatgaaatt cgtaccacc tggacgatta cgttatcggc      240
caggagcagg cgaaaaaagt gctggcgggtg gcggtctata accactacaa gcgtctgcgt      300
aacggtgata ccagcaatgg cgtcgagtta ggcaaaagca acattctgct gattggaccg      360
accggttccg gtaaaacgct gctggcggaa acgctggcgc gcttgctgga tgtgccgttc      420
actatggcgg atgcgaccac gctgaccgaa gcgggttacg tgggtgaaga cgtcgagaat      480
atcattcaga aactgttgca gaaatgcgac tacgacgtgc aaaaagcgca gcgtgggatt      540
gtctacattg atgaaatcga taagatttcg cgtaaatacag acaatccgtc cattaccgcg      600
gatgtttccg gcgaaggcgt acagcaggcg ttgctgaaac tgatcgaagg caccgtcgcc      660
gcggttccac cgcagggcgg tcgcaaacat ccgcagcagg agttcttaca ggtagatacc      720
tctaagattc tgtttatctg cggcggcgcg tttgctggtc tggataaagt gatcgctaac      780
cgtgttgaaa ccggctccgg cattggtttt ggcgcgacgg tgaaagcgaa gtccgacaaa      840
gccagcgaag gcgagctggt gtcgcagggt gaaccggaag atttgatcaa atttggctctg      900

attcctgagt ttatcggtcg tctgccagtg gtggcgacgc tgaacgaact cagcgaagaa      960
gcgctgattc aaatcctgaa agagccgaaa aatgcgctga ccaagcagta tcaggcgctg     1020
tttaacctgg aaggcgctga tctggaattc cgtgacgaag cgctggacgc tatcgccagg     1080
aaagcaatgg cgcgtaaaac cgggtgccgt ggtctgcgtt ctatcgtcga agcggcgctg     1140
ctggatacca tgtacgattt gccatctatg gaagacgtcg aaaaagtggg gatcgacgag     1200
tccgttattg ccggtcagag taagccgttg ctgatttacg gcaaaccgga agcgcaggct     1260
tctggcgaat aa                                                                1272

```

<210> 39

<211> 1272

<212> ADN

5 <213> Salmonella Typhi Ty2

<220>

<221> misc_feature

<223> gen clpX

<400> 39

ES 2 431 327 T3

```

atgacagata aacgcaaaga tggctcgggc aaattgttgt actgctcttt ttgcggcaaa      60
agccagcatg aagtgcgcaa gctgattgcc ggtccatccg tgtatatctg cgacgaatgc      120
gtcgatttat gtaacgacat tattcgcgaa gaaattaaag aagttgctcc gcaccgtgaa      180
cgtagtgcg cgcgcgacgc gcatgaaatt cgtactcacc tggacgatta cgttatcggc      240
caggagcagg cgaaaaaagt gctggcgggtg gcgggtctata accactacaa gcgtctgcgt      300
aacggcgata ccagcaatgg cgtcgagtta ggcaaaagca acattctgct gactggaccg      360
accggttccg gtaaaacgct gctggcggaa acgctggcgc gcttgctgga tgtgccgttc      420
actatggcgg atgcgaccac gctgaccgaa gcgggttacg tgggggaaga cgtcgagaat      480
atcattcaga aactgttgca gaaatgcgac tacgacgtgc aaaaagcgca gcgtgggatt      540
gtctacattg atgaaatcga taagatttcg cgtaaatacag acaatccgtc cattaccgcg      600
gatgtttccg gcgaaggcgt acagcaggcg ttgctgaaac tgatcgaagg caccgtcgcc      660
gcggttccac cgcagggcgg tcgcaaacat ccgcagcagg agttcttaca ggtagatacc      720
tctaagattc tgtttatctg cggcggcgcg tttgcgggtc tggataaagt gatcgctaac      780
cgtgttgaaa ccggctccgg cattggtttt ggcgcgacgg tgaaagcgaa gtccgacaaa      840
gccagtgaag gcgagctggt gtcgcagggt gaaccggaag atttgatcaa atttggtctg      900
attcctgagt ttatcggtcg tctgccagtg gtggcgacgc tgaacgaact cagcgaagaa      960
gcgctgggtc aaatcctgaa agagccgaaa aatgcgctga ccaagcagta tcaggcgctg     1020

tttaacctgg aaggcgctga tctggaattc cgtgacgaag cgctgaacgc tatcgccagg     1080
aaagcgatgg cgcgtaaaac tggtgcccggt ggccctgcgt ctatcgtcga agcggcgctg     1140
ctggatacca tgtacgattt gccatctatg gaagacgtcg aaaaagtggg gattgacgag     1200
tccgttattg ccggtcagag taagccgttg ctgatttacg gcaaaccgga agcgcaggct     1260
tctggcgaat aa                                                                1272

```

<210> 40

<211> 624

<212> ADN

5 <213> Salmonella Typhi Ty2

<220>

<221> misc_feature

<223> gen clpP

<400> 40

ES 2 431 327 T3

atgtcataca ggggagaacg agataatttg gcccctcata tggcgctggt gccgatggtc	60
attgaacaga cctcacgcgg tgagcgctct tttgatatct attctcgtct acttaaggaa	120
cgcgtcatat ttctgaccgg ccaggctcgaa gaccatatgg ctaacctgat cgtggcgag	180
atgctgttcc tggaagcgga aaaccggaa aaagatatct atctgtacat taattctcct	240
ggcggcgtaa ttactgcggg gatgtccatc tatgacacca tgcagtttat taagccagac	300
gtcagcacca tttgtatggg acaggcgggc tctatggggg cgtttctgct gactgccggg	360
gcgaaaggca aacgtttctg cttgccgaac tctcgctca tgatccacca gccgctgggc	420
ggctatcagg gccaggcgac ggatattgaa attcacgccc gcgaaatddd gaaagtataa	480
gggcgcata atgaacttat ggcgcatac acgggtcaat ctcttgagca gattgaacgt	540
gatactgagc gcgatcgctt cctctccgcg cctgaagcgg tagagtacgg tttggttgac	600
tcaatdddga cccatcgtaa ttga	624

REIVINDICACIONES

1. Cepa de *Salmonella* Paratyphi A atenuada, teniendo dicha cepa una mutación atenuante en los loci *guaBA* y una mutación atenuante en el gen *clpX*.
- 5 2. Cepa de *Salmonella* Paratyphi A según la reivindicación 1, caracterizada porque la mutación atenuante en los loci *guaBA* es una mutación atenuante en el gen *guaB* o una mutación atenuante en el gen *guaA* o una mutación atenuante en ambos genes.
3. Cepa de *Salmonella* Paratyphi A según la reivindicación 1, caracterizada porque la mutación atenuante en los loci *guaBA* es una mutación atenuante en el gen *guaB* o una mutación atenuante en el gen *guaA* o una mutación atenuante en ambos genes y porque la cepa tiene una mutación atenuante adicional en el gen *clpP*.
- 10 4. Cepa de *Salmonella* Paratyphi A según la reivindicación 1, caracterizada porque dicha mutación atenuante es una mutación atenuante que reduce el nivel de expresión de dichos loci o dichos genes o bloquea la expresión de dichos loci o dichos genes.
- 15 5. Cepa de *Salmonella* Paratyphi A según la reivindicación 1, caracterizada porque dicha mutación atenuante es una mutación atenuante que reduce la actividad de un polipéptido codificado por dichos loci o dichos genes o inactiva un polipéptido codificado por dichos loci o dichos genes.
6. Cepa de *Salmonella* Paratyphi A según la reivindicación 1, caracterizada porque dicha cepa es la cepa S. Paratyphi A 9150.
- 20 7. Cepa de *Salmonella* Paratyphi A según la reivindicación 1, caracterizada porque dicha cepa comprende además un sistema de expresión plasmídico estabilizado.
8. Cepa de *Salmonella* Paratyphi A según la reivindicación 7, caracterizada porque dicho sistema de expresión plasmídico estabilizado comprende un vector de expresión que comprende:
 - (a) un casete de origen de replicación de número de copias restringido que incluye
 - 25 (i) una secuencia de nucleótidos que codifica un origen de replicación que limita el vector de expresión a un número medio de copias plasmídicas de aproximadamente 2 a 75 copias por célula,
 - (ii) un primer sitio de corte de enzima de restricción único situado en 5' de la secuencia de nucleótidos que codifica el origen de replicación y
 - 30 (iii) un segundo sitio de corte de enzima de restricción único situado en 3' de la secuencia de nucleótidos que codifica el origen de replicación;
 - (b) como mínimo un casete de destrucción postsegregacional que incluye
 - (i) una secuencia de nucleótidos que codifica como mínimo un locus de destrucción postsegregacional,
 - 35 (ii) un tercer sitio de corte de enzima de restricción único situado en 5' de la secuencia de nucleótidos que codifica el locus o los loci de destrucción postsegregacional y
 - (iii) un cuarto sitio de corte de enzima de restricción único situado en 3' de la secuencia de nucleótidos que codifica el locus o los loci de destrucción postsegregacional;
 - (c) como mínimo un casete de partición que comprende
 - 40 (i) una secuencia de nucleótidos que codifica como mínimo una función de partición,
 - (ii) un quinto sitio de corte de enzima de restricción único situado en 5' de la secuencia de nucleótidos que codifica la o las funciones de partición y
 - (iii) un sexto sitio de corte de enzima de restricción único situado en 3' de la secuencia de nucleótidos que codifica la o las funciones de partición; y
 - 45 (d) un casete de expresión que comprende

(i) una secuencia de nucleótidos que codifica un antígeno seleccionado unido de manera operable a un promotor,

(ii) un séptimo sitio de corte de enzima de restricción único situado en 5' de la secuencia de nucleótidos que codifica un antígeno seleccionado unido de manera operable a un promotor y

5 (iii) un octavo sitio de corte de enzima de restricción único situado en 3' de la secuencia de nucleótidos que codifica un antígeno seleccionado unido de manera operable a un promotor.

9. Cepa de *Salmonella* Paratyphi A según la reivindicación 8, caracterizada porque la secuencia de nucleótidos que codifica un origen de replicación es una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo consistente en la secuencia *oriE1* mostrada en SEQ ID n°: 28, la secuencia *ori101* mostrada en SEQ ID n°: 30 y la secuencia *ori15A* mostrada en SEQ ID n°: 29.

10. Cepa de *Salmonella* Paratyphi A según la reivindicación 8, caracterizada porque la secuencia de nucleótidos que codifica como mínimo un locus de destrucción postsegregacional es una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo consistente en una secuencia de nucleótidos que codifica el sistema letal equilibrado *ssb*, una secuencia de nucleótidos que codifica el sistema letal equilibrado *asd*, una
15 secuencia de nucleótidos que codifica el sistema proteico *phd-doc* y una secuencia de nucleótidos que codifica el sistema antisentido *hok-sok*.

11. Cepa de *Salmonella* Paratyphi A según la reivindicación 10, caracterizada porque el sistema letal equilibrado *ssb* es un locus *ssb* seleccionado del grupo consistente en el locus *ssb* de *Shigella flexneri*, el locus *ssb* de *Salmonella typhi* y el locus *ssb* de *E. coli*.

20 12. Cepa de *Salmonella* Paratyphi A según la reivindicación 10, caracterizada porque el sistema letal equilibrado *ssb* es un locus *ssb* que comprende un promotor inducible de *ssb*, un promotor constitutivo de *ssb* y una región codificadora de *ssb* de la cepa de *S. flexneri* 2a CVD 1208s mostrada en SEQ ID n°: 34.

13. Cepa de *Salmonella* Paratyphi A según la reivindicación 8, caracterizada porque la secuencia de nucleótidos que codifica como mínimo una función de partición es una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo consistente en el locus *parA* de *E. coli* mostrado en SEQ ID n°: 31 y el locus *pSC101 par* de *E. coli* mostrado en SEQ ID n°: 32.

14. Cepa de *Salmonella* Paratyphi A según la reivindicación 8, caracterizada porque el promotor (d)(i) es un promotor inducible.

30 15. Cepa de *Salmonella* Paratyphi A según la reivindicación 14, caracterizada porque el promotor (d)(i) es el promotor de *ompC* mostrado en SEQ ID n°: 33.

16. Cepa de *Salmonella* Paratyphi A según la reivindicación 8, caracterizada porque dicha secuencia de nucleótidos que codifica un antígeno seleccionado (d)(i) es una secuencia de nucleótidos que codifica un antígeno homólogo.

35 17. Cepa de *Salmonella* Paratyphi A según la reivindicación 8, caracterizada porque dicha secuencia de nucleótidos que codifica un antígeno seleccionado (d)(i) es una secuencia de nucleótidos que codifica un antígeno heterólogo.

18. Cepa de *Salmonella* Paratyphi A según la reivindicación 8, caracterizada porque dicha secuencia de nucleótidos que codifica un antígeno seleccionado (d)(i) es una secuencia de nucleótidos que codifica un antígeno seleccionado del grupo consistente en un antígeno vírico, un antígeno bacteriano, un antígeno de
40 cáncer y un antígeno autoinmune.

19. Formulación farmacéutica que comprende la cepa de *Salmonella* Paratyphi A según la reivindicación 1 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

20. Formulación farmacéutica que comprende la cepa de *Salmonella* Paratyphi A según la reivindicación 7 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

45 21. Formulación farmacéutica según la reivindicación 19, caracterizada porque dicha formulación farmacéutica es una formulación farmacéutica oral.

22. Formulación farmacéutica según la reivindicación 20, caracterizada porque dicha formulación farmacéutica es una formulación farmacéutica oral.

23. Formulaci3n farmac3utica seg3n la reivindicaci3n 19 para su uso en un m3todo para inducir en un sujeto una respuesta inmunitaria a una cepa de *Salmonella* Paratyphi A atenuada.
24. Formulaci3n farmac3utica seg3n la reivindicaci3n 20 para su uso en un m3todo para inducir en un sujeto una respuesta inmunitaria a un ant3geno seleccionado.
- 5 25. Formulaci3n farmac3utica seg3n la reivindicaci3n 23, caracterizada porque dicha respuesta inmunitaria es una respuesta inmunitaria protectora.
26. Formulaci3n farmac3utica seg3n la reivindicaci3n 24, caracterizada porque dicha respuesta inmunitaria es una respuesta inmunitaria protectora.
- 10 27. Formulaci3n farmac3utica seg3n la reivindicaci3n 24, caracterizada porque dicha respuesta inmunitaria es una respuesta inmunitaria al ant3geno seleccionado.
28. Formulaci3n farmac3utica seg3n la reivindicaci3n 24, caracterizada porque dicha respuesta inmunitaria es una respuesta inmunitaria al ant3geno seleccionado y una respuesta inmunitaria a la cepa de *Salmonella* Paratyphi A.
- 15 29. Formulaci3n farmac3utica seg3n la reivindicaci3n 23, caracterizada porque dicha cantidad inmunol3gicamente eficaz de la formulaci3n farmac3utica contiene entre aproximadamente 10^2 cfu y aproximadamente 10^{10} cfu de la cepa de S. Paratyphi A.
30. Formulaci3n farmac3utica seg3n la reivindicaci3n 23, caracterizada porque dicha cantidad inmunol3gicamente eficaz de la formulaci3n farmac3utica contiene entre aproximadamente 10^6 cfu y aproximadamente 10^9 cfu de la cepa de S. Paratyphi A.
- 20 31. Formulaci3n farmac3utica seg3n la reivindicaci3n 24, caracterizada porque dicha cantidad inmunol3gicamente eficaz de la formulaci3n farmac3utica contiene entre aproximadamente 10^2 cfu y aproximadamente 10^{10} cfu de la cepa de S. Paratyphi A.
- 25 32. Formulaci3n farmac3utica seg3n la reivindicaci3n 24, caracterizada porque dicha cantidad inmunol3gicamente eficaz de la formulaci3n farmac3utica contiene entre aproximadamente 10^6 cfu y aproximadamente 10^9 cfu de la cepa de S. Paratyphi A.

Figura 1

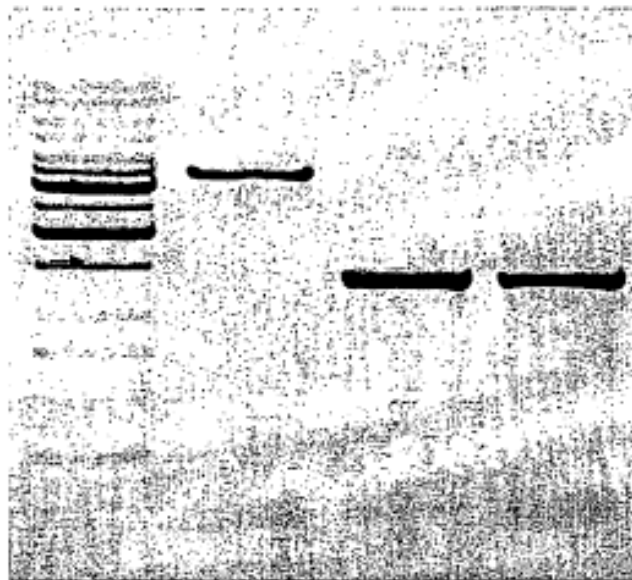


Figura 2

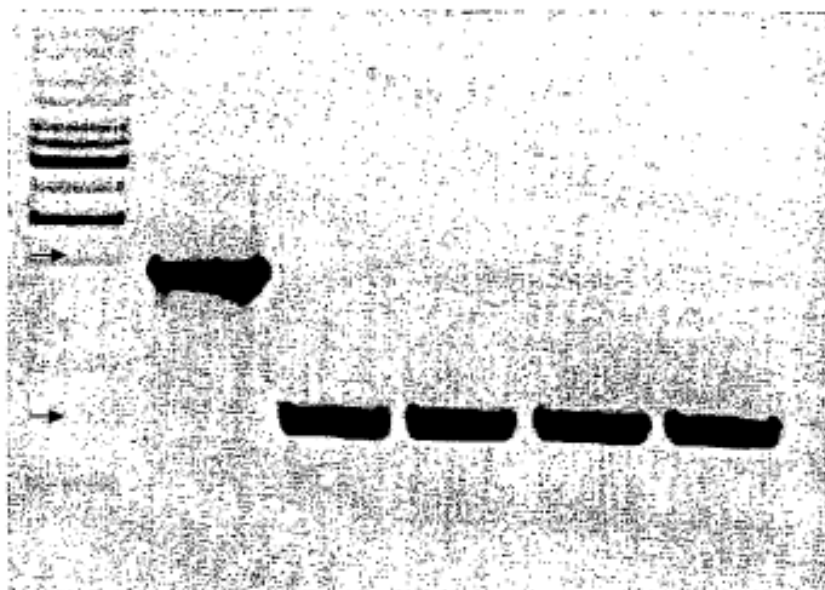


Figura 3

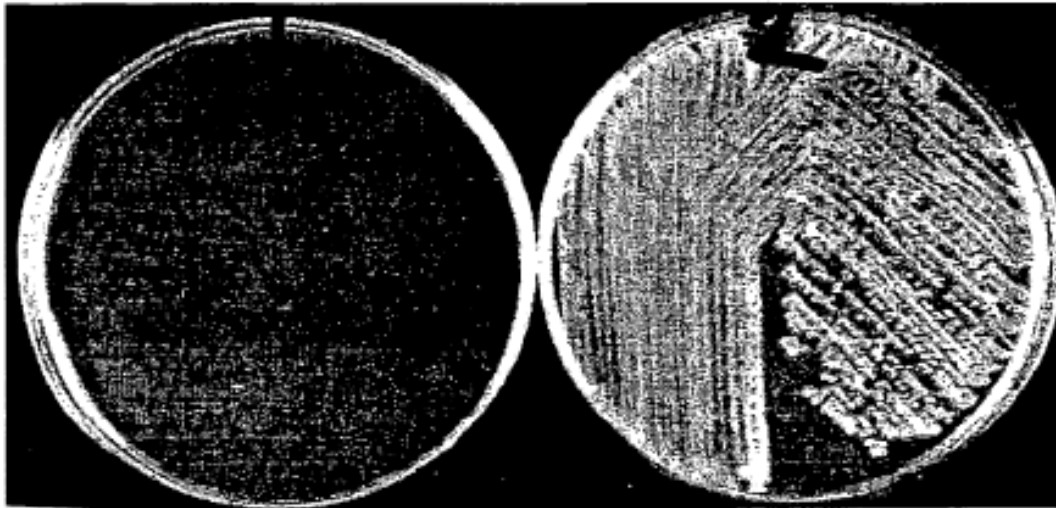


Figura 4

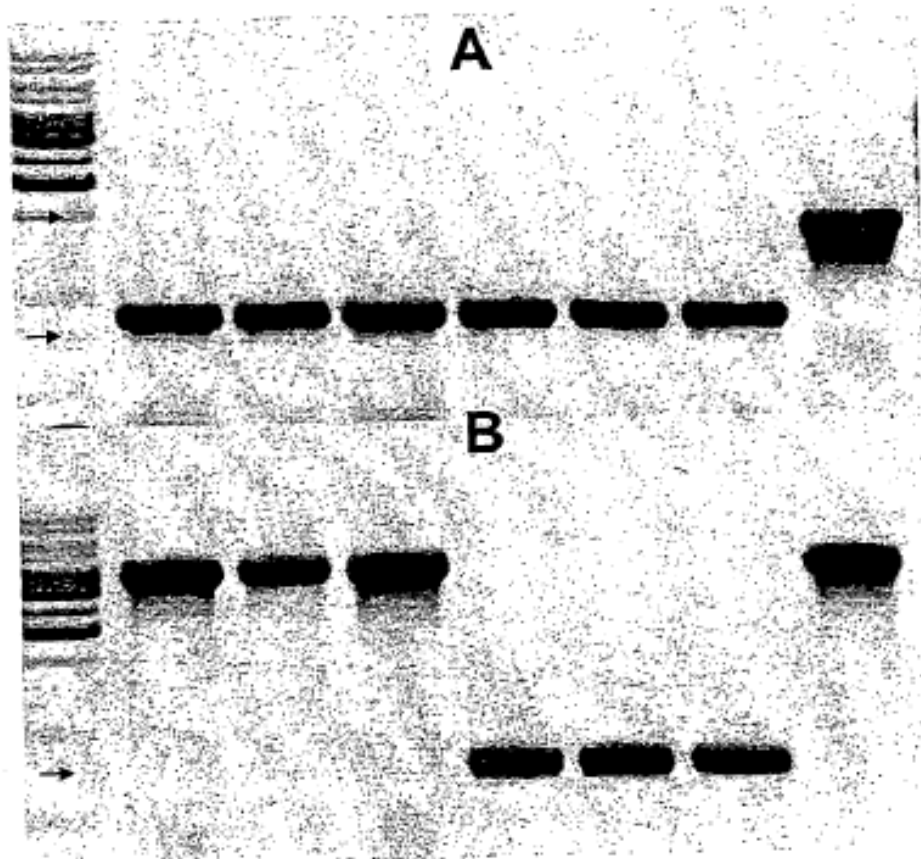


Figura 5

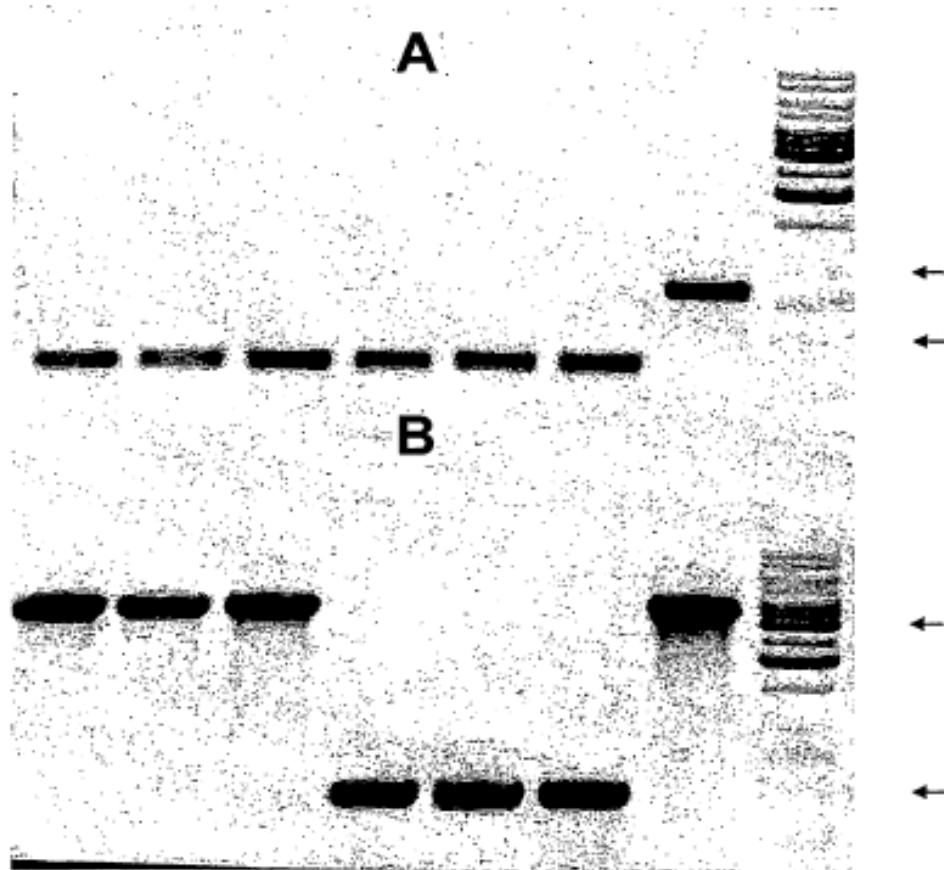


Figura 6

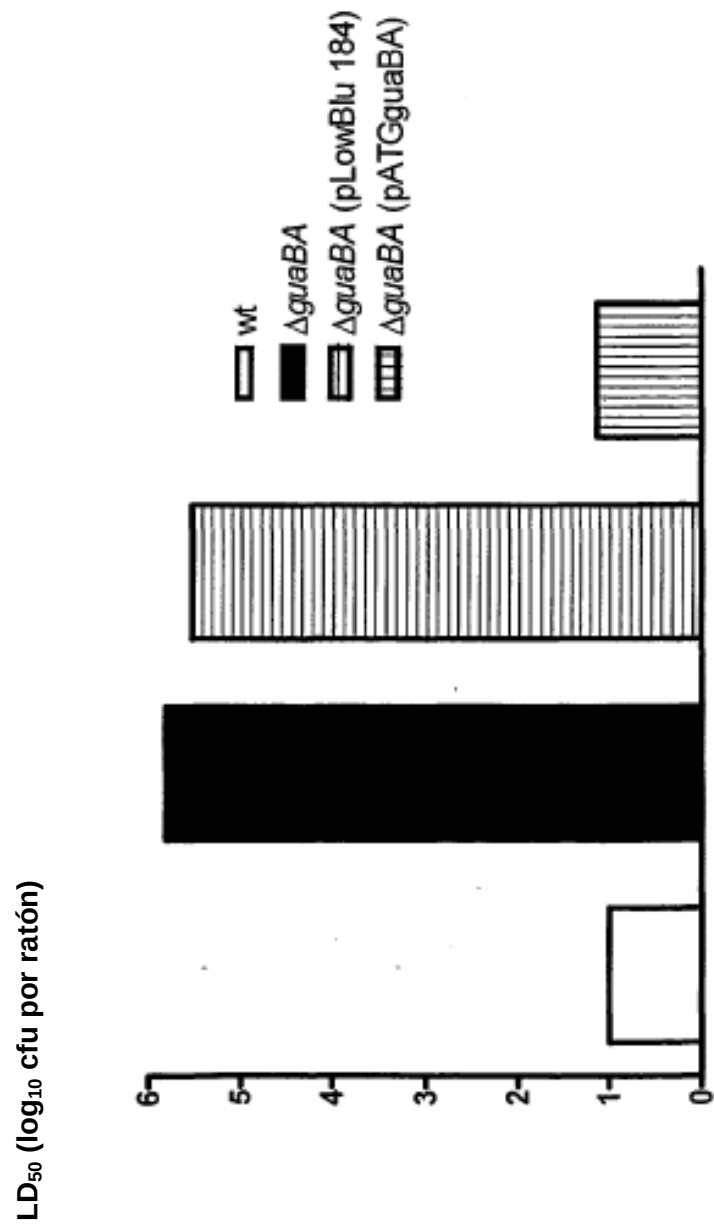


Figura 7

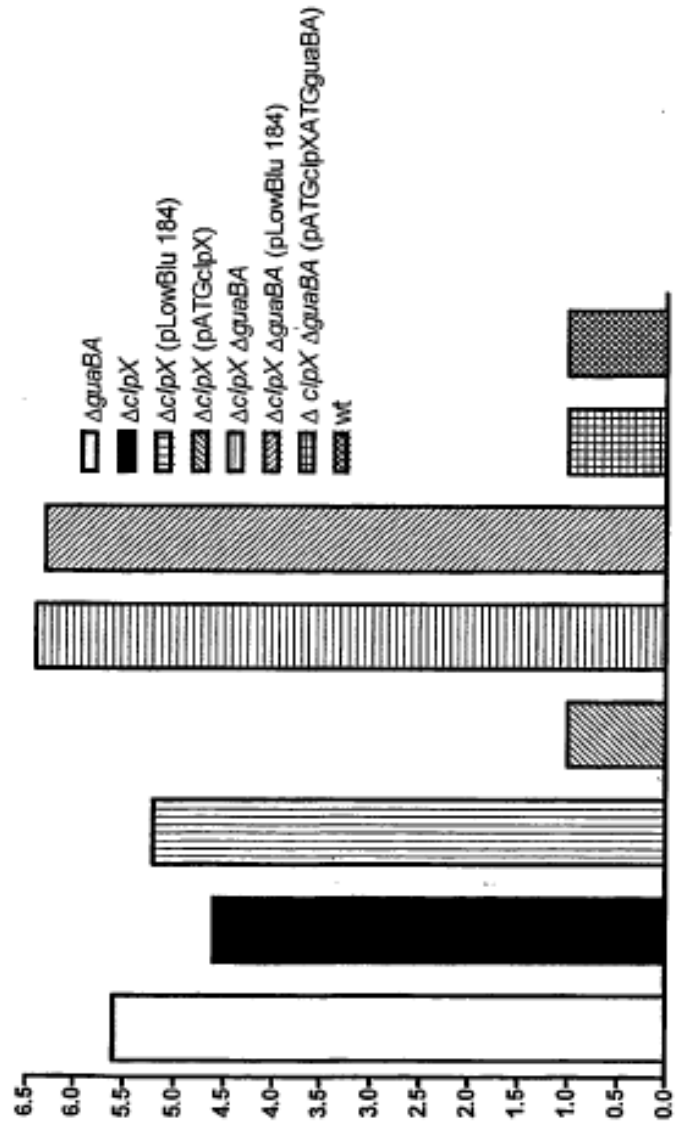
LD₅₀ (log₁₀ cfu por ratón)

Figura 8

