

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 644 766**

51 Int. Cl.:

A61K 39/112 (2006.01)

C12N 1/21 (2006.01)

C12N 15/31 (2006.01)

C12R 1/42 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.02.2010 PCT/US2010/025221**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.09.2010 WO10101750**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.02.2010 E 10749113 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.09.2017 EP 2403525**

54 Título: **Salmonella entérica atenuada serovariedad Parathypy y usos de la misma**

30 Prioridad:

06.03.2009 US 399091

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
30.11.2017

73 Titular/es:

**UNIVERSITY OF MARYLAND, BALTIMORE
(100.0%)
Office of Research and Development 620 W.
Lexington Street, 4th Floor
Baltimore, MD 21201, US**

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 644 766 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 atenuada serovariedad Paratyphi y usos de la misma

5 Declaración de investigación y desarrollo de financiación federal

La presente invención fue hecha con apoyo del gobierno con la subvención de NIH N.º AI029471 concedida por los Institutos Nacionales de Salud. El gobierno tiene ciertos derechos en la invención.

10 Antecedentes de la invención

La fiebre entérica producida por miembros del género *Salmonella*, que incluye fiebres tifoideas y paratifoideas, continúa constituyendo una carga de enfermedad y mortalidad significativa entre las poblaciones en países en 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 producida por *Salmonella enterica* serovariedades Typhi y Paratyphi A (*S. Typhi* y *S. Paratyphi A*) están en aumento debido a la emergencia y diseminación de variantes resistentes a los antibióticos (Lancet Infect Dis. 2005 5(10):623-8). Aunque la enfermedad clínica producida por *S. Paratyphi A* es en general algo más leve que la debida a *S. Typhi*, la primera puede, sin embargo, producir fiebre entérica en estado avanzado con una selección de complicaciones y, si no se trata o se trata inapropiadamente, puede producir la muerte. Existe la necesidad de vacunas que sean seguras y eficaces en combatir infecciones por *Salmonella*.

El documento WO2007/125535 se refiere a flagelina recombinante de *Salmonella* para su uso en una composición de vacuna. El documento WO98/26799 se refiere a una vacuna conjugada que comprende polisacáridos O de *S. Paratyphi A* unidos a un vehículo. El documento WO 2007/053489 se refiere a cepas atenuadas de *S. Paratyphi A*. Brett & Woods (Infect. Immun., 1996, 64, pp 2824-8) se refiere a la caracterización estructural e inmunológica de conjugados de polisacárido O-proteína flagelina de *Burkholderia pseudomallei*.

30 Sumario de la invención

Las realizaciones de la presente invención son como se definen en las reivindicaciones. En particular, la presente invención se refiere a un método de preparación de una vacuna conjugada, que comprende:

- 35 (a) mutar una cepa de *Salmonella Paratyphi A* para generar una cepa atenuada de *Salmonella Paratyphi A*, en las que dicha cepa de *Salmonella Paratyphi A* atenuada comprende una mutación del gen *clpP* y una o más mutaciones genéticas adicionales seleccionadas del grupo que consiste en una mutación de los loci *guaBA*, una mutación del gen *guaB* y una mutación del gen *guaA*;
- (b) aislar un polisacárido O (OPS) y una proteína flagelina de la cepa atenuada de (a), en las que dicha proteína flagelina es flagelina de fase 1 (*fliC*); y
- 40 (c) conjuguar el OPS con la proteína flagelina, preparando así una vacuna conjugada.

En el presente documento se desvela una cepa de *S. Paratyphi A* atenuada, preferentemente una cepa de *S. Paratyphi A* atenuada viva.

45 En el presente documento se desvela que las cepas de *S. Paratyphi A* para su uso en la presente invención tienen al menos una mutación atenuante seleccionada del grupo que consiste en mutaciones atenuantes en los loci *guaBA*, el gen *guaB*, el gen *guaA*, el gen *clpP* y el gen *clpX*. En realizaciones preferidas, la cepa de *S. Paratyphi A* tiene una mutación atenuante en el gen *guaB*, el gen *guaA* y el gen *clpP*. En el presente documento, se desvela que la cepa de *Salmonella Paratyphi A* tiene una mutación atenuante en el gen *guaB*, el gen *guaA* y el gen *clpX*. En una realización preferida adicional, la cepa de *Salmonella Paratyphi A* tiene una mutación atenuante en el gen *guaB*, el gen *guaA*, el gen *clpP* y el gen *clpX*.

55 En una realización, las mutaciones atenuantes de los loci *guaBA*, el gen *guaB*, el gen *guaA*, el gen *clpP* y el gen *clpX* son mutaciones atenuantes que reducen el nivel de expresión de los loci o los genes, o que bloquean la expresión de los loci o los genes.

En otra realización, las mutaciones atenuantes de los loci *guaBA*, el gen *guaB*, el gen *guaA*, el gen *clpP* y el gen *clpX* son mutaciones atenuantes que reducen la actividad de un polipéptido codificado por los loci o los genes, o inactivan un polipéptido codificado por los loci o los genes.

60 En una realización preferida, la cepa de *Salmonella Paratyphi A* es la cepa de *S. Paratyphi A* 9150.

En el presente documento se desvelan cepas de *S. Paratyphi A* para su uso en la invención que tienen al menos una mutación atenuante seleccionada del grupo que consiste en una mutación atenuante en los loci *guaBA*, el gen *guaB*, el gen *guaA*, el gen *clpP* y el gen *clpX*, y que comprende además un sistema de expresión en plásmido estabilizado.

El sistema de expresión en plásmido estabilizado puede comprender un vector de expresión que tiene (a) un casete de origen de replicación de número de copias restringido, (b) al menos un casete de destrucción post-segregacional, (c) al menos un casete de reparto, y (d) un casete de expresión.

5 El casete de origen de replicación de número de copias restringido puede comprender (i) una secuencia de nucleótidos que codifica un origen de replicación que limita el vector de expresión a un número de copias de plásmido promedio de aproximadamente 2 a 75 copias por célula, (ii) un primer sitio de escisión de enzima de restricción único localizado 5' de la secuencia de nucleótidos que codifica el origen de replicación, y (iii) un segundo sitio de escisión de enzima de restricción único localizado 3' de la secuencia de nucleótidos que codifica el origen de replicación.

10 El casete de destrucción post-segregacional puede comprender (i) una secuencia de nucleótidos que codifica al menos un locus de destrucción post-segregacional, (ii) un tercer sitio de escisión de enzima de restricción único localizado 5' de la secuencia de nucleótidos que codifica el locus de destrucción post-segregacional, y (iii) un cuarto sitio de escisión de enzima de restricción único localizado 3' de la secuencia de nucleótidos que codifica el locus de destrucción post-segregacional.

15 El casete de reparto puede comprender (i) una secuencia de nucleótidos que codifica al menos una función de reparto, (ii) un quinto sitio de escisión de enzima de restricción único 5' de la secuencia de nucleótidos que codifica la función de reparto, y (iii) un sexto sitio de escisión de enzima de restricción único localizado 3' de la secuencia de nucleótidos que codifica la función de reparto.

20 El casete de expresión puede comprender (i) una secuencia de nucleótidos que codifica un antígeno seleccionado operativamente unido a un promotor, (ii) un séptimo sitio de escisión de enzima de restricción único localizado 5' de la secuencia de nucleótidos que codifica el antígeno seleccionado operativamente unido a un promotor, y (iii) un octavo sitio de escisión de enzima de restricción único localizado 3' de la secuencia de nucleótidos que codifica el antígeno seleccionado operativamente unido a un promotor.

25 La secuencia de nucleótidos que codifica el origen de replicación puede ser una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste 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.

30 La secuencia de nucleótidos que codifica el locus de destrucción post-segregacional pueden ser una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste 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*. Más preferentemente, el locus de destrucción post-segregacional es una secuencia de nucleótidos que codifica el sistema letal equilibrado *ssb* seleccionado del grupo que consiste en el locus *ssb* de *Shigella flexneri*, el locus *ssb* de *Salmonella Typhi* y el locus *ssb* de *E. coli*. Incluso más preferentemente, el sistema letal equilibrado *ssb* es un locus *ssb* que comprende un promotor inducible *ssb*, un promotor constitutivo *ssb* y una región codificante *ssb* de la cepa de *S. flexneri* 2a CVD 1208s expuesta en SEQ ID NO:34.

35 La secuencia de nucleótidos que codifica la función de reparto puede ser una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en el locus *parA* de *E. coli* expuesto en SEQ ID NO:31 y el locus *par* de *E. coli* pSC101 expuesto en SEQ ID NO:32.

40 El promotor puede ser un promotor inducible, más preferentemente un promotor *ompC*, incluso más preferentemente el promotor *ompC* expuesto en SEQ ID NO:33.

45 La secuencia de nucleótidos que codifica un antígeno seleccionado puede ser 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.

50 La secuencia de nucleótidos que codifica un antígeno seleccionado puede ser una secuencia de nucleótidos que codifica un antígeno heterólogo seleccionado del grupo que consiste en un antígeno viral, un antígeno bacteriano, un antígeno de cáncer y un antígeno auto-inmunitario.

55 En el presente documento se desvela una formulación farmacéutica que comprende una o más de las cepas de *Salmonella Paratyphi A* atenuadas. Preferentemente, las formulaciones farmacéuticas son formulaciones farmacéuticas orales.

60 En el presente documento se desvela un método de inducción de una respuesta inmunitaria en un sujeto, que comprende administrar una cantidad inmunológicamente eficaz de una formulación farmacéutica como se desvela en el presente documento a un sujeto. Preferentemente, la respuesta inmunitaria es una respuesta inmunitaria protectora.

65

La cantidad inmunológicamente eficaz de la formulación farmacéutica contiene aproximadamente 10^2 ufc a aproximadamente 10^{10} ufc, más preferentemente aproximadamente 10^6 ufc a aproximadamente 10^9 ufc, de la cepa de *S. Paratyphi A* atenuada dentro de la formulación farmacéutica.

5 La respuesta inmunitaria puede ser a *Salmonella* Paratyphi A. La respuesta inmunitaria puede ser al antígeno seleccionado. La respuesta inmunitaria puede ser a tanto *Salmonella* Paratyphi A como al antígeno seleccionado.

El sistema de mutagénesis mediada por Lambda Red puede usarse para mutar o deletar diversos loci y genes cromosómicos de las cepas *S. Paratyphi* de la presente invención.

10 Breve descripción de los dibujos

15 La Figura 1 muestra los productos de amplificación por PCR de *guaBA* y *guaBA::cml*. El carril 1 es *guaBa* no mutado; los carriles 2 y 3 son *guaBA::cml*. Las flechas indican bandas de marcadores de peso molecular de 3 kb (arriba) y 1,5 kb (abajo).

20 La Figura 2 muestra los productos de amplificación por PCR de *guaBA::cml* y deletaciones de *guaBA*. El carril 1 es *guaBA::cml*; los carriles 2 a 5 son deletaciones de *guaBa*. Las flechas indican bandas de marcadores de peso molecular de 1,5 kb (arriba) y 0,5 kb (abajo).

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

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

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

35 La Figura 6 es una representación gráfica de datos de pruebas de DL_{50} en ratones inyectados con *S. Paratyphi A* wt, deletada en *guaBA*, deletada en *guaBA* complementada con pLowBlu 184, y deletada en *guaBA* complementada con pATGguaBA.

40 La Figura 7 es una representación gráfica de datos de pruebas de DL_{50} en ratones inyectados con *S. Paratyphi A* wt, deletada en *clpX*, *S. Paratyphi A* deletada en *guaBA*, o *S. Paratyphi A* deletada en *clpX-guaBA*. Los datos incluyen ratones inyectados con *S. Paratyphi A* deletada en *clpX* complementada con pLowBlu 184 o pATGclpX, además de *S. Paratyphi A* deletada en *clpX-guaBA* complementada con pLowBlu 184 o pATGclpXATGguaBA.

45 La Figura 8 es una representación gráfica de datos de pruebas de DL_{50} en ratones inyectados con *S. Paratyphi A* wt, deletada en *clpP*, *S. Paratyphi A* deletada en *guaBA* o *S. Paratyphi A* deletada en *clpP-guaBA*. Los datos incluyen ratones inyectados con *S. Paratyphi A* deletada en *clpP* complementada con pLowBlu 184 o pATGclpP, además de *S. Paratyphi A* deletada en *clpP-guaBA* complementada con pLowBlu 184 o pATGclpPATGguaBA.

50 La Figura 9 muestra hiper-flagelación por microscopía electrónica de mutaciones *clpP* en *S. Paratyphi A*.

55 Figura 10 Alineamiento de loci *fliD-fliS* cromosómicos de *Salmonella enterica* serovariedades Typhimurium, Enteritidis, Paratyphi A y Typhi. Las Figuras 10A-10D muestran el alineamiento de loci *fliD-fliS* cromosómicos como entre *Salmonella* Typhimurium (SEQ ID NO:47), serovariedad Paratyphi A (usando la abreviatura "Typhi A") (SEQ ID NO:48) y serovariedad Typhi cepa Ty2 (SEQ ID NO:49). Las Figuras 10E-10H muestran el alineamiento de los loci *fliD-fliS* cromosómicos como entre *Salmonella* Enteritidis (SEQ ID NO:50) y *Salmonella* Typhimurium (SEQ ID NO:47).

60 Descripción detallada de la invención

A. Cepas de *S. Paratyphi A* atenuadas

65 En el presente documento se desvela una cepa de *S. Paratyphi A* atenuada. En el presente documento, se desvela que tales cepas de *S. Paratyphi A* atenuadas pueden usarse para inducir una respuesta inmunitaria en un sujeto sin causar enfermedad en el sujeto.

La cepa de *S. Paratyphi A* usadas como material de partida de la presente invención pueden ser cualquier cepa de *S. Paratyphi A* y la identidad de la cepa no es crítica. Cepas de *S. Paratyphi A* preferidas incluyen la cepa 9150 de *S. Paratyphi A* cepa.

5 Las cepas de *S. Paratyphi A* para su uso en la presente invención están atenuadas. Como se usa en el presente documento, cepas atenuadas de *S. Paratyphi A* son aquellas que tienen una capacidad reducida, disminuida o suprimida para producir enfermedad en un sujeto, o aquellas que carecen completamente de la capacidad de causar enfermedad en un sujeto. Las cepas atenuadas pueden presentar expresión reducida o ninguna expresión de uno o más genes, pueden expresar una o más proteínas con actividad reducida o ninguna, 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.

15 Además de las cepas de *S. Paratyphi A* atenuadas para su uso en la presente invención, cepas atenuadas de otros patógenos entéricos (por ejemplo, *Salmonella* Typhi, *Salmonella* Paratyphi B, *Shigella*, *Vibrio cholerae*), comensales (por ejemplo, *Lactobacillus*, *Streptococcus gordonii*) y cepas de vacunas autorizadas (por ejemplo, BCG) también se desvelan en el presente documento. Estas cepas adicionales tienen todas las mutaciones atenuantes de las cepas de *S. Paratyphi A* para su uso en la presente invención, pueden transformarse con el sistema de expresión en plásmidos estabilizado como se desvela en el presente documento, y pueden usarse como una composición inmunizante como se describe en el presente documento.

20 En el presente documento, se desvela que las cepas de *S. Paratyphi A* atenuadas para su uso en la presente invención tienen una mutación en uno o más de los loci *guaBA*, el gen *guaB*, el gen *guaA*, el gen *clpP* y el gen *clpX* de *S. Paratyphi*. Las cepas de *S. Paratyphi A* atenuadas para su uso en 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*, el gen *clpP* y el gen *clpX*, (vi) en el gen *guaA*, el gen *clpP* y el gen *clpX*, (vii) en el gen *guaB*, el gen *guaA*, el gen *clpP* y el gen *clpX*, o (viii) en los loci *guaBA*, el gen *clpP* y el gen *clpX*.

30 Las mutaciones de los loci y genes descritos en el presente documento pueden ser cualquier mutación, tal como una o más deleciones, inserciones o sustituciones de ácidos nucleicos. Las mutaciones pueden ser cualquier deleción, inserción o sustitución de los loci o genes que produzca una reducción o ausencia de expresión de los loci o genes, o una reducción o ausencia de actividad de un polipéptido codificado por los loci o genes. Las mutaciones pueden estar en las regiones codificantes o no codificantes de los loci o genes.

35 Preferentemente, en la presente invención, el genoma cromosómico de la cepa de *S. Paratyphi A* se modifica eliminando o modificando de otro modo los loci *guaBA*, y así bloqueando la biosíntesis *de novo* de nucleótidos de guanina. Más preferentemente, una mutación en los loci *guaBA* inactiva las enzimas de la vía metabólica de purina IMP deshidrogenasa (codificada por *guaB*) y GMP sintetasa (codificada por *guaA*). Como consecuencia de estas mutaciones, *S. Paratyphi A* son incapaces de sintetizar *de novo* GMP, y por consiguiente nucleótidos GDP y GTP, que limita gravemente el crecimiento bacteriano en tejidos de mamífero. *In vitro*, los mutantes de *S. Paratyphi A* Δ *guaBA* para su uso en la presente invención son incapaces de crecer en medio mínimo, a menos que se complementen con guanina. En cultivo de tejido, se encontró que los mutantes de *S. Paratyphi A* Δ *guaBA* para su uso en la presente invención mostraban una reducción significativa en su capacidad para invasión. Los mutantes de *S. Paratyphi A* Δ *guaBA* pueden secuestrar nucleótidos de guanina de los tejidos del hospedador mamífero. Sin embargo, su asimilación en *S. Paratyphi A* requiere desfosforilación previa a nucleósidos por nucleotidasas periplásmicas que van a incorporarse como precursores de nucleótidos en la vía de rescate de guanina. Por tanto, como los nucleótidos están fácilmente disponibles en el entorno intracelular del hospedador mamífero, la atenuación debida a la síntesis *de novo* de nucleótidos de guanina es debida o bien a la ineficiencia de la vía de rescate o a motivos que son desconocidos para el conocimiento actual.

50 El gen *guaA* de *S. Paratyphi A* 9150, que codifica GMP sintetasa, tiene 1578 pb de tamaño (SEQ ID NO:36), y es 98 % homólogo al gen *guaA* de *S. Typhi* Ty2 como se ha determinado por comparación de nucleótidos con NCBI BLAST. Pueden producirse mutantes de deleción eliminando porciones de la región codificante del gen *guaA* de *S. Paratyphi A* de manera que se prevenga el apropiado plegamiento o actividad de GUA. Por ejemplo, pueden ser delecionados aproximadamente 25 a aproximadamente 1500 pb, aproximadamente 75 a aproximadamente 1400 pb, aproximadamente 100 a aproximadamente 1300 pb, o toda la región codificante. Alternativamente, los mutantes de deleción pueden producirse eliminando, por ejemplo, un fragmento de 1 a 100 pb del gen *guaA* de *S. Paratyphi A* de manera que se desplace el marco de lectura apropiado del gen. En el último caso, puede producirse un polipéptido de terminación o la síntesis de polipéptidos puede ser abortada debido a un codón de terminación inducido por desplazamiento del marco. El tamaño preferido de la deleción es aproximadamente 75 a 750 pb. También pueden hacerse deleciones que se extienden más allá del gen *guaA*, es decir, deleciones en los elementos que controlan la traducción del gen *guaA*, tal como en un sitio de unión a ribosoma.

65 El gen *guaB* de *S. Paratyphi A* 9150, que codifica IMP deshidrogenasa, tiene 1467 pb de tamaño (SEQ ID NO:35), y es 98 % homólogo al gen *guaB* de *S. Typhi* Ty2 como se ha determinado por comparación de nucleótidos con NCBI BLAST. Pueden producirse mutantes de deleción eliminando porciones de la región codificante del gen *guaB* de *S.*

Paratyphi A de manera que se prevenga el apropiado plegamiento o actividad de GuaB. Por ejemplo, pueden ser deletados aproximadamente 25 a aproximadamente 1400 pb, aproximadamente 75 a aproximadamente 1300 pb, aproximadamente 100 a aproximadamente 1200 pb, o toda la región codificante. Alternativamente, pueden producirse mutantes de delección eliminando, por ejemplo, un fragmento de 1 a 100 pb del gen *guaB* de S. Paratyphi A de manera que se desplace el marco de lectura apropiado del gen. En el último caso, puede producirse un polipéptido de terminación o la síntesis de polipéptidos puede ser abortada debido a un codón de terminación inducido por desplazamiento del marco. El tamaño preferido de la delección es aproximadamente 75 a 750 pb. También pueden hacerse delecciones que se extienden más allá del gen *guaB*, es decir, delecciones en los elementos que controlan la traducción del gen *guaB*, tal como en un promotor.

El gen *clpP* de S. Paratyphi A 9150, que codifica una serina-proteasa, tiene 624 pb de tamaño (SEQ ID NO:37), y es 99 % homólogo al gen *clpP* de S. Typhi Ty2 como se ha determinado por comparación de nucleótidos con NCBI BLAST. Pueden producirse mutantes de delección eliminando porciones de la región codificante del gen *clpP* de S. Paratyphi A de manera que se prevenga el apropiado plegamiento o actividad de ClpP. Por ejemplo, pueden ser deletados aproximadamente 25 a aproximadamente 600 pb, aproximadamente 75 a aproximadamente 500 pb, aproximadamente 100 a aproximadamente 400 pb, o toda la región codificante. Alternativamente, pueden producirse mutantes de delección eliminando, por ejemplo, un fragmento de 1 a 100 pb del gen *clpP* de S. Paratyphi A de manera que se desplace el marco de lectura apropiado del gen. En el último caso, puede producirse un polipéptido de terminación o la síntesis de polipéptidos puede ser abortada debido a un codón de terminación inducido por desplazamiento del marco. El tamaño preferido de la delección es aproximadamente 25 a 600 pb. También pueden hacerse delecciones que se extienden más allá del gen *clpP*, es decir, delecciones en los elementos que controlan la traducción del gen *clpP*, tal como en un promotor.

El gen *clpX* de S. Paratyphi A 9150, que codifica una chaperona ATPasa, tiene 1272 pb de tamaño (SEQ ID NO:38), y es 99 % homólogo al gen *clpX* de S. Typhi Ty2 como se ha determinado por comparación de nucleótidos con NCBI BLAST. Pueden producirse mutantes de delección eliminando porciones de la región codificante del gen *clpX* de S. Paratyphi A de manera que se prevenga el apropiado plegamiento o actividad de ClpX. Por ejemplo, pueden ser deletados aproximadamente 25 a aproximadamente 1200 pb, aproximadamente 75 a aproximadamente 1100 pb, aproximadamente 100 a aproximadamente 1000 pb, o toda la región codificante. Alternativamente, pueden producirse mutantes de delección eliminando, por ejemplo, un fragmento de 1 a 100 pb del gen *clpX* de S. Paratyphi A de manera que se desplace el marco de lectura apropiado del gen. En el último caso, puede producirse un polipéptido de terminación o la síntesis de polipéptidos puede ser abortada debido a un codón de terminación inducido por desplazamiento del marco. El tamaño preferido de la delección es aproximadamente 75 a 750 pb. También pueden hacerse delecciones que se extienden más allá del gen *clpX*, es decir, delecciones en los elementos que controlan la transcripción del gen *clpX*, tal como en un promotor.

Pueden hacerse delecciones en cualquiera de los loci o genes incluidos en el presente documento usando sitios de restricción convenientes localizados dentro de los loci o genes, o por mutagénesis dirigida al sitio con oligonucleótidos (Sambrook et al, en: Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Eds., Cold Spring Harbor Publications (1989)).

La inactivación de los loci o genes también puede llevarse a cabo por una inserción de ADN foráneo usando cualquier sitio de restricción conveniente, o por mutagénesis dirigida al sitio con oligonucleótidos (Sambrook et al, arriba), de manera que se interrumpa la correcta transcripción de los loci o genes. El tamaño típico de una inserción que puede inactivar los loci o genes es de 1 par de bases a 100 kbp, aunque se prefieren inserciones más pequeñas de 100 kbp. La inserción puede hacerse en cualquier parte dentro de los loci o regiones codificantes de genes o entre las regiones codificantes y los promotores.

Otros métodos para la inactivación de los loci y genes incluyen la transferencia en *Salmonella* de delecciones o inserciones hechas en otros loci *guaBA* de enterobacteriae, genes *guaA*, *guaB*, *clpP* o *clpX*, delecciones generadas por transposones, y escisión imprecisa de inserciones de ADN.

Preferentemente, los loci y genes bacterianos se mutan usando mutagénesis mediada por Lambda red (Datsenko y Wanner, PNAS USA 97:6640-6645 (2000)). Brevemente, en la etapa 1, las bacterias hospedadoras dirigidas para 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. La mutagénesis cromosómica de una secuencia diana se lleva a cabo por electroporación del hospedador con ADN lineal en la que el gen diana se sustituye por un marcador de resistencia a antibióticos. Este ADN también codifica regiones cortas de secuencias cromosómicas flanqueantes para permitir la integración cromosómica del marcador de resistencia por recombinación homóloga mediada por λ Red. Los recombinantes se seleccionan sobre medios sólidos que contienen el antibiótico apropiado, y se incuban a una temperatura que facilita la pérdida del plásmido que codifica λ Red recombinasa. Para la etapa 2, la eliminación del marcador de resistencia cromosómico se facilita transformando las bacterias con un plásmido sensible a la temperatura que codifica FLP recombinasa, que se dirige a secuencias únicas dentro del marcador de resistencia antibiótico ahora presente en el cromosoma hospedador. Se cultivan transformantes a temperaturas permisivas para la presencia de la FLP recombinasa que se expresa constitutivamente. Se criban

mutantes mediante PCR, se cultivan a una temperatura para facilitar la pérdida del plásmido que codifica FLP recombinasa, y se seleccionan para el almacenamiento.

Las cepas de *S. Paratyphi A* atenuadas para su uso en la presente invención pueden contener mutaciones en uno o más genes adicionales. Aunque se proporciona una amplia discusión de mutaciones atenuantes adicionales de *Salmonella* spp. en la patente de EE.UU. N.º 6.682.729, genes a modo de ejemplo incluyen aquellos que codifican diversas vías bioquímicas, sistemas reguladores globales, proteínas de choque térmico, otros genes reguladores y supuestas propiedades de virulencia. Ejemplos específicos de tales mutaciones atenuantes incluyen, pero no se limitan a: (i) mutaciones auxotróficas, tales como mutaciones *aro*, *gua*, *nad*, *thy* y *asd*; (ii) mutaciones que inactivan funciones reguladoras globales, tales como mutaciones *cya*, *crp*, *phoP/phoQ*, *phoP^c* y *ompR*; (iii) mutaciones que modifican la respuesta de estrés, tales como mutaciones *recA*, *htrA*, *htpR*, *hsp* y *groEL*; (iv) mutaciones en factores de virulencia específicos, tales como *pag* y *prg*; (v) mutaciones que afectan la topología de ADN, tales como mutaciones *topA*; (vi) mutaciones que bloquean la biogénesis de polisacáridos de superficie, tales como mutaciones *rfa*, *galE* y *via*; (vii) mutaciones que modifican sistemas suicida, tales como mutaciones *sacB*, *nuc*, *hok*, *gef*, *kil* y *phlA*; (viii) mutaciones que introducen sistemas suicidas, tales como lisógenos codificados por *P22*, λ mureína transglicosilasa y gen *S*; y (ix) mutaciones que alteran o modifican el correcto ciclo celular, tales como mutaciones *minB*.

B. Sistema de plásmidos de expresión estabilizados

Las cepas de *S. Paratyphi A* atenuadas para su uso en la presente invención incluyen aquellas cepas manipuladas para expresar polipéptidos seleccionados (antígenos). Tales cepas de *S. Paratyphi A* atenuadas pueden usarse para inducir una respuesta inmunitaria a la propia *S. Paratyphi*, o para inducir una respuesta inmunitaria a los antígenos seleccionados expresados por las cepas de *S. Paratyphi A* atenuadas, o ambos.

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

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

El sistema de plásmidos de expresión estabilizados optimiza el mantenimiento del vector de expresión en las bacterias en dos niveles independientes: (1) eliminando la única dependencia sobre los sistemas de mantenimiento letales equilibrados; y (2) incorporando un sistema de reparto de plásmidos para prevenir la segregación al azar de vectores de expresión, potenciando así su herencia y estabilidad.

El PMS incluye (a) un origen de replicación, (b) al menos una función de destrucción post-segregacional, y (c) al menos una función de reparto. Cada uno de los elementos indicados del PMS puede ser un casete individual del sistema de plásmidos de expresión estabilizados. Cada uno de los casetes puede comprender sitios de escisión de enzimas de restricción únicos localizados en los extremos 5' y 3' de los casetes.

Sistemas de plásmidos de expresión estabilizados preferidos son aquellos descritos en la publicación de solicitud de patente de EE.UU. en trámite número US 2007/0281348.

1. Origen de replicación

El PMS incluye un origen de replicación de número de copias restringido que limita el vector de expresión a un intervalo de copias de plásmido por célula. Debido a grados variables de toxicidad asociados a diferentes antígenos seleccionados (por ejemplo, toxicidad más alta para antígenos derivados de organismos parasíticos tales como *Plasmodium falciparum* frente a prácticamente ninguna toxicidad para el fragmento C de la toxina tetánica), el sistema de plásmidos de expresión estabilizados de la presente invención se basa en vector de expresión de o bien un número bajo o bien medio de copias (plásmido). Se apreciará por un experto en la materia que la selección de un origen de replicación dependerá del grado de toxicidad, es decir, el número de copias debe disminuir a medida que aumenta la toxicidad a la cepa bacteriana.

Es preferible que el origen de replicación confiera un número de copias promedio que está 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 incluidos en el presente documento se derivan del plásmido de *E. coli* pAT153 (*oriE1*, ~60 copias por equivalente cromosómico), el plásmido de *E. coli* pACYC184 (*ori15A*, ~15 copias por equivalente cromosómico) y el plásmido de *Salmonella typhimurium* pSC101 (*ori101*, ~5 copias por equivalente cromosómico). La organización estructural de los casetes de orígenes de replicación manipulados para pSC101, pACYC184 y pAT153 son análogos en estructura y función.

Los orígenes de replicación para su uso en la presente invención incluyen tanto orígenes de replicación que existen de forma natural, además de orígenes de replicación codificados por secuencias de nucleótidos que son

sustancialmente homólogas a secuencias de nucleótidos que codifican orígenes de replicación que existen de forma natural, y que retienen la función presentada por los orígenes de replicación que existen de forma natural.

5 En realizaciones preferidas, la secuencia de nucleótidos que codifica el origen de replicación es una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste 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.

10 En una realización preferida adicional, el origen de replicación es el locus *oriE1* de pSC101, que confiere un número de copias de aproximadamente 5 copias por equivalente de genoma, expuesto en SEQ ID NO:28.

2. Función de reparto

15 El PMS también incluye una función de reparto, también conocida en la técnica y en el presente documento como un "sistema segregante" y un "sistema de reparto". La función de reparto es cualquier función que potencie la estabilidad del plásmido que opera para aumentar la frecuencia de administración satisfactoria de un plásmido a cada célula bacteriana recientemente dividida, en comparación con la frecuencia de administración de un plásmido correspondiente sin una función tal. Los sistemas de reparto incluyen, por ejemplo, sistemas de equi-reparto, sistemas de reparto de sitio par y los sistemas proporcionados en la Tabla 1 del Capítulo 5, Partition Systems of Bacterial Plasmids. B.E. Funnell and R.A. Slavcev. En Plasmid Biology. 2004. BE Funnell and GJ Phillips, eds. ASM Press, Washington, DC.

25 Los sistemas de reparto para su uso en la presente invención incluyen tanto sistemas de reparto que existen de forma natural, además de sistemas de reparto codificados por secuencias de nucleótidos que son sustancialmente homólogas a secuencias de nucleótidos que codifican sistemas de reparto que existen de forma natural, y que retienen la función presentada por los sistemas de reparto que existen de forma natural.

Funciones de reparto a modo de ejemplo incluyen, sin limitación, sistemas de pSC101, el factor F, el profago P1, y plásmidos de resistencia al fármaco IncFII.

30 En particular, puede usarse el locus de reparto pasivo para *par*. La función del locus *par* parece estar relacionada con el aumento del superenrollamiento de plásmidos en el origen de replicación, que también es el sitio de unión para ADN girasa. Una secuencia de *par* a modo de ejemplo es la de *E. coli*, expuesta en SEQ ID NO:32 (Miller et al. Nucleotide sequence of the partition locus of Escherichia coli plasmid pSC101, Gene 24:309-15 (1983); N.º de acceso de GenBank X01654, nucleótidos 4524 - 4890).

35 También pueden usarse el locus *parA* de reparto activo. Una secuencia de locus *parA* a modo de ejemplo se expone en SEQ ID NO:31.

3. Función de destrucción post-segregacional

40 El PMS incluye además al menos una función de destrucción post-segregacional (PSK). La función PSK es una función que produce la muerte de cualquier célula bacteriana recientemente dividida que no hereda el plásmido de interés, y específicamente incluye sistemas letales equilibrados tales como *asd* o *ssb*, sistemas proteicos tales como *phd-doc*, y sistemas antisentido tales como *hok-sok*.

45 La función PSK para su uso en la presente invención incluye tanto funciones PSK que existen de forma natural, además de funciones PSK codificadas por secuencias de nucleótidos que son sustancialmente homólogas a secuencias de nucleótidos que codifican funciones PSK que existen de forma natural, y que retienen la función presentada por las funciones PSK que existen de forma natural.

50 En realizaciones preferidas, la función PSK es el sistema letal equilibrado *ssb*. La proteína de unión monocatenaria (SSB) de *S. Typhi* se usa para trans-complementar una mutación por lo demás letal introducida en el gen cromosómico *ssb*. Las funciones bioquímicas y metabólicas de la proteína SSB de *E. coli* han sido ampliamente revisadas en Lohman et al., Annual Reviews in Biochemistry 63:527, 1994 y Chase et al., Annual Reviews in Biochemistry 55:103, 1986.

55 En las cepas de *S. Paratyphi A* para su uso en la presente invención que comprenden un sistema de plásmidos de expresión estabilizados en las que la función PSK es el sistema letal equilibrado *ssb*, está inactivado el locus *ssb* nativo de las bacterias. El locus *ssb* nativo puede inactivarse mediante cualquier medio conocido en la técnica, tal como un vector suicida que comprende un origen de replicación sensible a la temperatura o mutagénesis mediada por Lambda Red (Datsenko y Wanner, PNAS USA 97:6640-6645 (2000)). En un aspecto preferido, se usa mutagénesis mediada por Lambda Red para inactivar el locus *ssb* de las cepas de *S. Paratyphi A* atenuadas de la presente invención.

65 En otro aspecto de la invención, la función PSK es el locus *ssb* donde tanto los promotores del gen *ssb* inducibles como constitutivos se usan como los promotores de la función PSK de *ssb*. En una realización preferida, la función

PSK comprende un promotor inducible *ssb*, un promotor constitutivo *ssb* y una región codificante *ssb*. Preferentemente, el locus *ssb* es el locus *ssb* de una cualquiera de *Shigella flexneri*, *Salmonella Typhi* y *E. coli*. En una realización, el locus *ssb* es el locus *ssb* de *S. flexneri* 2a cepa CVD 1208s expuesto en SEQ ID NO:34.

5 En un aspecto relacionado de la invención, alelos mutados tales como *ssb-1* (o cualquier mutación funcionalmente equivalente a este alelo, tal como W54S; Carlini et al. Mol. Microbiol. 10:1067-1075 (1993)) pueden incorporarse en el sistema de plásmidos de expresión estabilizados para potenciar plásmidos de número de copias más altos por expresión en exceso de proteínas similares a SSB1 para formar los tetrámeros biológicamente activos requeridos de SSB.

10

En una realización adicional, el PMS comprende dos funciones PSK.

4. Antígeno seleccionado

15 El sistema de plásmidos de expresión estabilizados también comprende un polinucleótido que codifica antígeno seleccionado bajo el control de un promotor.

El promotor es preferentemente un promotor ambientalmente regulable, controlado por una señal biológicamente relevante tal como osmolaridad. En una realización preferida, el promotor es el promotor *ompC*. El gen *ompC* codifica una proteína de porina que se inserta como un trímero en la membrana externa de una célula bacteriana. La expresión y control de *ompC* ha sido revisada en detalle considerable en Pratt et al., Molecular Microbiology 20:911, 1996 y Egger et al., Genes to Cells 2:167, 1997. En una realización preferida, el fragmento del promotor *ompC* de *E. coli* se expone en SEQ ID NO:33. Véase la patente de EE.UU. N.º: 6.703.233. La transcripción de este casete puede ser terminada en la región distal 3' por un terminador transcripcional *trpA*.

20

25 En un aspecto, el promotor inducible es el promotor P_{ompC1} mutado, o P_{ompC3} . El promotor puede usarse para controlar exclusivamente la transcripción del antígeno seleccionado en la dirección 3'.

30 La invención engloba la expresión de cualquier antígeno que no destruye la cepa de *S. Paratyphi* A atenuada que la expresa, y que provoca una respuesta inmunitaria cuando la cepa de *S. Paratyphi* A atenuada que expresa el antígeno se administra al sujeto. Los antígenos seleccionados pueden ser homólogos (de *S. Paratyphi* A) o heterólogos.

35 Ejemplos no limitantes del antígeno seleccionado incluyen: antígeno de toxina 1 Shiga (Stx1), antígeno de toxina 2 Shiga (Stx2), hepatitis B, *Haemophilus influenzae* tipo b, hepatitis A, pertussis acelular (_{ac}P), varicela, rotavirus, *Streptococcus pneumoniae* (neumocócico) y *Neisseria meningitidis* (meningocócica). Véase Ellis et al., Advances in Pharm., 39: 393423, 1997. Donde el antígeno es un antígeno de toxina 2 Shiga, el antígeno de toxina 2 Shiga puede ser, por ejemplo, o bien un pentámero de subunidad B o bien una Stx 2 genéticamente desintoxicada. Antígenos adicionales de relevancia para la biodefensa incluyen: 1) uno o más dominios del resto del antígeno protector PA83 de la toxina del carbunco, que incluyen, pero no se limitan a, dominio 4 (el dominio de unión a células eucariotas; D4), la forma biológicamente activa de 63 kDa procesada de PA83, o PA83 de longitud completa; y 2) antígenos de *Clostridium botulinum* que comprenden el fragmento de cadena pesada de unión a células eucariotas de cualquier serotipo de neurotoxina A, B, C, D, E, F o G, en cualquier combinación. Otros antígenos seleccionados incluyen cada uno de los desvelados en la patente de EE.UU. N.º 6.190.669.

40

45 En un aspecto, el antígeno seleccionado es un antígeno que indujo una respuesta inmunitaria al cáncer. En otro aspecto, el antígeno seleccionado se diseña para provocar una respuesta inmunitaria a autoantígenos, receptores de linfocitos B y/o receptores de linfocitos T que participan en enfermedades autoinmunitarias o inmunológicas. Por ejemplo, donde se producen respuestas inmunitarias inapropiadas contra tejidos del cuerpo o antígenos ambientales, las composiciones de inmunización de la presente invención pueden usarse para inducir una respuesta inmunitaria a los autoantígenos, receptores de linfocitos B y/o receptores de linfocitos T para modular las respuestas y mejorar las enfermedades. Por ejemplo, tales técnicas pueden ser eficaces en el tratamiento de miastenia grave, lupus eritematoso, artritis reumatoide, esclerosis múltiple, alergias y asma.

50 En otro aspecto de la presente invención, el sistema de plásmidos de expresión estabilizados puede incluir un polinucleótido que codifica un marcador de selección, o un marcador sensible a la temperatura, tal como marcador de resistencia a fármaco. Un ejemplo no limitante de un marcador de resistencia a fármaco incluye *aph*, que se conoce en la técnica por conferir resistencia a los aminoglucósidos kanamicina y/o neomicina.

55 El término "sustancialmente homóloga" u "homóloga sustancial", en referencia a una secuencia de nucleótidos o secuencia de aminoácidos en el presente documento, indica que la secuencia de ácidos nucleicos o secuencia de aminoácidos tiene homología suficiente en comparación con una secuencia de referencia (por ejemplo, una secuencia nativa o que existe de forma natural) para permitir que la secuencia realice la misma función básica que la secuencia de referencia correspondiente; una secuencia sustancialmente homóloga normalmente tiene al menos aproximadamente el 70 por ciento de secuencias idénticas en comparación con la secuencia de referencia, normalmente al menos aproximadamente el 85 por ciento de secuencias idénticas, preferentemente al menos

60

65

aproximadamente el 90 o 95 por ciento de secuencias idénticas, y lo más preferentemente aproximadamente el 96, 97, 98 o el 99 por ciento de secuencias idénticas, en comparación con la secuencia de referencia. Se apreciará que en toda la memoria descriptiva, donde se hace referencia a secuencias de nucleótidos y/o secuencias de aminoácidos específicas, que tales secuencias de nucleótidos y/o secuencias de aminoácidos pueden sustituirse por secuencias sustancialmente homólogas.

C. Métodos de inducción de una respuesta inmunitaria

En el presente documento se desvelan métodos de inducción de una respuesta inmunitaria en un sujeto. La respuesta inmunitaria puede ser a la propia cepa de *S. Paratyphi A* atenuada, un antígeno seleccionado expresado por una cepa de *S. Paratyphi A* atenuada transformada con un sistema de plásmidos de expresión estabilizados, o ambos.

En el presente documento se desvela que el método de inducción de una respuesta inmunitaria comprende administrar una o más de las cepas desveladas en el presente documento a un sujeto en una cantidad suficiente para inducir una respuesta inmunitaria en el sujeto. Como se usa en el presente documento, la cepa incluye tanto cepas no transformadas como transformadas de *S. Paratyphi A* atenuadas.

En el presente documento se desvela que el método de inducción de una respuesta inmunitaria comprende administrar una formulación farmacéutica que comprende una o más de las cepas como se desvela en el presente documento a un sujeto en una cantidad suficiente para inducir una respuesta inmunitaria en el sujeto (una cantidad inmunológicamente eficaz).

Por comodidad, las cepas como se desvelan en el presente documento y las formulaciones farmacéuticas que comprenden las cepas se denominan en el presente documento "composiciones inmunizantes". El experto apreciará que las composiciones inmunizantes son sinónimo de vacunas.

Como se usa en el presente documento, una "respuesta inmunitaria" es la respuesta fisiológica del sistema inmunitario del sujeto a la composición inmunizante. Una respuesta inmunitaria puede incluir una respuesta inmunitaria innata, una respuesta inmunitaria adaptativa, o ambas.

En el presente documento se desvela que la respuesta inmunitaria es una respuesta inmunitaria protectora. Una respuesta inmunitaria protectora confiere memoria celular inmunológica al sujeto, con el efecto que una exposición secundaria al mismo antígeno o similar se caracteriza 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 exposición previa a la composición inmunizante; producción de anticuerpo que continúa durante un periodo más largo que la producción de anticuerpo resultante de la exposición al antígeno seleccionado en ausencia de exposición previa a la composición inmunizante; un cambio en el tipo y la calidad de anticuerpo producido en comparación con el tipo y la calidad de anticuerpo producido tras la exposición al antígeno seleccionado en ausencia de exposición previa a la composición inmunizante; un desplazamiento en la respuesta de clase, apareciendo los anticuerpos IgG en concentraciones más altas y con mayor persistencia que IgM, que se produce en respuesta a exposición al antígeno seleccionado en ausencia de exposición previa a la composición inmunizante; un aumento de la afinidad promedio (constante de unión) de los anticuerpos para el antígeno en comparación con la afinidad promedio de anticuerpos para el antígeno resultante de la exposición al antígeno seleccionado en ausencia de exposición previa a la composición inmunizante; y/u otras características conocidas en la técnica para caracterizar una respuesta inmunitaria secundaria.

El sujeto al que pueden administrarse las composiciones inmunizantes es preferentemente un ser humano, pero también puede ser otro mamífero tal como un simio, perro, gato, caballo, vaca o cerdo, o un ave, tal como un pollo.

En el presente documento se desvela que el sujeto es un sujeto en riesgo de desarrollar una infección por *S. Paratyphi A*. En el presente documento se desvela que el sujeto está inmunológicamente intacto o, alternativamente, presenta inmunidad preexistente a infección por *S. Typhi* o infección por *S. Paratyphi A*.

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

D. Formulaciones, dosificaciones y modos de administración

Las cepas atenuadas desveladas en el presente documento, tanto aquellas no transformadas como transformadas con un sistema de plásmidos de expresión estabilizados, pueden administrarse a un sujeto para inducir una respuesta inmunitaria. Las cepas desveladas en el presente documento se administran en una formulación farmacéutica.

Las formulaciones farmacéuticas desveladas en el presente documento pueden incluir vehículos farmacéuticamente aceptables, excipientes, otros componentes, tales como adyuvantes. Vehículos farmacéuticamente aceptables,

excipientes, otros componentes son aquellos compuestos, soluciones, sustancias o materiales que son compatibles con las cepas y no son excesivamente perjudiciales para el receptor de las mismas. En particular, vehículos, excipientes, otros componentes, son aquellos útiles en la preparación de una formulación farmacéutica que es generalmente segura, no tóxica y ni biológicamente ni de otro modo no deseable, y que pueden presentar perfiles farmacológicamente favorables, e incluyen vehículos, excipientes, otros componentes que son aceptables para uso veterinario, además de uso farmacéutico humano.

Los vehículos y excipientes farmacéuticamente aceptables adecuados son muy conocidos en la técnica y pueden ser determinados por aquellos expertos en la materia como garantiza la situación clínica. El experto entenderá que los diluyentes están incluidos dentro del alcance de los términos vehículos y excipientes. Ejemplos de vehículos y excipientes adecuados incluyen solución salina, solución salina tamponada, dextrosa, agua, glicerol, etanol, más particularmente: (1) solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco, pH aproximadamente 7,4, que contiene aproximadamente 1 mg/ml a 25 mg/ml de albúmina de suero humano, (2) solución salina al 0,9 % (0,9 % en peso/volumen de NaCl), (3) 5 % (peso/volumen) de dextrosa, y (4) agua.

El modo de administración de las composiciones inmunizantes desveladas en el presente documento puede ser cualquier medio de administración adecuado y/o métodos que producen la inducción de una respuesta inmunitaria en el sujeto. Los medios de administración pueden incluir, sin limitación, métodos de administración parenteral, tales como inyección subcutánea (SC), inyección intravenosa (IV), transdérmica, intramuscular (IM), intradérmica (ID), además de administración no parenteral, por ejemplo, oral, nasal, intravaginal, pulmonar (inhalación), oftálmica, rectal, o por cualquier otro modo que haga que la composición inmunogénica se ponga en contacto con los tejidos de la mucosa. En el presente documento se desvela que la administración es por vía oral.

En el presente documento se desvela que las composiciones inmunizantes existen como una dispersión atomizada para administración por inhalación. Pueden prepararse diversos líquidos y formulaciones en polvo por métodos convencionales para inhalación en los pulmones del sujeto que van a tratarse. La dispersión atomizada de las composiciones inmunizantes normalmente contiene vehículos comunes para dispersiones atomizadas o aerosolizadas, tales como solución salina tamponada y/u otros compuestos muy conocidos para aquellos expertos en la materia. La administración de las composiciones inmunogénicas mediante inhalación tiene el efecto de dispersar rápidamente las composiciones inmunizantes a una gran área de tejidos de la mucosa, además de la rápida absorción por la sangre para la circulación de las composiciones inmunizantes.

Adicionalmente, las composiciones inmunizantes desveladas en el presente documento también existen en una forma líquida. El líquido puede ser para dosificación oral, para dosificación oftálmica o nasal como gotas, o para su uso como un enema o irrigador vaginal. Cuando la composición inmunizante se formula como un líquido, el líquido puede ser o bien una solución o bien una suspensión de la composición inmunizante. Hay una variedad de formulaciones adecuadas para la solución o suspensión de la composición inmunizante que son muy conocidas para aquellos expertos en la materia, dependiendo del uso previsto de las mismas. Formulaciones líquidas para administración por vía oral preparadas en agua u otros vehículos acuosos pueden contener diversos agentes de suspensión tales como metilcelulosa, alginatos, tragacanto, pectina, kelgin, carragenina, goma arábiga, polivinilpirrolidona y poli(alcohol vinílico). Las formulaciones líquidas también pueden incluir soluciones, emulsiones, jarabes y elixires que contienen, junto con las composiciones inmunizantes, agentes humectantes, edulcorantes, y agentes colorantes y aromatizantes.

La administración de las composiciones inmunizantes descritas en forma líquida mediante dosificación oral expone la mucosa del tubo gastrointestinal y el aparato genitourinario a las composiciones inmunizantes. Una dosis adecuada, estabilizada para resistir a los pH extremos del estómago, administra la composición inmunizante a todas las partes del tubo gastrointestinal, especialmente las porciones superiores del mismo. Cualquier método de estabilización de la composición inmunizante en una dosificación oral líquida de forma que la administración eficaz de la composición se distribuya a lo largo del tubo gastrointestinal se contempla para su uso con las composiciones inmunizantes descritas en el presente documento, que incluyen cápsulas y una solución resuspendida de tampón para proteger las bacterias atenuadas contra el pH ácido. Los vehículos o diluyentes farmacéuticamente aceptables particulares empleados no son críticos para la presente invención, y son convencionales en la materia. Ejemplos de diluyentes incluyen: tampones para tamponar contra ácido gástrico en el estómago, tales como tampón citrato (pH 7,0) que contiene sacarosa, tampón bicarbonato (pH 7,0) solo o tampón bicarbonato (pH 7,0) que contiene ácido ascórbico, lactosa, y opcionalmente aspartamo (Levine et al, Lancet, II:467-470 (1988)). Ejemplos de vehículos incluyen: proteínas, por ejemplo, como se encuentran en la leche desnatada; azúcares, por ejemplo, sacarosa; o polivinilpirrolidona.

La administración de las composiciones inmunizantes descritas en forma líquida mediante gotas oftálmicas expone la mucosa de los ojos y tejidos asociados a las composiciones inmunizantes. Un vehículo líquido típico para colirios se tampona y contiene otros compuestos muy conocidos y fácilmente identificables para aquellos expertos en la materia.

La administración de las composiciones inmunizantes descritas en forma líquida mediante gotas nasales o aerosol expone la mucosa de la nariz y senos y tejidos asociados a las composiciones inmunizantes. Vehículos líquidos para gotas nasales normalmente son diversas formas de solución salina tamponada.

5 Formulaciones inyectables de las composiciones inmunizantes 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. Excipientes fisiológicamente aceptables pueden incluir, por ejemplo, 5 % de dextrosa, 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 al 5% de glucosa.

10 En el presente documento se desvela que las cepas de *S. Paratyphi A* atenuadas pueden administrarse a un sujeto conjuntamente con otros agentes farmacológicamente o fisiológicamente activos adecuados, por ejemplo, sustancias antigénicas y/u otras biológicamente activas.

15 En el presente documento se desvela que las cepas de *S. Paratyphi A* atenuadas que comprenden un sistema de plásmidos de expresión estabilizados pueden administrarse a un sujeto antes de, simultáneamente con, o después de que haya empezado la expresión del antígeno seleccionado. En el presente documento se desvela que la cepa de *S. Paratyphi A* atenuada que comprende un sistema de plásmidos de expresión estabilizados puede cultivarse durante un periodo de tiempo antes de la administración a un sujeto para permitir que las bacterias produzcan cantidades suficientes del antígeno seleccionado, de forma que se produzca una respuesta inmunitaria al antígeno seleccionado tras la administración de las bacterias.

20 En el presente documento se desvela que la cantidad y tasa de administración de las composiciones inmunizantes pueden ser fácilmente determinadas por aquellos expertos habituales en la materia sin excesiva experimentación, tal como por el uso de técnicas de determinación de títulos de anticuerpos convencionales y protocolos de bioeficacia/biocompatibilidad convencionales. La cantidad y tasa de administración variarán basándose en factores tales como el peso y la salud del sujeto, la identidad de las bacterias que se administran al sujeto, la identidad del polipéptido que se expresa en aquellas cepas manipuladas para expresar un antígeno seleccionado, el efecto terapéutico deseado, el periodo de tiempo deseado de bioactividad y el modo de administración de la composición inmunizante.

25 En general, la cantidad de una composición inmunizante administrada a un sujeto es una cantidad suficiente para inducir una respuesta inmunitaria en el sujeto a una cepa de *S. Paratyphi A* o al antígeno seleccionado que se expresa por la cepa de *S. Paratyphi A* (una cantidad inmunológicamente eficaz). En el presente documento se desvela que la respuesta inmunitaria es una respuesta inmunitaria protectora.

30 En el presente documento se desvela que la dosificación empleada contendrá aproximadamente 10^2 ufc a 10^{10} ufc de la cepa de *S. Paratyphi A*, preferentemente aproximadamente 10^2 ufc a 10^7 cfu, o aproximadamente 10^6 ufc a 10^9 ufc. En el presente documento, se desvela que las formulaciones para administración por vía oral comprenden aproximadamente 10^2 ufc a 10^{10} ufc de la cepa de *S. Paratyphi A*, preferentemente aproximadamente 10^6 ufc a 10^9 ufc, y la formulación está en una cápsula o se resuspende en una solución de tampón para proteger las bacterias atenuadas contra el pH ácido en el estómago. En el presente documento se desvela que las formulaciones para administración nasal comprenden aproximadamente 10^2 ufc a 10^{10} ufc de la cepa de *S. Paratyphi A*, preferentemente aproximadamente 10^2 ufc a 10^7 ufc, y se usan para administración intranasal en el que las bacterias se administran en gotas o en aerosol.

35 En el presente documento se desvela que las composiciones inmunizantes pueden administrarse en una dosis única, o en múltiples dosis durante periodos de tiempo prolongados. En el presente documento se desvela que las composiciones inmunizantes 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 más largos de un año.

40 En el presente documento se desvela que las composiciones inmunizantes pueden proporcionarse en unidad de dosificación para dosificación uniforme y facilidad de administración. Cada forma unitaria de dosificación contiene una cantidad predeterminada de las cepas de la presente invención calculada para producir una respuesta inmunitaria deseada, en asociación con un vehículo, excipiente farmacéuticamente aceptable, u otro componente.

45 En el presente documento se desvela un kit que comprende una o más de las composiciones inmunizantes, y opcionalmente medios para administrar las composiciones, e instrucciones para administrar las composiciones.

50

55

60

E. Ejemplos

1. Cepas bacterianas y condiciones de cultivo

5 Se usó la cepa de *Escherichia coli* DH5 alfa para todas las construcciones de plásmido. La cepa de *S. Typhi* atenuada viva CVD 908-*htrA* aloja mutaciones de delección en *aroC* y *aroD*, interrumpiendo la vía de biosíntesis de compuestos aromáticos, 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 compró *S. Paratyphi A* 9150 lote N.º 11848 de la Colección Americana de Cultivos Tipo (Manassas, VA), y se guardó como CV 223 y CV 224. CV 223 se usó en
10 todos los experimentos.

Se cultivó *E. coli* DH5 alfa usando medio líquido de 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), donde fuera necesario. Se cultivaron CVD 908-*htrA* y *S. Paratyphi A* 9150 y sus derivados con 2x medio de soja (20 g de 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 donde fuera necesario. Los cultivos líquidos se incubaron a 30 °C o 37 °C a 250 rpm durante 16-24 h, a menos que se establezca de otro modo.

El medio mínimo modificado (MMM) usado 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 % (peso/volumen) de casaminoácidos (Difco), 0,5 % (peso/volumen) de glucosa, 0,01 % (peso/volumen) de MgSO₄·7H₂O, 15 g de agar granulado (Difco) por litro y 1 µg/ml de vitamina B1.

2. Plásmidos y técnicas genéticas moleculares

25 Se usaron técnicas convencionales para la construcción de los plásmidos representados aquí (véase, por ejemplo, Sambrook et al., 1989). La extracción de plásmidos y la purificación en gel de fragmentos de ADN se realizaron usando los kits QIAprep Spin Miniprep y QIAquick Gel Extraction, respectivamente, como se indicó por el fabricante (Qiagen Inc., Valencia, CA). Se usaron 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 la reacción en
30 cadena de la polimerasa (PCR) de extremos romos generados con la ADN polimerasa Vent[™] (New England Biolabs, Ipswich, MA). El plásmido pLowBlu 184 (E.M. Barry, datos sin publicar; CVD, Universidad de Maryland, Baltimore) es un plásmido de bajo número de copias basado en pACYC184 (ATCC), pero que contiene la secuencia del operón lactosa de pGEM[®]-5Zf(+) (2767 - 273 pb; Promega, Madison, WI) en lugar del gen de resistencia a tetraciclina entre *Aval* y *HindIII*. Se usó la ADN polimerasa Taq-Pro[™] (Denville Sci., Metuchen, NJ) para la mutagénesis mediada por Lambda Red, y para la PCR de diagnóstico usando 5 µl de una única colonia bacteriana diluida en 20 µl de agua estéril. También se usó la ADN polimerasa Taq-Pro[™] para añadir a fragmentos de PCR
35 pretratados generados por ADN polimerasa Vent[™] antes de la clonación en pGEM[®]-T o pGEM[®]-T Easy. Todas las enzimas de restricción se compraron de New England Biolabs. Se usó ADN polimerasa T4 (NEB) para crear fragmentos de ADN de extremos romos. La electroporación de cepas se realizó en un aparato Gene Pulser (Bio-Rad) establecido a 2,5 kV, 200 Ω y 25 µF. Los marcadores de peso molecular usados en la electroforesis en gel de ADN son el marcador de ADN O'GeneRuler[™] 1 kb, listo para usar (N.º SM1163, Fermentas, Hanover, MD).

3. Mutagénesis mediada por Lambda Red

45 Esta técnica se realizó como se describe por Datsenko y Wanner (*Proc Natl Acad Sci USA.* 2000 Jun 6;97(12):6640-50), con ciertas modificaciones. Brevemente, se añadieron 10 colonias de bacterias que llevan el plásmido cooperador Red pKD46 (el lector se remite 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 cultivado a 30 °C, 250 rpm durante 3 h (DO 600 nm de ~ 0,6). Las bacterias se hicieron electrocompetentes lavando 3 veces con agua estéril fría y concentrando 100 veces. Se sometieron a electroporación células competentes con 100 ng - 1 µg de producto de PCR purificado en gel. Tras la electroporación, las bacterias se repararon usando 2x medio de soja con o sin guanina. Las células se incubaron en 2x medio de soja a 37 °C durante 3 h antes de la siembra en 2x agar de soja que contenía guanina y cml durante la noche. Se seleccionaron colonias resistentes a antibióticos y se cribaron mediante PCR para alteraciones en las regiones cromosómicas de interés. Las colonias positivas volvieron a cultivarse en línea sobre 2x medio de soja que contenía cml, pero que carecía de carbenicilina, para garantizar la pérdida de pKD46. La eliminación del casete de resistencia a cml se realizó como se describe por Datsenko y Wanner e implicó usar pCP20. Las colonias que presentaron el genotipo deseado volvieron a cultivarse en línea en 2x medio de soja que carecía de los antibióticos para garantizar la pérdida de fenotipo de resistencia a antibióticos.
55 Aquellos seleccionados para almacenamiento volvieron a cribarse mediante PCR antes de la congelación a -70 °C en 2x medio de soja que contenía 20 % (v/v) de glicerol.

4. Aglutinación

65 Se probaron cepas de *S. Paratyphi A* con sueros comercialmente disponibles (grupo A de antisueros O para *Salmonella* Difco[™], Becton Dickinson, Sparks, MD, lote N.º 4092221). Brevemente, se emulsionó un pequeño

inóculo de bacterias tomadas de una placa nueva en 20 µl de PBS sobre un portaobjetos de vidrio. Se añadieron 5 µl de antisueros, y el portaobjetos se agitó suavemente hasta que se observó aglutinación. La cepa de vacunas de *S. flexneri* CVD 1208 (J Infect Dis. 2004 Nov 15;190(10):1745-54) o DH5 alfa de *E. coli* sirvieron de bacterias de control negativo.

5

5. Evaluación de la virulencia por inoculación intraperitoneal de ratones

Se evaluó la virulencia de *Salmonella* como se ha descrito previamente en Infect Immun. 2001 Aug;69(8):4734-41. Brevemente, se inyectaron por vía intraperitoneal (i.p.) ratones BALB/c hembra (Charles River Breeding Laboratories, Inc., Wilmington, Masa.) de 6 a 8 semanas de edad (tres ratones por grupo, tres grupos por cepa de vacuna) con diversas diluciones de 10 veces de las bacterias (cultivadas en presencia de guanina y antibióticos donde fuera necesario, y resuspendidas en solución salina tamponada con fosfato PBS) mezcladas con 10 % (peso/vol) de mucina gástrica de cerdo (Difco, lote N.º 4092018) en un volumen final de 0,5 ml. Los ratones se monitorizaron para la extrema agonía (próxima a la muerte) o muerte cada 24 h durante 72 h después de la inoculación. La dosis letal para el 50 % (DL50) para cada grupo de ratones se calculó por análisis de regresión lineal.

10

15

6. Construcción de una delección en *guaBA*.

20

La secuenciación del genoma de *S. Paratyphi A* estaba incompleta al comienzo de este proyecto. Por lo tanto, todos los cebadores de oligonucleótidos y posteriores moldes de ADN para la mutagénesis mediada por Lambda Red se construyeron basándose en la secuencia del genoma *S. Typhi* Ty2 indicada (Número de acceso de GenBank NC_004631, versión de 16 de diciembre de 2004). La comparación de secuencias de las regiones mutadas en *S. Paratyphi A* con aquellas de *S. Typhi* revelaron más del 99 % de identidad de secuencias de ADN.

25

30

Los genes que codifican inosina-5'-monofosfato deshidrogenasa (*guaB*) y guanosina monofosfato sintetasa (*guaA*) forman un operón y están localizados en 414059 a 417178 pb en el genoma de *S. Typhi* Ty2 (SEQ ID NO:26; véase también la patente de EE.UU. N.º 6.190.669 para información detallada con respecto a los loci *guaBA*). Se usaron cebadores CVOL 13 y CVOL 15 (Tabla 1) a secuencias fuera de la región designada para la mutación. Los cebadores CVOL 28 y CVOL 32 se diseñaron para unirse a regiones del plásmido molde de Lambda Red pKD3. El producto de PCR resultante codificó un cartucho de resistencia a cml flanqueado en cualquier 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.

35

Tabla 1

Nombre	Secuencia ^a	SEQ ID NO:	Diana	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	CATATGAATATCCTCCTTAG	7	pKD3	1044 - 1025
CVOL 28	CGAACCGTCTGGTTAAGGCGGCTTACGGTAAAAAT TGAGGAAGTTTGAGAGGATAACATGTGAGCGGGAT CAAATTCTAAATCAGCAGGTTATTCAATCGTGTAG GCTGGAGCTGCTTC	8	pKD3	31 - 50
CVOL 32	TTCAATGATGATGCGGTTGGAAACACGACCCAGGA AGTCATACGGCAGGTGCGCCAGTGCAGCGTCATA AAGTCGATGGTTTCGACAGCACGACAGAGCATAT GAATATCCTCCTTAG	9	pKD3	1044 - 1025
CVOL 41	GAAGGAGTATTGCCCATGCTACGTATCG	10	Ty2	414057 - 414077
CVOL 64	CATATGAAGGAGTATTGCCCATGCT ACGTATCGCTAAAGAAG	11	Ty2	414057 - 414086
CVOL 65	ATGCATCTGCAGTCATTCCCCTCAA TGGTAGCCGG	12	Ty2	417176 - 417155
CVOL 85	ACAGATAAACGCAAAGATGGCTCGGGCAAA	13	Ty2	2484865 - 2484836
CVOL 86	TTATTCGCCAGAAGCCTGCGCTTCCGGTTT	14	Ty2	2483597 - 2483626
CVOL 87	CCTGAGAATGGCATTGCGTCTGCTGTGC	15	Ty2	2484929 - 2484900
CVOL 88	ACGGCGTGTTTACAGGAAAACGAAAGGGG	16	Ty2	2483520 - 2483549
CVOL 89	TCATACAGCGGAGAACGAGATAATTTGGCC	17	Ty2	2485740 - 2485711
CVOL 90	TTACATAAGTAAGTCACTGGGAGGCGCGCT	18	Ty2	2485027 - 2485056
CVOL 91	TCCATCAGGTTACAATCAGTACAGCAGATT	19	Ty2	2485800 - 2485771
CVOL 92	TCATTAGTATATACAAAAATCATTGAGC	20	Ty2	2484961 - 2484990
CVOL 122	GCGGCCGCGAAGGAGAGACCGAAA TGTCATACAGCGGAGAACGAG	21	Ty2	2485752 - 2485722
CVOL 123	TCGCGAGAATTCTTACATAAGTAAG TCACTGGGAGGCGCGCT	22	Ty2	2485024 - 2485056
CVOL 124	GCGGCCGCGAAGGAGTTTGACTCATG ACAGATAAACGCAAAGATC	23	Ty2	2484876 - 2484847

CVOL 125	<u>CATA</u> <u>TGTTA</u> <u>TTCGCCAGAAGCC</u> <u>TGGCTTCCGGTTT</u>	24	Ty2	2483597 - 2483626
CVOL 128	<u>CGCGCCGCTTACATAAAGTAAAGT</u> <u>CACTGGGAGGCCGCGCT</u>	25	Ty2	2485024 - 2485056

a. Los cebadores se enumeran en la dirección 5' > 3' con sitios de escisión de la enzima de restricción subrayados.

b. Indica región de homología con el genoma de *S. Typhi* Ty2 (número de acceso de GenBank NC_004631) o el plásmido pKD3 (número de acceso de GenBank AY048742).

5 *S. Paratyphi* A 9150 se hizo electrocompetente y se transformó con pKD46, produciendo la cepa CV 250. Se realizó mutagénesis Lambda Red en CV 250 usando el producto de PCR generado usando 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 sembraron en placa a 37 °C, y aquellos que presentaron resistencia a *cml* se cribaron por PCR usando CVOL 13 y CVOL 15. Se encontró que *guaBA* no modificado amplificado a partir de *S. Paratyphi* A 9150 era ~ 3,5 kb (Figura 1, carril 1), mientras que se encontró un fragmento de ~1,4 kb en dos clones con una región *guaBA* mutada (Figura 1, carriles 2 y 3). Estos mutantes se llamaron CV 411 y CV 412, respectivamente. El 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 deletantes por PCR con cebadores CVOL 13 y CVOL 15 y se encontró que tenían una banda de ~ 0,5 kb (Figura 2, carriles 2 - 4) en comparación con un progenitor de *guaBA::cml* (Figura 2, carril 1). Los deletantes de *guaBA* resultantes de *S. Paratyphi* A 9150 se llamaron CV 415 - CV 418. La región *guaBA* mutada en CV 415 se amplificó por PCR con CVOL 15 y CVOL 13 y el producto se secuenció (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. La cepa CV 415 se eligió para todos los estudios posteriores.

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

20 *S. Paratyphi* A 9150 contiene una auxotrofia indefinida, que la hace incapaz de crecer en medio mínimo sin la adición de casaminoácidos. La cepa de ATCC 11511 y una cepa clínica de CVD *S. Paratyphi* A 516 también son incapaces de crecer en medio mínimo, sugiriendo que contienen la misma auxotrofia que se encuentra en *S. Paratyphi* A 9150.

25 Para demostrar que la mutagénesis mediada por Lambda Red solo se dirigió a *guaBA* en CV 415, se diseñó un plásmido basado en pLowBlu 184 (número de copias bajo) que contenía un fragmento mínimo que codificaba *guaBA* bajo el control del promotor de lactosa (*P_{lacZ}*). Se usaron los cebadores CVOL 13 y CVOL 41 para amplificar un fragmento de ~ 3,1 kb que codificaba *guaBA* con un sitio de unión a ribosoma optimizado (GAAGGAG) 8 pb en la dirección 5' del codón de iniciación usando el cromosoma de CVD 908-*htrA* como molde. Este fragmento se subclonó en pGEM[®]-T Easy y se cortó con *EcoRI*, se hizo romo con ADN polimerasa T4 y se clonó en el sitio *NotI* de pLowBlu 184 creando pATGguaBA (guardado en CV 295).

35 Se sometió a electroporación CV 415 con o bien pATGguaBA o bien pLowBlu 184 (control) y se sembró en 2x medio de soja que contenía guanina y *cml*, creando las cepas CV 486 y CV 487, respectivamente. 2x medio de soja que carece de guanina es capaz de soportar el crecimiento de *S. Paratyphi* A delecionada en *guaBA*. Volvieron a sembrarse en línea colonias únicas de cada una en MMM que contenía *cml* y se incubaron a 37 °C durante la noche. Como se muestra en la Figura 3, CV 486 fue capaz de crecer en MMM (placa 2) a diferencia del control (CV 487; placa 1) 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

45 Con el fin de minimizar la reversión de *S. Paratyphi* A 9150 delecionada en *guaBA* a un genotipo no mutado (wt), se dirigieron genes adicionales como marcadores de atenuación secundarios. Estos genes fueron *clpP* y *clpX*, que codifican una serina-proteasa y una chaperona ATPasa, respectivamente (revisado en Structure (Camb). 2004 Feb;12(2):175-83). Se ha mostrado que la alteración de *clpP* y/o *clpX* reduce significativamente el potencial de colonización de *Salmonella* Typhimurium en ratones (Infect Immun. 2001 May;69(5):3164-74). En *S. Typhi* Ty2, *clpX* (SEQ ID NO:39) y *clpP* (SEQ ID NO:40) están ambos localizados entre 2483597 y 2485743 (SEQ ID NO:27) en la hebra complementaria del cromosoma, respectivamente, y se expresan a partir de promotores individuales. *S. Paratyphi* A 9150 wt también se sometió a mutagénesis tal que pudiera evaluarse la virulencia de mutantes que contienen delecciones individuales en o bien *clpX* o bien *clpP* en ratones.

55 Para deleccionar *clpX*, se diseñaron cebadores CVOL 85 y 86 para amplificar un fragmento de ~ 1,3 kb que codificaba *clpX* que carece de un codón de iniciación de CVD 908-*htrA*. Este fragmento se purificó en columna, se trató con ADN Polimerasa Taq-Pro™ y se clonó en pGEM[®]-T (guardado 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 fragmento de *EcoRI* se hizo romo y se insertó en pGEM[®]-T::*clpX*. Este cartucho de *cml* había sido previamente creado por PCR usando CVOL 25 y

CVOL 26 con pKD3 como molde (guardado en CV 134). Tras la ligación y transformación, se usó PCR con cebadores CVOL 26 y CVOL 85 para confirmar la inserción del cartucho de *cml* en la orientación correcta para la mutagénesis Lambda Red. Se identificó un clon positivo, llamado pGEM[®]-T::(*clpX*::*cml*) y se guardó como CV 481.

5 Se transformó *S. Paratyphi* A delecionada en *guaBA* (CV 415) con pKD46 y se guardó como CV 421. CV 421 y CV 250 (*S. Paratyphi* A 9150 wt transformada con pKD46) se sometieron a mutagénesis Lambda Red con un producto de PCR de ~ 1,4 kb amplificado a partir de pGEM[®]-T::(*clpX*::*cml*) usando 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 aquellas homólogas a CVOL 85 y CVOL 86. Se seleccionaron mutantes que presentaron un perfil de PCR correcto para el
10 tratamiento con pCP20 para eliminar el cartucho de *cml*. La Figura 4 muestra que los mutantes que contienen un gen *clpX* alterado presentaron una banda de ~ 0,6 kb más pequeña por PCR (Panel A, carriles 1 - 6) en comparación con la encontrada en *S. Paratyphi* A 9150 no alterada (Panel A, carril 7). El análisis por PCR de las mismas cepas con CVOL 13 y 15 confirmó que *guaBA* se delecionó solo de cepas derivadas de CV 415 y no CV 250 (Panel B, carriles 4 - 6, en comparación con los carriles 1 - 3 y 7). Los mutantes que carecen 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 cebadores CVOL 87 y CVOL 88 y el producto secuenciado (SEQ ID NO:2); las regiones 5' y 3' de SEQ ID NO:2 son homólogas a *clpX*, mientras que la región central es homóloga a pKD3.

20 Para delecionar *clpP*, se diseñaron CVOL 89 y 90 para amplificar un fragmento de ~ 0,7 kb que codificaba *clpP* que carece de un codón de iniciación de CVD 908-*htrA*. Este fragmento se purificó en columna y se clonó en pGEM[®]-T, creando pGEM[®]-T::(*clpP*) (guardado como CV 470). Se digirió pGEM[®]-T::(*clpP*) con *Pst*I y *Nsi*I, se trató con ADN polimerasa T4 y se re-ligó (creando pGEM[®]-T::(*clpPm*), guardado como CV 484) con el fin de eliminar los sitios *Nde*I y *Hinc*II del esqueleto de vector. pGEM[®]-T::(*clpPm*) se digirió entonces con *Nde*I y *Hinc*II para eliminar fragmentos de
25 ADN ascendiendo a ~ 0,5 kb de tamaño, y se trataron con ADN polimerasa T4. Similarmente a lo anteriormente mencionado, un cartucho de *cml* aislado de pCR-Blunt II-TOPO como un fragmento *Eco*RI se trató con ADN polimerasa T4 y se usó para sustituir los fragmentos eliminados de pGEM[®]-T::(*clpPm*). Tras la ligación y transformación, se usó PCR con los cebadores CVOL 26 y CVOL 85 para confirmar la inserción del cartucho de *cml* en la orientación correcta para la mutagénesis Lambda Red. Se identificó un clon positivo, llamado pGEM[®]-T::(*clpPm*::*cml*) y se guardó como CV 501.

30 Se sometieron *S. Paratyphi* A 9150 wt y delecionada en *guaBA* que contenía pKD46 (CV 250 y CV 421, respectivamente) a mutagénesis Lambda Red con un producto de PCR de ~ 1,4 kb amplificado a partir de pGEM[®]-T::(*clpPm*::*cml*) usando 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 aquellas homólogas a CVOL 89 y CVOL 90. Se seleccionaron mutantes que presentaron un perfil de PCR correcto para el tratamiento con pCP20 para eliminar el
35 cartucho de *cml*.

40 La Figura 5 muestra que los mutantes que contienen un gen *clpP* alterado presentaron una banda de ~ 0,4 kb más pequeña por PCR (Panel A, carriles 1 - 6) en comparación con la encontrada en *S. Paratyphi* A 9150 no alterada (Panel A, carril 7). El análisis por PCR de las mismas cepas usando cebadores CVOL 13 y 15 confirmó que *guaBA* se delecionó solo de cepas derivadas de CV 415 y no de aquellas basadas en CV 250 (Panel B, carriles 4 - 6, en comparación con los carriles 1 - 3 y 7). Los mutantes que carecen de *clpP*, y tanto *clpP* como *guaBA*, se almacenaron como CV 528 y CV 530, respectivamente. La región de *clpP* mutada en CV 528 y CV 530 fue amplificada por PCR con los cebadores CVOL 87 y CVOL 88 y el producto se secuenció (secuencia de polinucleótidos SEQ ID NO:3); las regiones 5' y 3' de SEQ ID NO:3 son homólogas a *clpP*, mientras que la región central es homóloga a pKD3.

9. Construcción de plásmidos de baja copia para análisis de complementación

50 Como se realizó anteriormente, para confirmar que la mutagénesis mediada por Lambda Red se dirigió solo a loci específicos, se diseñaron plásmidos basados en pLowBlu 184 mono- o bi-cistrónicos (bajo número de copias) que contenían fragmentos mínimos que codificaban o bien *clpX* o *clpP*, o bien *guaBA* inmediatamente en la dirección 3' de o bien *clpX* o bien *clpP*. La expresión constitutiva de los genes en estos plásmidos estuvo dirigida por P_{lacZ}.

55 Se usaron cebadores CVOL 64 y CVOL 65 para amplificar por PCR *guaBA* de CVD 908-*htrA* que contenía un sitio de unión a ribosoma potenciado con sitios de restricción *Nde*I y *Nsi*I en los extremos 5' y 3', respectivamente. El producto se purificó en columna y se ligó en pCR-Blunt II-TOPO (guardado como CV 394), se extrajo como un fragmento de *Nde*I - *Nsi*I de ~ 3,5 kb y se clonó en los sitios *Nde*I y *Nsi*I en pLowBlu 184, creando p*guaBAV.2* (guardado como CV 482).

60 Para crear un plásmido de bajo número de copias que codifica *clpP*, se usaron cebadores CVOL 122 y CVOL 123 para amplificar *clpP* con un sitio de unión a ribosoma potenciado de CVD 908-*htrA* con sitios *Not*I y *Nru*I en los extremos 5' y 3', respectivamente. El producto de ~ 0,7 kb se purificó en columna y se ligó en pCR-Blunt II-TOPO (guardado como CV 567), se extrajo como un fragmento *Not*I - *Nru*I y se ligó en pLowBlu 184 previamente cortado con *Not*I y *Nde*I, creando pATG*clpP* (guardado como CV 584). Para construir un plásmido bi-cistrónico que contiene
65 *clpP* y *guaBA*, los cebadores CVOL 122 y CVOL 128 se diseñaron para amplificar *clpP* con un sitio de unión a

ribosoma potenciado de CVD 908-*htrA* con sitios *NotI* en tanto los extremos 5' como 3'. El producto de ~ 0,7 kb se purificó en columna y se ligó en pCR-Blunt II-TOPO (guardado como CV 600), se extrajo como un fragmento *NotI* y se ligó en p*guaBAV.2* previamente cortado con *NotI*, creando pATGclpPATG*guaBA* (guardado como CV 603).

5 Para crear un plásmido de baja copia que codifica *clpX*, se usaron cebadores CVOL 124 y CVOL 125 para amplificar *clpX* con un sitio de unión a ribosoma potenciado 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 (guardado como CV 569), se extrajo como un fragmento *NotI* - *NdeI* y se ligó en o bien pLowBlu 184 o bien p*guaBAV.2*, ambos previamente cortados con *NotI* y *NdeI*, creando pATGclpX (guardado como CV 582) y pATGclpXATG*guaBA* (guardado como CV 573).

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

15 Se realizaron estudios de DL₅₀ 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 de DL₅₀ obtenidos con la inyección de ratones con *S. Paratyphi A* wt y delecionadas en *guaBA*. *S. Paratyphi A* wt tiene un valor de DL₅₀ de < 10 bacterias por ratón. A diferencia, *S. Paratyphi A* delecionada en *guaBA* tuvo un valor de DL₅₀ ~ 4,5 log mayor. La complementación del mutante *guaBA* con pLowBlu 184 no alteró el valor de DL₅₀, mientras que la transformación con pATG*guaBA* restauró la virulencia similar a wt.

25 La Figura 7 muestra los datos de DL₅₀ obtenidos con la inyección de ratones con *S. Paratyphi A* wt, *S. Paratyphi A* delecionada en *clpX*, o *S. Paratyphi A* delecionada en *clpX-guaBA*. Los valores de DL₅₀ de *S. Paratyphi A* wt y delecionada en *guaBA* estuvieron de acuerdo con aquellos logrados previamente. *S. Paratyphi A* delecionada en *clpX* presentó un valor de DL₅₀ de ~ 1 log mayor en comparación con los mutantes *guaBA*, que indica que una deleción en *clpX* no estaba tan atenuada como aquella en *guaBA*. La complementación de las cepas delecionadas en *clpX* o las delecionadas en *clpX-guaBA* con pLowBlu 184 no tuvo efecto, mientras que la transformación con pATGclpX y pATGclpXATG*guaBA*, respectivamente, restauró la virulencia similar a wt.

30 La Figura 8 muestra los datos de DL₅₀ de ratones inyectados con *S. Paratyphi A* wt, *S. Paratyphi A* delecionada en *clpP* o *S. Paratyphi A* delecionada en *clpP-guaBA*. Los valores de DL₅₀ de *S. Paratyphi A* wt y delecionada en *guaBA* fueron coherentes con aquellos logrados previamente. Al igual que con la cepa delecionada en *clpX*, *S. Paratyphi A* delecionada en *clpP* presentó elevada virulencia en comparación con el mutante *guaBA*. Esto indicó que una deleción en *clpP* no era tan atenuante como aquella en *guaBA*. La complementación de *clpX* o las cepas delecionadas en *clpX-guaBA* con pLowBlu 184 no tuvo efecto sobre la virulencia. La transformación de estas cepas con pATGclpP y pATGclpPATG*guaBA*, respectivamente, no restauró completamente la virulencia wt. Sin desear quedar ligado a teoría alguna, la expresión regulada de *clpP*, a diferencia de la expresión no regulada como se codificó por pATGclpP y pATGclpPATG*guaBA*, se requiere para complementar completamente la mutación *clpP*.

40 11. Vacuna conjugada derivada de *S. Paratyphi A*

Se desarrollan y prueban vacunas conjugadas como se describe en el presente documento. Una vacuna conjugada de la presente invención comprende el polisacárido O (OPS) de *S. Paratyphi A* y una proteína flagelina de *S. Paratyphi A*. Además, preferentemente, una vacuna conjugada de la presente invención consiste en OPS de *S. Paratyphi A* y una proteína flagelina de *S. Paratyphi A*. Incluso más preferentemente, una vacuna conjugada de la presente invención consiste esencialmente en OPS de *S. Paratyphi A* y una proteína flagelina de *S. Paratyphi A*.

En el presente documento se desvela una vacuna conjugada que comprende una proteína flagelina que comprende cualquier proteína flagelina conocida (véase, por ejemplo, la publicación de patente internacional WO 2005/042564). En particular, cualquier proteína flagelina conocida de *S. Paratyphi A*. En la presente invención, la proteína flagelina es flagelina de fase 1 (fliC).

Una vacuna conjugada que comprende OPS comprende cualquier OPS conocido de *S. Paratyphi A*. En aspectos particulares de la invención, el OPS pertenece a OPS de grupo A que por definición presenta epítotope 2 inmunodominante y normalmente también tiene epítotope 1 y 12 no dominantes. El OPS de grupo A de *Salmonella* contiene un esqueleto de repeticiones de manosil-ramnosil-galactosa con el que la azúcar didesoxihexosa paratosa está unido alfa-1,3 al resto de manosa. Esto da lugar al epítotope inmunodominante "2" que define el OPS del grupo A de *Salmonella*.

60 Se prepara una vacuna amplia contra fiebre paratifoidea y tifoidea, incluyendo conjugados, para prevenir enfermedad por *S. Paratyphi B*, enfermedad por *S. Paratyphi C* y enfermedad por *S. Typhi*. Los conjugados se preparan según los mismos métodos y estrategias descritos en el presente documento de unir el OPS purificado relevante con la proteína flagelina de fase 1 homóloga. Así, una vacuna conjugada de *S. Paratyphi B* comprende, consiste en, o consiste esencialmente en OPS del grupo B conjugado con la proteína "b" de flagelos de fase 1 (es decir, con la subunidad de proteína codificada por fliC de *S. Paratyphi B*). Una vacuna conjugada de *S. Paratyphi C* comprende, consiste en, o consiste esencialmente en el OPS de grupo C1 conjugado con la proteína "c" de flagelos

de fase 1 (es decir, conjugado con la subunidad de proteína codificada por flhC de *S. Paratyphi C*). Una vacuna conjugada de *S. Typhi* comprende, consiste en, o consiste esencialmente en OPS del grupo D conjugado con la proteína "d" de flagelos de fase 1 (es decir, conjugado con la subunidad de proteína codificada por flhC de *S. Typhi*). Además de los conjugados anteriormente descritos que se preparan según los mismos métodos y estrategias, estos conjugados también se administran y fabrican según los mismos métodos y estrategias descritos en el presente documento.

La conjugación de OPS de *S. Paratyphi A* y una proteína flagelina de *S. Paratyphi A* puede llevarse a cabo por métodos conocidos para un experto habitual en la materia (véase, por ejemplo, la publicación de solicitud de patente de EE.UU. N.º 20090028889). En aspectos particulares de la invención extraídos de la conjugación de OPS de *S. Paratyphi A* y una proteína flagelina de *S. Paratyphi A*, métodos para la conjugación química de polipéptidos, hidratos de carbono y/o lípidos son muy conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Hermanson. *Bioconjugate Techniques* (Academic Press; 1992); Aslam y Dent, eds. *Bioconjugation: Protein coupling Techniques for the Biomedical Sciences* (MacMillan: 1998); y Wong *Chemistry of Protein Conjugation and Cross-linking* (CRC Press: 1991)). Por ejemplo, en el caso de conjugación de hidratos de carbono o lípidos, grupos amino y sulfhidrilo funcionales pueden incorporarse en ellos por química convencional. Por ejemplo, pueden incorporarse grupos amino primarios mediante reacción con etilendiamina en presencia de cianoborohidruro de sodio y pueden introducirse sulfhidrilos haciendo reaccionar diclorhidrato de cisteamina seguido de reducción con un agente reductor de disulfuro estándar.

Reticulantes heterobifuncionales, tales como, por ejemplo, sulfosuccinimidil (4-yodoacetil) aminobenzoato, que enlazan el grupo amino épsilon en los restos de D-lisina de copolímeros de D-lisina y D-glutamato con una cadena lateral de sulfhidrilo de un resto de cisteína del extremo amino en el péptido que va a acoplarse, pueden usarse para aumentar la relación de OPS de *S. Paratyphi A* con una proteína flagelina de *S. Paratyphi A* y/o una proteína flagelina de *S. Paratyphi A* con OPS de *S. Paratyphi A* en el conjugado.

OPS de *S. Paratyphi A* o una proteína flagelina de *S. Paratyphi A* pueden contener cadenas laterales de aminoácidos tales como grupos amino, carbonilo, hidroxilo o sulfhidrilo o anillos aromáticos que pueden servir de sitios para la conjugación. Restos que tienen tales grupos funcionales pueden añadirse a o bien OPS de *S. Paratyphi A* o bien a una proteína flagelina de *S. Paratyphi A*. Tales restos pueden incorporarse por técnicas de síntesis en fase sólida o técnicas recombinantes, ambas de las cuales son muy conocidas en la técnica.

OPS de *S. Paratyphi A* y una proteína flagelina de *S. Paratyphi A* pueden ser químicamente conjugados usando agentes de reticulación convencionales tales como carbodiimidas. Ejemplos de carbodiimidas son 1-ciclohexil-3-(2-morfolinil-(4-etil)carbodiimida (CMC), 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) y 1-etil-3-(4-azonia-44-dimetilpentil)carbodiimida.

Ejemplos de otros agentes de reticulación adecuados son bromuro de cianógeno, glutaraldehído y anhídrido succínico. En general, puede usarse cualquiera de varios agentes homobifuncionales que incluyen un aldehído homobifuncional, un epóxido homobifuncional, un imidoéster homobifuncional, un éster de N-hidroxisuccinimida homobifuncional, una maleimida homobifuncional, un haluro de alquilo homobifuncional, un disulfuro de piridilo homobifuncional, un haluro de arilo homobifuncional, una hidrazida homobifuncional, un derivado de diazonio homobifuncional o un compuesto fotorreactivo homobifuncional. También están incluidos compuestos heterobifuncionales, por ejemplo, compuestos que tienen un grupo reactivo con amina y un reactivo con sulfhidrilo, compuestos con un grupo reactivo con amina y un fotorreactivo, y compuestos con un grupo reactivo con carbonilo y un reactivo con sulfhidrilo.

Ejemplos específicos de agentes de reticulación homobifuncionales incluyen los ésteres de N-hidroxisuccinimida bifuncionales ditiobis(succinimidilpropionato), suberato de disuccinimidilo y tartarato de disuccinimidilo; los imidoésteres bifuncionales adipimidato de dimetilo, pimelimidato de dimetilo y suberimidato de dimetilo; los reticulantes reactivos con sulfhidrilo bifuncionales 1,4-di-[3'-(2'-piridilditio)propionamido]butano, bismaleimidohexano y bis-N-maleimido-1,8-octano; los haluros de arilo bifuncionales 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenceno y 4,4'-difluoro-3,3'-dinitrofenilsulfona; agentes fotorreactivos bifuncionales tales como bis-[b-(4-azidosalicilamida)etil]disulfuro; los aldehídos bifuncionales formaldehído, malondialdehído, succinaldehído, glutaraldehído y adipaldehído; un epoxidado bifuncional tal como diglicidil éter de 1,4-butanodiol; las hidrazidas bifuncionales dihidrazida de ácido adípico, carbohidrazida y dihidrazida de ácido succínico; los diazonios bifuncionales o-tolidina, bencidina diazotizada y bis-diazotizada; los haluros de alquilo bifuncionales N1N'-etilen-bis(yodoacetamida), N1N'-hexametilén-bis(yodoacetamida), N1N'-undecametilén-bis(yodoacetamida), además de haluros de bencilo y halomostazas, tales como ácido a1a'-diyodo-p-xilenosulfónico y tri(2-cloroetil)amina, respectivamente.

Ejemplos de otros agentes de reticulación heterobifuncionales comunes que pueden usarse incluyen, pero no se limitan a, SMCC (succinimidil-4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato), MBS (éster de m-maleimidobenzoil-N-hidroxisuccinimida), SIAB (N-succinimidil(4-iodoetil)aminobenzoato), SMPB (succinimidil-4-(p-maleimidofenil)butirato), GMBS (éster de N-(maleimidobutiriloxi)succinimida), MPHB (hidrazida de ácido 4-(4-N-maleimidofenil)butírico), M2C2H (4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxil-hidrazida), SMPT (succinimidiloxicarbonil-a-metil-a-(2-piridilditio)tolueno) y SPDP (N-succinimidil-3-(2-piridilditio)propionato). Por

ejemplo, la reticulación puede llevarse a cabo acoplado un grupo carbonilo a un grupo amina o a un grupo hidrazida por aminación reductora.

En otro aspecto de la invención, OPS de *S. Paratyphi A* y una proteína flagelina de *S. Paratyphi A* se conjugan mediante polímeros, tales como PEG, poli-D-lisina, poli(alcohol vinílico), polivinilpirrolidona, inmunoglobulinas, y copolímeros de D-lisina y ácido D-glutámico. La conjugación de OPS de *S. Paratyphi A* a una proteína flagelina de *S. Paratyphi A* puede lograrse en cualquier número de formas, que incluyen implicar uno o más agentes de reticulación y grupos funcionales en los OPS de *S. Paratyphi A* y/o una proteína flagelina de *S. Paratyphi A*. El polímero puede ser derivatizado para contener grupos funcionales si ya no posee grupos funcionales apropiados.

Sin desear quedar ligado a teoría, una vacuna conjugada de la invención preparada con OPS estimulará anticuerpos bactericidas (Konadu E et al. *Infect Immun* 1996; 64(7):2709-15; MacLennan et al. *J Clin. Invest.* 2008; 118:1553-62.) El usar una proteína flagelina como vehículo producirá respuestas de anticuerpos en suero O potenciadas debido al efecto adyuvante (agonista de TLR5) de la proteína flagelina (Feuillet et al. *PNAS* 2006; 103:12487-92; Gewirtz et al. *J. Immunol.* 2001; 167:1882-5; Huleatt et al. *Vaccine.* 2007; 25:763-75).

12. Vacunación que comprende un conjugado que comprende OPS y una proteína flagelina

Las estrategias de vacuna son muy conocidas en la técnica y, por tanto, la estrategia de vacunación englobada por la invención no limita la invención de ninguna manera. En el presente documento se desvela que la vacuna conjugada se administra sola en una única administración o se administra en administraciones secuenciales. En el presente documento se desvela que la vacuna conjugada se administra como un componente de un régimen de sensibilización / refuerzo homólogo o heterólogo. En aspectos particulares desvelados en el presente documento extraídos para sensibilización / refuerzo heterólogo, se usa una estrategia de inmunización por sensibilización de la mucosa / refuerzo parenteral. Por ejemplo, una cepa de *S. Paratyphi A* atenuada como se enseña en el presente documento se administra por vía oral y posteriormente se refuerza por vía parental con una vacuna conjugada de OPS de *S. Paratyphi A* y una proteína flagelina de *S. Paratyphi A* como se describe en el presente documento.

13. Métodos de fabricación a gran escala de una proteína derivada de flagelina de *S. Paratyphi A*

Cuando se generan vacunas atenuadas para administración o para componentes usados para preparar una vacuna de conjugación (que incluyen, por ejemplo, OPS y una proteína flagelina), debe prestarse atención al grado de atenuación. Con respecto a la fabricación a gran escala, la atenuación es particularmente importante para garantizar la seguridad en el proceso de fabricación (que incluye, por ejemplo, la seguridad medioambiental). La fabricación de *S. Paratyphi A* atenuada para su uso en la invención se atenúa suficientemente para garantizar seguridad de no solo la administración de la cepa, sino también la fabricación de la cepa para la producción de *S. Paratyphi A* para derivar componentes para preparar una vacuna conjugada.

En aspectos particulares de la invención extraídos para *S. Paratyphi A* para derivar componentes para preparar una vacuna conjugada, la cepa atenuada produce, por ejemplo, más flagelos que *S. Paratyphi A* no mutante o produce la exportación de una proteína flagelina de *S. Paratyphi A*.

En ciertos aspectos de la invención, una cepa atenuada que tiene flagelos elevados en comparación con una cepa no mutante es particularmente ventajosa desde al menos una perspectiva de fabricación. En aspectos particulares de la invención, una cepa de *S. Paratyphi A* atenuada que tiene una o más mutaciones descritas en el presente documento que conducen a atenuación e hiperflagelación puede usarse para la fabricación de una vacuna oral y/o componentes para una vacuna conjugada. Por ejemplo, una cepa atenuada de *S. Paratyphi A* que tiene una mutación en los loci *guaBA*, el gen *guaB*, o el gen *guaA*, y mutación en el gen *clpP* produce una cepa atenuada y una fenotípicamente hiperflagelada de *S. Paratyphi A* (véase, por ejemplo, la Figura 9). Métodos de purificación de una proteína flagelina a partir de flagelos completos se conocen en la técnica o pueden ser fácilmente modificados por un experto habitual en la materia usando métodos conocidos en la materia. Por ejemplo, modificando el método de Ibrahim et al., se logra la purificación de flagelos; por debajo de pH 3,0, los flagelos se disocian en subunidades de flagelina (Ibrahim et al. *J. Clin. Microbiol.* 1985; 22:1040-4. Métodos modernos de purificación y mutantes de *clpP* deben aumentar marcadamente el rendimiento y la pureza de una proteína flagelina usada para construir una vacuna conjugada de la invención (véase, por ejemplo, Ogushi et al. *J. Biol. Chem.* 2001; 276:30521-6; Yoon et al. *Infect. Immun.* 2008; 76:1282-8).

En otros aspectos de la invención, la exportación de una proteína flagelina de una cepa de *S. Paratyphi A* atenuada se usa para derivar una proteína flagelina usada para construir una vacuna conjugada de la invención. Por ejemplo, una mutación en el gen *fliD*, gen *flgL*, o gen *flgK*, produce la exportación de monómeros de flagelina en el sobrenadante. En el presente documento se desvela que una cepa de *S. Paratyphi A* atenuada tiene una mutación en al menos los loci *guaBA*, el gen *guaB*, o el gen *guaA*, y mutación en el gen *fliD*, gen *flgL*, o gen *flgK*.

En el presente documento se desvela que *S. Paratyphi A* que contiene una mutación *guaBA* y una mutación *fliD* se prepara y usa para derivar una proteína flagelina usada para construir una vacuna conjugada de la invención. La mutación en *guaBA* se ha descrito en el presente documento. La mutación del gen *fliD* puede llevarse a cabo por

varios métodos, que incluyen, por ejemplo, inactivación del gen *fliD*. Un método usado para inactivar *fliD* incluye, por ejemplo, con referencia a la Tabla 2, PCR N.º 1 mezclada con PCR N.º 2 y luego se amplifica con cebadores 5*FliD* y 3*FRT-aph* en una PCR de solapamiento, que genera un fragmento resistente a kanamicina que se recupera en, por ejemplo, el vector PSMART-LCAMP™ (Lucigen). La PCR N.º 3 también puede recuperarse en el vector PSMART-LCAMP™, entonces se corta con BamHI y XhoI, y se inserta en el clon pSMART-*fliD-aph* cortado con BamHI y XhoI. El fragmento ensamblado final se corta y se somete a electroporación en *S. Paratyphi A* que lleva pKD46 y selección para resistencia a kanamicina según el método de Datsenko y Wanner, seguido de cruzar el casete *aph*, si procede, usando pCP20 según el método de Datsenko y Wanner (Proc Natl Acad Sci USA. 2000 Jun 6;97(12):6640-50).

Tabla 2

PCR N.º 1 (usando ADN de molde cromosómico de <i>guaBA</i> de <i>Salmonella</i>)	5 <i>FliD</i> : 5'-tcaccgacacgctgcagggtgtgttgatttc-3'	SEQ ID NO:41
	5 <i>FliD</i> -rev: 5'-gaacttcGAAGCAGCTCCAGCacctaataatgatgaaattgaagccatgc-3'	SEQ ID NO:42
PCR N.º 2 (usando molde de ADN de pKD 13)	5 <i>FRT-aph</i> : 5'-GCTGGAGCTGCTTCgaagttc-3'	SEQ ID NO:43
	3 <i>FRT-aph</i> : 5'-ctcgagTTCCGGGGATCCGTCGACCTGCAGTTC-3'	SEQ ID NO:44
PCR N.º 3 (usando ADN de molde cromosómico de <i>guaBA</i> de <i>Salmonella</i>)	3 <i>FliD</i> : 5'-GGATCCgctatgaacaagtcctgataacagaggt-3'	SEQ ID NO:45
	3 <i>FliD</i> -rev: 5'-CTCGAGttaacgagactcctgaaagatgcttcggtgaaatctgc-3'	SEQ ID NO:46

Además de las cepas de *S. Paratyphi A* atenuadas descritas en el presente documento para fines de vacunación y para derivar una proteína flagelina usada como un componente de la vacuna conjugada descrita en el presente documento, estas cepas pueden usarse para derivar OPS que se usan como componente de la vacuna conjugada descrita en el presente documento. En el presente documento se desvela cualquiera de las mutaciones anteriores en cualquier combinación que proporciona eficacia máxima o resultados de fabricación (por ejemplo, puede hacerse cualquier combinación de mutaciones en los loci *guaBA*, el gen *guaB*, gen *guaA*, gen *clpP*, gen *clpX*, gen *fliD*, gen *flgL*, gen *flgK*, o cualquier otra mutación descrita en el presente documento, en todas las posibles combinaciones o variaciones).

Documentos citados

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 synthase from *Salmonella* Typhi. *J Gen Micro* 137:147-152, 1990.
- 5 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, and the Chilean Typhoid Committee. Efficacy of one or two doses of Ty21a *Salmonella* Typhi vaccine in enteric-coated capsules in a controlled field trial. *Vaccine* 8:81-84, 1990.
- 10 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.
- 15 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.
- 20 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.
- 25 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, Thisyakorn U, Cryz SJ Jr. Safety and immunogenicity of *Salmonella* Typhi Ty21a liquid formulation vaccine in 4- to 6-year-old Thai children. *J Infect Dis* 166:451-452, 1992.
- 30 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.
- 35 Cryz SJ Jr, Vanprapar N, Thisyakorn U, Olanratmanee T, Losonsky G, Levine MM, Chearskul S. Safety and immunogenicity of *Salmonella* Typhi Ty21a vaccine in young children. *Infect Immun* 61:1149-1155, 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.
- 40 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.
- 45 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.
- 50 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.
- 55 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.
- 60 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.
- 65

- 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.
- 5 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.
- 10 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.
- 15 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.
- 20 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.
- 25 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.
- 30 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.
- 35 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.
- 40 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.
- 45 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.
- 50 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.
- 55 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.
- 60 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.
- 65 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.
- 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.

- 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.
- 5 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.
- 10 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.
- 15 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.
- 20 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.
- Orr N, Galen JE, Levine MM. Novel use of 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.
- 25 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.
- 30 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.
- 35 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.
- 40 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.
- 45 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.
- 50 Salerno-Goncalves R, Wyant TL, Pasetti MF, Fernandez-Vina M, Tacket CO, Levine MM, Sztein MB. Concomitant Induction of CD4(+) and CD8(+) T Cell Responses in Volunteers Immunized with *Salmonella enterica* Serovar Typhi Strain CVD 908-htrA. *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.
- 55 Vindurampulle CJ, Cuberos LF, Barry EM, Pasetti MF, Levine MM. Recombinant *Salmonella enterica* serovar Typhi in a prime-boost strategy. *Vaccine* 22(27-28):3744-3750, 2004.
- 60 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.
- 65 Kotloff KL, Pasetti MF, Barry EM, Nataro JP, Wasserman SS, Sztein MB, Picking WD, Levine MM. Deletion in the *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

ES 2 644 766 T3

anthrax protective antigen domain 4 expressed by the attenuated live vector vaccine strain CVD 908-htrA. Infect Immun 72:7096-7106, 2004.

LISTADO DE SECUENCIAS

- 5 <110> VINDURAMPULLE, Christofer BARRY, Eileen LEVINE, Myron GALEN, James
- <120> *SALMONELLA ENTERICA* ATENUADA SEROVARIEDAD *PARATYPHI* Y USOS DE LA MISMA
- 10 <130> 56995
- <150> US 12/399.091
<151> 06-03-2009
- 15 <160> 50
- <170> PatentIn versión 3.5
- <210> 1
20 <211> 489
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
- <220>
25 <223> región guaBA mutada, químicamente sintetizada
- <400> 1
- | | |
|--|-----|
| ggaacatcgc acagcgcacc tgagcggat cgtctttgag cgtaaagtac cagtggcccg | 60 |
| acgcaggctg cgtgaaatta gaaatctcgc cgtgatcca tacctgtccc atctcctggt | 120 |
| ctaacagcag acgaaccgtc tggtaaggc ggcttacggg aaaaattgag gaagtttgag | 180 |
| aggataacat gtgagcggga tcaaattcta aatcagcagg ttattcaatc ggtgtaggct | 240 |
| ggagcctgct tccaagtcc tatactttct agagaatagg aacttcggaa taggaactaa | 300 |
| ggaggatatt catatgctct ctctctcgt gctgtcgaaa ccatcgactt tatgaccgcg | 360 |
| cactgggggc acctgccgta tgacttctcgt ggtcgtggtt ccaaccgcat catcaatgaa | 420 |
| gtcaacggga tttcccgtgt ggtgatgac atcagcggta aaccaccggc taccattgag | 480 |
| tggaatga | 489 |
- 30 <210> 2
<211> 634
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
- 35 <220>
<223> Región cipX mutada, químicamente sintetizada
- 40 <400> 2

ES 2 644 766 T3

cctgagaatg gcatttgcgt cgtcgtgtgc ggcacaaaga acaaagaaga ggttttgact 60
 catgacagat aaacgcaaag atggctcggg caaattgttg tactgctctt tttgcgccaa 120
 aagccagcat gaagtgcgca agctgattgc cggteccatcc 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 aaaaccgggtg cccgtggtct gcgttctatc gtcgaagcgg 420
 cgctgctgga taccatgtac gatttgccat ctatggaaga cgtcgaaaaa gtgggtgatcg 480
 acgagtcogt tattgccggt cagagtaagc cgttgcctgat ttacggcaaa ccggaagcgc 540
 agcttctgg cgaataatta aacattcata caatcagtta gccaaaaaag gggggatttt 600
 atctcccctt tcgtttttcc tgtaaacacg ccgt 634

5 <210> 3
 <211> 370
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Región cipP mutada, químicamente sintetizada
 <400> 3

tccatcaggt tacaatcagt acagcaggtt ttttcaattt ttatccagga gacggaaatg 60
 tcatacagcg gagaacgaga taatttggcc cctcatatat gaatattctc cttagttcct 120
 attccgaagt tcctattctc tagaaagtat aggaacttcg aagcagctcc agcctacacg 180
 ctaggactca attttgacc atcgtaattg atgccctgga cgcaagtgtg ccgctataca 240
 cttcatcctt cacgctacct cgggtgttggg tgccagcgcg cctcccgggtg acttacttat 300
 gtaagcgcct gcggagtcgc cgagttgccg ccttgatgta gctcgaatga ttttgtgtat 360
 atactaatga 370

15 <210> 4
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Cebador oligonucleotídico químicamente sintetizado
 <400> 4
 ctgcagtc tcccactcaa tggtagc 27

25 <210> 5
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30

ES 2 644 766 T3

<220>
 <223> Cebador oligonucleotídico químicamente sintetizado

5 <400> 5
 ggaacatcgc acagcgca 18

<210> 6
 <211> 17
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador oligonucleotídico químicamente sintetizado

15 <400> 6
 gtgtaggagc tgcttcg 17

<210> 7
 <211> 20
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador oligonucleotídico químicamente sintetizado

25 <400> 7
 catatgaata tcctccttag 20

<210> 8
 <211> 119
 <212> ADN
 30 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador oligonucleotídico químicamente sintetizado

35 <400> 8

cgaaccgtct ggtaaggcg gcttacggta aaaattgagg aagtttgaga ggataacatg 60

tgagcgggat caaattctaa atcagcaggt tattcaatcg tgtaggctgg agctgcttc 119

40 <210> 9
 <211> 120
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Cebador oligonucleotídico químicamente sintetizado

50 <400> 9

ttcattgatg atgegggttg aaacacgacc caggaagtca tacggcaggt gcgcccagtg 60

cgcggtcata aagtcgatgg ttctgacagc acgcagagag catatgaata tcctccttag 120

<210> 10
 <211> 28
 <212> ADN
 55 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador oligonucleotídico químicamente sintetizado

60

ES 2 644 766 T3

<400> 10
 gaaggagtat tgcccatgct acgatatcg 28

5 <210> 11
 <211> 42
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Cebador oligonucleotídico químicamente sintetizado

 <400> 11
 catatgaagg agtattgccc atgctacgta tcgctaaaga ag 42

15 <210> 12
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Cebador oligonucleotídico químicamente sintetizado

 <400> 12
 atgcatctgc agtcattccc actcaatggt agccgg 36

25 <210> 13
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Cebador oligonucleotídico químicamente sintetizado

 <400> 13
 acagataaac gcaaagatgg ctcgggcaaa 30

35 <210> 14
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> Cebador oligonucleotídico químicamente sintetizado

45 <400> 14
 ttattcgcca gaagcctgcg ctccggttt 30

 <210> 15
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <223> Cebador oligonucleotídico químicamente sintetizado

55 <400> 15
 cctgagaatg gcatttcgct cgtcgtgtgc 30

60 <210> 16
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

65 <220>
 <223> Cebador oligonucleotídico químicamente sintetizado

ES 2 644 766 T3

<400> 16
 acggcgtgtt tacaggaaaa acgaaagggg 30

5 <210> 17
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Cebador oligonucleotídico químicamente sintetizado

 <400> 17
 tcatacagcg gagaacgaga taattggcc 30

15 <210> 18
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Cebador oligonucleotídico químicamente sintetizado

 <400> 18
 ttacataagt aagtcactgg gaggcgcgct 30

25 <210> 19
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Cebador oligonucleotídico químicamente sintetizado

 <400> 19
 tccatcaggt tacaatcagt acagcagatt 30

35 <210> 20
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> Cebador oligonucleotídico químicamente sintetizado

45 <400> 20
 tcattagtat atacacaaaa tcattcgagc 30

 <210> 21
 <211> 45
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <223> Cebador oligonucleotídico químicamente sintetizado

55 <400> 21
 gcggccgcga aggagagacg gaaatgcat acagcggaga acgag 45

60 <210> 22
 <211> 42
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

65 <220>
 <223> Cebador oligonucleotídico químicamente sintetizado

ES 2 644 766 T3

<400> 22
tcgcgagaat tcttacataa gtaagtcact gggaggcgcg ct 42

5 <210> 23
<211> 45
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Cebador oligonucleotídico químicamente sintetizado

<400> 23
gcggccgcga aggagtttga ctcacgacag ataaacgcaa agatg 45

15 <210> 24
<211> 36
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Cebador oligonucleotídico químicamente sintetizado

25 <400> 24
catatgttat tcgccagaag cctgcgcttc cggttt 36

30 <210> 25
<211> 38
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<223> Cebador oligonucleotídico químicamente sintetizado

<400> 25
gcggccgctt acataagtaa gtcactggga ggcgcgct 38

40 <210> 26
<211> 3120
<212> ADN
<213> *Salmonella Typhi* Ty2

<400> 26

ttgcccatgc tacgtatcgc taaagaagcc ctgacgtttg acgacgtcct ccttgttccc	60
gctcaactcca cggttttgcc gaatactgct gatctcagca cgcagttgac gaaaactatt	120
cgtctgaata ttcctatgct ttctgcggcg atggacaccg tgaccggaagc gcgcctggca	180
attgcctcgg cccaggaagc cggcatcggg tttatccaca aaaacatgtc tattgagcgc	240
caggcgggaag aagttcggcg cgtgaagaaa cacgagtcgg gcgtagtgac cgacccgcag	300
accgtcctgc caaccaccac gttgcatgaa gtgaaagccc tgaccgagcg taacggtttt	360
gcgggctatc cggtggtgac tgaagataac gagctggtgg gtatcatcac cggtcgtgac	420

ES 2 644 766 T3

gtgCGttttg tgactgaCct gaaccagcCg gtgagtgttt acatgacgCcc gaaagagcCgt 480
 ctgggtgacCg ttCgtgaagg cgaagcCcgT gaagtcCgtgc tggcaaaaat gcacgaaaaa 540
 cgcgtagaaa aagcCgtCgt cgttgatgat aacttccatc tCcttggcat gattaccgta 600
 aaagatttcc agaaagcCgga acgtaaacca aactcctgta aagatgagca gggcCgttta 660
 cgtgtcCgCg cggcCgtcCg cgcagcCgCg ggcaacgaag agcCgCgttga cgcCgtCgtg 720
 gcggcagCgCg ttgacgtCct gctgatcCgac tcttctcCag gtcactctga aggcCgtgtg 780
 caacgtatcc gtgaaacCcg tCetaaatat cctgacCctgc aaatcatcCg cggcaacCgtc 840
 gcgacggCgCg caggcCctCg cgcactgCgCg gaagcCcgTt gcagcCgCgt gaaagtcCgtt 900
 atcggcCcgCg gttccatctg taccactcCgt atcgtgactg gcCtgggCgt tccCgagatt 960
 accCgtgttt ctgacCgCagt tgaagcCgtg gaagcCaccCg ggattcCcgTt tatcCgtgac 1020
 ggcCgtatcc gtttctcCcg cCacatcCgc aaagcCcatCg cCgcaaggCgc gagcCgtgtc 1080
 atggtcCgtt ctatCgtCgc gggtaCcgaa gaatcCccCg gcgaaatcga actctaccag 1140
 ggcCgttctt acaaatctta cCgcggcCagT ggctcCgtCg gcCgCgatgtc caaaggTtcc 1200
 tctgacCgtt acttccagag cCacaacCgc gccgacaaaC tggTgcCgga aggtatcga 1260
 ggcCgCgtag cctataaagg tCgCctgaaa gagatcattc accagcagat gggcCgCctg 1320
 cCctcctgta tggggctgac cCgttgtgct accatcCgac aactgcCgtac taaagcCgag 1380
 tttgtCgta tCagcCgtgc gggtatcCag gaaagcCacCg ttcacCgacgt gaccatcacc 1440
 aaagagTccc cgaactacCg tctgggctcc tGatTtctt cCccCgacct tCgCgtcCgg 1500
 cGatTtattt aatctgttcc acttgcCctCg gaataagcCgt caatgacCgga aaacattcat 1560
 aagcatcCga tCctcattct ggacttCcgTt tctcagTaca ctcaactggT tCgCgCcgC 1620
 gtgCgtgagc tgggtgttta ctgcgaactg tgggcCgtggg atgtgacaga agcacaatt 1680
 cgtgacttca acccaagcCg cattattctt tccgCgCgC cggaaagcCac caccgaagaa 1740
 aacagcCcgC gcCgCgCgca gtatgtcttt gaagcCagCg tgcCggtatt tggcCgtctgc 1800
 tacgggatgc agaccatggc gatgcagctt ggcCgtcCag tagaaggTtC taatgagcCgt 1860
 gaatttggtt acgCgCaggt cgaagtCgtg accgacagCg cCgtggTtCg cCgtattgaa 1920
 gattcCctga cCgCgCagCg caaacCgctg ctggacCgtg gCgtgagCca cggcCgataaa 1980
 gtgacCgCga ttcCgtcCga ctctCgtgacc gtagcCagca cCgaaagctg cCcgTtCgC 2040
 atcatggcta acgaagaaaa acgcttctac ggcgtacagT tccacCcgga agtgactcac 2100
 acccCgCagC gtatgcCcat gctggagcCgt tttgtcCgtg atatctgCca gtgtgaagcc 2160
 ctgtggacCg cggcgaagat catcCagcCac gccgtggcCg gcattcCgca gcaggtaggc 2220
 gacgataaag tgatcctcCg tctctcCggc ggcCgtggatt ctccCgtaac cCcaatgctg 2280
 ctgcacCcgC cGatcCgTaa aaatctgacc tgtgtattcCg tCgacaacCg cctgctgCgt 2340

ES 2 644 766 T3

```

ctcaacgaag ccgagcaggt gatggacatg tttggcgacc attttggctt gaacatcgtt      2400
cacgtaccgg cagaagatcg cttcctgtcc gcgttgctg gcgaaaacga tccggaagcg      2460
aagcgtaaga tcattggcgg tgtttttgtg gaagtgttcg acgaagaagc gttgaaactg      2520
gaagacgtga aatggctggc gcagggcacc atctaccctg acgtcatcga atctgcggcg      2580
tctgcaaccg gtaaagcgca cgtcatcaaa tctcaccaca atgttggcgg cctgccgaaa      2640
gagatgaaga tggggctggg tgaaccgctg aaagagctgt tcaaagacga agtgcgtaag      2700
attggtctgg agctgggcct gccgtacgac atgctgtacc gtcacccgtt cccggggcgg      2760
ggcctcggcg tacgtgtact ggggtgaagtg aagaaagagt actgcgacct gctgcgcctt      2820
gctgatgcca tcttcattga agagctgcgt aaggcggatc tgtacgaaa agtcagccag      2880
gcgttcaccg tcttctgtcc agtacgctcc gttggcgtaa tgggcgatgg tcgtaagtac      2940
gattgggtgg tctctctgcg tgctgtcgaa accatcgact ttatgaccgc gcaactggcg      3000
cacctgccgt atgacttctt gggctcgtgtt tccaaccgca tcatcaatga agtcaacggg      3060
atttcccggt tgggtgatga catcagcggg aaaccaccgg ctaccattga gtgggaataa      3120

```

<210> 27

<211> 2147

5

<212> ADN

<213> *Salmonella Typhi Ty2*

<400> 27

ES 2 644 766 T3

ttattcgcca gaagcctgcg cttcgggtt gccgtaaate agcaacggct tactctgacc	60
ggcaataacg gactcgtcaa tcaccacttt ttcgacgtct tccatagatg gcaaatcgta	120
catggtatcc agcagcgccg cttcgacgat agaacgcagg ccacggggcac cagttttacg	180
cgccatcgct ttcttggcga tagcgttcag cgcttcgtca cggaattcca gatcgacgcc	240
ttccaggtta aacagcgcct gatactgctt ggtcagcgca tttttcggct ctttcaggat	300
ttgaaccagc gcttcttcgc tgagttcggt cagcgtcgcc accactggca gacgaccgat	360
aaactcagga atcagaccaa atttgatcaa atcttcgggt tcaacctgcg acaacagctc	420
gccttcaactg gctttgtcgg acttcgcttt caccgtcgcg ccaaaaccaa tgccggagcc	480
ggtttcaaca cggttagcga tcactttate cagaccggca aacgcgcgcg cgcagataaa	540
cagaatctta gaggtatcta cctgtaagaa ctctgctgc ggatgtttg gaccgacctg	600
cggtggaacc gcggcgacgg tgccttcgat cagtttcagc aacgcctgct gtacgccttc	660
gccggaaaca tcgcggttaa tggacggatt gtctgattta cgcgaaatct tatcgatttc	720
atcaatgtag acaatcccac gctgcgcttt ttgcacgtcg tagtcgcatt tctgcaacag	780
ttctgaaatg atattctcga cgtcttcccc cagtaacct gcttcggtea gcgtggtegc	840
atccgccata gtgaacggca catccagcaa gcgcgccagc gtttcgcca gcagcgtttt	900
accggaaccg gtcggtcag tcagcagaat gttgcttttg cctaactcga cgccattgct	960

ES 2 644 766 T3

ggatcgccg ttacgcagac gcttgtagtg gttatagacc gccaccgcca gcaactttttt	1020
cgctgctcc tggccgataa cgtaatcgtc caggtgagta cgaatttcat gcggcgctcg	1080
cagcgcaacta cgttcacggt gcggagcaac ttctttaatt tcttcgcgaa taatgtcgtt	1140
acataaatcg acgcattcgt cgcagatata cacggatgga ccggcaatca gcttgcgcac	1200
ttcatgctgg cttttgccgc aaaaagagca gtacaacaat ttgcccgagc catctttgcg	1260
tttatctgtc atgagtcaaa acctcttctt tgttctttgt gccgcacacg acgacgcaaa	1320
tgccattctc agggcgcaagc cgctaatacag cgttgctgccc cccttcatta gtatatacac	1380
aaaatcattc gagctacatc aaggcggcaa ctcagcgact 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 gaccocgatg atgogccata agttcattca tgcgcccttt tactttcaaa	1680
atttcgcggg cgtgaatttc aatatecgtc gcctggccct gatagccgcc cagcggctgg	1740
tggatcatga cgcgagagtt cggcaagcag aaacgtttgc ctttcgcccc ggcagtcagc	1800
agaaacgccc ccatagaggc cgctgtccc atacaaatgg tgctgacgtc tggcttaata	1860
aactgcatgg tgcatagat ggacatcccc gcagtaatta cgcgccagg agaattaatg	1920
tacagataga tatctttttc cgggttttcc gcttccagga acagcatctg cgccacgac	1980
aggttagcca tatggctctc gacctggccg gtcagaaata tgacgcgttc cttaagtaga	2040
cgagaataga tatcaaaaga gcgctcaccg cgtgaggtct gttcaatgac catcggcacc	2100
agcgccatat gaggggcaaa attatctcgt tctccgctgt atgacat	2147

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

5

<400> 28

ES 2 644 766 T3

cctagggcca gcaaaaggcc aggaaccgta aaaaggccgc gttgctggcg tttttccata 60
 ggctccgccc ccctgacgag catcacaaaa atcgacgctc aagtccagagg tggcgaacc 120
 cgacaggact ataaagatac caggcgtttc ccctggaag ctccctcgtg cgctctcctg 180
 ttccgacct gccgcttacc ggatacctgt ccgcctttct cccttcggga agcgtggcgc 240
 tttctcatag ctcaagctgt aggtatctca gttcggtgta ggtcgttcgc tccaagctgg 300
 getgtgtgca cgaaccccc gttcagccc accgctgcgc cttatccggt aactatcgtc 360
 ttgagtccaa cccgtaaga cagcacttat cgccactggc agcagccact ggtaacagga 420
 ttagcagagc gaggtatgta ggcgggtgta cagagttctt 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
 <213> *Salmonella typhimurium*

5

<400> 29

cctaggagat acttaacagg gaagtgagag ggccgcggca aagccglttt tccataggct 60
 ccgccccct gacaagcatc acgaaatctg acgctcaaat cagtgggtggc gaaaccgcac 120
 aggactataa agataccagg cgtttcccc tggcggctcc ctcgctgcgt ctccctgttc 180
 tgcctttcgg tttaccggtg tcattccgct gttatggccg cgtttgtctc attccacgcc 240
 tgacactcag ttccgggtag gcagttcgtc ccaagctgga ctgtatgcac gaaccccccg 300
 ttcagtcoga ccgctgcgcc ttatccggtg actatcgtct tgagtccaac ccggaagac 360
 atgcaaaaagc accactggca gcagccactg gtaattgatt tagaggagtt agtcttgaag 420
 tcatgcgccc gtttaaggcta aactgaaagg acaagttttg gtgactgcgc tccctcaagc 480
 cagttacctc ggttcaaaga gttggtagct cagagaacct tcgaaaaacc gccctgcaag 540
 gcggtttttt cgttttcaga gcaagagatt acgcgcagac caaacgctc tcaagaagat 600
 catcttatta atcagataaa atatttctag gatct 635

10

<210> 30
 <211> 1955
 <212> ADN
 <213> *E. coli*

15

<400> 30

ES 2 644 766 T3

cctaggtttc acctgttcta ttaggtgta catgctgttc atctgttaca ttgtcgatct	60
gttcatggtg aacagcttta aatgcaccaa aaactcgtaa aagctctgat gtatctatct	120
tttttacacc gttttcatct gtgcatatgg acagttttcc ctttgatata taacggtgaa	180
cagttgttct acttttgttt gttagtcttg atgcttcact gatagataca agagccataa	240
gaacctcaga tccttccgta tttagccagt atgttcteta gtgtggttcg ttgtttttgc	300
gtgagccatg agaacgaacc attgagatca tgcttacttt gcatgtcact caaaaatfff	360
gcctcaaaac tggtagagctg aatffffgca gttaaagcat cgtgtagtgt ttttcttagt	420
ccgttaacgta ggtaggaatc tgatgtaatg gttgttggtta tttgtcacc attcattfff	480
atctggttgt tctcaagttc ggttacgaga tccatttgtc tatctagttc aacttggaaa	540
atcaacgtat cagtcgggag gectcgctta tcaaccacca atttcatatt gctgtaagtg	600
tttaaatctt tacttattgg tttcaaaacc cattgggtaa gccttttaaa ctcatggtag	660
ttatfffcaa gcattaacat gaacttaaat tcatcaaggc taatctctat atttgccttg	720

ES 2 644 766 T3

tgagttttct tttgtgtag ttcttttaaat aaccactcat aaatcctcat agagtatttg	780
ttttcaaaag acttaacatg ttccagatta tattttatga atttttttaa ctggaaaaga	840
taaggcaata tctcttcaact aaaaactaat tctaattttt cgcttgagaa cttggcatag	900
tttgtccact ggaaaatctc aaagccttta accaaaggat tcctgatttc cacagttctc	960
gtcatcagct ctctggttgc tttagctaat acaccataag cattttccct actgatgttc	1020
atcatctgag cgtattggtt ataagtgaac gataccgtcc gttctttcct tgtagggttt	1080
tcaatcgtgg ggttgagtag tgccacacag cataaaatta gcttggttcc atgctccggt	1140
aagtcatagc gactaatcgc tagttcattt gctttgaaaa caactaatc agacatacat	1200
ctcaattggt ctaggtgatt ttaatcacta taccaattga gatgggctag tcaatgataa	1260
ttactagtcc ttttcctttg agttgtgggt atctgtaa atctgctagac ctttgctgga	1320
aaacttgtaa attctgctag accctctgta aattccgcta gacctttgtg tgtttttttt	1380
gtttatattc aagtggttat aatttataga ataaagaaag aataaaaaaa gataaaaaga	1440
atagatccca gccctgtgta taactcacta ctttagtcag ttccgcagta ttacaaaagg	1500
atgtcgcaaa cgctgtttgc tctctacaa aacagacott aaaaccetaa aggettaagt	1560
agcaccctcg caagctcggg caaatcgctg aatattcctt ttgtctccga ccatcaggca	1620
cctgagtcgc tgtctttttc gtgacattca gttcgtcgcg ctcacggetc tggcagtgaa	1680
tgggggtaaa tggcactaca ggcgcctttt atggattcat gcaaggaaac taccataat	1740
acaagaaaag cccgtcacgg gcttctcagg gcgttttatg gcgggtctgc tatgtggtgc	1800
tatctgactt tttgctgttc agcagttcct gccctctgat tttccagtct gaccacttcg	1860
gattatcccg tgacaggtea ttcagactgg ctaatgcacc cagtaaggca gcggtatcat	1920
caacaggett acccgtctta ctgtcaaccg gatct	1955

<210> 31
 <211> 1686
 <212> ADN
 <213> *Escherichia coli*
 <400> 31

5

ES 2 644 766 T3

cacttttgtt acccgccaaa caaaacccaa aaacaaccca taccacaacc aataaaacac 60
 caaaacaaga caaataatca ttgattgatg gttgaaatgg ggtaaacttg acaaacaaac 120
 ccacttaaaa cccaaaacat acccaaacac acaccaaaaa aacaccataa ggagttttat 180
 aaatgttggt attcattgat gacggttcaa caaacatcaa actacagtgg caggaaagcg 240
 acggaacaat taaacagcac attagcccga acagcttcaa acgcgagtgg gcagtctctt 300
 ttggtgataa aaaggtcttt aactacacac tgaacggcga acagtattca tttgatccaa 360
 tcagcccgga tgctgtagtc acaaccaata tcgcatggca atacagcgac gttaatgtcg 420
 ttgcagtgca tcacgcctta ctgaccagtg gtctgccggg aagcgaagtg gatattgttt 480

 gcacacttcc tctgacagag tattacgaca gaaataacca acccaatacg gaaaatattg 540
 agcgtaagaa agcaaaacttc cggaaaaaaa ttacattaaa tggcggggat acattcacia 600
 taaaagatgt aaaagtcatt cctgaatcta taccggcagg ttatgaagtt ctacaagaac 660
 tggatgagtt agattcttta ttaattatag atcteggggg 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 atggttatag 1020
 gcgggtggcgc agaattaata tgcgatgcag taaaaaaaca cacacagatt cgtgatgaac 1080
 gttttttcaa aaccaataac tctcaatatg atttagttaa cggatgtat ctcataggta 1140
 attaatgatg gacaagcgca gaaccattgc cttcaaaacta aatccagatg taaatcaaac 1200
 agataaaatt gtttgtgata cactggacag tatcccgcaa ggggaacgaa gccgccttaa 1260
 ccgggcccga ctgacggcag gtctggcctt atacagacaa gatccccgga ccccttctct 1320
 tttatgtgag ctgctgacga aagaaaccac attttcagat atcgtgaata tattgagatc 1380
 gctatttcca aaagagatgg ccgattttaa ttcttcaata gtcactcaat cctcttcaca 1440
 acaagagcaa aaaagtgatg aagagaccaa aaaaaatgcg atgaagctaa taaattaatt 1500
 caattattat tgagttccct ttatccacta tcaggctgga taaagggaac tcaatcaagt 1560
 tattttctta ccagtcatta cataatcgtt attatgaaat aatcgtttgc actgtctctg 1620
 ttattcaggc aatttcaata aaggcacttg ctcaagctct gtcattttct gaaactcttc 1680
 atgctg 1686

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

ES 2 644 766 T3

<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 tccataaaag	240
gcgcctgtag tgccatttac cccattcac tgccagagcc gtgagcgcag cgaactgaat	300
gtcacgaaaa agacagcgac tcaggtgcct gatggtcgga gacaaaagga atattcagcg	360
atattgcc	367

5 <210> 33
 <211> 459
 <212> ADN
 <213> *Escherichia coli*

10 <400> 33

ttctgtggta gcacagaata atgaaaagtg tgtaaagaag ggtaaaaaaaa accgaatgcg	60
aggcatccgg ttgaaatagg ggtaaacaga cattcagaaa tgaatgacgg taataaataa	120
agttaatgat gatagcggga gttattctag ttgcgagtga aggttttgtt ttgacattca	180
gtgctgtcaa atacttaaga ataagttatt gattttaacc ttgaattatt attgottgat	240
gttaggtgct tatttcgcca ttccgcaata atcttaaaaa gttcccttgc atttacattt	300
tgaaacatct atagcgataa atgaaacatc ttaaaaagttt tagtatcata ttcgtggtgg	360
attattctgc atttttgggg agaatggact tgccgactga ttaatgaggg ttaatcagta	420
tgcagtggca taaaaagca aataaaggca tataacaga	459

15 <210> 34
 <211> 734
 <212> ADN
 <213> *Shigella flexneri* 2a cepa CVD 1208s

20 <400> 34

ES 2 644 766 T3

```

catatgattg acctgaatga atatacagta ttggaatgca ttatccggag tgttgtgtaa      60
caatgtctgg ccaggtttgt ttcccggaac cgaggtcaca acatagtaaa agcgcatttg      120
gtaatggtac aatcgcgctt ttacacttat tcagaacgac aggagacacg aacatggcca      180
gcagaggcgt aaacaaggtt attctcgttg gtaatctggg tcaggacccg gaagtacgct      240
acatgccaaa tgggtggcga gttgccaaaca ttacgctggc tacttccgaa tcctggcgtg      300
ataaagcgac cggcgagatg aaagaacaga ctgaatggca ccgcttctgt ctgttcggca      360
aactggcaga agtggcgagc gaatatctgc gtaaagggtc tcaggtttat atcgaaggtc      420
agctgcgtac ccgtaaattg accgatcaat ccggtcagga tcgctacacc acagaagtcc      480
tggtgaaagt tggcggcacc atgcagatgc tgggtggtcg tcagggtggt ggcgctccgg      540
cagggtggcaa tatcgggtgt ggtcagccgc agggcggttg gggtcagcct cagcagccgc      600
aggggtggcaa tcagttcagc ggccggcgcc agtctcgccc gcagcagtcc gctccggcag      660
cgccgtctaa cgagccgccg atggactttg atgatgacat tccgttctga tttgtcatta      720
aaacaatagc tagc                                                                734

```

```

5 <210>35
  <211> 1467
  <212> ADN
  <213> Salmonella Paratyphi A 9150

10 <220>
    <221> misc_feature
    <223> guaB

    <400> 35

```

ES 2 644 766 T3

```

atgctacgta tcgctaaaga agccctgacg tttgacgacg tcctccttgt tcccgctcac      60
tccaccgttt tgccgaatac tgccgatctc agcacgcagt tgacgaaaac tattcgtctg      120
aatattccta tgctttctgc ggcgatggac accgtgacgg aagcgcgcct ggcaattgcc      180
ctggcccagg aaggcggcat tggttttatc cacaaaaaca tgtccattga gcgccaggcg      240
gaagaagttc gccgcgtgaa gaaacacgag tccggcgtag tgaccgacct gcagaccgtc      300
ctgccaacca ccacgttgca tgaagtgaaa gccctgaccg agcgtaacgg ttttgccggc      360
tatccggtgg tgactgaaga taacgagctg gtggggatca tcaccggtcg tgacgtgcgt      420
tttgtgactg acctgaacca gccggtaagt gtctacatga cgccgaaaga gcgtctggtg      480
accgttcgtg aaggcgaagc ccgtgaagtc gtgctggcaa aaatgcacga aaaacgcgta      540
gaaaaagcgc tggtcgttga tgataacttc catctgcttg gcatgattac cgtaaaagat      600
ttccagaaaag cggaacgtaa accaaactcc tgtaaagatg agcagggccg tttacgtgtc      660
ggcgcggggg tcggcgcagg cgogggcaac gaagagcggg ttgacgcgct ggtggcggca      720
ggcgttgacg tactgctgat cgactcctct cacggtcact ctgaaggcgt gttgcaacgt      780
atccgtgaga cgcgtgctaa atatcctgac ctgcaaatca tcggcggcaa cgttgcgacg      840
ggcgcaggcg ctgcgcact ggcggaagcc ggttgacgag cggtgaaagt gggtatcggc      900
ccgggctcca tctgtaccac tcgtatcgtg actgggtgtg gcgttcgca gatcacgct      960
gtttccgacg cggtagaagc gctggaagcc accggaattc cggttatcgc tgacggcgggt      1020
atccgtttct ccggcgacat cgccaaagcc atcgccgcag gcgcgagcgc cgtgatggtg      1080
ggetctatgc tggccggtac cgaagaatcc ccgggcgaaa tcgaactcta ccagggccgt      1140
tcgtacaaat cttaccgcg catgggctcg ctgggcgcga tgtccaaagg ttctccgac      1200
cgttacttoc agagcgacaa cgccgctgac aaactggtgc cggaaaggtat cgaaggccgc      1260
gtagcctata aaggtcgcct gaaagagatc attcaccagc agatgggcgg cctgcgctcc      1320
tgtatggggc tgaccggtg tgctaccatc gacgaactgc gtactaaagc ggagtttgtg      1380
cgtatcagcg gtgcgggtat ccaggaaagc cacgttcacg acgtgaccat caccaaagag      1440
tcccgaact accgtctggg ctctga      1467

```

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

5

<220>
 <221> misc_feature
 <223> guaA

10

<400> 36

ES 2 644 766 T3

```

atgacggaaa acattcataa gcatcgcac ctcattctgg acttcgggtc tcagtacact      60

caactggttg cgcgccgctg gcgtgagctg ggtgtttact gcgaactgtg ggcgtgggat      120

gtgacagaag cacaaattcg tgacttcaac ccaagcggca ttattcttcc cggcggccccg      180

gaaagcacca ccgaagaaaa cagcccgcgc gcgccgcagt atgtctttga agcaggcgtg      240

ccggtatttg gcgtttgcta tggatgacg accatggcga tgcagcttgg cggtcagtga      300

gaaggttcta atgagcgtga atttggttat gcgcaggtcg aagtgttgac cgacagcgcg      360

ctggttcgcg gtattgaaga ttccctgacc gcagacggca aaccgctgct ggacgtgtgg      420

atgagccacg gcgataaagt gacggcgatt ccgtccgact tcgtgaccgt cgccagcacc      480

gagagctgcc cgttcgccat catggctaac gaagaaaaac gcttctacgg cgtacagttc      540

caccgcgaag tgaccacac cgcgccggg atgcgcacgc tggagcgttt tgtgctgat      600

atctgccagt gtgaagcgtt gtggacgcc gcgaagatca tcgacgacgc cgtggcgcgc      660

attcgcgagc aggtaggcga cgataaagt atcctcggtc tctccggcgg cgtggattct      720

tccgtcaacc caatgctgct gcaccgcgc atcggtaaaa atctgacctg tgtattcgtc      780

gacaacggcc tgctgctct caacgaagcc gagcaggtga tggacatgtt tggcgaccat      840

tttggcctga atatcgttca cgttcggcgc gaagagcgtt tcctgtccgc gttggetggc      900

gaaaacgata ccgaagcga gcgtaagatc attggccgtg tttttgtgga agtgttcgac      960

gaagaagcgt tgaaactgga agacgtgaaa tggctggcgc agggcaccat ctaccctgac     1020

gtcatcgagt ctgcggcgtc tgcaaccggt aaagcgcacg tcatcaaac tcaccacaat     1080

gttggcggcc tgccgaaaga gatgaagatg gggctggttg aaccgctgaa agagctgttc     1140

aaagacgaag tgcgtaagat tggctctggag ctgggcctgc cgtacgacat gctgtaccgt     1200

catccgttcc cggggccggg cctcggcgtg cgtgtactgg gtgaagtga gaaagagtac     1260

tgcgacctgt tgcgccgtgc tgaccgcac ttcatgaag agctgcgtaa ggcggatctg     1320

tacgacaaaag tcagccaggc gttcaccgtc ttctgcccag tacgctccgt tggcgtaatg     1380

ggcgatggtc gtaagtacga ttgggtggtc tcctcgcgtg ctgtcgaaac catcgacttt     1440

atgactgcgc actgggcgca tctgccgtat gacttccctg gtcgtgtttc caaccgcac     1500

atcaatgaag tcaacgggat ttcccggtg gtgtatgaca tcagcggtaa accaccggct     1560

accattgagt ggaataa                                     1578

```

<210> 37
 <211> 624
 <212> ADN
 <213> *Salmonella Paratyphi* A 9150

5

<220>
 <221> misc_feature
 <223> clpP

10

ES 2 644 766 T3

<400> 37

```
atgtcataca gcggagaacg agataatttg gccctcata tggcgtggt gcgatggtc      60
attgaacaga cctcacgcgg tgagcgctct tttgatatct attctcgtct acttaaggaa    120
cgcgtcatat ttctgaccgg ccaggtcgaa gaccatatgg ctaacctgat cgtggcgcag    180
atgctgttcc tgggaagcgg aaaccggaa aaagatatct atctgtacat taattctcct    240
ggcggcgtaa ttactgcggg gatctccatc tatgacacca tgcagtttat taagccagac    300
gtcagcacca tttgatatgg acaggcggcc tctatggggg cgtttctgct gactgccggg    360
gcgaaaggca aacgtttctg cttgccgaac tctcgcgtca tgatccacca gccgctgggc    420
ggctaccagg gccaggcgac ggatattgaa attcacgccc gcgaaatfff gaaagtaaaa    480
gggcgcctga atgaacttat ggcgcctcat acgggtcaat ctcttgagca gattgaacgt    540
gatactgagc gcgatcgctt cctctccgcg cctgaagcgg tagagtacgg tttggttgac    600
tcaatfffga cccatcgtaa ttga                                           624
```

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

10 <220>
<221> misc_feature
<223> clpX

15 <400> 38

ES 2 644 766 T3

```

atgacagata aacgcaaaga tggctcgggc aaattgttgt actgctcttt ttgcggaaca    60
agccagcatg aagtgcgcaa gctgattgcc ggtccatccg tgtatatctg cgacgaatgc    120
gtcgaattat 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 aactggtgca gaaatgcgac tacgacgtgc aaaaagcgca gcgtgggatt    540
gtctacattg atgaaatoga taagatttcg cgtaaatacag acaatccgtc cattaaccgc    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 gtcgcaggtt gaaccggaag atttgatcaa atttggtctg    900
attcctgagt ttatcggctg tctgccagtg gtggcgacgc tgaacgaact cagcgaagaa    960

gcgctgattc aaatcctgaa agagccgaaa aatgcgctga ccaagcagta tcaggcgcctg    1020
ttaaacctgg aaggcgtcga tctggaattc cgtgacgaag cgctggacgc tatcgccagg    1080
aaagcaatgg cgcgtaaaac cggtgcccgt ggtctgcggt ctatcgtcga agcggcgcctg    1140
ctggatacca tgtacgattt gccatctatg gaagacgtcg aaaaagtggg gatcgacgag    1200
tccgttattg ccggtcagag taagccgttg ctgatttacg gcaaaccgga agcgcaggct    1260
tctggcgaat aa                                                    1272

```

5 <210> 39
 <211> 1272
 <212> ADN
 <213> *Salmonella Typhi* Ty2

10 <220>
 <221> misc_feature
 <223> clpX gene

<400> 39

ES 2 644 766 T3

```

atgacagata aacgcaaaga tggctcgggc aaattgttgt actgctcttt ttgcggcaaa      60
agccagcatg aagtgcgcaa gctgattgcc ggtccatccg tgtatatctg cgacgaatgc      120
gtcgaatttat gtaacgacat tattcgcgaa gaaattaaag aagttgctcc gcaccgtgaa      180
cgtagtgcgc tgccgacgcc gcatgaaatt cgtactcacc tggacgatta cgttatcggc      240
caggagcagg cgaaaaaagt gctggcgggtg gcggtctata accactacaa gcgtctgcgt      300
aacggcgata ccagcaatgg cgtcgaagta ggcaaaagca acattctgct gactggaccg      360
accggttccg gtaaaacgct gctggcggaa acgctggcgc gcttgcggga tgtgccgttc      420
actatggcgg atgcgaccac gctgaccgaa gcgggttacg tgggggaaga cgtcgagaat      480
atcattcaga aactgttgca gaaatgcgac tacgacgtgc aaaaagcgca gcgtgggatt      540
gtctacattg atgaaatcga taagatttcg cgtaaatacag acaatccgtc cattaaccgc      600
gatgtttccg gcgaaggcgt acagcaggcg ttgctgaaac tgategaagg caccgtcggc      660
gcggttccac cgcagggcgg tcgcaaacat ccgcagcagg agttcttaca ggtagatacc      720
tctaagattc tgtttatctg cggcggcgcg tttgccggtc tggataaagt gatcgctaac      780
cgtgttgaaa ccggctccgg cattggtttt ggcgcgacgg tgaaagcgaa gtccgacaaa      840
gccagtgaag gcgagctggt gtcgcaggtt gaaccggaag atttgatcaa atttggtctg      900
attcctgagt ttatcggctg tctgccagtg gtggcgacgc tgaacgaact cagcgaagaa      960
gcgctgggtc aaatcctgaa agagccgaaa aatgcgctga ccaagcagta tcaggcgtg      1020
tttaacctgg aaggcgtcga tctggaattc cgtgacgaag cgctgaacgc tatcgccagg      1080
aaagcgatgg cgcgtaaaac tgggtgccctg ggctgcggt ctatcgtcga agcggcgtg      1140
ctggatacca tgtacgattt gccatctatg gaagacgtcg aaaaagtggg gattgacgag      1200

tccgttattg ccggtcagag taagccggtg ctgatttacg gcaaaccgga agcgcaggct      1260
tctggcgaat aa                                                                1272

```

5 <210> 40
 <211> 624
 <212> ADN
 <213> *Salmonella Typhi* Ty2

10 <220>
 <221> misc_feature
 <223> clpP gene

<400> 40

ES 2 644 766 T3

atgtcataca gcggagaacg agataatttg gccctcata tggcgctggt gccgatggtc 60
attgaacaga cctcacgcgg tgagcgctct tttgatatct attctcgtct acttaaggaa 120
cgcgtcatat ttctgaccgg ccaggctgaa gaccatatgg ctaacctgat cgtggcgag 180
atgctgttcc tggaagcggg aaaccggaa aaagatatct atctgtacat taattctcct 240
ggcggcgtaa ttactgcggg gatgtccatc tatgacacca tgcagtttat taagccagac 300
gtcagcacca tttgtatggg acaggcggcc tctatggggg cgtttctgct gactgcggg 360
gcgaaaggca aacgtttctg cttgccgaac tctcgcgtca tgatccacca gccgctgggc 420
ggctatcagg gccaggcgac ggatattgaa attcacgcc gccgaaatctt gaaagtaaaa 480
gggcgcatga atgaacttat ggcgcatcat acgggtcaat ctcttgagca gattgaacgt 540
gatactgagc gcgatcgctt cctctccgcg cctgaagcgg tagagtacgg tttggttgac 600
tcaatcttga cccatcgtaa ttga 624

5 <210> 41
<211> 32
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Cebador oligonucleotídico químicamente sintetizado

<400 41
tcacgcacac gctgcagggt gttgtgatt tc 32

15 <210> 42
<211> 47
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Cebador oligonucleotídico químicamente sintetizado

<400> 42
gaactcgaa gcagctccag cacctaatga tgaattgaa gccatgc 47

25 <210> 43
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> Cebador oligonucleotídico químicamente sintetizado

<400> 43
gctggagctg cttcgaagt c 21

35 <210> 44
<211> 33
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<223> Cebador oligonucleotídico químicamente sintetizado

45 <400> 44
ctcgagtcc ggggatccgt cgacctgcag ttc 33

ES 2 644 766 T3

<210> 45
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> Cebador oligonucleotídico químicamente sintetizado
 <400> 45
 10 ggatccgcta tgaacaagtc ctgataacag aggt 34
 <210> 46
 <211> 46
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador oligonucleotídico químicamente sintetizado
 20 <400> 46
 ctcgagftaa cgagactcct ggaaagatgc ttccggtgaa atctgc 46
 <210> 47
 <211> 2363
 25 <212> ADN
 <213> *Salmonella enterica* serovariedad *Typhimurium*
 <400> 47
 tcacgcacac gctgcagggtt gttggttgatt tegtccagcg cgccttcagt ggtctgcgca 60
 atggagatac cgtcgttagc gttacgggaa gcctgagtca gacctttgat gttcgcggta 120
 aaacggtttag caatcgccctg acctgccgca tegtctttcg cgctggtgat acgcagaccg 180
 gaagacagac gctcgatagc ggtgcccaga gcggactggg atttgttcag gttattctgg 240
 gtcaacagcg acaggctggt tgtattaatg acttgtgcc a tgatcttttc cttatcaatt 300
 acaacttgat gttattgggc tgttgcccac ggtttctcac cgtaaccctt gtatcggcac 360
 30 ctgaatttgc aactttagaa aatttttcac ttccccgat ctttttctta ggcggcgaaa 420

ES 2 644 766 T3

tagccgcttt atgcatcatt attccgcgca ttatTTTTgc aaaattatca ttaaactttg	480
cctccagatt gccgataacg cgcttaacta ctgtttgcaa tcaaaaagga agaaggcatg	540
gottcaattt catcattagg tgtgggatca aacttaccgt tagaccagtt gttgacagac	600
ctgacaaaaga acgaaaaagg acgcttaacg ccaattacca aacagcagag cgcgaattcg	660
gcaaagctaa ccgcctatgg cacattgaaa agcgcattag aaaattcca gacggcaaat	720
accgcgttaa ataaagcggg tttatttaag tctaccgtgg cgtccagcac cactgaagat	780
ctcaaagtca gtactaccgc tggcgtgccc gcagggactt ataagattaa cgtaaccag	840
cttgccgcgg cacagtcgct gggacaaaa accaccttcg cgaccaccaa agagcagttg	900
ggcgatacgt cggtcacgtc ccggacaatt aaaattgaac agccgggacg taaagagccg	960
ctggaaatta agctggataa aggcgacacc tccatggagg cgatccgtga cgccatcaat	1020
gacgccgaca gcggtatcgc cgcctatc gttaagggtca aagagaacga attccagttg	1080
gtgcttaccg ccaatagcgg taccgacaat acgatgaaga tcacgggtgga aggcgataca	1140
aaacttaacg atctactcgc ttatgacagc accaccaata ccggcaatat gcaagagctg	1200
gtgaaagcag aaaacgcgaa gctgaacgta aacggcatcg acattgagcg tcagagcaat	1260
accgtaaccg acgcccctca gggaaattacg ctaccctga ccaagaaagt gaccgacgcg	1320
accgtgacgg taacgaaaga tgataccaag gcgaaagagg cgattaaatc ctgggtggat	1380
gcctataact cgctggtgga tacctttagc tcgttaacca aatataccgc cgttgagccg	1440
ggcgaagaag ccagcgataa aaacggcgcg ctgttaggcg atagtgtggt tcgtactatc	1500
cagaccggga ttccggcaca atttgccaat agcggcagta attctgcgct caaaacaatg	1560
gcggaaattg gcatcaccca ggatgggact tccggcaaac tgaagattga tgatgataag	1620
ctgaccaaag tactgaaaga taacacagcc gcagcgcgtg agctgctggt aggcgatggt	1680
aaagaaacgg gtatcacccac caaaattgcc accgaagtga aaagttatct ggcggatgac	1740
ggcattattg ataatgcgca ggacaacggt aacgccacgc tgaaaagcct gacaaaacag	1800
tacctgtccg ttagcaacag catcgatgaa accgttgccc gttacaagge ccagtttacc	1860
caactggata ccatgatgag taagctgaat aacaccagta gttatttgac ccagcaattt	1920
acagctatga acaagtccg ataacagagg tcaccatgta caccgcgagc ggtatcaaag	1980
cttatgcgca agtcagcgtg gaaagcgcg tgatgagcgc cagcccgcac cagttgattg	2040
aaatgttggt tgatggcgcg aatagcgtc tggcgcgcgc tcgctggtt ttagaacaag	2100
gcgatggtg cgcgaaagggt gaagcgttaa gcaaagccat caatattatc gataacgggc	2160
tgaaagccgg cctcgatcag gaaaaaggcg gtgagattgc gacgaatctt tccgagctat	2220
acgactatat gattcgcctg ttaactgcagg ctaatttgcg taacgacgct caggccatcg	2280
aagaagtgga agggttactc agcaatattg cagaagcctg gaagcagatt tcaccgaaag	2340
catctttcca ggagtctcgt taa	2363

ES 2 644 766 T3

<210> 48
 <211> 2363
 <212> ADN
 <213> *Salmonella enterica* serovariedad *Paratyphi A*

5

<400 48

```

tcacgcacac gctgcagggt gttgttgatt tcgttcageg cgccttcagt ggtctgcgca      60
atggagatac cgtcgttagc gttacgggaa gcctgagtcg gacctttgat gttcgcgggtg      120
aaacggttag caattgcctg acctgccgca tcgtctttog cgtctgtgat acgcagaccg      180
gaagacagac gctcgatagc ggtgccca ga gcggaactggg atttgttcag gttattctgg      240
gtcaacagcg acaggctgtt tgtattaatg acttgtgccg tgatcttttc cttatcaatt      300
acaacttgat gttattgggc tgttgcccac ggtttctcac cgtaaccctt gtatcggcac      360
ctgaatttog aactttagaa aatttttcac ttccccgat ctttttctta ggcggcgaaa      420
tagccgcttt atgcatcatt attccgcgca ttatttttgc aaaattatca ttaaactttg      480
cctccagatt gccgataacg cgtttaacta ctgtttgcaa tcaaaaagga agaaggcatg      540
gcttcaatth catcattagg tgtgggatca aacttaccgt tagaccagt gttgacagac      600
ctgacaaaaga acgaaaaagg acgcttaacg ccaattacca aacagcagag cgcgaattcg      660
gcaaaagtaa ccgcctatgg cacattgaaa agcgcattag aaaaattcca gacggcaaat      720
accgcgttaa ataaagcggg tttattttaag tctaccgtgg cgtccagcac gacagaggac      780
ctcaaagtea gtactaccgc aggcgctgcc gcagggactt ataagattag cgtaaccacg      840
cttgccgccc cgcagtcgct ggcgacaaaa accaccttcg caaccaccaa agagcagttg      900
ggcgatacgt cggtcacgtc ccggacaatt aaaattgaac agccgggacg taaagagccg      960
ctggaaatta agctggataa aggcgacacc tccatggagg cgatccgtga cgccatcaat     1020
gacgccgaca gcggtatcgc cgccagtatc gttaaaggtca aagagaacga attccagttg     1080
gtgcttaccg ccaatagcgg taccgacaat acgatgaaga tcacgggtga aggcgataca     1140
aaacttaacg atctactcgc ttatgacagc accaccaata ccggcaatat gcaagagctg     1200
gtgaaagcag aaaacgcgaa gctgaacgta aacggcatcg acattgagcg tcagagcaat     1260
accgtaaccg acgcccctca ggggaattacg ctcaccctga cgaagaaagt gaccgacgcg     1320
accgtgacgg taacgaaaga tgataccaag gcgaaagagg cgattaaatc ctgggtggat     1380
gcctataact cgctggtgga taccttttagc tcgttaacca aatataccgc cgttgagccg     1440
ggcgaagaag ccagcgataa aaacggcgcg ctgttaggcg atagtgtggt tcgtactatc     1500
cagaccggga ttcgggcaca atttgccaat agcggcagta attctgcggt caaaacaatg     1560
gcggaaattg gcatcaccca ggatgggact tccggcaaac tgaagattga tgatgataag     1620
ctgaccaagg tactgaaaga taacacagcc gcagcgcgtg agctgctggt aggcgatggt     1680
    
```

ES 2 644 766 T3

```

aaagaaacgg gtatcaccac caaaattgcc accgaagtga aaagttatct ggaggatgac 1740
ggcattattg ataatgcgca ggacaacggt aacgccacgc tgaaaagcct gacaaaacag 1800
tacctgtccg ttagcaacag catcgatgaa accggtgccc gttacaaggc ccagtttacc 1860
caactggata ctatgatgag taagctgaat aacaccagta gttatttgac ccagcaattt 1920
acagctatga acaagtccctg ataacagagg tcaccatgta caccgcgagc ggtatcaaag 1980
cttatgcgca agtcagcgtg gaaagcgccg tgatgagcgc cagcccgcac cagttgattg 2040
aaatgttggt tgatggcgcg aatagcgcctc tggtgccgcgc tcgcctgttt ttagaacaag 2100
gcgatgttgt cgcgaaaggt gaagcgtaa gcaaagccat caatattatc gataacgggc 2160
tgaaagccgg cctcgatcag gaaaaaggcg gtgagattgc gacgaatctt tccgagctat 2220
acgactatat gattcgccgt ttactgcagg ctaatttgcg taacgacgct caggccatcg 2280
aagaagtgga agggttactc agcaatattg cagaagcctg gaagcagatt tcaccgaaag 2340
catctttcca ggagtctcgt taa 2363

```

<210>49

<211> 2363

5

<212> ADN

<213> *Salmonella enterica* serovariedad *Typhi* cepa Ty2

<400 49

ES 2 644 766 T3

tcacgcacac gctgcaggtt gttggttgatt tegtccagcg cgccttcagt ggtctgcgca	60
atggagatac cgtcgttagc gttacgggaa gcctgagtca gacctttgat gttcgcggta	120
aaacggttag caategcctg tectgcccga tegtctttcg cgtcgttgat acgcagaccg	180
gaagacaaac gctcgatagc agtgcccagt ggggactggg atttgttcag gttattctgg	240
gtcaacagcg acaggctggt tgtattaatg acttgtgcca tgatcttttc cttatcaatt	300
acaacttgat gttattgggc tgttgcccac ggtttctcac cgtaaccctt gtatcggcac	360
ctgaatttcg aactttagaa aatttttcac ttccccgat ctttttctta ggcggcgaaa	420
tagccgcttt atgcatcatt attccgcgca ttatttttgc aaaattatca ttaaactttg	480
cctccagatt gccgataacg cgcttaacta ctgtttgcaa tcaaaaagga agaaggcatg	540
gcttcaattt catcattagg tgtgggatca aacttaccgt tagaccagtt gttgacagac	600
ctgacaaaaga acgaaaaagc acgcttaacg ccaattacca aacagcagag cgcgaattcg	660
gcaaagctaa ccgcctatgg cacattgaaa agcgcattag aaaaattcca gacggcaaat	720
accgcgttaa ataaagcggg tttatttaag tctaccgtgg cgtccagcac gacagaggac	780
ctcaaagtca gtactaccgc aggcgctgcc gcagggactt ataagattag cgtaaccocag	840
cttgccgccg cgcagtcgct ggcgacaaaa accaccttcg caaccaccaa agagcagttg	900
ggcgatacgt cggtcacatc ccggacaatt aaaattgaac agccgggacg taaagagccg	960
ctggaatta agctggataa aggcgacacc tccatggagg cgatccgtga cgccattaat	1020

ES 2 644 766 T3

gacgccgaca gcggtatcgc cgccagtatc gttaaggcca aagagaacga attccagttg 1080
 gtgcttaccg ccaatagcgg taccgacaat acgatgaaga tcacgggtgga aggcgatata 1140
 aaacttaacg atctactcgc ttatgacagc accaccaata ccggcaatat gcaagagctg 1200
 gtgaaagcag aaaacgcgaa gctgaacgta aacggcatcg acattgagcg tcagagcaat 1260
 accgtaaccg acgcccctca ggggaattaca ctcacctga ccaagaaagt gaccgacgcg 1320
 accgtgacgg tgacgaaaga tgataccaag gcgaaagagg cgattaaatc ctgggtggat 1380
 goctataact cgctgggtgga tacttttagc tcattaacta aatataccgc cggtgagccg 1440
 ggcgaagaag ccagcagataa aaacggcgcg ctgttagcgg atagtgtggt tcgtgctatc 1500
 cagaccggga ttcgggcaca atttgccaat agcggcagta attctgcgtt caaaacaatg 1560
 gcggaaattg gcatcaccca ggatgggact tccggcaaac tgaagattga cgatgataag 1620
 ctgaccaagg tactgaaaga taacaaggcc gcagcgcgtg agctgctggt aggcgatggt 1680
 aaagaaacgg gtatcaccac caaaattgcc accgaagtga aaagttatct ggcggatgac 1740
 ggcattattg ataatgcgca ggacaacggt aacgccacgc tgaaaagcct gacaaaacag 1800
 tacctgtcgg ttagcaacag catcgatgaa accggtgccc gttacaaggc ccagtttacc 1860
 caactggata ccatgatgag taagctgaat aacaccagta gttatttgac ccagcaattt 1920
 acagctatga acaagtccctg ataacagagg tcaccatgta caccgcgagc ggtatcaaag 1980
 cttatgcgca agtcagcgtg gaaagcgccg tgatgagcgc cagcccgcac cagttgattg 2040
 aatgttggtt tgatggcgcg aatagcgcctc tggcgcgcgc tcgcctgttt ttagaacaag 2100
 gcgatggtgt cgcgaaaggt gaagcgttaa gcaaagccat caatattatc gataacgggc 2160
 tgaaaagccgg cctcgatcag gaaaaaggcg gtgagattgc gacgaatctt tccgagctat 2220
 acgactatat gattcgccgt ttactgcagg ctaatttgcg taacgacgct caggccatcg 2280
 aagaagtgga aaggttactc agcaatattg cagaagcctg gaagcagatt tcaccgaaag 2340
 catctttcca ggagtctcgt taa 2363

<210>50
 <211> 2365
 <212> ADN
 <213> *Salmonella enterica* serovariedad *Enteritidis*

5

<400> 50

ES 2 644 766 T3

tcacgcacac gctgcagggt gttggtgatt tcattcagcg caccttcagt ggtctgcgca	60
atagaaatgc cgtcgtttagc gttacgggaa gcctgagtca gacctttgat attagaagtg	120
aagcggttag caatcgectg gcctgccgca tcgtctttcg cgctggtgat acgcagacca	180
gaggacagac gctcaatagc ggaactcagt gaggactgag atttgttcag gttattctgg	240
gtcaacagcg acaggetggt tgtattaatg acttggtcca tgatcttttc cttatcaatt	300
acaacttgat gttattgggc tgttgcccac ggtttctcac cgtaaccett gtatcggcac	360

ES 2 644 766 T3

ctgaatttcg aacttttagaa aatittttcac ttcccccgat cttttttotta gcctgocgaaa 420
 tagccgcttt atgcatcatt attocacgca ttattttttgc aaaattatca ttaaactttg 480
 cttccagatt gccgataacg cgtttaacta ctgtttgcaa tcgaaaggaa gatggcatgg 540
 cttcaatttc atcattaggt gtaggggtcaa acttaoctct ggattcaactg ctgactaaac 600
 tgaccaacgc tgaaaaagga cgtttaacgc cgatcacaca gcagcagagt gctaatacgg 660
 cccgtctaac gccatacggg acttttaaaa gtgcactgga gaagtttcaa acagcaaaaa 720
 cggcggttaa taaagccgat ctgttttaaaa gtacgaatgt caccagcagt acagaagacc 780
 tgaaagtctc gacggaagct ggggccgcac ctggaactta tgtggttagc gtaactcagt 840
 tagcacaagc acaatctttg agtacagcaa ccaaaattac atctacaaa gaagtgcctg 900
 gagataccac atctgacagc cgtaccataa aaattgaaca gaaaggccgt aaagaaccac 960
 ttgaaatcaa gctcactaaa gatcaaacct ctttagaggg tatccgtgac gccattaatg 1020
 atgctgacag tggatattcc gccagtatcg ttaaagttaa agaaggcgat taccagcttg 1080
 tactgaccgc agatagtggc acggataatc aaatgactat ctctgtggaa ggcgatagca 1140
 aactcagcga tctgttgctc tatgatagta gtactggcac gggcaaaatg aagcaactgg 1200
 ttgctgcaga taatgctttg ttaaccgtta acggcattga tattgagcga ccgagtaata 1260
 aaactactga cgctccacaa gccgtgacgc ttgaactaac caaagaagta aaagatgccc 1320
 gtattaccgt cacaaaagat aatgaaaagg cgaccgaagc cgtcaaaagt tgggttgatg 1380
 cctacaactc actgcttgat accttttagt cattaacaaa atatacagag gttgatccag 1440
 gggctgaaga acaggacaaa aacaacggtg cactacttgg agataccgtg gtgcgaacga 1500
 ttcaaaactg aatccgcgct cagttcgcta atggtgcaag tacaggtaca ttaagacc 1560
 tgaatgaaat tggatattact tctgatggta ccaccggaaa actaaaaatt gatgatacca 1620
 agcttaaaaa agcgtggat gaaaataccg cttctgtacg tgagctgctg gttaggtgatg 1680
 gtaaagaaac ggggatcacc accaaaattg ccaccgaagt gaaaagttat ctggccgatg 1740
 acggcattat tgacagcgc caggacagta ttaacgccac gctgaaaaag ctgactaagc 1800
 aatatctgac cgtcagcagt agcattgacg acaccggtgc ccgttacaag gccagttta 1860
 cccaactgga taccatgatg agtaagctga ataaccag tacttatttg acccagcaat 1920
 ttaatgctat gaacaagtcc tgataacaga gggtaccatg tacaccgga gcggtatcaa 1980
 agcttatgcg caagtcagcg tggaaagcgc cgtgatgagc gccagccgc atcagttgat 2040
 tgaaatggtg tttgatggcg cgaatagcgc tctggtgccc gctcgcctgt ttttagaaca 2100
 aggcgatggt gtcgcgaaag gtgaagcgtt aagcaaagcc atcaatatta tcgataacgg 2160
 gctgaaagcc ggctcagtc aggaaaaagc cggtgagatt gcgacgaatc tttccgagct 2220
 atacgactat atgattegcc gtttactgca ggtaatttg cgtaacgagc etcaggccat 2280
 cgaagaagtg gaagggttac tcagcaatat tgcagaagcc tggaagcaga tttcaccgaa 2340
 agcatcttcc caggagtctc gttaa 2365

REIVINDICACIONES

1. Un método de preparación de una vacuna conjugada, que comprende:

- 5 (a) mutar una cepa de *Salmonella* Paratyphi A para generar una cepa atenuada de *Salmonella* Paratyphi A, en el que dicha cepa atenuada de *Salmonella* Paratyphi A comprende una mutación del gen *clpP* y una o más mutaciones genéticas adicionales seleccionadas del grupo que consiste en una mutación de los loci *guaBA*, una mutación del gen *guaB* y una mutación del gen *guaA*;
- 10 (b) aislar un polisacárido O (OPS) y una proteína flagelina de la cepa atenuada de (a), en el que dicha proteína flagelina es flagelina de fase 1 (*fliC*); y
- (c) conjuguar el OPS con la proteína flagelina, preparando así una vacuna conjugada.

2. El método de la reivindicación 1, en el que dicho OPS de *Salmonella* Paratyphi A pertenece a OPS de grupo A de *Salmonella*.

- 15 3. El método de la reivindicación 1 o 2, en el que dicha cepa de *Salmonella* Paratyphi A atenuada comprende además una o más mutaciones genéticas seleccionadas del grupo que consiste en una mutación del gen *clpX*, una mutación del gen *fliD*, una mutación del gen *flgK* y una mutación del gen *flgL*.

20 4. El método de la reivindicación 1, en el que dicha cepa atenuada de *Salmonella* Paratyphi A comprende una mutación de los loci *guaBA* y una mutación del gen *clpP*.

5. El método de la reivindicación 4, en el que la mutación de los loci *guaBA* y la mutación del gen *clpP* es una delección de parte o todos los loci *guaBA* y una delección de parte o todo el gen *clpP*.

25 6. El método de la reivindicación 1, en el que el OPS y la proteína flagelina se conjugan por conjugación química usando un reticulante o un polímero.

Figura 1

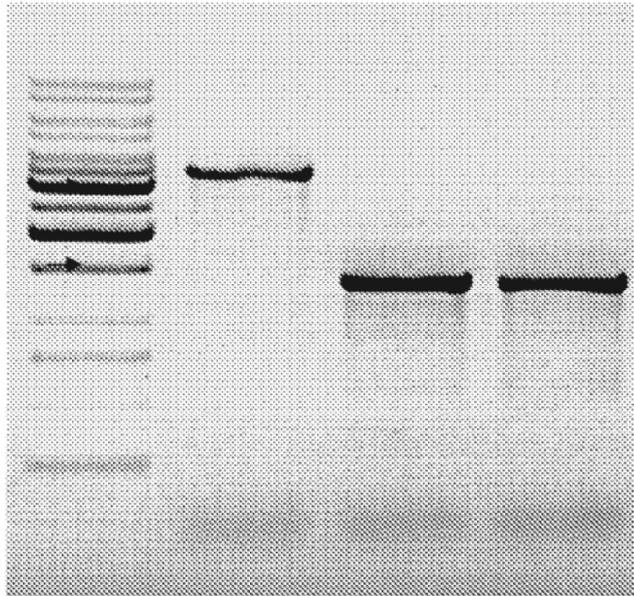


Figura 2

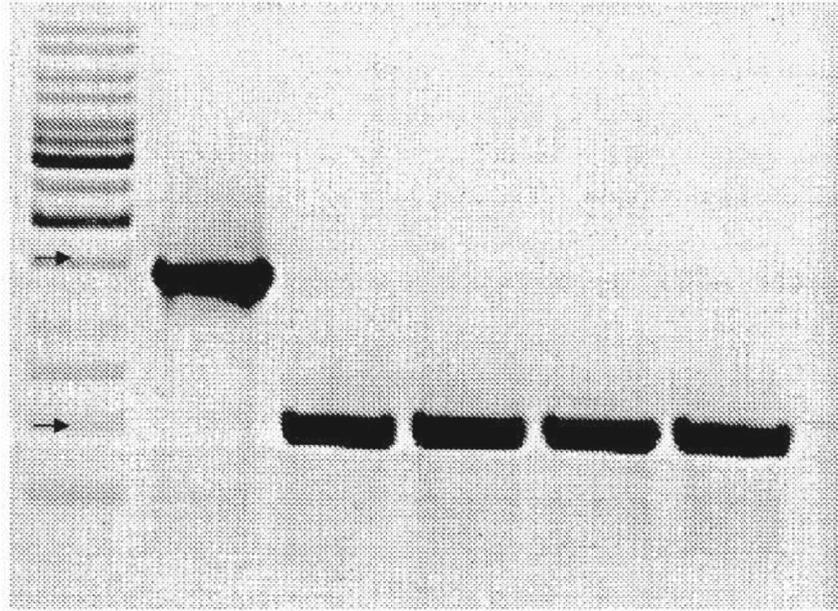


Figura 3

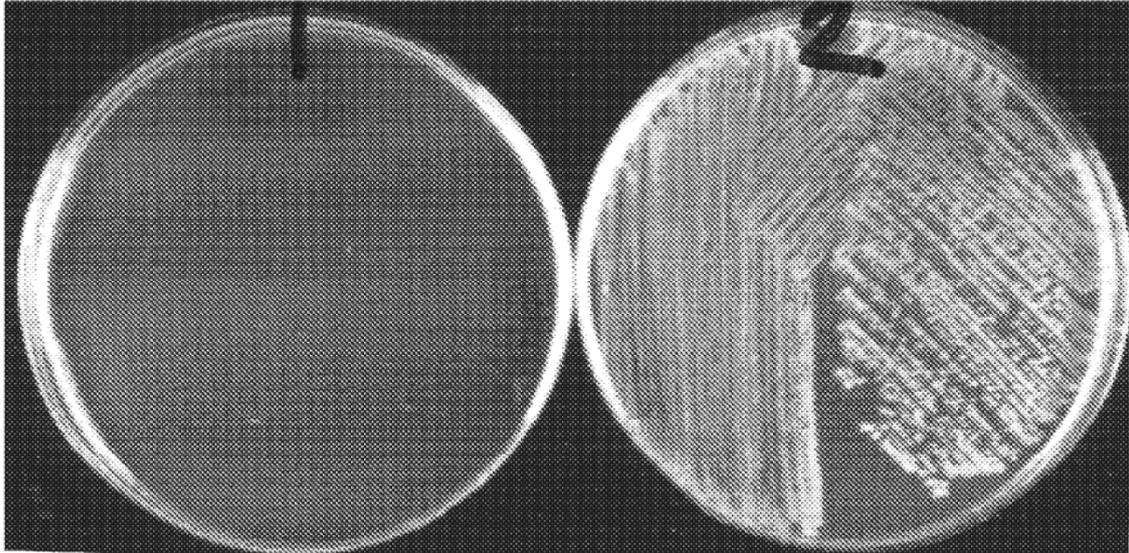


Figura 4

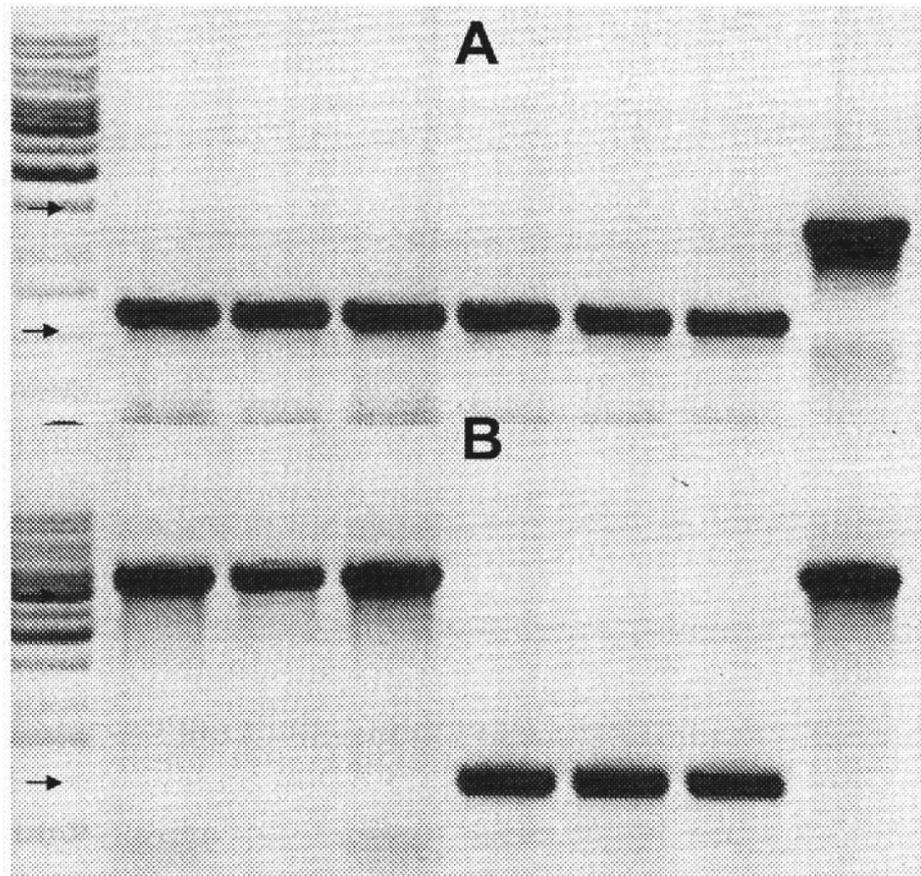


Figura 5

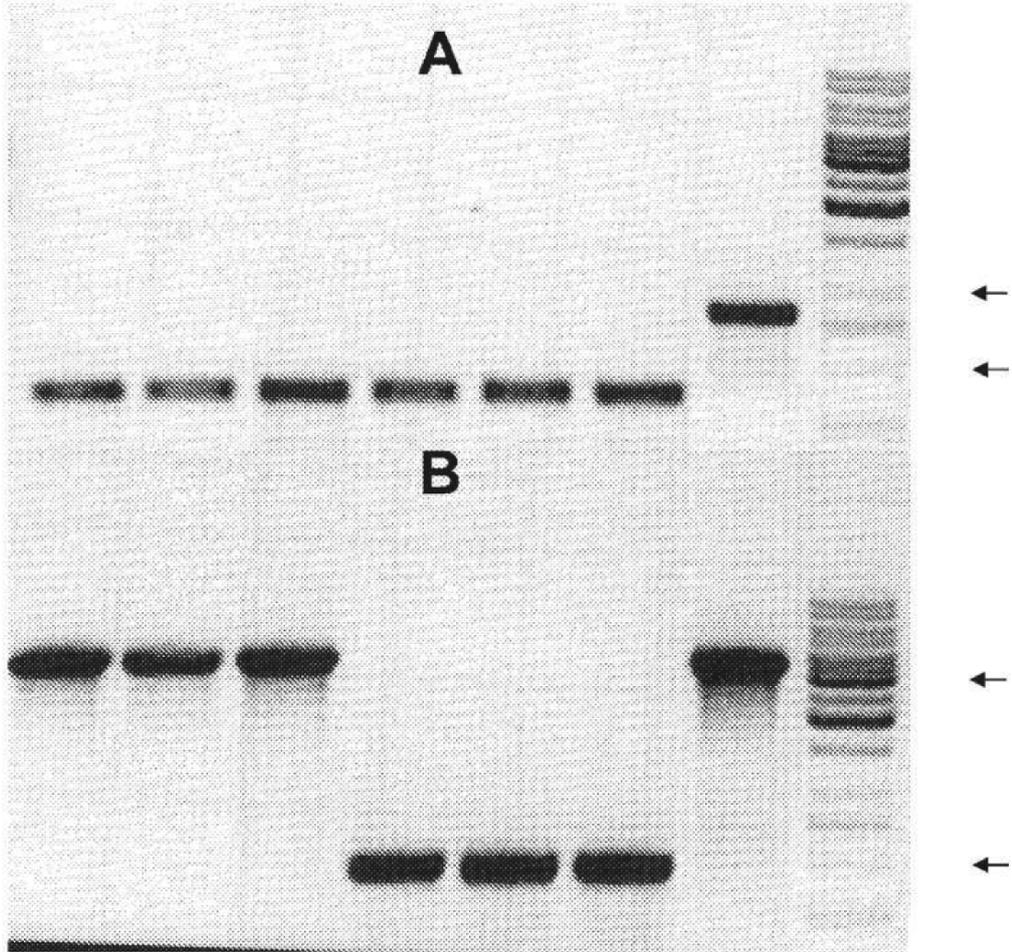


Figura 6

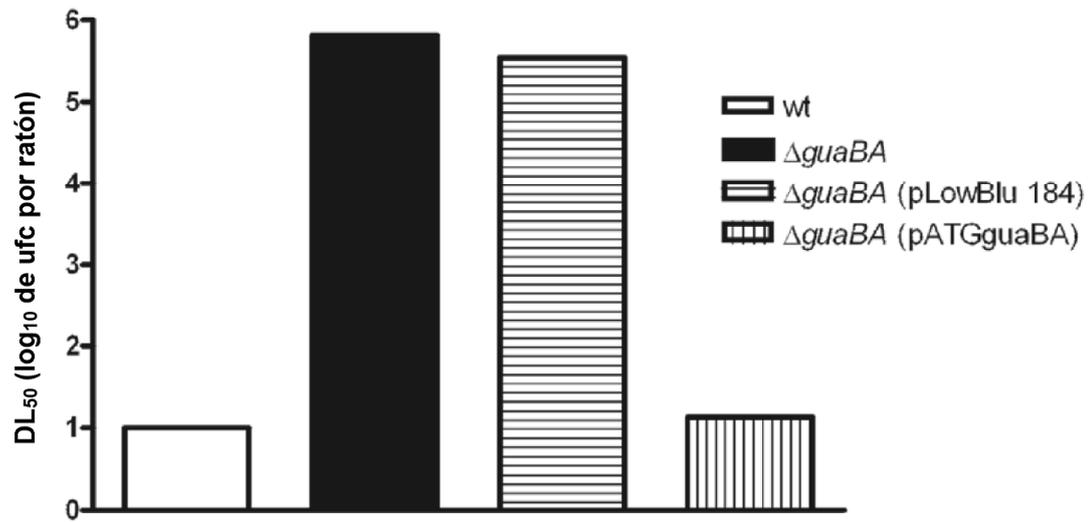


Figura 7

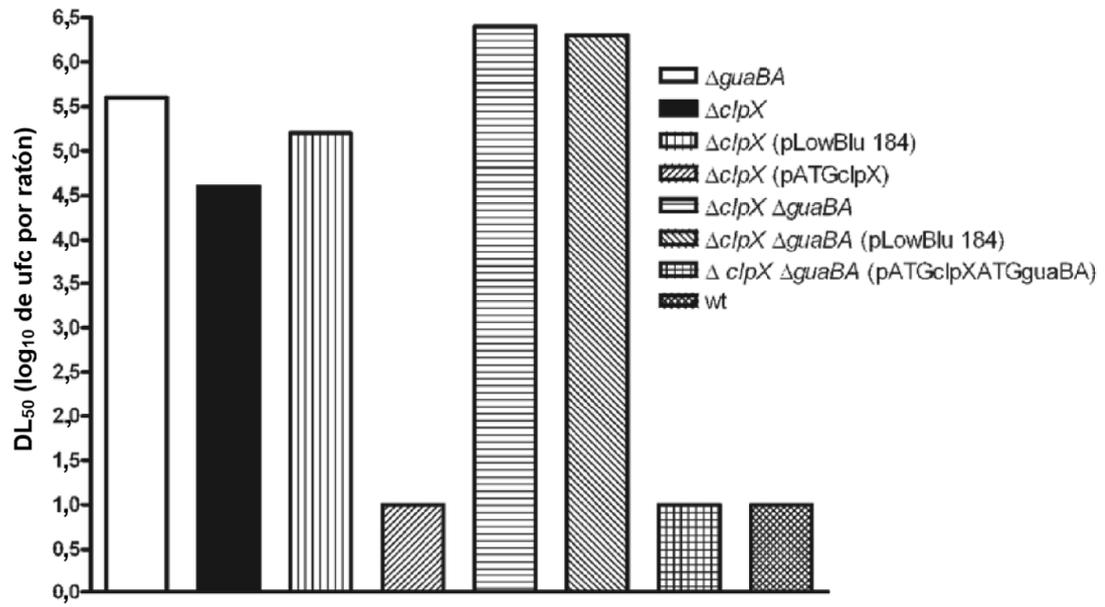


Figura 8

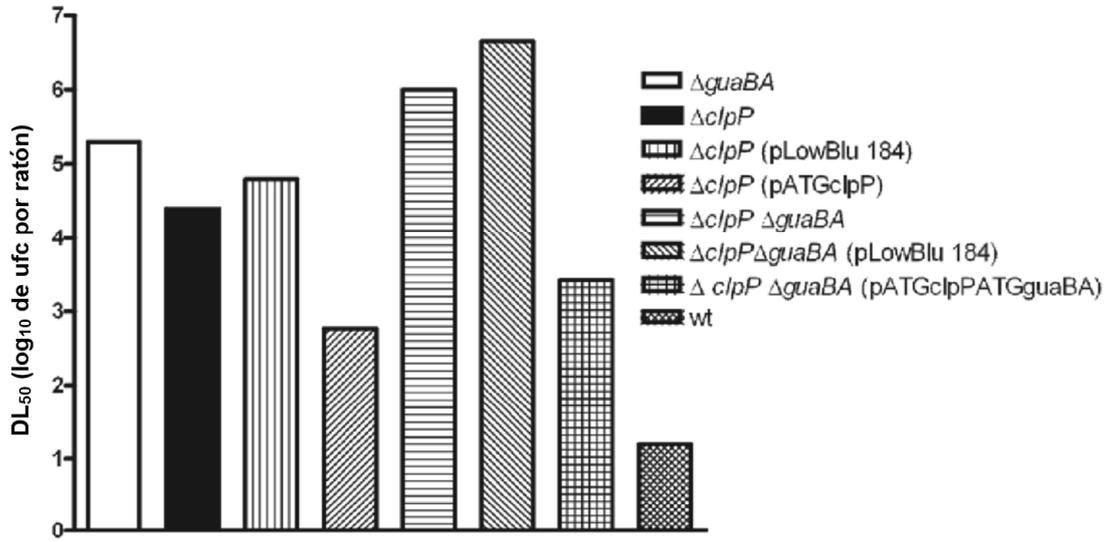


Figura 9

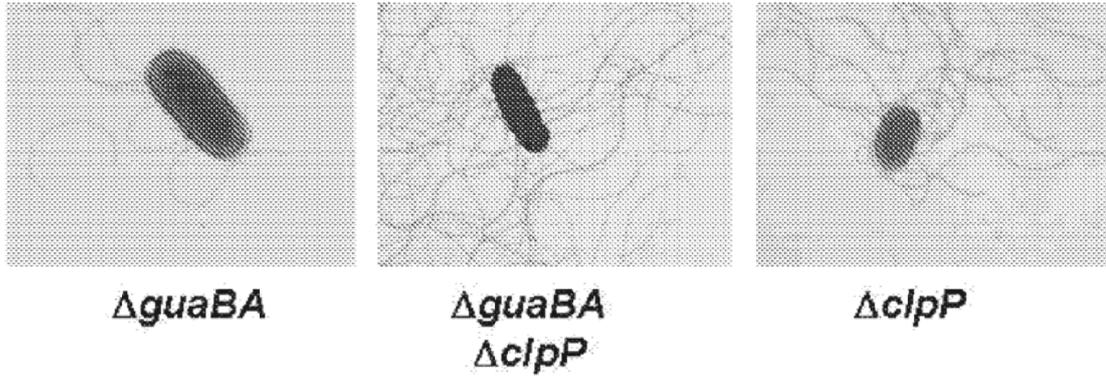


Figura 10A

	10	20	30	40	50	60
Typhimurium	tcacgcacac	gctgcaggtt	gttgttgatt	tcgttcagcg	cgcccttcagt	ggtctgcgca
Typhi A	tcacgcacac	gctgcaggtt	gttgttgatt	tcgttcagcg	cgcccttcagt	ggtctgcgca
Ty2	tcacgcacac	gctgcaggtt	gttgttgatt	tcgttcagcg	cgcccttcagt	ggtctgcgca
	70	80	90	100	110	120
Typhimurium	atggagatac	cgtcgtagc	gttacgggaa	gcctgagtca	gacctttgat	gttcgcggta
Typhi A	atggagatac	cgtcgtagc	gttacgggaa	gcctgagtca	gacctttgat	gttcgcgggtg
Ty2	atggagatac	cgtcgtagc	gttacgggaa	gcctgagtca	gacctttgat	gttcgcggta
	130	140	150	160	170	180
Typhimurium	aaacgggttag	caatcgctg	acctgcccga	tcgtctttcg	cgctggtgat	acgcagaccg
Typhi A	aaacgggttag	caat <u>tc</u> gctg	acctgcccga	tcgtctttcg	cgctggtgat	acgcagaccg
Ty2	aaacgggttag	caatcgctg	<u>t</u> ccctgcccga	tcgtctttcg	cgctggtgat	acgcagaccg
	190	200	210	220	230	240
Typhimurium	gaagacagac	gctcgatagc	ggtgcccgaa	gcggactggg	atgtgttcag	gttattctgg
Typhi A	gaagacagac	gctcgatagc	ggtgcccgaa	gcggactggg	atgtgttcag	gttattctgg
Ty2	gaagaca <u>a</u> ac	gctcgatagc	<u>agt</u> gcccgaa	gcggactggg	atgtgttcag	gttattctgg
	250	260	270	280	290	300
Typhimurium	gtcaacagcg	acaggctggt	tgtattaatg	acttgtgcca	tgatcttttc	cttatcaatt
Typhi A	gtcaacagcg	acaggctggt	tgtattaatg	acttgtgcca	tgatcttttc	cttatcaatt
Ty2	gtcaacagcg	acaggctggt	tgtattaatg	acttgtgcca	tgatcttttc	cttatcaatt
	310	320	330	340	350	360
Typhimurium	acaacttgat	gttattgggc	tgttgcccac	ggtttctcac	cgtaaccctt	gtaacggcac
Typhi A	acaacttgat	gttattgggc	tgttgcccac	ggtttctcac	cgtaaccctt	gtaacggcac
Ty2	acaacttgat	gttattgggc	tgttgcccac	ggtttctcac	cgtaaccctt	gtaacggcac
	370	380	390	400	410	420
Typhimurium	ctgaatttcg	aactttagaa	aatttttcac	ttccccgat	ctttttctta	ggcggcgaaa
Typhi A	ctgaatttcg	aactttagaa	aatttttcac	ttccccgat	ctttttctta	ggcggcgaaa
Ty2	ctgaatttcg	aactttagaa	aatttttcac	ttccccgat	ctttttctta	ggcggcgaaa
	430	440	450	460	470	480
Typhimurium	tagccgcttt	atgcatcatt	attccgcgca	ttatttttgc	aaaattatca	ttaaactttg
Typhi A	tagccgcttt	atgcatcatt	attccgcgca	ttatttttgc	aaaattatca	ttaaactttg
Ty2	tagccgcttt	atgcatcatt	attccgcgca	ttatttttgc	aaaattatca	ttaaactttg
	490	500	510	520	530	540
Typhimurium	cctccagatt	gccgataacg	cgcttaacta	ctgtttgcaa	tcaaaaagga	agaagggcatg
Typhi A	cctccagatt	gccgataacg	cgcttaacta	ctgtttgcaa	tcaaaaagga	agaagggcatg
Ty2	cctccagatt	gccgataacg	cgcttaacta	ctgtttgcaa	tcaaaaagga	agaagggcatg
	550	560	570	580	590	600
Typhimurium	gottcaatth	catcattagg	tgtgggatca	aacttaccgt	tagaccagtt	gttgacagac
Typhi A	gottcaatth	catcattagg	tgtgggatca	aacttaccgt	tagaccagtt	gttgacagac
Ty2	gottcaatth	catcattagg	tgtgggatca	aacttaccgt	tagaccagtt	gttgacagac
	610	620	630	640	650	660
Typhimurium	ctgacaaaaga	acgaaaaagg	acgcttaacg	ccaattacca	aacagcagag	cgcgaattcg
Typhi A	ctgacaaaaga	acgaaaaagg	acgcttaacg	ccaattacca	aacagcagag	cgcgaattcg
Ty2	ctgacaaaaga	acgaaaaagg	acgcttaacg	ccaattacca	aacagcagag	cgcgaattcg

Figura 10B

	670	680	690	700	710	720
Typhimurium	gcaaagctaa	ccgcctatgg	cacattgaaa	agcgcattag	aaaaattcca	gacggcaaat
Typhi A	gcaaagctaa	ccgcctatgg	cacattgaaa	agcgcattag	aaaaattcca	gacggcaaat
Ty2	gcaaagctaa	ccgcctatgg	cacattgaaa	agcgcattag	aaaaattcca	gacggcaaat
	730	740	750	760	770	780
Typhimurium	accgcgtaa	ataaagcggg	tttatttaag	tctaccgtgg	cgtccagcac	<u>cactgaagat</u>
Typhi A	accgcgtaa	ataaagcggg	tttatttaag	tctaccgtgg	cgtccagcac	gacagaggac
Ty2	accgcgtaa	ataaagcggg	tttatttaag	tctaccgtgg	cgtccagcac	gacagaggac
	790	800	810	820	830	840
Typhimurium	ctcaaagtca	gtactaccgc	<u>tggcgctgcc</u>	gcagggactt	ataagatta	<u>a</u> cgtaaccag
Typhi A	ctcaaagtca	gtactaccgc	aggcgctgcc	gcagggactt	ataagattag	cgtaaccag
Ty2	ctcaaagtca	gtactaccgc	aggcgctgcc	gcagggactt	ataagattag	cgtaaccag
	850	860	870	880	890	900
Typhimurium	cttgccgccc	<u>ca</u> cagtcgct	ggcgacaaaa	accaccttcg	<u>cg</u> accaccaa	agagcagttg
Typhi A	cttgccgccc	cgcagtcgct	ggcgacaaaa	accaccttcg	caaccaccaa	agagcagttg
Ty2	cttgccgccc	cgcagtcgct	ggcgacaaaa	accaccttcg	caaccaccaa	agagcagttg
	910	920	930	940	950	960
Typhimurium	ggcgatacgt	cggtcacgtc	ccggacaatt	aaaattgaac	agccgggacg	taaagagccg
Typhi A	ggcgatacgt	cggtcacgtc	ccggacaatt	aaaattgaac	agccgggacg	taaagagccg
Ty2	ggcgatacgt	cggtcac <u>at</u> c	ccggacaatt	aaaattgaac	agccgggacg	taaagagccg
	970	980	990	1000	1010	1020
Typhimurium	ctggaatta	agctggataa	aggcgacacc	tccatggagg	cgatccgtga	cgccatcaat
Typhi A	ctggaatta	agctggataa	aggcgacacc	tccatggagg	cgatccgtga	cgccatcaat
Ty2	ctggaatta	agctggataa	aggcgacacc	tccatggagg	cgatccgtga	cgccat <u>t</u> aat
	1030	1040	1050	1060	1070	1080
Typhimurium	gacgccgaca	gcggtatcgc	cgccagtatc	gttaagggtca	aagagaacga	attccagttg
Typhi A	gacgccgaca	gcggtatcgc	cgccagtatc	gttaagggtca	aagagaacga	attccagttg
Ty2	gacgccgaca	gcggtatcgc	cgccagtatc	gttaagggtca	aagagaacga	attccagttg
	1090	1100	1110	1120	1130	1140
Typhimurium	gtgcttaccg	ccaatagcgg	taccgacaat	acgatgaaga	tcacgggtgga	aggcgataca
Typhi A	gtgcttaccg	ccaatagcgg	taccgacaat	acgatgaaga	tcacgggtgga	aggcgataca
Ty2	gtgcttaccg	ccaatagcgg	taccgacaat	acgatgaaga	tcacgggtgga	aggcgataca
	1150	1160	1170	1180	1190	1200
Typhimurium	aaacttaacg	atctactcgc	ttatgacagc	accaccaata	cgggcaatat	gcaagagctg
Typhi A	aaacttaacg	atctactcgc	ttatgacagc	accaccaata	cgggcaatat	gcaagagctg
Ty2	aaacttaacg	atctactcgc	ttatgacagc	accaccaata	cgggcaatat	gcaagagctg
	1210	1220	1230	1240	1250	1260
Typhimurium	gtgaaagcag	aaaacgcgaa	gctgaacgta	aacggcatcg	acattgagcg	tcagagcaat
Typhi A	gtgaaagcag	aaaacgcgaa	gctgaacgta	aacggcatcg	acattgagcg	tcagagcaat
Ty2	gtgaaagcag	aaaacgcgaa	gctgaacgta	aacggcatcg	acattgagcg	tcagagcaat
	1270	1280	1290	1300	1310	1320
Typhimurium	accgtaaccg	acgcccctca	gggaattacg	ctcaccctga	ccaagaaaagt	gaccgacgcg
Typhi A	accgtaaccg	acgcccctca	gggaattacg	ctcaccctga	<u>cg</u> aagaaaagt	gaccgacgcg
Ty2	accgtaaccg	acgcccctca	gggaattac <u>a</u>	ctcaccctga	ccaagaaaagt	gaccgacgcg

Figura 10C

	1330	1340	1350	1360	1370	1380
Typhimurium	accgtgacgg	taacgaaaga	tgataccaag	gcgaaagagg	cgattaaatc	ctgggtggat
Typhi A	accgtgacgg	taacgaaaga	tgataccaag	gcgaaagagg	cgattaaatc	ctgggtggat
Ty2	accgtgacgg	tg acgaaaga	tgataccaag	gcgaaagagg	cgattaaatc	ctgggtggat
	1390	1400	1410	1420	1430	1440
Typhimurium	gcctataact	cgctggtgga	taccttttagc	tcgttaacca	aatataaccgc	cgttgagccg
Typhi A	gcctataact	cgctggtgga	taccttttagc	tcgttaacca	aatataaccgc	cgttgagccg
Ty2	Gcctataact	cgctggtgga	tac <u>t</u> tttagc	tc <u>a</u> tttaac <u>t</u> a	aatataaccgc	cgttgagccg
	1450	1460	1470	1480	1490	1500
Typhimurium	ggcgaagaag	ccagcgataa	aaacggcgcg	ctgttaggcg	atagtggtgt	tcgtactatc
Typhi A	ggcgaagaag	ccagcgataa	aaacggcgcg	ctgttaggcg	atagtggtgt	tcgtactatc
Ty2	ggcgaagaag	ccagcgataa	aaacggcgcg	ctgttaggcg	atagtggtgt	tcgt <u>g</u> ctatc
	1510	1520	1530	1540	1550	1560
Typhimurium	cagaccggga	ttcgggcaca	atttgccaat	agcggcagta	attctgcggt	caaaacaatg
Typhi A	cagaccggga	ttcgggcaca	atttgccaat	agcggcagta	attctgcggt	caaaacaatg
Ty2	cagaccggga	ttcgggcaca	atttgccaat	agcggcagta	attctgcggt	caaaacaatg
	1570	1580	1590	1600	1610	1620
Typhimurium	gcggaattg	gcatcaccca	ggatgggact	tccggcaaac	tgaagattga	tgatgataag
Typhi A	gcggaattg	gcatcaccca	ggatgggact	tccggcaaac	tgaagattga	tgatgataag
Ty2	gcggaattg	gcatcaccca	ggatgggact	tccggcaaac	tgaagattga	cg atgataag
	1630	1640	1650	1660	1670	1680
Typhimurium	ctgaccaa <u>g</u>	tactgaaaga	taacacagcc	gcagcgcgtg	agctgctggt	aggcgatggt
Typhi A	ctgaccaagg	tactgaaaga	taacacagcc	gcagcgcgtg	agctgctggt	aggcgatggt
Ty2	ctgaccaagg	tactgaaaga	taacac <u>g</u> gcc	gcagcgcgtg	agctgctggt	aggcgatggt
	1690	1700	1710	1720	1730	1740
Typhimurium	aaagaaacgg	gtatcaccac	caaaattgcc	accgaagtga	aaagttatct	ggcggatgac
Typhi A	aaagaaacgg	gtatcaccac	caaaattgcc	accgaagtga	aaagttatct	ggcggatgac
Ty2	aaagaaacgg	gtatcaccac	caaaattgcc	accgaagtga	aaagttatct	ggcggatgac
	1750	1760	1770	1780	1790	1800
Typhimurium	ggcattattg	ataatgcgca	ggacaacggt	aacgccacgc	tgaaaagcct	gacaaaaacag
Typhi A	ggcattattg	ataatgcgca	ggacaacggt	aacgccacgc	tgaaaagcct	gacaaaaacag
Ty2	ggcattattg	ataatgcgca	ggacaacggt	aacgccacgc	tgaaaagcct	gacaaaaacag
	1810	1820	1830	1840	1850	1860
Typhimurium	tacctgtccg	ttagcaacag	catcgatgaa	accgttgccc	gttacaaggc	ccagtttacc
Typhi A	tacctgtccg	ttagcaacag	catcgatgaa	accgttgccc	gttacaaggc	ccagtttacc
Ty2	tacctgtccg	ttagcaacag	catcgatgaa	accgttgccc	gttacaaggc	ccagtttacc
	1870	1880	1890	1900	19120	1920
Typhimurium	caactggata	ccatgatgag	taagctgaat	aacaccagta	gttatttgac	ccagcaat
Typhi A	caactggata	c atgatgag	taagctgaat	aacaccagta	gttatttgac	ccagcaat
Ty2	caactggata	ccatgatgag	taagctgaat	aacaccagta	gttatttgac	ccagcaat
	1930	1940	1950	1960	1970	1980
Typhimurium	acagctatga	acaagtccctg	ataacagagg	tcaccatgta	caccgcgagc	ggtatcaaaag
Typhi A	acagctatga	acaagtccctg	ataacagagg	tcaccatgta	caccgcgagc	ggtatcaaaag
Ty2	acagctatga	acaagtccctg	ataacagagg	tcaccatgta	caccgcgagc	ggtatcaaaag

Figura 10D

	1990	2000	2010	2020	2030	2040
Typhimurium	cttatgcgca	agtcagcgtg	gaaagcgccg	tgatgagcgc	cagccccgat	cagttgattg
Typhi A	cttatgcgca	agtcagcgtg	gaaagcgccg	tgatgagcgc	cagccccgat	cagttgattg
Ty2	cttatgcgca	agtcagcgtg	gaaagcgccg	tgatgagcgc	cagccccgat	cagttgattg
	2050	2060	2070	2080	2090	2100
Typhimurium	aaatgttggt	tgatggcgcg	aatagcgcctc	tggtgcgcgc	tcgcctgttt	ttagaacaag
Typhi A	aaatgttggt	tgatggcgcg	aatagcgcctc	tggtgcgcgc	tcgcctgttt	ttagaacaag
Ty2	aaatgttggt	tgatggcgcg	aatagcgcctc	tggtgcgcgc	tcgcctgttt	ttagaacaag
	2110	2120	2130	2140	2150	2160
Typhimurium	gcgatgttgt	cgcgaaaggt	gaagcgttaa	gcaaagccat	caatattatc	gataacgggc
Typhi A	gcgatgttgt	cgcgaaaggt	gaagcgttaa	gcaaagccat	caatattatc	gataacgggc
Ty2	gcgatgttgt	cgcgaaaggt	gaagcgttaa	gcaaagccat	caatattatc	gataacgggc
	2170	2180	2190	2200	2210	2220
Typhimurium	tgaaagccgg	cctcgatcag	gaaaaagcgc	gtgagattgc	gacgaatctt	tccgagctat
Typhi A	tgaaagccgg	cctcgatcag	gaaaaagcgc	gtgagattgc	gacgaatctt	tccgagctat
Ty2	tgaaagccgg	cctcgatcag	gaaaaagcgc	gtgagattgc	gacgaatctt	tccgagctat
	2230	2240	2250	2260	2270	2280
Typhimurium	acgactatat	gattcgccgt	ttactgcagg	ctaatttgcg	taacgacgct	caggccatcg
Typhi A	acgactatat	gattcgccgt	ttactgcagg	ctaatttgcg	taacgacgct	caggccatcg
Ty2	acgactatat	gattcgccgt	ttactgcagg	ctaatttgcg	taacgacgct	caggccatcg
	2290	2300	2310	2320	2330	2340
Typhimurium	aagaagtgga	agggttactc	agcaatattg	cagaagcctg	gaagcagatt	tcaccgaaaag
Typhi A	aagaagtgga	agggttactc	agcaatattg	cagaagcctg	gaagcagatt	tcaccgaaaag
Ty2	aagaagtgga	agggttactc	agcaatattg	cagaagcctg	gaagcagatt	tcaccgaaaag
	2350	2360				
Typhimurium	catctttcca	ggagtctcgt	taa			
Typhi A	catctttcca	ggagtctcgt	taa			
Ty2	catctttcca	ggagtctcgt	taa			

Figura 10E

	10	20	30	40	50	60
Enteritidis	tcacgcacac	gctgcaggtt	gttgttgatt	tcattcagcg	caccttcagt	ggtctgcgca
Typhimurium	tcacgcacac	gctgcaggtt	gttgttgatt	tcggttcagcg	cgccttcagt	ggtctgcgca
Enteritidis	atagaatgc	cgtcgtagc	gttacgggaa	gcctgagtca	gacctttgat	attagaagtg
Typhimurium	atggagatac	cgtcgtagc	gttacgggaa	gcctgagtca	gacctttgat	gttcgcggtg
Enteritidis	aagcggtag	caatgcctg	gcctgcccga	tcgtctttcg	cgctggtgat	acgcagacca
Typhimurium	aaacggtag	caatgcctg	acctgcccga	tcgtctttcg	cgctggtgat	acgcagaccg
Enteritidis	gaggacagac	gctcaatagc	ggaaactcagt	gaggactgag	atttgttcag	gttattctgg
Typhimurium	gaagacagac	gctcgatagc	ggtgcccaga	gcggactggg	atttgttcag	gttattctgg
Enteritidis	gtcaacagcg	acaggctggt	tgtattaatg	acttgtgcca	tgatcttttc	cttatcaatt
Typhimurium	gtcaacagcg	acaggctggt	tgtattaatg	acttgtgcca	tgatcttttc	cttatcaatt
Enteritidis	acaacttgat	gttattgggc	tgttgcccac	ggtttctcac	cgtaaccctt	gtatcggcac
Typhimurium	acaacttgat	gttattgggc	tgttgcccac	ggtttctcac	cgtaaccctt	gtatcggcac
Enteritidis	ctgaatttog	aactttagaa	aatTTTTcAc	ttccccgat	ctttttctta	gcttgcgaaa
Typhimurium	ctgaatttog	aactttagaa	aatTTTTcAc	ttccccgat	ctttttctta	ggcggcgaaa
Enteritidis	tagccgcttt	atgcatcatt	attccacgca	ttatTTTTgC	aaaattatca	ttaaactttg
Typhimurium	tagccgcttt	atgcatcatt	attccgcgca	ttatTTTTgC	aaaattatca	ttaaactttg
Enteritidis	cttccagatt	gccgataacg	cgTTtaacta	ctgTTtgcaa	tcgaaaNgga	agatggcatg
Typhimurium	cctccagatt	gccgataacg	cgcttaacta	ctgTTtgcaa	tcaaaaagga	agaaggcatg
Enteritidis	gcttcaattt	catcattagg	tgtagggtca	aacttacctc	tggaattcac	gctgactaaa
Typhimurium	gcttcaattt	catcattagg	tgtgggatca	aacttacctg	tagaccagtt	gttgacagac
Enteritidis	ctgaccaaag	ctgaaaaaag	acgcttaacg	ccgatcacac	agcagcagag	tgctaatacg
Typhimurium	ctgacaaaag	acgaaaaaag	acgcttaacg	ccaattacca	aacagcagag	cgcgaattcg
Enteritidis	gcCCgtctaa	cggcatacgg	tactTTaAAA	agtgcactgg	agaagTTtca	aacagcaaac
Typhimurium	gcaaaagctaa	ccgcctatgg	cacattgaaa	agcgcattag	aaaaattcca	gacggcaaat

Figura 10F

	730	740	750	760	770	780
Enteritidis	ac <u>g</u> gcgtaa	ataaagc <u>g</u> ga	t <u>ct</u> gtttaa	<u>ag</u> tac <u>g</u> aatg	<u>tc</u> accagcag	<u>ta</u> c <u>ag</u> aagac
Typhimurium	accgcgtaa	ataaagcgga	tttatttaag	tctaccgtgg	cgccagcac	cactgaagat
	790	800	810	820	830	840
Enteritidis	ctgaaagt <u>ct</u>	<u>cg</u> ac <u>g</u> gaagc	tgg <u>g</u> gc <u>cg</u> ca	<u>ct</u> ggaactt	at <u>gt</u> ggttag	cgtaact <u>c</u> ag
Typhimurium	ctcaaagtca	gtactaccgc	tggcgctgoc	gcagggactt	ataagattaa	cgtaaccag
	850	860	870	880	890	900
Enteritidis	<u>tt</u> agc <u>aca</u> ag	cacaat <u>ct</u> tt	<u>gag</u> tacagc	acc <u>aaa</u> atta	<u>cat</u> ct <u>ac</u> caa	aga <u>ag</u> tg <u>ct</u> g
Typhimurium	cttgccgccc	cacagtgcgt	ggcgacaaaa	accaccttcg	cgaccaccaa	agagcagttg
	910	920	930	940	950	960
Enteritidis	gg <u>ag</u> atac <u>ca</u>	<u>cat</u> ctgacag	ccg <u>tac</u> cata	aaaattgaac	ag <u>aa</u> gg <u>cg</u>	taaaga <u>acc</u> a
Typhimurium	ggcgatacgt	cggtcacgtc	ccggacaatt	aaaattgaac	agccgggacg	taaagagccg
	970	980	990	1000	1010	1020
Enteritidis	ct <u>t</u> gaaat <u>ca</u>	agct <u>cac</u> taa	agat <u>ca</u> aacc	t <u>ctt</u> ta <u>g</u> agg	<u>gt</u> atccgtga	cgccat <u>t</u> aat
Typhimurium	ctggaatta	agctggataa	aggcgacacc	tccatggagg	cgatccgtga	cgccatcaat
	1030	1040	1050	1060	1070	1080
Enteritidis	gat <u>gc</u> tgaca	<u>gt</u> ggtat <u>tt</u> c	cgccagtatc	gtta <u>aa</u> gt <u>ta</u>	aaga <u>agg</u> cg	<u>tt</u> atcag <u>ctt</u>
Typhimurium	gacgocgaca	gcggtatcgc	cgccagtatc	gttaaggtca	aagagaacga	attccagttg
	1090	1100	1110	1120	1130	1140
Enteritidis	gt <u>act</u> gaccg	<u>cag</u> atag <u>tg</u>	<u>cac</u> ggataat	<u>caa</u> atgacta	t <u>ct</u> ctgtgga	aggcgatagc
Typhimurium	gtgcttaccg	ccaatagcgg	taccgacaat	acgatgaaga	tcacggtgga	aggcgataca
	1150	1160	1170	1180	1190	1200
Enteritidis	aaact <u>cag</u> cg	atct <u>gt</u> tg <u>tc</u>	<u>ct</u> atgatag <u>t</u>	<u>ag</u> tactg <u>gc</u> a	cgggcaaat	<u>ga</u> agcaactg
Typhimurium	aaacttaacg	atctactcgc	ttatgacagc	accaccaata	ccggcaatat	gcaagagctg
	1210	1220	1230	1240	1250	1260
Enteritidis	gt <u>tg</u> ctgcag	<u>ata</u> atg <u>ctt</u> t	<u>gt</u> ta <u>ac</u> cg <u>tt</u>	aacggcattg	atattgagcg	<u>acc</u> gag <u>t</u> aat
Typhimurium	gtgaaagcag	aaaacgcgaa	gctgaacgta	aacggcatcg	acattgagcg	tcagagcaat
	1270	1280	1290	1300	1310	1320
Enteritidis	<u>aaa</u> at <u>cact</u> g	acgct <u>cc</u> aca	<u>agg</u> cg <u>tg</u> acg	ct <u>tg</u> aa <u>ct</u> a	caa <u>ag</u> aag	<u>aaa</u> gatg <u>cc</u>
Typhimurium	accgtaaccg	acgccccca	gggaattacg	ctcacccctga	ccaagaaag	gaccgacgcg
	1330	1340	1350	1360	1370	1380
Enteritidis	<u>cgt</u> attaccg	t <u>cac</u> aaaaga	<u>ta</u> atgaaag	gcgac <u>cg</u> aag	<u>cc</u> gt <u>ca</u> aaag	<u>tt</u> gggtg <u>g</u> at
Typhimurium	accgtgacgg	taacgaaaga	tgataccaag	gcgaaagagg	cgattaaatc	ctgggtggat
	1390	1400	1410	1420	1430	1440
Enteritidis	gcct <u>a</u> caact	<u>cact</u> g <u>ctt</u> ga	tacctttag <u>t</u>	<u>tc</u> atta <u>aca</u>	aatatac <u>aga</u>	<u>gg</u> ttg <u>at</u> cc <u>a</u>
Typhimurium	gcctataact	cgctggtgga	tacctttagc	tcgttaacca	aatataccgc	cgttgagccg

Figura 10G

	1450	1460	1470	1480	1490	1500
Enteritidis	ggggctgaag	<u>aacagga</u> caa	aaaca <u>acgg</u> t	<u>gcac</u> tacttg	<u>gagat</u> accgt	<u>ggcgca</u> acg
Typhimurium	ggcgaagaag	ccagcgataa	aaacggcgcg	ctgttaggcg	atagtgtggt	tcgtactatc
	1510	1520	1530	1540	1550	1560
Enteritidis	<u>attcaaa</u> ctg	<u>gaatccg</u> cg	<u>tcagtt</u> cg	aatgg <u>tgca</u>	<u>gtacagg</u> tac	<u>at</u> ttagacc
Typhimurium	cagaccggga	ttcgggcaca	atttgccaat	agcggcagta	attctgcggt	caaaacaatg
	1570	1580	1590	1600	1610	1620
Enteritidis	<u>ctgaa</u> tgaaa	ttgg <u>tatt</u> ac	<u>ttct</u> gatggt	<u>acca</u> ccgga	aact <u>aaa</u> at	tgatgat <u>acc</u>
Typhimurium	gcgNNNgaaa	ttggcatcac	ccaggatggg	acttccggca	aactgaagat	tgatgatgat
	1630	1640	1650	1660	1670	1680
Enteritidis	aagct <u>taaa</u>	aag <u>cg</u> ctga	<u>tgaaa</u> at <u>acc</u>	<u>gctt</u> ctgtac	gtgagctgct	ggtagg <u>t</u> gat
Typhimurium	aagctgacca	aagtactgaa	agataacaca	gccgcagcgc	gtgagctgct	ggtaggcgat
	1690	1700	1710	1720	1730	1740
Enteritidis	ggtaaagaaa	cggg <u>gat</u> cac	cacccaaaatt	gccaccgaag	tgaaaagtta	tctggc <u>cg</u> gat
Typhimurium	ggtaaagaaa	cggttatcac	cacccaaaatt	gccaccgaag	tgaaaagtta	tctggcggat
	1750	1760	1770	1780	1790	1800
Enteritidis	gacggcatta	ttga <u>cag</u> cg	<u>ccagg</u> acag	<u>atta</u> acgcca	cgctgaaaaa	<u>gctgact</u> aa <u>g</u>
Typhimurium	gacggcatta	ttgataatgc	gcaggacaac	gttaacgcca	cgctgaaaag	cctgacaaaa
	1810	1820	1830	1840	1850	1860
Enteritidis	ca <u>ata</u> ctga	ccgt <u>cag</u> cag	<u>tag</u> cat <u>tg</u> ac	<u>gac</u> accgttg	cccgttacia	ggcccagttt
Typhimurium	cagtacctgt	ccgttagcaa	cagcatcgat	gaaaccgttg	cccgttacia	ggcccagttt
	1870	1880	1890	1900	1910	1920
Enteritidis	acccaactgg	ataccatgat	gagtaagctg	aataacacca	gta <u>ctt</u> at	gacccagcaa
Typhimurium	acccaactgg	ataccatgat	gagtaagctg	aataacacca	gtagtat	gacccagcaa
	1930	1940	1950	1960	1970	1980
Enteritidis	ttta <u>at</u> gcta	tgaacaagtc	ctgataacag	aggt <u>t</u> acat	gtacaccgcg	agcggtatca
Typhimurium	tttacagcta	tgaacaagtc	ctgataacag	aggtcaccat	gtacaccgcg	agcggtatca
	1990	2000	2010	2020	2030	2040
Enteritidis	aagcttatgc	gcaagtcagc	gtggaaagcg	ccgtgatgag	cgccagcccg	catcagttga
Typhimurium	aagcttatgc	gcaagtcagc	gtggaaagcg	ccgtgatgag	cgccagcccg	catcagttga
	2050	2060	2070	2080	2090	2100
Enteritidis	ttgaaatggt	gtttgatggc	gcgaatagcg	ctctggtgcg	cgctcgoc	tttttagaac
Typhimurium	ttgaaatggt	gtttgatggc	gcgaatagcg	ctctggtgcg	cgctcgoc	tttttagaac
	2110	2120	2130	2140	2150	2160
Enteritidis	aaggcgatgt	tgtcgcgaaa	ggtgaagcgt	taagcaaacg	catcaatatt	atcgataacg
Typhimurium	aaggcgatgt	tgtcgcgaaa	ggtgaagcgt	taagcaaacg	catcaatatt	atcgataacg

Figura 10H

	2170	2180	2190	2200	2210	2220
Enteritidis	ggctgaaagc	cggcctcgat	caggaaaaag	gcggtgagat	tgcgacgaat	ctttccgagc
Typhimurium	ggctgaaagc	cggcctcgat	caggaaaaag	gcggtgagat	tgcgacgaat	ctttccgagc
	2230	2240	2250	2260	2270	2280
Enteritidis	tatacgacta	tatgattcgc	cgtttactgc	aggctaattt	gcgtaacgac	gctcaggcca
Typhimurium	tatacgacta	tatgattcgc	cgtttactgc	aggctaattt	gcgtaacgac	gctcaggcca
	2290	2300	2310	2320	2330	2340
Enteritidis	Tcgaagaagt	ggaaggggta	ctcagcaata	ttgcagaagc	ctggaagcag	atttcaccga
Typhimurium	tcgaagaagt	ggaaggggta	ctcagcaata	ttgcagaagc	ctggaagcag	atttcaccga
	2350	2360				
Enteritidis	Aagcatcttt	ccaggagtct	cgtaa			
Typhimurium	Aagcatcttt	ccaggagtct	cgtaa			