

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 506 466**

51 Int. Cl.:

C12N 15/64 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.06.2011 E 11733896 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.07.2014 EP 2588615**

54 Título: **Plásmido auto-supresor**

30 Prioridad:

30.06.2010 GB 201011046

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

13.10.2014

73 Titular/es:

**COBRA BIOLOGICS LIMITED (100.0%)
Stephenson Building, Keele University Science
Park
Keele ST5 5SP, GB**

72 Inventor/es:

**CRANENBURGH, ROCKY MARC y
LECKENBY, MATTHEW WILLIAM**

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO FACES, José

ES 2 506 466 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

Plásmido auto-supresor

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a procedimientos de producción de plásmidos sin gen marcador de selección. En particular, la invención se refiere a procedimientos de cultivo de un plásmido que contiene un gen marcador de selección en condiciones que permiten la selección basándose en la expresión del gen marcador de selección, y la posterior escisión del gen marcador de selección. La invención también se refiere a usos de los plásmidos producidos por un procedimiento tal para la producción de proteína recombinante para fines terapéuticos y de vacuna, producción de ADN terapéutico y vacunas de ADN y administración de proteína recombinante y ADN a un paciente usando vectores bacterianos vivos.

15 Todos los documentos citados en el presente documento se incorporan por referencia.

Antecedentes de la invención

20 Los plásmidos son moléculas de ADN auto-replicantes que existen naturalmente en bacterias, arqueas y algunos eucariotas unicelulares, tales como levadura. En los últimos años se han convertido en esenciales para la industria de la biotecnología para la expresión de genes de proteína recombinante y como terapéuticos de ADN y vacunas. Para tales aplicaciones, los plásmidos que codifican genes de interés se modifican y replican generalmente en una célula huésped bacteriana tal como *Escherichia coli*. Los plásmidos frecuentemente codifican un gen de resistencia a antibióticos para permitir que la selección de antibióticos se use para identificar las células que contienen el plásmido tras la transformación, con el antibiótico selectivo añadido al medio de crecimiento para destruir células que han perdido el plásmido.

30 Sin embargo, hay varias desventajas de usar antibióticos para la selección y mantenimiento de plásmidos. En primer lugar, la expresión constitutiva del gen de resistencia a antibióticos en la célula huésped produce una carga metabólica sobre la célula que reduce la viabilidad y aumenta la frecuencia de pérdida de plásmidos. En segundo lugar, los antibióticos representan un contaminante adicional en la fabricación, y la presión de selección se reduce por la degradación del antibiótico durante la fermentación. En tercer lugar, para terapéuticos de ADN y vacunas, el uso de genes de resistencia a antibióticos lleva el riesgo de transferencia a patógenos en el entorno, conduciendo a cepas patógenas resistentes a antibióticos. Esto es un riesgo elevado cuando se usan cepas bacterianas vivas como vectores para la administración de genes a un paciente. Hay, por tanto, un requisito de desarrollar un mecanismo de selección de plásmidos sin el uso de genes de resistencia a antibióticos.

35 Se han desarrollado tecnologías alternativas que requieren un gen marcador de selección expresado, tal como una copia funcional de un gen esencial que complementa una copia suprimida sobre el cromosoma del huésped. El gen timidilato sintasa *thyA* (McNeil y col., 2000, Appl. Environ. Microbiol., 66: 1216-1219) o el gen *asd* que participa en la síntesis de ácido diaminopimélico (Degryse 1991, Mol. Gen. Genet. 227: 49-51) se han usado como genes selectivos sobre plásmidos en células en las que los genes cromosómico no son funcionales. Tanto este enfoque como la selección de antibióticos comparten el mismo inconveniente importante: la presencia y expresión de un gen marcador de selección que produce una carga metabólica significativa a la célula y hace la pérdida de plásmidos selectivamente ventajosa (Bentley y col., 1990, Biotechnol. Bioeng. 35: 668-681).

40 Se han desarrollado dos tecnologías más que evitan el requisito de expresión del gen marcador de selección y, por tanto, conducen a una carga metabólica reducida sobre la célula. ORT (valoración de operador-represor) utiliza una célula bacteriana modificada en la que un gen cromosómico esencial se coloca bajo el control de un promotor inducible. Una proteína represora se une a secuencias de operador adyacentes a un promotor para prevenir la expresión del gen esencial, haciendo así que la célula muera a menos que esté presente un inductor. Cuando una célula bacteriana ORT se transforma con un plásmido de múltiples copias que contiene la secuencia del operador, el represor se valora por el plásmido y la expresión del gen esencial se activa, permitiendo así el crecimiento celular y, por tanto, la selección y mantenimiento de plásmidos (Cranenburgh y col., 2001. Nucleic Acids Res. 29: e26).

45 El otro sistema sin gen marcador de selección, *ori*SELECT, utiliza el origen de replicación pMB1 que se encuentra sobre la mayoría de los plásmidos usados en la investigación y desarrollo genético molecular. pMB1 *ori* produce naturalmente un ARN antisentido para regular su número de copias, y las células *ori*SELECT se modifican de forma que este ARN interactúe con el ARNm de una secuencia codificante correspondiente manipulada en una fusión de genes con tanto un represor que regula un gen esencial como un gen de toxina, de forma que la presencia del plásmido se requiere para la supervivencia celular (Cranenburgh 2005, documento WO06/003412).

50 La desventaja de ambos de estos sistemas de expresión sin gen marcador de selección es que los cromosomas de las células microbianas necesitan estar genéticamente modificadas. Esto puede ser técnicamente exigente en muchas especies, e incluso en especies que son fácilmente susceptibles a manipulación genética requiere tiempo y es laborioso. Por tanto, sigue existiendo la necesidad de desarrollar un sistema de selección de plásmidos que esté

libre de genes marcadores de selección y que no requiera modificación genética de la célula huésped.

Descripción de la invención

5 Los inventores han desarrollado un sistema de producción de un plásmido sin gen marcador de selección. En el desarrollo de este sistema, los inventores han descubierto sorprendentemente que un plásmido sin gen marcador de selección puede mantenerse en una célula huésped sin un sistema de mantenimiento de plásmidos. Este hallazgo es inesperado, debido a que el experto habría esperado que un plásmido se hubiera perdido de una célula huésped en ausencia de un sistema de mantenimiento de plásmidos. Este sorprendente hallazgo es probable que sea debido a la gran disminución en la carga metabólica puesta en la célula tras la escisión del gen marcador de selección.

Por tanto, en un primer aspecto la invención se refiere a un procedimiento de producción de un plásmido sin gen marcador de selección que comprende las etapas de:

- 15 a) cultivar un plásmido que contiene un gen marcador de selección flanqueado por sitios diana de recombinasa específica de sitio en un primer entorno de célula huésped que es incapaz de efectuar la recombinación entre los sitios diana de recombinasa específica de sitio; y
- 20 b) posteriormente cultivar el plásmido en un segundo entorno de célula huésped que puede efectuar la recombinación entre los sitios diana de recombinasa específica de sitio, de forma que el gen marcador de selección se escinde.

Entorno de célula huésped

25 El término "entorno de célula huésped" engloba la propia célula huésped y las condiciones del entorno de célula huésped. Por tanto, el entorno de célula huésped se altera si el plásmido se mueve de una primera célula huésped a una segunda célula huésped o si las condiciones de la célula huésped se alteran. En el caso posterior, el primer y segundo entornos de células huésped están temporalmente separados. Las condiciones en una célula huésped se alteran generalmente alterando las condiciones en las que la célula se cultiva. Las condiciones que pueden alterarse incluyen, pero no se limitan a, osmolaridad, temperatura, presencia o ausencia de un inductor, la fase de crecimiento de la célula y la presencia de sustancias químicas que alteran la estructura secundaria del ADN o superenrollamiento.

35 Por tanto, en un segundo aspecto la invención se refiere a un procedimiento de producción de un plásmido sin gen marcador de selección que comprende las etapas de:

- 40 a) cultivar un plásmido que contiene un gen marcador de selección flanqueado por sitios diana de recombinasa específica de sitio en una primera célula huésped que es incapaz de efectuar la recombinación entre los sitios diana de recombinasa específica de sitio; y
- b) posteriormente cultivar el plásmido en una segunda célula huésped que puede efectuar la recombinación entre los sitios diana de recombinasa específica de sitio, de forma que el gen marcador de selección se escinde.

45 En un tercer aspecto la invención se refiere a un procedimiento de producción de un plásmido sin gen marcador de selección que comprende las etapas de:

- 50 a) cultivar un plásmido que contiene un gen marcador de selección flanqueado por sitios diana de recombinasa específica de sitio en una célula huésped a una osmolaridad que hace incapaz efectuar la recombinación entre los sitios diana de recombinasa específica de sitio; y
- b) posteriormente alterar la osmolaridad de la célula huésped de manera que pueda efectuar la recombinación entre los sitios diana de recombinasa específica de sitio, de forma que el gen marcador de selección se escinde.

55 En un cuarto aspecto la invención se refiere a un procedimiento de producción de un plásmido sin gen marcador de selección que comprende las etapas de:

- 60 a) cultivar un plásmido que contiene un gen marcador de selección flanqueado por sitios diana de recombinasa específica de sitio en una célula huésped a una temperatura que hace incapaz efectuar la recombinación entre los sitios diana de recombinasa específica de sitio; y
- 65 b) posteriormente alterar la temperatura de la célula huésped de manera que pueda efectuar la recombinación entre los sitios diana de recombinasa específica de sitio, de forma que el gen marcador de selección se escinde.

En un quinto aspecto la invención se refiere a un procedimiento de producción de un plásmido sin gen marcador de selección que comprende las etapas de:

- 5 a) cultivar un plásmido que contiene un gen marcador de selección flanqueado por sitios diana de recombinasa específica de sitio en una célula huésped en ausencia de un inductor de manera que sea incapaz de efectuar la recombinación entre los sitios diana de recombinasa específica de sitio; y
- 10 b) posteriormente añadir un inductor a la célula huésped de manera que pueda efectuar la recombinación entre los sitios diana de recombinasa específica de sitio, de forma que el gen marcador de selección se escinde.

En un sexto aspecto la invención se refiere a un procedimiento de producción de un plásmido sin gen marcador de selección que comprende las etapas de:

- 15 a) cultivar un plásmido que contiene un gen marcador de selección flanqueado por sitios diana de recombinasa específica de sitio en una célula huésped en presencia de sustancias químicas que alteran la estructura secundaria del ADN o superenrollamiento del plásmido para convertir la célula en incapaz de efectuar la recombinación entre los sitios diana de recombinasa específica de sitio; y
- 20 b) posteriormente alterar el nivel de sustancias químicas en la célula de manera que pueda efectuar la recombinación entre los sitios diana de recombinasa específica de sitio, de forma que el gen marcador de selección se escinde.

En un séptimo aspecto la invención se refiere a un procedimiento de producción de un plásmido sin gen marcador de selección que comprende las etapas de:

- 25 a) cultivar un plásmido que contiene un gen marcador de selección flanqueado por sitios diana de recombinasa específica de sitio en una primera célula huésped en ausencia de una recombinasa específica de sitio capaz de actuar sobre los sitios diana de recombinasa específica de sitio de manera que la célula es incapaz de efectuar la recombinación entre los sitios diana de recombinasa específica de sitio; y
- 30 b) posteriormente cultivar el plásmido en una segunda célula huésped en presencia de una recombinasa específica de sitio capaz de actuar sobre los sitios diana de recombinasa específica de sitio, de forma que el gen marcador de selección se escinde.
- 35

En una realización, el entorno de célula huésped puede alterarse por uno o más de los cambios descritos anteriormente.

Recombinasa específica de sitio

40 En una realización, el procedimiento de la invención utiliza recombinasas específicas de sitio endógenas para efectuar la escisión del gen marcador de selección en el segundo entorno de célula huésped. Esto es ventajoso debido a que elimina la necesidad de modificar genéticamente la célula huésped, haciendo el procedimiento tanto más simple como más eficaz. El término "endógeno" se usa para indicar entonces que las recombinasas específicas de sitio se originan a partir del mismo tipo de célula que el segundo entorno de célula huésped. Generalmente, las recombinasas específicas de sitio se originarán a partir del segundo entorno de célula huésped, es decir, el segundo entorno de célula huésped no se habrá manipulado genéticamente con el fin de contener genes que pueden expresar las recombinasas específicas de sitio.

45

50 Será evidente para el experto que la naturaleza de la recombinasa específica de sitio endógena que actúa sobre el plásmido en el procedimiento de la invención dependerá de la naturaleza de los sitios diana de recombinasa específica de sitio que estén presentes dentro del plásmido.

55 La utilización de recombinasas específicas de sitio endógenas es ventajosa con respecto a la técnica anterior debido a que no requiere la introducción de una recombinasa exógena en *trans*. Esto simplifica el procedimiento, haciéndolo más rápido, más barato y más eficaz debido a que no se requiere la modificación del entorno de célula huésped para expresar la recombinasa. En otra realización, las recombinasas específicas de sitio endógenas pueden incluir una o más de XerC, XerD, CodV, RipX, Cre, Int, Xis, P22, Flp y R1.

60 En una realización, la recombinasa específica de sitio endógena puede seleccionarse de Cre, Flp, R, XerC, XerD, RipX y CodV.

En otra realización, las recombinasas específicas de sitio endógenas pueden ser transposasas.

65 Preferentemente, las recombinasas específicas de sitio son XerC y XerD. Más preferentemente, las recombinasas específicas de sitio XerC y XerD son endógenas.

El sistema de recombinación Xer en procariotas es esencial para garantizar la correcta segregación cromosómica tras la replicación, y para restaurar de nuevo los dímeros de cromosoma generados por RecA a monómeros, permitiendo que los cromosomas replicados se segreguen. Las recombinasas Xer son miembros de la familia de tirosina recombinasa y se representan por XerC y XerD en bacterias Gram-negativas tales como *Escherichia coli* (Blakely y col., Cell 1993, 75: 351-361) y por CodV y RipX en *Bacillus subtilis* y otras bacterias Gram-positivas (Sciochetti y col., 1999, J. Bacteriol. 181: 6053-6062). Las recombinasas Xer actúan sobre cromosomas en la secuencia diana de 28 pares de bases conocida como *dif* (Leslie y Sherratt 1995, EMBO J. 14: 1561-1570; Sciochetti y col., 2001, J. Bacteriol. 183: 1058-1068). La proteína FtsK es necesaria para la recombinación de Xer en *E. coli* (Recchia y col., 1999, EMBO J. 18: 5724-5734), y los homólogos de FtsK están ampliamente conservados en bacterias, pero no se encuentran en arqueas (Recchia y Sherratt 1999, Mol. Microbiol. 34: 1146-1148).

El sistema de recombinación Xer endógeno se ha usado previamente en una técnica ('Xer-cise') para escindir los genes de resistencia a antibióticos de cromosomas tras la integración de moléculas de ADN lineal en cromosomas de células huésped (Bloor y Cranenburgh 2006, Appl. Environ. Microbiol. 72: 2520-2525).

El sistema de recombinación Xer endógeno también funciona resolviendo dímeros de plásmido. Con el fin de facilitar la recombinación, dímeros de plásmidos contienen sitios de reconocimiento de recombinasa específica de sitio que son funcionalmente equivalentes a *dif*. Estos sitios son *cer* y *psi*. *cer* se encuentra en el plásmido de *E. coli* ColE1 (Summers y Sherratt 1984, Cell 36: 1097-1103) y *psi* se encuentra en el plásmido de *Salmonella* pSC101 (Cornet y col., 1994, J. Bacteriol. 176: 3188-3195).

Cuando se forma un dímero de plásmidos, el sistema de recombinación Xer actúa convirtiendo el dímero de nuevo en dos monómeros llevando a cabo recombinación de ADN en los sitios *cer* y *psi*. Sin embargo, a diferencia del sitio cromosómico *dif*, XerC y XerD solo actúan sobre sitios diana de plásmido si también están presentes secuencias accesorias de ~180 pb (Hayes y Sherratt, 1997). Estas secuencias accesorias para *cer* son los sitios de unión para las proteínas PepA (aminopeptidasa A) y ArgR (represor de la ruta de la biosíntesis de argenina), y para *psi* son sitios de unión para las proteínas PepA y ArcA (Colloms y col., 1998, Mol Microbiol. 28: 521-530). Esta disposición se requiere para garantizar que la recombinación de Xer sea direccional sobre plásmidos, es decir, solo funciona sobre sitios de resolución de dímeros que se repiten directamente que se forman naturalmente por dimerización.

El sistema Xer-cise previamente descrito no puede aplicarse directamente a plásmidos debido al requisito de las secuencias accesorias con el fin de resolver los dímeros de plásmidos.

En una realización, la recombinasa específica de sitio puede ser inducible o expresarse constitutivamente. En algunas realizaciones, la recombinasa específica de sitio es preferentemente inducible. En particular, si el procedimiento de la invención utiliza un primer entorno de célula huésped y un segundo entorno de célula huésped que están presentes dentro de la misma célula huésped, la recombinasa específica de sitio es preferentemente inducible. Dentro de esta realización, la expresión de la recombinasa puede inducirse alterando uno o más de la osmolaridad, la temperatura, la presencia o ausencia de un inductor, la fase de crecimiento de la célula y la presencia de sustancias químicas que alteran la estructura secundaria del ADN o superenrollamiento.

Introducción de recombinasa

La realización preferida de la invención como se ha descrito anteriormente no requiere modificación genética del segundo entorno de célula huésped, en el que se mantiene el plásmido. Sin embargo, si las recombinasas específicas de sitio, tales como el sistema de recombinasa Xer, no están naturalmente presentes en el segundo entorno de célula huésped, el procedimiento de la invención puede llevarse a cabo introduciendo genes que codifican recombinasas específicas de sitio adecuadas o transposasas en el entorno de célula huésped. Este enfoque también puede usarse si recombinasas específicas de sitio están presentes en el segundo entorno de célula huésped, pero se desean recombinasas específicas de sitio alternativas, que estén naturalmente ausentes del segundo entorno de célula huésped. En esta realización, los genes que codifican las recombinasas específicas de sitio alternativas pueden introducirse en el segundo entorno de célula huésped.

Los genes que codifican recombinasas específicas de sitio pueden introducirse tanto sobre un elemento extracromosómico como integrarse en el cromosoma de la célula huésped. Ejemplos de recombinasas adecuadas para introducción en el entorno de célula huésped incluyen, pero no se limitan a, Cre del bacteriófago P1 (Dale y Ow 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 10558-10562), Int y Xis de bacteriófagos lambda (Zubko y col., 2000, Nature Biotechnol. 18: 442-445) y P22 (Wulff y col., 1993, Mol. Microbiol. 9: 261-271), Flp (Datsenko y Wanner 2000, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97: 6640-6645) y R (Sugita y col., 2000, Plant J. 22:461-469) de levadura. Una transposasa expresada en *trans* también puede usarse para escindir un gen marcador de selección flanqueado con sitios de resolución internos (Sanchis y col., 1997, Appl. Environ. Microbiol. 63: 779-784) y puede, por tanto, introducirse en el entorno de célula huésped del mismo modo que una recombinasa.

El gen marcador de selección sobre el plásmido se flanqueará por el sitio diana de recombinasa específica de sitio del sistema de recombinasa que se introduce en el entorno de célula huésped. El procedimiento de la invención funcionará como se describe si se usa un sistema de recombinasa específica de sitio endógena.

Sitios diana de recombinasa específica de sitio

El gen marcador de selección presente dentro del plásmido usado en el procedimiento de la presente invención está flanqueado por sitio diana de recombinasa específica de sitio.

Un sitio diana de recombinasa específica de sitio es una porción de la secuencia de ADN de un cromosoma o un plásmido al que se dirige una recombinasa específica de sitio. Si sitios diana de recombinasa específica de sitio están presentes en tándem, los sitios pueden ser influidos por una o más recombinasas específicas de sitio para escindir la porción de ADN localizada entre los sitios.

Dentro del alcance de la presente invención, el término sitio diana de recombinasa específica de sitio también incluye sitios diana de transposasa.

Como se trata anteriormente, el sistema de recombinasa Xer es endógeno para procariontes y utiliza las tirosina recombinasas XerC y XerD para resolver tanto dímeros de cromosomas como de plásmidos.

En una realización, los sitios diana de recombinasa específica de sitio pueden ser capaces de unirse a XerC y/o XerD.

En una realización, los sitios diana de recombinasa específica de sitio pueden ser cualquier sitio de unión de XerC y/o XerD. Sitios a modo de ejemplo pueden identificarse de cromosomas y plásmidos de células huésped.

Los sitios diana de recombinasa específica de sitio pueden formarse combinando sitios de resolución de dímeros de plásmidos que se producen naturalmente a partir de plásmidos y cromosomas. Un ejemplo de un sitio híbrido tal es el sitio híbrido *dif-psi* también conocido como el sitio *pif* (Cornet y col., 1994, J. Bacteriol. 176: 3188-3195), cuya secuencia se facilita en la siguiente Tabla 1. El sitio *pif* se diferencia en solo un nucleótido de *psi*, pero puede promover la recombinación de Xer sobre plásmidos y cromosomas. Otros sitios híbridos para su uso en el procedimiento de la invención pueden desarrollarse generando secuencias híbridas y determinando la capacidad de estas secuencias híbridas para actuar de sitios de resolución de dímeros de plásmidos usando simples pruebas de recombinación tales como aquellas descritas por Barre y col., 2000 (Genes Dev. 14: 2976-2988).

Se cree que el superenrollamiento local de un cromosoma o un plásmido es un factor importante en la recombinación de Xer, de manera que puede haber situaciones en las que las condiciones osmóticas o la secuencia de ADN de alrededor pueden facilitar la recombinación de Xer sobre plásmidos mediante sitios que normalmente funcionan solo sobre cromosomas, tales como *dif*. Por tanto, en una realización, el sitio diana de recombinasa específica de sitio puede ser un sitio *dif*.

En otra realización, los sitios de recombinación específica de sitio pueden parecerse a cualquiera de los sitios enumerados en la Tabla 1 más adelante (es decir, SEC ID N°: 1-9) o una cualquiera de SEC ID N°: 17, 20 ó 23. Un sitio diana de recombinasa específica de sitio se considera que se parece a uno de SEC ID N°: 1-9, 17, 20 ó 23 si comprende o consiste en una cualquiera de SEC ID N°: 1-9, 17, 20 ó 23. Un sitio diana de recombinasa específica de sitio se considera que se parece a uno de SEC ID N°: 1-9, 17, 20 ó 23 si tiene el 50 % o mayor identidad de secuencias con una cualquiera de SEC ID N°: 1-9, 17, 20 ó 23. Alternativamente, el sitio diana de recombinasa específica de sitio puede tener el 60 %, 70 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 99 % o el 100 % de identidad de secuencias con uno de SEC ID N°: 1-9, 17, 20 ó 23. Esto puede ser equivalente a una secuencia que tiene 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 ó 15 sustituciones de nucleótidos en comparación con una cualquiera de SEC ID N°: 1-9, 17, 20 ó 23. Las secuencias que comprenden un fragmento de 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33 ó 34 nucleótidos de una cualquiera de SEC ID N°: 1-9, 17, 20 ó 23 también están incluidas dentro del alcance de la invención. Las secuencias de fragmentos o de variante descritas anteriormente pueden ser capaces de unirse a XerC y/o XerD.

Será evidente para el experto que la naturaleza de los sitios diana de recombinasa específica de sitio incluidos en el plásmido dependerá de las recombinasas específicas de sitio que son endógenas para el primer y segundo entornos de células huésped en el que está teniendo lugar el procedimiento de la invención.

El procedimiento de la invención proporciona una ventaja con respecto a los procedimientos de la técnica anterior porque no requiere la introducción de una recombinasa exógena en *trans*. Los sitios diana de recombinasa específica de sitio deben, por tanto, poder ser influidos por recombinasas específicas de sitio endógenas en el segundo entorno de células. Sin embargo, esto no significa que los sitios diana de recombinasa específica de sitio deban también ser endógenos para la célula en la que está teniendo lugar el procedimiento. Por ejemplo, hay pruebas de que las recombinasas específicas de sitio de una especie pueden actuar en sitios diana de recombinasa específica de sitio de otras especies (Neilson y col., 1999, Mol. Microbiol. 31: 915-926). Además, se ha mostrado que las recombinasas específicas de sitio resuelven sitios que son diferentes (Cornet y col., 1994, J. Bacteriol. 176: 3188-3195), por ejemplo, un sitio *dif* de *E. coli* y un híbrido de *psi-dif* (sitio *pif*).

Las células eucariotas también contienen recombinasas específicas de sitio naturales que actúan escindiendo el

ADN entre dos sitios diana de recombinasa específica de sitio. Por ejemplo, la recombinasa Flp del plásmido de dos micrómetros de levadura actúa invirtiendo una región del plásmido por recombinación de ADN entre sitios *FRT*. Por tanto, en una realización, el sitio diana de recombinasa específica de sitio puede ser un sitio *FRT*.

5 **Tabla 1: Sitios de unión a modo de ejemplo para recombinasas específicas de sitio para su uso en la invención y sus sitios de unión**

Sitio	Secuencia (5'-3')	Recombinasas	Origen	SEQ ID Nº
10 <i>Ecdif</i>	GGTGCGCATAATGTATATTATGTTAAAT	XerC, XerD	<i>E. coli</i> cromosoma	SEQ ID Nº: 1
15 <i>cer</i>	GGTGCGTACAATTAAGGGATTATGGTAAAT	XerC, XerD	Plasmido de <i>E. coli</i> ColE1	SEQ ID Nº: 2
<i>psi</i>	GTGCGCGCAAGATCCATTATGTTAAAC	XerC, XerD	<i>Salmonella</i> plasmido PSC101	SEQ ID Nº: 3
20 <i>pif</i>	GGTGCGCGCAAGATCCATTATGTTAAAT	XerC, XerD	Hibrido <i>dif-psi</i>	SEQ ID Nº: 4
<i>mwr</i>	GGTGCACGCAACAGATGTTATGGTAAAT	XerC, XerD	<i>K. pneumoniae</i> plasmido pJHCMW1	SEQ ID Nº: 5
25 <i>Bsdif</i>	ACTTCCTAGAATATATATTATGTAAACT	CodV, RipX	<i>B. subtilis</i> cromosoma	SEQ ID Nº: 6
<i>loxP</i>	ATAACTTCGTATAATGTATGCTATACGAAGTTAT	Cre	Bacteriófago P1	SEQ ID Nº: 7
30 <i>FRT</i>	GAAGTTCCTATTCTCTAGAAAGTATAGGAACTT	Flp	Levadura	SEQ ID Nº: 8
35 <i>RS</i>	TTGATGAAAGAATACGTTATTCTTTCATCAA	R	Levadura	SEQ ID Nº: 9

En una realización, las secuencias diana de la recombinasa específica de sitio pueden ser iguales entre sí. En otra realización, las secuencias diana de la recombinasa específica de sitio pueden ser diferentes entre sí.

40 Como se trata anteriormente, se requieren secuencias accesorias para dirigir la recombinación específica de sitio entre sitios diana de recombinasa específica de sitio presentes sobre un plásmido. Por tanto, en una realización, uno o más de los sitios diana de recombinasa específica de sitio pueden estar funcionalmente asociados a los sitios de unión para una o más proteínas accesorias.

45 Los sitios de unión para proteínas accesorias se denominan generalmente sitios accesorios.

En una realización, las secuencias accesorias pueden ser sitios de unión para una o más de las proteínas accesorias PepA, ArgR o ArcA. En realizaciones específicas, las secuencias accesorias pueden contener sitios de unión para PepA y tanto ArgR como ArcA.

50 En una realización, las secuencias accesorias pueden parecerse a las secuencias mostradas más adelante en las que los sitios de unión ArgR/ArcA están subrayados con una línea de puntos y los sitios de unión XerCD están subrayados con una línea continua sencilla. PepA se une a las secuencias accesorias alrededor de los sitios de unión ArgR/ArcA, pero no se ha definido la localización precisa.

55 Un sitio accesorio se considera que se parece a uno de los sitios enumerados más adelante si comprende o consiste en una cualquiera de SEC ID Nº: 17, 20 ó 23. Un sitio accesorio se considera que se parece a uno de los sitios enumerados más adelante si tiene el 50 % o más de identidad de secuencias con una cualquiera de SEC ID Nº: 17, 20 ó 23. Alternativamente, el sitio accesorio puede tener el 60 %, 70 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 99 % o el 100 % de identidad de secuencias con una cualquiera de SEC ID Nº: 17, 20 ó 23: Esto puede ser equivalente a una secuencia que tiene 1, 2, 3 ó 4 sustituciones de nucleótidos en comparación con una cualquiera de SEC ID Nº: 17, 20 ó 23. Las secuencias que comprenden un fragmento de 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 nucleótidos de una cualquiera de SEC ID Nº: 17, 20 ó 23 también están incluidas dentro del alcance de la invención. Las secuencias de fragmentos o de variante descritas anteriormente pueden ser capaces de unirse a PepA, ArgR o ArcA.

65

sitio *psi* y secuencias accesorias de pSC101 (SEC ID N°: 15)

gcctcccgtggggaaaaaatcatggcaattctggaagaaatagcgcttcagccggcaaacctgaagccggatctgcgattct
 5 gataacaaactagcaacaccagaacagcccgtttgcgggcagcaaaacccgtacttttgacgttccggcggtttttgtggcg
 agtggtgttcgggcggtgcgcgcaagatccattatgttaaacgggcga

10 sitio *cer* y secuencias accesorias de ColeI (SEC ID N°: 18)

gtgaaacctgaaaaatggcagcttcagtgattaagtgggggtaatgtggcctgtaccctctggttgcataaggtattcatacgggt
 15 taaaatttatcaggcgcgatcgcgcagttttaggggtggtttgtgccattttacctgtctgctgccgtgatcgcgctgaacgcggtt
 tagcgggtgcgtacaattaagggattatggtaaatccactt

sitio *mwr* y secuencias accesorias de pJHCMW1 (SEC ID N°: 21)

20 aagaagaacatcggaaacaggacttactccggctgaatggtgtgaaattctgcgctatgcacttgcgcgcatactcatgcatgc
 cgtaaaaacagagcctgcgcggttctggcgggttttcgggtggtttgtgcctgtttaccggttcccgtcagaaacgcctgag
 25 ggctctcaggcgggtgcacgcaacagatgttatggtaaatacaatg

Genes marcadores de selección

30 Un gen marcador de selección puede ser cualquier gen que pueda usarse para detectar la presencia de una molécula de ácido nucleico.

En general, los genes de resistencia a antibióticos se usan en la materia para identificar células que contienen una molécula de ácido nucleico particular. Por tanto en una realización, el gen marcador de selección es un gen de resistencia a antibióticos que permite la identificación de células que contienen el plásmido por cultivo en un medio que contiene el antibiótico. Los genes de resistencia a antibióticos se conocen en la técnica y puede usarse cualquiera de estos genes. Ejemplos de genes de resistencia a antibióticos que puede usarse incluyen, pero no se limitan a, genes que llevan resistencia a kanamicina, neomicina, estreptomycin, gentamicina, ampicilina, cloranfenicol, tetraciclina, neomicina, blastidina, higromicina, puromicina, eritromicina, lincomicina y zeocina. Otros genes de resistencia a antibióticos que pueden usarse según la invención se describen en Neu 1992, Science 257 1064-1073.

En una realización alternativa, el gen marcador de selección permite la producción de un metabolito esencial para, pero ausente, del entorno de célula huésped. En una realización, el gen marcador de selección puede participar en la ruta biosintética de aminoácidos de un aminoácido que no se encuentra en los medios en los que se cultiva la célula huésped. En otra realización, el gen marcador de selección puede ser el gen timidilato sintasa *thyA* o el gen *asd* que participa en la síntesis de ácido diaminopimélico.

Un plásmido sin gen marcador de selección es un plásmido que carece de un gen marcador de selección.

50 **Primer entorno de célula huésped**

El primer entorno de célula huésped es incapaz de efectuar la recombinación entre los sitios diana de recombinasa específica de sitio que flanquean el gen marcador de selección. Por tanto, el gen marcador de selección seguirá dentro del plásmido, permitiendo que las células que contienen el plásmido se seleccionen basándose en la expresión del gen marcador de selección.

En una realización, la célula es incapaz de efectuar la recombinación entre los sitios diana de recombinasa específica de sitio si menos del 50 % de los plásmidos experimentan recombinación específica de sitio. En otras realizaciones, la célula es incapaz de efectuar la recombinación entre los sitios diana de recombinasa específica de sitio si menos del 40 %, 30 %, 20 %, 15 %, 10 %, 5 %, 3 %, 2 %, 1 %, 0,5 %, 0,1 % o el 0 % de los plásmidos experimentan recombinación específica de sitio.

Mutaciones

65 En una realización, el primer entorno de célula huésped puede contener una mutación en un gen que codifica una o más de las proteínas que participan en la recombinación específica de sitio de un plásmido.

Se prefiere que no haya mutación a los genes que codifican las recombinasas específicas de sitio tales como XerC o XerD. Esto es debido a que estas proteínas se requieren para la segregación de cromosomas, y en ausencia de versiones funcionales de estas proteínas, la segregación de cromosomas no se producirá y el primer entorno de célula huésped no será viable.

5 En una realización, el gen cromosómico que codifica una o más de las proteínas accesorias PepA, ArgR o ArcA puede mutarse.

10 Como se trata anteriormente, PepA y ArgR se requieren para la recombinación específica de sitio de un plásmido en un sitio *cer*, mientras PepA y ArcA se requieren para la recombinación específica de sitio en un sitio *psi*. Por tanto, una mutación en uno o más de los genes que codifican estas proteínas accesorias prevendrá que se produzca la recombinación específica de sitio en el primer entorno de célula huésped. Por consiguiente, el gen marcador de selección será retenido por el plásmido cuando esté presente en el primer entorno de célula huésped, y la presión de selección podrá usarse para seleccionar células que contienen el plásmido.

15 La mutación a los genes que codifican una o más de las proteínas PepA, ArgR o ArcA puede ser una mutación inactivante. Una mutación tal puede producirse por medio de adición, delección o sustitución de uno o más de los nucleótidos que codifican una o más de estas proteínas accesorias.

20 En otra realización, una mutación puede estar presente en el primer entorno de célula huésped que previene que se expresen una o más de las proteínas accesorias. Una mutación tal puede estar en un gen que codifica una proteína implicada en la expresión de proteínas accesorias. Alternativamente, un represor o secuencia antisentido que previene la traducción del ARNm de proteínas accesorias podría expresarse en exceso.

25 En una realización preferida, el primer entorno de célula huésped contiene una mutación en el gen PepA, ya que éste hará que la célula sea incapaz de recombinación en tanto los sitios *cer* como *psi*.

30 El mutante de proteína accesoria que se usa como primer entorno de célula huésped puede ser una cepa de *E. coli* mutante seleccionada de DS957, DS941 *pepA*, DS941 *arcA2*, DS941 *arcA::Tn5(2.3)* (Colloms y col., 1998 Mol. Microbiol. 28(3): 521-530), ECK4253 y ECK3226 (Baba y col., 2006, Mol. Systems Biology (2006) doi:10.1038/msb4100050).

Osmolaridad

35 En otra realización, el primer entorno de célula huésped puede ser incapaz de efectuar la recombinación entre los sitios de recombinación específica de sitio debido a que la osmolaridad del primer entorno de célula huésped no permitirá que se produzca la recombinación.

40 Dentro de la realización, el sitio diana de recombinasa específica de sitio puede ser el sitio *mwr* del plásmido de *Klebsiella pneumoniae* pJHCMW1. Este sitio está relacionado con *cer* y es adyacente a secuencias accesorias que se unen a PepA y ArgR (Pham y col., 2002, J. Bacteriol. 184: 1607-1616). Esta secuencia osmorregulada no permite la eficaz recombinación de Xer bajo altas concentraciones de sales, pero la recombinación de Xer se activa cuando la concentración de sales es inferior al 0,5 % de NaCl en caldo L, debido a cambios resultantes en el superenrollamiento de ADN (Trigueros y col., 2009, Nucleic Acids Res. 37: 3580-3587).

45 Por tanto, en esta realización, el primer entorno de célula huésped puede tener una osmolalidad superior a o igual a 209 mmoles/kg (0,5 % de NaCl). La osmolaridad del primer entorno de célula huésped puede mantenerse a un nivel por encima del requerido para la completa recombinación de todos los plásmidos en la población cultivando el primer entorno de célula huésped en un medio que contiene 0,5 %, 0,4 %, 0,3 %, 0,2 % o 0,1 % de NaCl, ya que este intervalo de concentración permite que persista una proporción suficiente de plásmidos no recombinados. Idealmente, la concentración del primer entorno de célula huésped es superior al 0,5 %. El segundo entorno al que se transfiere la célula huésped tendrá menos del 0,1 % de NaCl, e idealmente 0 % de NaCl.

Temperatura

55 En otra realización, el primer entorno de célula huésped puede ser incapaz de efectuar la recombinación entre los sitios de recombinación específica de sitio debido a que la temperatura del primer entorno de célula huésped está tanto por encima como por debajo de la requerida para efectuar la recombinación.

Inductores

60 En otra realización, el primer entorno de célula huésped puede ser incapaz de efectuar la recombinación entre los sitios diana de recombinasa específica de sitio debido a la ausencia de un inductor en el primer entorno de célula huésped. Un inductor tal puede ser requerido para que se produzca la recombinación.

65 *Sustancias químicas que alteran la estructura secundaria o superenrollamiento del plásmido*

Con el fin de que se produzca la recombinación entre sitios diana de recombinasa específica de sitio, el plásmido debe tener la correcta estructura secundaria y superenrollamiento para que las recombinasas y proteínas accesorias accedan a los sitios diana de recombinasa específica de sitio y secuencias accesorias, respectivamente. Por tanto, en una realización, el primer entorno de célula huésped puede ser incapaz de efectuar la recombinación entre los sitios diana de recombinasa específica de sitio debido a que la presencia de una sustancia química que produce una estructura secundaria de plásmido o superenrollamiento no permite que las recombinasas específicas de sitio y/o proteínas accesorias accedan a los sitios relevantes sobre el plásmido. Una sustancia química tal puede intercalar ADN, tal como bromuro de etidio.

Ausencia de recombinasa específica de sitio

En otra realización, el primer entorno de célula huésped puede ser incapaz de efectuar la recombinación entre los sitios diana de recombinasa específica de sitio debido a que la ausencia de una recombinasa específica de sitio puede actuar sobre los sitios diana de recombinasa específica de sitio.

Segundo entorno de célula huésped

El segundo entorno de célula huésped puede efectuar la recombinación entre los sitios diana de recombinasa específica de sitio que flanquean el gen marcador de selección. Por tanto, el gen marcador de selección se escindirá del plásmido por recombinación entre los sitios diana de recombinasa específica de sitio flanqueando el gen marcador de selección.

En una realización, la célula puede efectuar la recombinación entre los sitios diana de recombinasa específica de sitio si más del 1 % de las células pueden realizar la recombinación específica de sitio sobre el plásmido. En otras realizaciones, la célula puede efectuar la recombinación entre los sitios diana de recombinasa específica de sitio si más del 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 %, 99,9 % o el 100 % de los plásmidos experimentan recombinación específica de sitio.

PepA, ArgA y ArcA activas

En la realización en la que el primer entorno de célula huésped contiene una mutación inactivante en uno o más de los genes que codifican las proteínas accesorias PepA, ArgR y ArcA, el segundo entorno de célula huésped puede contener versiones activas de una o más de PepA, ArgR y ArcA. Preferentemente, el segundo entorno de célula huésped contiene una versión activa de PepA y al menos una de ArgR y ArcA de manera que la recombinación pueda efectuarse en sitios *cer* o *psi*. En una realización, el segundo entorno de célula huésped puede contener una versión activa de cualquiera que sea la proteína accesoria inactivada en el primer entorno de célula huésped.

Osmolaridad

En la realización en la que el primer entorno de célula huésped se mantiene a una osmolaridad por debajo de la requerida para que se produzca la recombinación, el segundo entorno de célula huésped puede hacerse capaz de efectuar la recombinación mostrando una osmolaridad superior a la requerida para efectuar la recombinación.

Esta realización puede producirse cuando el sitio diana de recombinasa específica de sitio se parece al sitio *mwr* del plásmido de *Klebsiella pneumoniae* pJHCMW1.

En esta realización, el segundo entorno de célula huésped puede tener una osmolaridad debido a una concentración inferior al 0,5 % de sal. En una realización, la osmolaridad en el primer entorno de célula huésped puede ser debida a una concentración superior al 0,55 %, 0,6 %, 0,7 %, 0,8 %, 0,9 %, 1 % o más de sal.

Será evidente para un experto en la materia que la osmolaridad puede alterarse entre el primer entorno de célula huésped y el segundo entorno de célula huésped en una variedad de formas. En una realización, la osmolaridad puede alterarse diluyendo el primer entorno de célula huésped con medio libre de sal con el fin de convertirlo en el segundo entorno de célula huésped. Alternativamente, las células del primer medio que contiene sal se centrifugan para producir un sedimento de células, el sobrenadante que contiene la sal se elimina y las células se resuspenden en un medio que está libre de sal.

Temperatura

En la realización en la que el primer entorno de célula huésped se mantiene a una temperatura tanto por encima como por debajo de la requerida para efectuar la recombinación, el segundo entorno de célula huésped puede hacerse capaz de efectuar la recombinación mostrando una temperatura superior o inferior a la requerida para efectuar la recombinación.

Será evidente para un experto en la materia que la temperatura puede alterarse entre el primer entorno de célula

huésped y el segundo entorno de célula huésped en una variedad de formas. En una realización, la temperatura puede alterarse alterando la temperatura a la que se cultiva la célula huésped.

Inductores

5 En la realización en la que el primer entorno de célula huésped es incapaz de efectuar la recombinación entre los sitios diana de recombinasa específica de sitio debido a la ausencia de un inductor en el primer entorno de célula huésped, el segundo entorno de célula huésped puede hacerse capaz de efectuar la recombinación mediante la adición de un inductor.

10 Será evidente para un experto en la materia que un inductor puede añadirse a una célula en una variedad de formas. En una realización, el inductor puede añadirse añadiendo el inductor al medio en el que la célula huésped está siendo cultivada con el fin de convertirlo de un primer entorno de célula huésped en un segundo entorno de célula huésped.

15 *Sustancias químicas que alteran la estructura secundaria o superenrollamiento del plásmido*

20 En la realización en la que el primer entorno de célula huésped es incapaz de efectuar la recombinación entre los sitios diana de recombinasa específica de sitio debido a la presencia de una sustancia química que produce una estructura secundaria de plásmido o superenrollamiento que no permite que las recombinasas específicas de sitio y/o proteínas accesorias accedan a los sitios relevantes sobre el plásmido, el segundo entorno de célula huésped puede hacerse capaz de efectuar la recombinación por la eliminación de la sustancia química.

25 Será evidente para un experto en la materia que una sustancia química puede eliminarse de una célula en una variedad de formas. Las células del primer medio que contiene la sustancia química pueden centrifugarse para producir un sedimento de células, el sobrenadante que contiene la sustancia química puede eliminarse, y las células resuspenderse en un medio que está libre de la sustancia química.

30 *Presencia de recombinasa específica de sitio*

35 En la realización en la que el primer entorno de célula huésped es incapaz de efectuar la recombinación entre los sitios diana de recombinasa específica de sitio debido a la ausencia de una recombinasa específica de sitio capaz de actuar sobre los sitios diana de recombinasa específica de sitio, el segundo entorno de célula huésped puede ser capaz de efectuar la recombinación entre los sitios diana de recombinasa específica de sitio debido a la presencia de una recombinasa específica de sitio capaz de actuar sobre los sitios diana de recombinasa específica de sitio.

40 Las recombinasas específicas de sitio capaces de actuar sobre los sitios diana de recombinasa específica de sitio pueden codificarse en un plásmido separado presente dentro del segundo entorno de célula huésped o, si el segundo entorno de célula huésped es una célula huésped separada, la recombinasa específica de sitio puede haber sido incorporada en el cromosoma de la segunda célula huésped.

Selección del entorno de célula huésped

45 En una realización, la segunda célula huésped puede ser un miembro de las Enterobacteriaceae (por ejemplo, los géneros *Escherichia*, *Shigella* o *Salmonella*). Dentro de esta realización, el primer entorno de célula huésped puede ser una cepa de *E. coli* que contiene un mutante *pepA* o *argR/arcA*. Esto garantiza que las proteínas XerC y XerD presentes dentro del primer entorno de célula huésped son incapaces de recombinar los sitios diana de recombinasa específica de sitio dentro del primer entorno de célula huésped.

50 Esta realización también puede producirse si las recombinasas Xer y sitios diana de proteínas accesorias requeridos para la recombinación en el segundo entorno de célula huésped están presentes en el primer entorno de célula huésped.

55 Sin embargo, si el primer entorno de célula huésped es suficientemente evolutivamente divergente del segundo entorno de célula huésped de forma que su sistema de recombinación de Xer no funcione sobre el sitio de reconocimiento de recombinasa específica de sitio sobre el plásmido en el primer entorno de célula huésped, entonces el primer entorno de célula huésped no necesita ser un mutante de *pepA* o *argR/arcA*.

60 En otra realización, el primer entorno de célula huésped puede ser una célula procariota, y el plásmido puede contener sitios diana de recombinasa específica de sitio FRT. Como las células procariotas no contienen la recombinasa FIp requerida para recombinar sitios FRT, los sitios diana de recombinasa específica de sitio no se recombinarán en el primer entorno de célula huésped, y no se requiere mutación a los genes que codifican una o más de las proteínas accesorias en el primer entorno de célula huésped. En esta realización, el segundo entorno de célula huésped debe ser una célula eucariota capaz de recombinación específica de sitio entre sitios FRT, tal como una célula de levadura, de manera que la recombinación entre los sitios FRT puede producirse en el segundo entorno de célula huésped para escindir el gen marcador de selección.

Transformación de células huésped

Se entenderá que el primer entorno de célula huésped se transformará con un plásmido que contiene un gen marcador de selección flanqueado por sitios diana de recombinasa específica de sitio.

En realizaciones en las que el primer entorno de célula huésped y el segundo entorno de célula huésped se forman en diferentes células, el plásmido que contiene un gen marcador de selección flanqueado por sitios diana de recombinasa específica de sitio se eliminará del primer entorno de célula huésped y se transformará en el segundo entorno de célula huésped. Los procedimientos de transformación de células huésped son muy conocidos en la técnica y se describen, por ejemplo, en Sambrook (Molecular Cloning; A Laboratorio Manual, segunda edición, 1989). Los procedimientos de aislamiento del plásmido que contiene un gen marcador de selección flanqueado por sitios diana de recombinasa específica de sitio del primer entorno de célula huésped también son muy conocidos en la técnica y se describen, por ejemplo, en Sambrook (Molecular Cloning; A Laboratorio Manual, segunda edición, 1989). En una realización preferida, la transformación puede realizarse por electroporación.

En realizaciones en las que el primer entorno de célula huésped y el segundo entorno de célula huésped se forman en diferentes células, los procedimientos de transformación del plásmido en cada entorno de célula huésped pueden ser iguales o pueden ser diferentes.

Cultivo celular

En la primera etapa, el plásmido que contiene un gen marcador de selección flanqueado por sitios diana de recombinasa específica de sitio se cultiva en un primer entorno de célula huésped en condiciones que lo hacen incapaz de efectuar la recombinación entre los sitios diana de recombinasa específica de sitio. Dentro de esta etapa, la célula puede cultivarse en presencia de una presión selectiva de manera que solo se mantienen células que contienen el plásmido.

En la segunda etapa, el plásmido que contiene un gen marcador de selección flanqueado por sitios diana de recombinasa específica de sitio se cultiva en un segundo entorno de célula huésped en condiciones que lo hacen capaz de efectuar la recombinación entre los sitios diana de recombinasa específica de sitio, de forma que el gen marcador de selección se escinde. Condiciones adecuadas de cultivo celular se conocen en la técnica. En una realización, las condiciones de cultivo celular pueden incluir una temperatura de 25-42 °C, idealmente 30-37 °C, en un cultivo de caldo o placa de agar que proporciona todos los nutrientes requeridos para el crecimiento. Las condiciones más comunes serían a 37 °C sobre agar de LB o en caldo de LB.

Será evidente para un experto en la materia que el gen marcador de selección no se escindirán instantáneamente. Por tanto, el segundo entorno de célula huésped puede incluir inicialmente la presencia de una presión selectiva para garantizar que solo células que contienen el plásmido se mantienen inicialmente.

En una realización, el procedimiento puede incluir adicionalmente la etapa de mantener el plásmido sin gen marcador de selección en cultivo celular. Esta etapa puede seguir a la escisión del gen marcador de selección.

Los inventores han descubierto sorprendentemente que un plásmido sin gen de selección producido según el procedimiento de la invención puede mantenerse en el segundo entorno de célula huésped en ausencia de un sistema de mantenimiento de plásmidos. Esto es sorprendente debido a que el experto habría esperado que se perdiera un plásmido en ausencia de un sistema de mantenimiento de plásmidos. Es probable que los plásmidos producidos según el procedimiento de la invención se mantengan debido a una disminución de la carga metabólica en ausencia de expresión de un gen marcador de selección.

En otra realización, el procedimiento puede comprender adicionalmente la etapa de aislar el plásmido sin gen marcador de selección del primer y/o segundo entorno de célula huésped. Los procedimientos de aislamiento de plásmidos son muy conocidos en la técnica e incluyen, pero no se limitan a, centrifugación y purificación por lisis alcalina según procedimientos basados en Birnboim y Doly 1979, Nucleic Acids Res. 7: 1513-1523. El ADN puede analizarse tras la extracción del segundo entorno de célula huésped.

Tipos de células huésped

El primer y segundo entornos de células huésped pueden estar formados de cualquier tipo de célula. El primer y segundo entornos de células huésped pueden ser el mismo tipo de célula o pueden ser diferentes tipos de células. Si el primer y segundo entornos de células huésped son el mismo tipo de célula, pueden ser cepas diferentes. En la realización en la que el primer y segundo entornos de células huésped se forman en la misma célula, el primer y segundo entornos de células huésped serán del mismo tipo de célula.

En una realización, el primer entorno de célula huésped y/o el segundo entorno de célula huésped pueden ser una célula procariota. Dentro de esta realización, el primer entorno de célula huésped y el segundo entorno de célula huésped pueden ser una célula bacteriana.

5 En una realización, el primer entorno de célula huésped y/o el segundo entorno de célula huésped pueden ser una célula bacteriana Gram-negativa. Dentro de esta realización, el primer entorno de célula huésped y el segundo entorno de célula huésped pueden seleccionarse independientemente de los géneros *Escherichia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Agrobacterium*, *Pseudomonas* y *Vibrio*. Adicionalmente, dentro de esta realización, el primer entorno de célula huésped y el segundo entorno de célula huésped pueden seleccionarse independientemente de *Escherichia coli* y *Salmonella enterica* (incluyendo las serovariedades Typhi y Typhimurium).

10 En otra realización, el primer entorno de célula huésped y/o el segundo entorno de célula huésped pueden ser una célula bacteriana Gram-positiva. Dentro de esta realización, el primer entorno de célula huésped y el segundo entorno de célula huésped pueden seleccionarse independientemente de los géneros *Bacillus*, *Streptomyces*, *Listeria*, *Lactobacillus*, *Lactococcus* y *Mycobacterium*. Adicionalmente, dentro de esta realización, el primer entorno de célula huésped y el segundo entorno de célula huésped pueden seleccionarse independientemente de *Bacillus subtilis* o *Mycobacterium bovis* (por ejemplo, cepa BCG).

15 En otra realización, el primer entorno de célula huésped y/o el segundo entorno de célula huésped pueden ser una arquea. Dentro de esta realización, el primer entorno de célula huésped y/o el segundo entorno de célula huésped pueden ser levadura. Adicionalmente, dentro de esta realización, el primer entorno de célula huésped y el segundo entorno de célula huésped pueden seleccionarse independientemente de los géneros *Hansenula*, *Pichia*, *Saccharomyces* y *Schizosaccharomyces*.

20 En otra realización, el primer entorno de célula huésped y/o el segundo entorno de célula huésped pueden ser un eucariota no fúngico que puede replicar un plásmido. Dentro de esta realización, el primer entorno de célula huésped y el segundo entorno de célula huésped pueden seleccionarse independientemente de los géneros *Chlamydomonas*, *Dictyostelium* y *Entamoeba*.

Si la célula es una célula procariota, puede ser una célula RecA⁺ o una célula RecA⁻.

30 Dentro del alcance de la invención, cualquiera de los tipos de células huésped propuestos puede ser células huésped atenuadas o no atenuadas.

Se entenderá que todas las combinaciones del primer y segundo entornos de células huésped se contemplan dentro del alcance de la invención.

35 **Gen de interés**

En una realización, el plásmido usado en el procedimiento de la invención contiene un gen de interés. El gen de interés puede codificar cualquier ácido nucleico o proteína que se desee producir recombinantemente o que pueda usarse terapéuticamente.

40 En otra realización, el gen de interés puede ser una proteína terapéutica o profilácticamente útil. En otra realización, el gen puede ser un gen adecuado para su uso como una vacuna.

45 **Procedimiento de una etapa**

Generalmente, el procedimiento de la invención se llevará a cabo como se ha descrito anteriormente, usando un primer entorno de célula huésped y un segundo entorno de célula huésped. Sin embargo, en una realización alternativa, el plásmido puede sintetizarse o ligarse químicamente y transformarse directamente en el segundo entorno de célula huésped. Este procedimiento invalidaría el requisito del primer entorno de célula huésped. Por tanto, la invención engloba un procedimiento que utiliza un único entorno de célula huésped que puede efectuar la recombinación entre los sitios diana de recombinasa específica de sitio, de forma que el gen marcador de selección se escinde.

50 Este procedimiento alternativo mantiene la sorprendente ventaja de que el plásmido se mantiene dentro del segundo entorno de célula huésped tras la escisión del gen marcador de selección, en ausencia de un sistema de mantenimiento de plásmidos.

55 **Plásmido**

60 En una realización, la invención también engloba el plásmido sin gen marcador de selección producido mediante el procedimiento de la invención. Este plásmido puede aislarse y/o purificarse a partir del segundo entorno de célula huésped.

65 En otra realización, la invención también incluye el segundo entorno de célula huésped que contiene un plásmido sin gen marcador de selección producido mediante el procedimiento de la invención.

En otra realización, la invención incluye una composición que comprende un plásmido producido según el procedimiento de la invención y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

Célula huésped que contiene el plásmido

En una realización, la invención también engloba una célula huésped que contiene un plásmido sin gen marcador de selección. También podría decirse que una célula huésped tal carece de un sistema de mantenimiento de plásmidos. En una realización, el plásmido dentro de la célula huésped contiene un sitio diana de recombinasa específica de sitio residual. Un sitio diana de recombinasa específica de sitio residual es uno que queda sobre el plásmido tras la recombinación entre los dos sitios diana de recombinasa específica de sitio inicialmente presentes. Por tanto, en una realización, el plásmido dentro de la célula huésped puede contener un único sitio diana de recombinasa específica de sitio. Esto permitirá que una célula huésped que contiene un plásmido producido mediante el procedimiento de la invención se distinga de una célula huésped que contiene un plásmido producido mediante un procedimiento alternativo, que no contendría un sitio diana de recombinasa específica de sitio residual. Si se requiere, la célula huésped puede contener un sistema de mantenimiento de plásmidos tal como ORT (valoración de operador-represor) u oriSELECT, como se ha tratado anteriormente.

En una realización, la célula huésped puede contener un gen que codifica una recombinasa específica de sitio inducible. La recombinasa específica de sitio inducible puede estar presente sobre el cromosoma de la célula huésped.

En una realización, la célula huésped puede ser una célula huésped sin modificar.

Una célula huésped sin modificar que no contiene un sistema de mantenimiento de plásmidos puede solo producirse mediante un procedimiento según la presente invención debido a que previamente era inesperado que una célula huésped que no contiene un sistema de mantenimiento de plásmidos retuviera un plásmido.

La célula huésped puede ser cualquier tipo de célula tratado anteriormente en relación con el procedimiento de la invención. Por ejemplo, la célula huésped puede ser una célula bacteriana Gram-negativa (por ejemplo, de los géneros *Escherichia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Agrobacterium*, *Pseudomonas* o *Vibrio*), una célula bacteriana Gram-positiva (por ejemplo, de los géneros *Bacillus*, *Streptomyces*, *Listeria*, *Lactobacillus*, *Lactococcus* o *Mycobacterium*), una arquea, una célula de levadura (por ejemplo, de los géneros *Hansenula*, *Pichia*, *Saccharomyces* o *Schizosaccharomyces*), o un eucariota no fúngico que puede replicar un plásmido (por ejemplo, de los géneros *Chlamydomonas*, *Dictyostelium* o *Entamoeba*).

El sitio diana de recombinasa específica de sitio residual contenido sobre el plásmido en la célula huésped puede ser cualquier sitio diana de recombinasa específica de sitio tratado en relación con el procedimiento de la invención que incluye *Ecdif*, *cer*, *psi*, *pif*, *mwr*, *Bsdif*, *loxP*, *FRT* y *RS*.

Una célula huésped tal puede usarse ventajosamente como terapéutico o como vacuna, como se trata más adelante.

En otra realización, la invención incluye una composición que comprende una célula huésped sin modificar que contiene un plásmido sin gen marcador de selección y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

Usos de plásmidos y células huésped

Dentro del alcance de la invención, los plásmidos producidos según el procedimiento de la invención y células huésped que contienen un plásmido en ausencia de un sistema de mantenimiento de plásmidos pueden tener varios usos.

Principalmente, el plásmido producido según el procedimiento de la invención y las células huésped que contienen un plásmido en ausencia de un sistema de mantenimiento de plásmidos pueden usarse en terapia. La terapia puede ser terapéutica o profiláctica.

Producción de proteínas recombinantes como terapéuticos y vacunas

En una realización, la célula transformada que contiene el plásmido sin gen marcador de selección (es decir, el segundo entorno de célula huésped) puede cultivarse en un matraz de caldo nutritivo o fermentador para producir una proteína recombinante que después se recoge para su uso como un terapéutico de proteína o una vacuna de proteína.

Producción de ADN terapéutico y vacunas de ADN

En otra realización, la célula transformada que contiene el plásmido sin gen marcador de selección (es decir, el segundo entorno de célula huésped) puede cultivarse en un matraz de caldo nutritivo o fermentador para producir

una secuencia de ADN que después se recoge para su uso como un terapéutico de ADN o vacuna de ADN. El terapéutico de ADN o vacuna de ADN tomará generalmente la forma de un plásmido, pero también puede tomar la forma de una molécula de ADN lineal mediante el posterior procesamiento del plásmido. Tal procesamiento puede incluir el uso de endonucleasas de restricción.

5

Administración de proteína recombinante y ADN a animales usando vectores bacterianos vivos

En otra realización, la célula transformada que contiene el plásmido sin gen marcador de selección (es decir, el segundo entorno de célula huésped) puede administrarse directamente a un animal en necesidad de tratamiento. Dentro de esta realización, el entorno celular puede estar atenuado o no atenuado. En esta realización, las células pueden liberar su contenido al paciente con el fin de producir un efecto terapéutico o inmunológico. Por ejemplo, puede usarse *Salmonella* atenuada para administrar por vía oral un plásmido que expresa un antígeno recombinante al sistema inmunitario de la mucosa en el revestimiento del tubo gastrointestinal (Leckenby y col., 2009, Microb. Patog. 46: 201-206). Alternativamente, el segundo entorno de célula huésped que contiene el plásmido sin gen marcador de selección, por ejemplo, cuando la célula es un miembro del género *Agrobacterium*, puede usarse para administrar ADN de plásmido directamente a plantas para permitir la modificación genética (Ebinuma y col., 2001, Plant Cell Rep. 20: 383-392).

10

15

20

El plásmido sin gen marcador de selección o la célula que contiene el plásmido descrito anteriormente puede administrarse a un paciente por cualquier procedimiento conocido en la técnica. Estos procedimientos incluyen, pero no se limitan a, administración oral, intradérmica, subcutánea, intramuscular, intramucosa, intravenosa, intraperitoneal o nasal.

25

Dentro del alcance de la invención, el paciente que va a tratarse puede ser cualquier animal en necesidad de tratamiento. Éste incluye seres humanos, peces, perros, gatos, monos, cabras, camellos, cerdos, ovejas, ratas, ratones y caballos.

30

En otra realización, la invención incluye un procedimiento de vacunación o tratamiento de un paciente que comprende administrar al paciente una célula transformada que contiene el plásmido sin gen marcador de selección o un plásmido producido según el procedimiento de la invención en una cantidad farmacéuticamente aceptable.

35

En otra realización, la invención incluye una célula transformada que contiene el plásmido sin gen marcador de selección o un plásmido producido según el procedimiento de la invención para su uso en la vacunación de un paciente o tratamiento de una enfermedad en un paciente.

40

En otra realización, la invención incluye una célula transformada que contiene el plásmido sin gen marcador de selección o un plásmido producido según el procedimiento de la invención para su uso en la fabricación de un medicamento para vacunar un paciente o tratar una enfermedad en un paciente.

Kits y células huésped para su uso en kits

En una realización, la presente invención engloba un kit para realizar el procedimiento de la invención.

45

El kit puede comprender o consistir en:

50

- i) un primer entorno de célula huésped que contiene un plásmido que contiene un gen marcador de selección flanqueado por sitios diana de recombinasa específica de sitio, en el que el primer entorno de célula huésped es incapaz de efectuar la recombinación entre los sitios diana de recombinasa específica de sitio y;
- ii) un segundo entorno de célula huésped que puede efectuar la recombinación entre los sitios diana de recombinasa específica de sitio, de forma que el gen marcador de selección se escinde.

55

En una realización, el primer y segundo entornos de células huésped en el kit pueden estar presentes dentro de células separadas, es decir, el kit comprende una primera célula huésped y una segunda célula huésped. Las células huésped presentes dentro del kit pueden ser de cualquier tipo de célula. En particular, las células huésped pueden ser de cualquier tipo de célula tratado anteriormente en relación con el procedimiento de la invención.

60

El primer huésped puede contener una mutación en un gen que codifica una o más de las proteínas implicadas en la recombinación específica de sitio de un plásmido. Preferentemente, el gen cromosómico que codifica una o más de las proteínas accesorias PepA, ArgR o ArcA puede mutarse en la primera célula huésped.

65

La segunda célula huésped puede ser capaz de efectuar la recombinación entre los sitios diana de recombinasa específica de sitio debido a la presencia de XerC/XerD endógeno y/o una versión activa de una o más de las proteínas accesorias PepA, ArgR o ArcA.

Los sitios diana de recombinasa específica de sitio pueden ser cualquier sitio diana de recombinasa específica de

sitio tratado en relación con el procedimiento de la invención

El kit también puede comprender instrucciones.

5 La presente invención también proporciona células huésped adecuadas para su uso como este primer entorno de célula huésped en los kits o procedimientos de la invención. En particular, la presente invención proporciona una célula huésped que contiene un plásmido que contiene un gen marcador de selección flanqueado por sitios diana de recombinasa específica de sitio, en el que la célula huésped comprende además una mutación inactivante en uno o más de los genes cromosómicos que codifican una o más de la proteínas accesorias PepA, ArgR o ArcA.

10 La célula huésped según este aspecto de la invención puede ser de cualquier tipo de célula. En particular, la célula huésped puede ser de cualquier tipo de célula tratado anteriormente en relación con los procedimientos de la invención. Los sitios diana de recombinasa específica de sitio contenidos sobre el plásmido en la célula huésped descritos anteriormente y en el kit pueden ser cualquier sitio diana de recombinasa específica de sitio tratado en relación con los procedimientos de la invención. El gen marcador de selección sobre el plásmido de estas células huésped puede ser cualquier gen marcador de selección tratado anteriormente en relación con los procedimientos de la invención.

15 La invención se describirá ahora en más detalle a modo de ejemplos. Se apreciará que pueden hacerse modificaciones a los sistemas descritos en los ejemplos

20 Breve descripción de las figuras

La **Figura 1** muestra una ilustración de los procedimientos por los que un gen de resistencia a antibióticos puede escindirse de un plásmido en una realización preferida de la invención.

La **Figura 2** muestra una representación de los plásmidos pORT3CMV, pORT3aCMV y pORT4CMV.

30 La **Figura 3 A)** muestra los plásmidos pORT3CMV y pORT4CMV como se propagan en la cepa mutante de *pepA* de *E. coli* DS957 ('Sec. Ac.' se refiere a las secuencias accesorias que contienen sitios de unión *pepA* y ArgR/ArcA, '*cat*' es el gen de resistencia a cloranfenicol; no se ilustran otros elementos de plásmido). **B)** muestra la generación del plásmido pORT3aCMV a partir de pORT3CMV por recombinación de Xer en sitios *psi* directamente repetidos y secuencias accesorias tras la transformación de los plásmidos en la cepa de *E. coli* no mutada DH1. **C)** muestra las preparaciones de plásmido de pORT3CMV y pORT4CMV durante el subcultivo diario en DH1 de *E. coli* sobre un gel de agarosa.

35 La **Figura 4** muestra el plásmido pSC2c y su derivado pSC2 en los que el gen *cat* se ha eliminado tras un acontecimiento de recombinación de Xer.

40 La **Figura 5A)** muestra la generación del plásmido pSC2 a partir de pSC2c por recombinación de Xer en sitios *psi* directamente repetidos y secuencias accesorias; **B)** muestra un gel de agarosa con digestiones NdeI de pSC2c del mutante de la cepa *pepA* de *E. coli* DS957, y de pSC2 durante un subcultivo de cuatro días en *Salmonella enterica* serovariedad Typhimurium cepa SL3261.

45 Ejemplo 1

El plásmido de expresión eucariota pORT1-CMV se construyó a partir de pORT1 (Cranenburgh y col., 2001. Nucleic Acids Res. 29: e26). El vector de expresión pcDNA3.1(+) (Invitrogen, Carlsbad, CA) se cortó con NruI y PvuII para escindir la región que contiene P_{CMV} y bGH pA. Este fragmento se ligó en pORT1 que se había cortado con HincII y Ecl136II para crear pORT1-CMV.

50 El gen de resistencia a cloranfenicol *cat* se amplificó por el producto de PCR de pACYC184 (New England Biolabs, Hitchin, R.U.) usando los cebadores 5'ACYC y 3'ACYC; éste se cortó luego con AvrII, se desfosforiló usando fosfatasa alcalina y luego se cortó con FseI. Se produjeron dos productos de PCR que codificaron el sitio *psi* de pSC101 (DSMZ, Braunschweig, Alemania) con los pares de cebadores 5AvrTPSI y 3AvrPSI y 5FsePSI y 3fSEPSI; éstos se cortaron usando AvrII y FseI, respectivamente. El plásmido pORT1-CMV se cortó con AvrII y FseI y se desfosforiló.

60 Se usó una ligación de tres fragmentos para combinar pORT1-CMV, pACYC184 y los productos de PCR de *psi* cortado con AvrII, generando un plásmido intermedio llamado pORTcatPSI. Entonces, este plásmido se cortó con FseI, se desfosforiló y el producto de PCR de *psi* cortado con FseI se ligó para crear los vectores pORT3-CMV (sitios *psi* en una orientación de repetición directa) y pORT4-CMV (sitios *psi* en una orientación repetida invertida).

65 Las cepas DH1(pORT3a-CMV) y DH1(pORT4-CMV) se inocularon de disoluciones madre congeladas sobre medio de crecimiento sólido y se incubaron para obtener colonias individuales. Se usó una colonia individual de cada cepa para inocular cultivos de caldo de LB. Estos cultivos llamados 'día 0' se incubaron entonces durante 24 horas. La

densidad óptica a 600 nm se midió y los cultivos de 'día 1' se inocularon a una densidad óptica determinada, los cultivos de 'día 1' se incubaron durante 24 horas. Este procedimiento se repitió hasta que el número total de generaciones de células superó 40. Se tomaron muestras normalizadas cada día y se congelaron para el posterior análisis. Se extrajo ADN de plásmido de las muestras congeladas por 'mini-prep' y se examinaron por electroforesis en gel de agarosa.

Los sitios diana de recombinasa específica de sitio en pORT3-CMV están en la orientación relativa correcta (directamente repetida), de forma que la recombinación de Xer en la célula DH1 de *E. coli* sin modificar genera el plásmido sin gen de resistencia a antibióticos pORT3a-CMV. Este plásmido se mantiene establemente durante el periodo de cultivo repetitivo (cuatro días). El plásmido pORT4-CMV se diferencia de pORT3-CMV solo por los sitios diana de recombinasa específica de sitio que están en la orientación relativa incorrecta (inversamente repetida). Cuando pORT4-CMV se transforma en la misma cepa de DH1 de *E. coli* sin modificar, la recombinación de Xer no puede tener lugar, por lo que se retiene el gen de resistencia a antibióticos. La carga metabólica del gen de resistencia a antibióticos hizo que se perdiera pORT4-CMV de las células después de solo dos días de cultivo repetitivo. Esto demuestra la retención de un plásmido sin gen marcador de selección en una célula bacteriana que no se ha modificado para contener un sistema de mantenimiento de plásmidos activo.

Ejemplo 2

Para construir el vector de expresión de número de copias bajo pSC2c se usaron los cebadores Tetlaccat1 y Tetlaccat2 para amplificar el casete del gen *cat* flanqueado por *psi* de pORT3-CMV e introducir el operador *lac* en la dirección 5' del mismo. Este producto de PCR se clonó en pCR2.1, generando pCRcatpsi. El origen de replicación de pSC101 se amplificó por PCR usando los cebadores a101 y as101 y se clonó en pCR2.1-TOPO, generando pCR101. Un fragmento BspHI de pCRcatpsi que incluye el casete del gen *cat* flanqueado por *psi* se ligó con el fragmento BspHI de pCR101 para generar p101cat. El promotor *pagC* se generó por PCR de ADN genómico de *Salmonella* usando los cebadores Ndepag1 y BspPag1. El producto de PCR se clonó en pCR2.1, generando pCRpag1. Los cebadores de PCR Notpag1 y Notpag2 se usaron para amplificar el promotor *pagC* de pCRpag1. El producto de PCR tratado con NotI se clonó en p101cat cortado con NotI para generar pSC2c. Se usaron las cepas mutantes de *pepA* de *E. coli* para operaciones de clonación, si se requiere.

El plásmido pSC2c se transformó en *Salmonella enterica* serovariedad Typhimurium SL3261, e inicialmente se seleccionaron transformantes sobre placas de agar de LB que contenía cloranfenicol. Se aislaron colonias individuales y se cultivaron durante la noche en caldo de LB en ausencia del antibiótico. La recombinación de Xer produjo la delección del gen *cat* para generar pSC2, y se identificaron colonias sensibles a cloranfenicol de SL3261(pSC2).

Para evaluar el mantenimiento del plásmido, una colonia individual de SL3261(pSC2) se inoculó en caldo de LB y se incubó durante 24 h ("día 1" en la Figura 5B). La densidad óptica a 600 nm se midió y se inició un segundo cultivo de caldo de LB a una densidad óptica determinada. Este procedimiento se repitió durante 4 días hasta que el número total de generaciones de células superó 40. Se recogieron muestras de células normalizadas cada día y se extrajo ADN de plásmido. Éstos se linealizaron por digestión con NdeI y se sometieron a electroforesis en gel de agarosa. El ADN de plásmido preparado a partir del mutante de la cepa *pepA* de *E. coli* DS957 se usó como referencia (pSC2c en la Figura 5B). El plásmido se mantuvo establemente durante los cuatro días de cultivo repetitivo, que indica que la presente invención también es aplicable a plásmidos de bajo número de copias en *Salmonella*.

Referencias

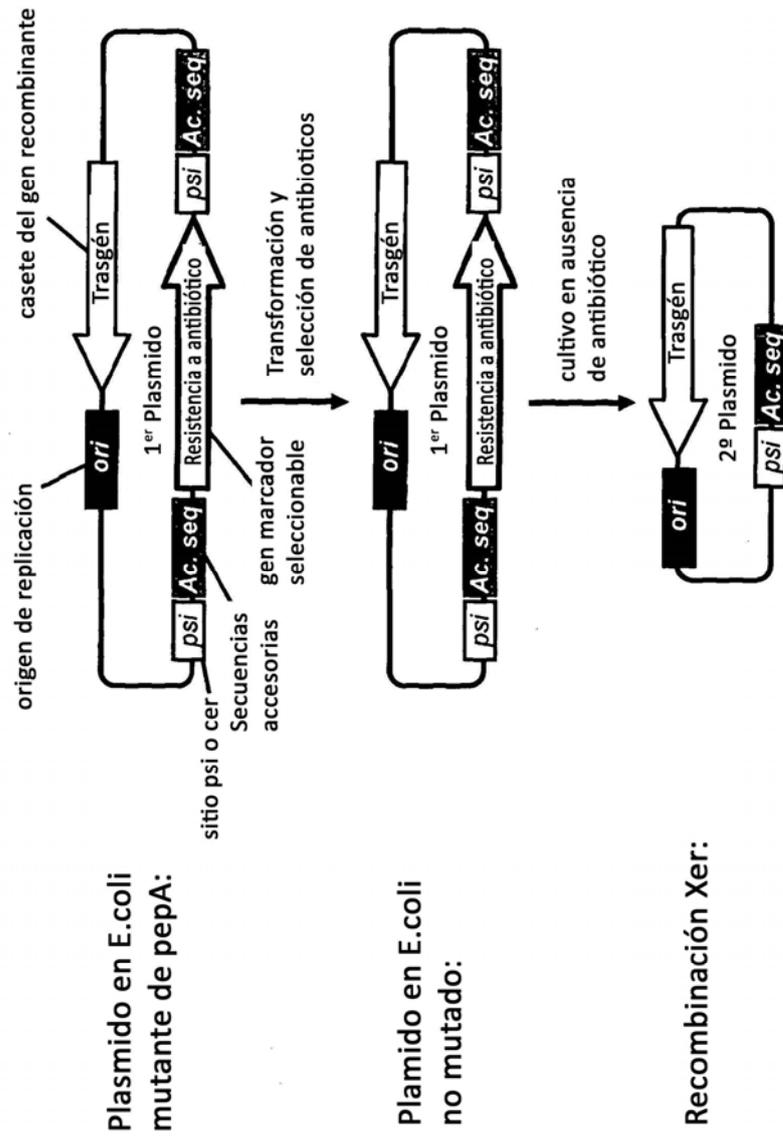
- Barre et al. 2000 Genes Dev. 14: 2976-2988
- Bentley et al. 1990, Biotechnol. Bioeng. 35: 668-681
- Birnboim and Doly 1979, Nucleic Acids Res. 7: 1513-1523
- Blakely et al. Cell 1993, 75: 351-361
- Bloor and Cranenburgh 2006, Appl. Environ. Microbiol. 72: 2520-2525
- Colloms et al. 1998 Mol. Microbiol. 28(3): 521-530
- Cornet et al. 1994, J. Bacteriol. 176: 3188-3195
- Cranenburgh et al. 2001. Nucleic Acids Res. 29: e26
- Cranenburgh 2005, WO06/003412
- Dale and Ow 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 10558-10562
- Datsenko and Wanner 2000, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97: 6640-6645
- Degryse 1991, Mol. Gen. Genet. 227: 49-51
- Ebinuma et al. 2001, Plant Cell Rep. 20: 383-392
- Leckenby et al. 2009, Microb. Pathog. 46: 201-206
- Leslie and Sherratt 1995, EMBO J. 14: 1561-1570
- McNeil et al., 2000, Appl. Environ. Microbiol., 66: 1216-1219
- Neilson et al. 1999, Mol. Microbiol. 31: 915-926
- Neu 1992, Science 257 1064-1073
- Pham et al. 2002, J. Bacteriol. 184: 1607-1616

5 Recchia et al. 1999, EMBO J. 18: 5724-5734
Recchia and Sherratt 1999, Mol. Microbiol. 34: 1146-1148
Sanchis et al. 1997, Appl. Environ. Microbiol. 63: 779-784
Sambrook Molecular Cloning; A Laboratory Manual, Second Edition, 1989
5 Sciochetti et al. 1999, J. Bacteriol. 181: 6053-6062
Sciochetti et al. 2001, J. Bacteriol. 183: 1058-1068
Sugita et al. 2000, Plant J. 22:461-469
Summers and Sherratt 1984, Cell 36: 1097-1103
10 Trigueros et al. 2009, Nucleic Acids Res. 37: 3580-3587
Wulff et al. 1993, Mol. Microbiol. 9: 261-271 1
Zubko et al. 2000, Nature Biotechnol. 18: 442-445

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de producción de un plásmido sin gen marcador de selección que comprende las etapas de:
 - 5 a) cultivar un plásmido que contiene un gen marcador de selección flanqueado por sitios diana de recombinasa específica de sitio seleccionado de *Ecdif*, *cer psi*, *pif* y *mwr* en un primer entorno de célula huésped que es incapaz de efectuar la recombinación entre los sitios diana de recombinasa específica de sitio, en el que el primer entorno de célula huésped comprende una mutación inactivante en uno o más de los genes que codifican PepA, ArgR y ArcA; y
 - 10 b) posteriormente cultivar el plásmido en un segundo entorno de célula huésped que puede efectuar la recombinación entre los sitios diana de recombinasa específica de sitio, de forma que el gen marcador de selección se escinde, en el que el segundo entorno de célula huésped contiene versiones activas de PepA y ArgR o ArcA, y comprende una recombinasa específica de sitio seleccionada de XerC y XerD.
- 15 2. El procedimiento de la reivindicación 1 que comprende además la etapa de:
 - c) mantener el plásmido sin gen marcador de selección en cultivo celular.
- 20 3. El procedimiento de la reivindicación 1 o la reivindicación 2 que comprende además la etapa de:
 - d) aislar el plásmido sin gen marcador de selección del segundo entorno de célula huésped.
- 25 4. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el primer entorno de célula huésped y el segundo entorno de célula huésped están dentro de diferentes células.
- 30 5. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que el primer entorno de célula huésped y el segundo entorno de célula huésped se forman dentro de la misma célula huésped.
- 35 6. El procedimiento de la reivindicación 5, en el que el primer entorno de célula huésped y el segundo entorno de célula huésped están temporalmente separados.
- 40 7. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el gen marcador de selección es un gen de resistencia a antibióticos.
- 45 8. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que el gen marcador de selección permite la producción de un metabolito esencial, pero ausente, del primer y/o el segundo entorno de célula huésped.
9. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el primer entorno de célula huésped y/o el segundo entorno de célula huésped es una célula bacteriana Gram-negativa.
10. El procedimiento según la reivindicación 9, en el que el primer entorno de célula huésped y el segundo entorno de célula huésped están seleccionados independientemente de los géneros *Escherichia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Agrobacterium*, *Pseudomonas* y *Vibrio*.
11. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el plásmido codifica uno o más genes de interés.

Figura 1



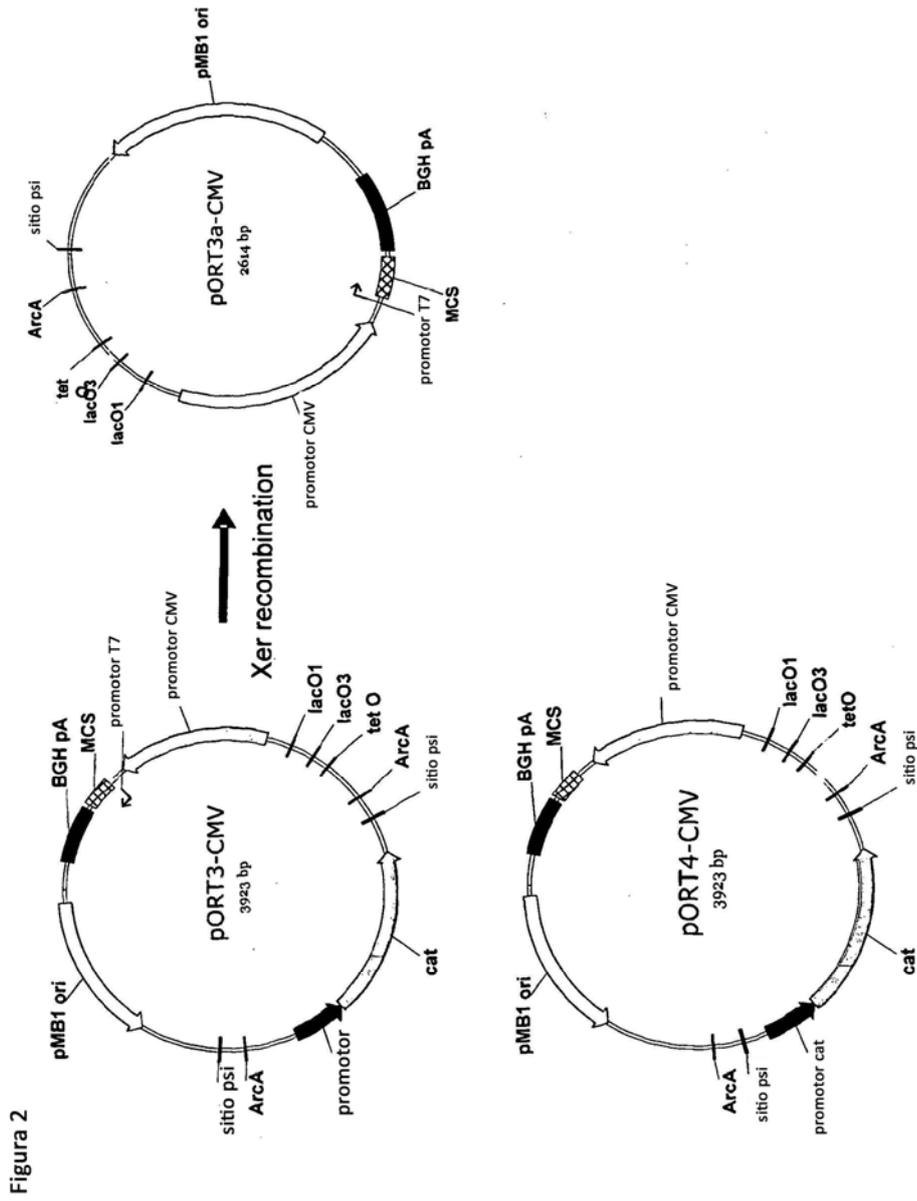


Figura 3

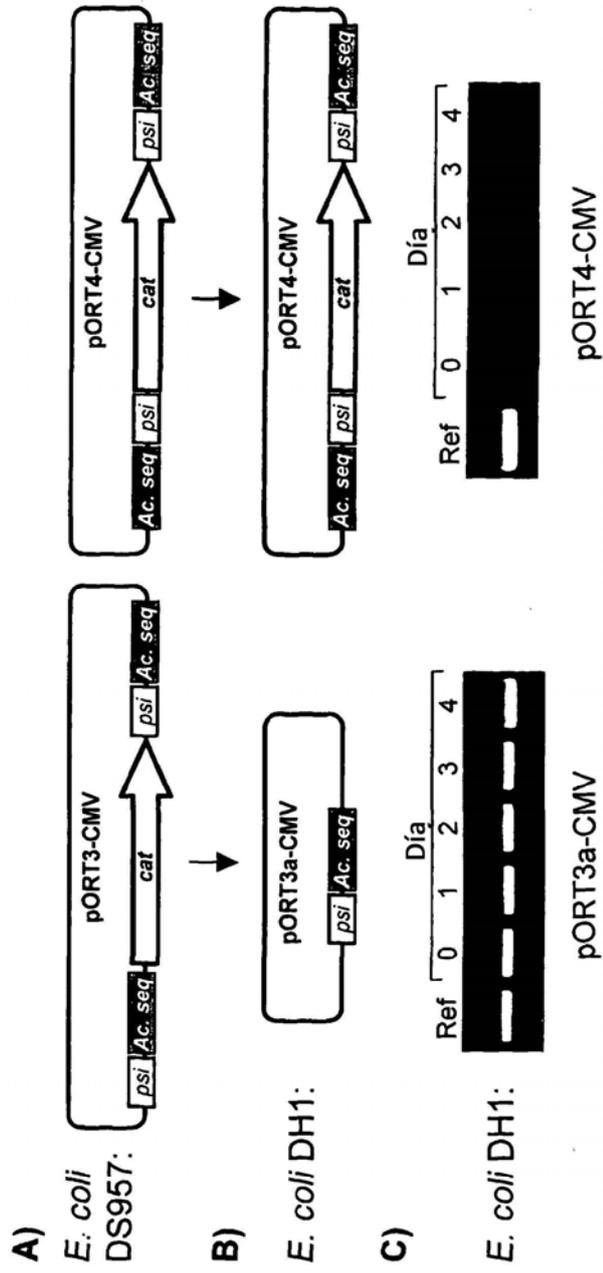


Figura 4

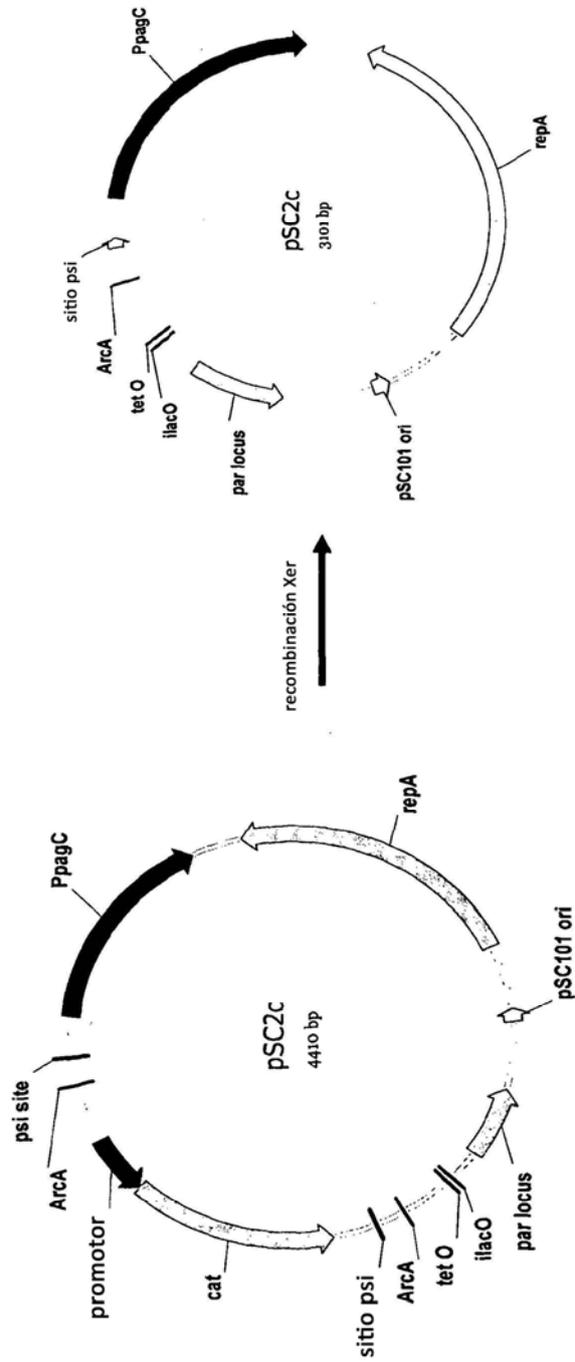


Figura 5

