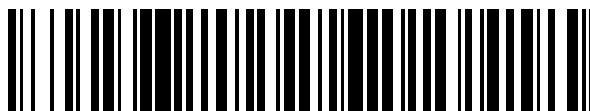


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 650 269**

51 Int. Cl.:

C12N 1/21	(2006.01)
C12N 1/36	(2006.01)
C12N 1/38	(2006.01)
C07K 14/71	(2006.01)
A61K 39/00	(2006.01)
C12R 1/42	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.12.2012 PCT/EP2012/005364**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.06.2013 WO13091898**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.12.2012 E 12808264 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.08.2017 EP 2794849**

54 Título: **Método para producir cepas atenuadas de salmonela de alto rendimiento**

30 Prioridad:

22.12.2011 EP 11400061

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

17.01.2018

73 Titular/es:

**VAXIMM AG (100.0%)
Hochbergerstrasse 60c
4057 Basel, CH**

72 Inventor/es:

**LUBENAU, HEINZ;
SIEDE, HOLGER;
JANSSEN, RENATE y
SPRINGER, MARCO**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 650 269 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

Método para producir cepas atenuadas de salmonela de alto rendimiento

Campo de la invención

5 Esta invención se relaciona con un nuevo método para cultivar cepas mutantes atenuadas de *Salmonella typhi* que albergan una mutación con pérdida de función en el gen *galE* y que alberga una molécula de ADN recombinante. El método comprende la etapa de cultivar dicha cepa de *Salmonella typhi* sin añadir glucosa al medio durante la fermentación con una cantidad de glucosa inicial que se agota antes de alcanzar la fase estacionaria. La invención se relaciona además con cepas de *Salmonella typhi* mutantes atenuadas obtenibles mediante dicho método y a una cepa mutante atenuada de *Salmonella typhi* que alberga una molécula de ADN recombinante que codifica una proteína receptora de VEGF para uso como vacuna.

Antecedentes de la invención

15 Entre el número de enfoques diferentes para el desarrollo de vacunas, las vacunas bacterianas vivas son una de las más prometedoras, ya que imitan la ruta de entrada de muchos patógenos y son capaces de provocar respuestas inmunes humorales y celulares efectivas, tanto a nivel sistémico como compartimentos mucosos. Las vacunas bacterianas vivas se pueden administrar por vía oral o nasal, lo que ofrece ventajas de simplicidad y seguridad en comparación con la administración parenteral. Los costes de preparación de los lotes son relativamente bajos y las formulaciones de vacunas bacterianas vivas muestran una alta estabilidad. La atenuación puede lograrse mediante la eliminación de varios genes, incluidos la virulencia, los genes reguladores y metabólicos.

20 Las vacunas bacterianas atenuadas no solo pueden usarse para inducir inmunidad a su cepa patógena correspondiente, sino que también pueden modificarse para administrar uno o más antígenos heterólogos.

25 Los derivados atenuados de *Salmonella* entérica son atractivos como vehículos para la administración de antígenos heterólogos al sistema inmune de mamíferos porque las cepas de *S. entérica* pueden administrarse potencialmente a través de rutas de inmunización de mucosa y tienen la capacidad de invadir tejidos del huésped y persistir, mientras continúan produciendo un antígeno heterólogo. Además, las cepas de *Salmonella* provocan fuertes respuestas inmunitarias humorales y celulares, tanto a nivel de los compartimentos sistémicos como mucosos.

Varias cepas de *Salmonella typhimurium* atenuadas por aromutaciones han demostrado ser vehículos de administración seguros y efectivos para antígenos heterólogos en modelos animales.

30 En el documento WO 03/073995 se describen enfoques para administrar estructuras de ADN que codifican antígenos heterólogos, en particular proteínas receptoras de VEGF, a través de cepas vivas atenuadas de *Salmonella typhimurium* en células diana de ratón. Niethammer et al., (*Nature Medicine* 2002, 8(12), 1369) demostraron que la cepa SL7207 de *S. typhimurium aroA* atenuada alberga un vector de expresión que codifica el receptor 2 del factor de crecimiento endotelial vascular murino (VEGFR-2 o FLK-1), que es esencial para la angiogénesis tumoral, es funcional como una vacuna contra el cáncer.

35 Sin embargo, solo hay una cepa atenuada de *Salmonella* entérica serovar, específicamente, *Salmonella* entérica serovar *typhi* Ty21a (abreviado: *S. typhi* Ty21a), que se ha aceptado para su uso en humanos.

Esta vacuna oral viva bien tolerada contra la fiebre tifoidea se obtuvo mediante mutagénesis química del aislado bacteriano virulento de tipo salvaje *S. typhi* Ty2 y alberga una mutación con pérdida de función en el gen *galE*, así como otras mutaciones menos definidas. Se ha licenciado como vacuna contra la fiebre tifoidea en muchos países después de que se demostró que es eficaz y segura en pruebas de campo.

40 Existe una fuerte demanda de vectores bacterianos vivos atenuados como vehículos de administración de antígenos heterólogos, especialmente antígenos cancerígenos, que son seguros para su uso en humanos. La provisión de dicho vector bacteriano atenuado como vacuna de ADN también requiere el cultivo eficiente, de alto rendimiento de la cepa bacteriana atenuada transformada con dicho ADN de antígeno heterólogo. La transformación de cepas bacterianas con construcciones de ADN recombinante a menudo da como resultado una disminución del crecimiento celular. Por lo tanto, a menudo es necesario mejorar el proceso de cultivo preferiblemente a gran escala para obtener altos rendimientos de células viables y funcionalmente activas.

Objetos de la invención

50 Un objetivo de la presente invención era mejorar los métodos de la técnica anterior para cultivar cepas mutantes atenuadas de *Salmonella typhi*. En particular, era un objeto de la presente invención desarrollar un método de cultivo eficiente para obtener altos rendimientos de células bacterianas viables que albergan una molécula de ADN recombinante que codifica un antígeno heterólogo. Tal método y cepas mutantes atenuadas de *Salmonella typhi* obtenibles mediante dicho método servirían para satisfacer la gran necesidad de cepas de *Salmonella* atenuadas y seguras como vacunas de ADN para uso en humanos. Tal método sería particularmente adecuado para la producción comercial a gran escala de vacunas de ADN con base en cepas de *Salmonella* atenuadas.

Resumen de la invención

- 5 Sorprendentemente, se ha descubierto que el rendimiento celular de una cepa atenuada de *Salmonella typhi* que carece de actividad de galactosa epimerasa puede aumentar notablemente si la cantidad de glucosa en el medio se reduce a cero antes de alcanzar la fase estacionaria. Los inventores han demostrado que la adición de glucosa al medio durante la fermentación no da como resultado una masa celular más alta/valores de OD más altos. Por el contrario, al omitir la adición de glucosa durante el cultivo de la cepa atenuada de *Salmonella* se obtienen densidades ópticas de aproximadamente 6 a aproximadamente 8 al comienzo de la fase estacionaria de crecimiento celular, mientras que el cultivo idéntico a un nivel de glucosa de aproximadamente 1 a aproximadamente 4 g/l, preferiblemente de aproximadamente 2 a aproximadamente 3 g/l (por ejemplo, conseguido pulsando secuencialmente el medio con glucosa) da como resultado densidades ópticas de solo aproximadamente 3 a aproximadamente 5,5.
- 10 El método para cultivar una cepa mutante atenuada de *Salmonella typhi* de acuerdo con la invención proporciona además células de diferente morfología en comparación con células cultivadas con glucosa. Las células de *Salmonella typhi* cultivadas sin glucosa son más pequeñas y más cortas que las células cultivadas con glucosa. Sin embargo, estas células morfológicamente diferentes, como las células cultivadas en un medio que contiene glucosa, son completamente biológicamente activas y no muestran ninguna tendencia a la lisis celular.
- 15 El aumento en el rendimiento celular obtenido omitiendo la adición de glucosa durante el cultivo de acuerdo con el método de la presente invención se observa independientemente de si la cepa mutante atenuada seleccionada de *Salmonella typhi* alberga una molécula de ADN recombinante que codifica un antígeno heterólogo (tal como ADNpc3.1-FLK1, o un plásmido derivado del mismo, como pVAX10.VR2-1) o no (la cepa atenuada vacía).
- 20 Por lo tanto, en un aspecto, la presente invención se refiere a un método para cultivar una cepa mutante atenuada de *Salmonella typhi* que alberga una mutación con pérdida de función en el gen *galE* y que comprende al menos una copia de una molécula de ADN recombinante que comprende un casete de expresión que comprende la etapa de cultivar la cepa en un medio regulado que comprende peptona a un valor de pH de partida aproximadamente neutro a escala de fermentación, en la que no se agrega glucosa al medio durante la fermentación y la cantidad de glucosa se reduce a cero antes de alcanzar la fase estacionaria, y en la que el volumen del medio es al menos aproximadamente 10 litros.
- 25 En el método de acuerdo con la invención, no se agrega glucosa al medio durante la fermentación y la cantidad inicial de glucosa se agota antes de alcanzar la fase estacionaria.
- En una realización particular, dicha cepa mutante atenuada de *Salmonella typhi* es *Salmonella typhi* Ty21a.
- 30 En una realización particular, el casete de expresión es un casete de expresión eucariota. En una realización particular, el casete de expresión codifica una proteína receptora de VEGF. En una realización particular, la proteína receptora de VEGF se selecciona del grupo que consiste en VEGFR-2 humana y un homólogo de la misma que comparte al menos aproximadamente 80% de homología con la misma. En una realización preferida, el VEGFR-2 humano tiene la secuencia de aminoácidos que se encuentra en la SEQ ID NO 1.
- 35 En una realización particular, el medio regulado comprende peptona de origen no animal. En una realización preferida, dicho medio regulado es caldo de soja triptico (TSB) de origen no animal.
- En una realización particular, el volumen del medio es de aproximadamente 10 litros a aproximadamente 10.000 litros, más particularmente de aproximadamente 30 litros a aproximadamente 1.000 litros, lo más particularmente de aproximadamente 100 litros a aproximadamente 500 litros.
- 40 En una realización particular, la concentración de glucosa inicial corresponde a la del medio bacteriano mínimo o menos, particularmente la concentración de glucosa inicial es de aproximadamente 0 g/l a aproximadamente 4 g/l.
- En una realización particular, el valor de pH inicial es de aproximadamente 5 a menos de aproximadamente 9, particularmente de aproximadamente 6 a aproximadamente 8, más particularmente de aproximadamente 6,5 a aproximadamente 7,5.
- 45 En una realización particular, el valor de pH se ajusta durante dicho cultivo a un valor de pH de aproximadamente 6 a aproximadamente 8, particularmente a un valor de pH de aproximadamente 6,5 a aproximadamente 7,5.
- En una realización particular, el progreso del crecimiento se determina midiendo la densidad óptica (OD), particularmente mediante el control in situ de la densidad óptica del cultivo o tomando muestras y midiendo la densidad óptica de las muestras.
- 50 En otra realización particular, el progreso del crecimiento se determina midiendo la densidad celular, de manera particular microscópicamente o midiendo la resistencia eléctrica, o mediante citometría de flujo.
- En otra realización particular, el progreso del crecimiento se determina midiendo el valor de unidades formadoras de colonias (CFU) tomando muestras y cultivando en placas de agar.

En una realización particular, las células se cosechan antes de alcanzar una densidad óptica de aproximadamente 6, particularmente a una densidad óptica de aproximadamente 5 a aproximadamente 6.

5 En una realización particular, la cepa mutante atenuada de *Salmonella typhi* es *Salmonella typhi* Ty21a y la molécula de ADN recombinante comprende el gen de resistencia a kanamicina, el ori pMB1 y un casete de expresión eucariota que codifica VEGFR-2 humano, bajo el control del promotor CMV. En una realización particular, el VEGFR-2 humano tiene la secuencia de ácido nucleico que se encuentra en la SEQ ID NO 2.

10 También se describe aquí una cepa mutante atenuada de *Salmonella typhi* que carece de actividad galactosa epimerasa y que comprende al menos una copia de una molécula de ADN recombinante que comprende un casete de expresión, que puede obtenerse mediante un método para cultivar la cepa, que comprende la etapa de cultivar la cepa en un medio regulado que comprende peptona a un valor de pH inicial aproximadamente neutro en escala de fermentación, en el que la cantidad de glucosa en el medio durante las fermentaciones se ajusta de manera que la cantidad de glucosa se reduce a cero antes de alcanzar la fase estacionaria.

Particularmente, no se agrega glucosa al medio durante la fermentación y la cantidad inicial de glucosa se agota antes de alcanzar la fase estacionaria.

15 Particularmente, el casete de expresión es un casete de expresión eucariota que codifica una proteína receptora de VEGF. En una realización particular, el casete de expresión eucariota codifica una proteína receptora de VEGF seleccionada del grupo que consiste en VEGFR-2 humano y un homólogo del mismo que comparte al menos aproximadamente 80% de homología con el mismo. En una realización particular, el VEGFR-2 humano tiene la secuencia de aminoácidos que se encuentra en la SEQ ID NO 1.

20 Particularmente, la cepa mutante atenuada es *Salmonella typhi* Ty21a y la molécula de ADN recombinante comprende el gen de resistencia de kanamicina, el pMB1 ori y un casete de expresión eucariota que codifica VEGFR-2 humano bajo el control del promotor de CMV. En una realización particular, el VEGFR-2 humano tiene la secuencia de ácido nucleico que se encuentra en la SEQ ID NO 2.

25 También se describe aquí una cepa mutante atenuada de *Salmonella typhi* Ty21a que comprende al menos una copia de una molécula de ADN recombinante que comprende un casete de expresión eucariota que codifica una proteína receptora de VEGF para uso como vacuna.

Particularmente, la proteína receptora de VEGF se selecciona del grupo que consiste en VEGFR-2 humano y un homólogo del mismo que comparte al menos aproximadamente 80% de homología con el mismo.

Particularmente, el VEGFR-2 humano tiene la secuencia de aminoácidos que se encuentra en la SEQ ID NO 1.

30 El hecho de que se puedan obtener mayores rendimientos celulares de cepas mutantes atenuadas de *Salmonella typhi* mediante el método de acuerdo con la invención es de importancia con respecto a la fabricación segura y económica de una vacuna de ADN comercial con base en una cepa atenuada de *Salmonella*, tal como la cepa aprobada de *Salmonella typhi* Ty21a. La *Salmonella typhi* Ty21a que porta una molécula de ADN recombinante que codifica un antígeno heterólogo, tal como el plásmido de expresión pVAX10.VR2-1, se puede cultivar de este modo
35 con rendimientos más altos, dando como resultado mayores rendimientos de la vacuna de ADN para uso en humanos. Esto también cumple con las fuertes normas de seguridad que deben aplicarse al fabricar y cultivar *Salmonella*, incluso en una versión atenuada.

Descripción detallada de la invención

40 La presente invención se puede entender más fácilmente por referencia a la siguiente descripción detallada de la invención y a los ejemplos incluidos en ella.

1) *Salmonella typhi* incluyendo *Salmonella typhi* Ty2 de tipo salvaje y *Salmonella typhi* Ty21a atenuada

45 Dentro del método objetivo, puede usarse cualquier cepa de *Salmonella typhi* atenuada que albergue una mutación con pérdida de función en el gen galE. La cepa *S. typhi* Ty21a atenuada es el componente activo de Typhoral L®, también conocido como Vivotif® (fabricado por Berna Biotech Ltd., una compañía de Crucell, Suiza). Actualmente es la única vacuna oral con licencia contra la fiebre tifoidea. Esta vacuna tiene licencia en más de 40 países. El número de autorización de comercialización de Typhoral L® es PL 15747/0001 con fecha de 16 de diciembre de 1996. Una dosis de vacuna contiene al menos 2×10^9 unidades formadoras de colonias *S. typhi* Ty21a viables y al menos 5×10^9 células Ty21a de *S. typhi* no viables. La cepa de la vacuna se cultiva en fermentadores bajo condiciones controladas en un medio que contiene un digesto de extracto de levadura, un digesto de ácido de caseína, glucosa y galactosa.

50 Una de las propiedades bioquímicas de la cepa bacteriana *Salmonella typhi* Ty21a, según se usa de acuerdo con esta invención, es su incapacidad para metabolizar galactosa. La cepa bacteriana atenuada recombinante tampoco es capaz de reducir el sulfato a sulfuro, lo que lo diferencia de la cepa tipo salvaje *Salmonella typhi* Ty2. En cuanto a las características serológicas de cepa *Salmonella typhi* Ty21a, contiene el antígeno 09 que es un polisacárido de la membrana externa de la bacteria y carece del antígeno 05 que a su vez es un componente característico de *Salmonella*

typhi Ty2. antígeno que es un polisacárido de la membrana externa de la bacteria y carece del antígeno 05 que a su vez es un componente característico de Salmonella typhi Ty2. De nuevo, esta característica serológica respalda la lógica para incluir la prueba apropiada en el panel de pruebas de identidad para la liberación de lotes.

5 En una realización particular, la cepa mutante atenuada de Salmonella typhi cultivada mediante el método de acuerdo con la invención es Salmonella typhi Ty21a que lleva al menos una copia de un ADN plasmídico, pVAX10.VR2-1, que codifica un casete de expresión eucariota del receptor 2 del factor de crecimiento vascular endotelial humano (VEGFR-2). Esta cepa mutante atenuada se denomina VXM01 y se puede usar como vacuna oral contra el cáncer.

10 De acuerdo con la invención, la cepa atenuada Salmonella typhi Ty21a funciona como el portador bacteriano del ADN del plásmido que codifica el antígeno heterólogo receptor 2 del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFR-2), en la administración oral de la vacuna de ADN denominada VXM01.

15 La administración de vacunas con base en la tecnología de ADN plasmídico da como resultado un amplio espectro de respuestas inmunitarias tanto de la mucosa como sistémicas. Los vectores replicadores vivos producen sus propios factores inmunomoduladores tales como lipopolisacáridos (LPS) in situ que pueden constituir una ventaja sobre otras formas de administración tales como la microencapsulación. Además, el uso de la ruta natural de entrada resulta ser
 20 beneficioso ya que muchas bacterias, como Salmonella, salen del lumen intestinal a través de las células M de las placas de Peyer y migran eventualmente a los ganglios linfáticos y al bazo, permitiendo así dirigir las vacunas a sitios inductores del sistema inmune. La cepa de vacuna de Salmonella typhi, Ty21a, ha demostrado hasta ahora, tener un excelente perfil de seguridad. Al salir del lumen intestinal a través de las células M, las bacterias son absorbidas por las células fagocíticas, como los macrófagos y las células dendríticas. Estas células son activadas por el patógeno y comienzan a diferenciarse, y probablemente migrar, hacia los nódulos linfáticos y el bazo. Debido a sus mutaciones atenuantes, las bacterias de la cepa S. typhi Ty21 no son capaces de persistir en estas células fagocíticas pero mueren en este momento. No hay datos disponibles hasta la fecha que indiquen que S. typhi Ty21a pueda ingresar al torrente sanguíneo sistémicamente. La cepa de vacuna viva atenuada Salmonella typhi Ty21a, por lo tanto, permite determinar como objetivo específico el sistema inmune mientras que muestra un excelente perfil de seguridad.

25 Los portadores bacterianos vivos atenuados que llevan ADN que codifica antígenos diana, pueden usarse como vehículos para la administración oral de estos antígenos. Los vectores replicantes vivos producen, in situ, sus propios factores inmunomoduladores, como los lipopolisacáridos (LPS), que también constituyen una ventaja sobre otras formas de administración de vacunas, como la microencapsulación.

30 La inmunización genética podría ser ventajosa con respecto a la vacunación convencional. El ADN diana puede detectarse durante un período de tiempo considerable actuando por lo tanto como un depósito del antígeno. Los motivos de secuencia en algunos plásmidos, como las islas GpC, son inmunoestimuladores y pueden funcionar como adyuvantes potenciados por la inmunoestimulación debida a LPS y otros componentes bacterianos.

35 Como se indicó anteriormente, las bacterias recombinantes de Salmonella son absorbidas por las células fagocíticas al salir del lumen intestinal a través de las células M. Estas células fagocíticas son activadas por el patógeno y comienzan a diferenciarse, y probablemente migrar, hacia los ganglios linfáticos y el bazo. Durante este período, las bacterias mueren debido a su mutación atenuada y liberan los vectores de expresión eucariotas con base en plásmidos seguidos de una transferencia de los plásmidos al citosol, ya sea a través de un sistema de transporte específico o mediante fuga endosómica. Finalmente, el vector ingresa al núcleo, donde se transcribe, lo que lleva a la expresión del antígeno en el citosol de la célula huésped. Células T citotóxicas específicas contra el antígeno heterólogo, preferiblemente VEGFR-2 humano, son inducidas por las células presentadoras de antígeno activadas (APCs).

40 En una realización particular, la molécula de ADN recombinante transportada por la cepa Ty21a de Salmonella typhi es un ADN plasmídico, pVAX10.VR2-1 (7,58 kb), que contiene un promotor temprano inmediato de citomegalovirus humano eucariota (CMV), para asegurar una transcripción eficaz de la proteína VEGFR-2 en la célula huésped, y un origen de replicación procariota (ori), para asegurar la multiplicación dentro del huésped bacteriano. El vector pcADN3 está disponible comercialmente (Invitrogen) y se modificó para cumplir los requisitos normativos por lo que las
 45 secuencias no necesarias para la replicación en E. coli o para la expresión de las proteínas recombinantes en células de mamífero se eliminaron para limitar las secuencias de ADN con posible homología con el genoma humano y para minimizar la posibilidad de integración cromosómica. Además, el gen de resistencia a la kanamicina sustituyó el gen resistente a la ampicilina. Para la cepa VXM01 de Salmonella typhi mutante atenuada producida de acuerdo con el método de esta invención, el origen pUC de alta copia del plásmido pVAX1-Fik-1 se reemplazó por el origen de
 50 replicación de baja copia de pBR322 en pVAX10.VR2-1. La modificación de baja copia se realizó con el fin de reducir la carga metabólica y hacer la construcción más estable. Los detalles de la construcción del plásmido pVAX10.VR2-1 se representan en la Figura 2.

2) Receptor de factor de crecimiento endotelial vascular:

55 Factor de crecimiento endotelial vascular VEGF (Kd 75-760 pM) es un miembro de una familia de seis proteínas estructuralmente relacionadas (VEGF-A [también conocido como VEGF], -B, -C, -D, -E y PLGF [factor de crecimiento placentario, también conocido como PGF o PIGF-2]) que regula el crecimiento y la diferenciación de múltiples componentes del sistema vascular, especialmente los vasos sanguíneos y linfáticos. El papel de VEGF en la

angiogénesis parece estar mediado por la interacción de esta proteína con VEGFR-2. VEGFR-2, también conocido como receptor que contiene el dominio de inserción de quinasa (KDR), es un receptor de alta afinidad de 1.356 aminoácidos de longitud, 200-230 kDa de peso molecular, para VEGF así como para VEGF-C y VEGF-D. Identificado en humanos mediante el cribado de ADNc endotelial para receptores de tirosina quinasa, VEGFR-2 comparte una identidad de secuencia del 85% con el VEGFR-2 murino descubierto previamente, también conocido como cinasa hepática fetal 1 (Flk-1). El VEGFR-2 se expresa normalmente en precursores endoteliales y hematopoyéticos, así como en células endoteliales, células madre hematopoyéticas nacientes y el estroma del cordón umbilical. Sin embargo, en la vasculatura adulta inactiva, el ARNm de VEGFR-2 parece estar subregulado.

5 El dominio extracelular de VEGFR-2 contiene 18 posibles sitios de glicosilación unidos a N. El VEGFR-2 se sintetiza inicialmente como una proteína de 150 kDa y se glicosila rápidamente en una forma intermedia de 200 kDa, y luego se glicosila aún más a una rata más lenta a una proteína madura de 230 kDa que se expresa en la superficie celular.

10 La secuencia de aminoácidos de la secuencia de ADNc que codifica VEGFR-2 humano clonado en el plásmido pVAX10.VR2-1 se presenta en la Figura 1.

3) Fabricación de Salmonella typhi Ty21a vacía y manipulada

15 El proceso de fabricación de la cepa mutante atenuada de Salmonella typhi como se lleva a cabo de acuerdo con la invención comprende cultivar la cepa mutante atenuada de Salmonella typhi en un medio que comprende peptona como fuente de aminoácidos y péptidos. Los medios adecuados para el método de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, medio TSB estándar así como medio TSB de origen no animal. Tanto el TSB estándar como el TSB de origen no animal comprenden 2,5 g/l de glucosa. Usualmente, la cantidad de glucosa inicial en TSB, o medio de tipo TSB se consume más o menos por completo después de 3-5 horas de cultivo de una cepa de Salmonella typhi atenuada, y debe sustituirse por glucosa fresca cada 3-5 horas para mantener un nivel de glucosa más o menos constante en el medio de cultivo. La observación de que omitir la adición de glucosa durante el cultivo de cepas mutantes atenuadas de Salmonella typhi que albergan opcionalmente una molécula de ADN recombinante que codifica un antígeno heterólogo conduce a un aumento del crecimiento celular en comparación con el cultivo con adición de glucosa es muy sorprendente y sugiere que rutas metabólicas específicas en las células bacterianas se desencadenan por la ausencia de glucosa. El efecto descrito también se puede observar, si el medio TSB o similar a TSB no contiene glucosa al comienzo del proceso de cultivo. Por lo tanto, el método de acuerdo con la invención tiene, además de mayores rendimientos celulares y por lo tanto mayores rendimientos de la vacuna de ADN final, la ventaja adicional de ser de menos coste y más simple haciendo innecesarios los pasos de alimentación de glucosa durante la fermentación.

30 El proceso de fabricación de la cepa mutante atenuada de Salmonella typhi Ty21a como se lleva a cabo de acuerdo con la invención se describe a modo de ejemplo en la siguiente Tabla 1:

Células I (Salmonella Typhi Ty21a, WT) o Células II (Salmonella Typhi Ty21a-pVAX10.VR2-1)
↓
2 x 500 ml TSB + kanamicina (500µL)
(OD ₆₀₀ > 0,3)
↓
10 x 1000 ml TSB + kanamicina (75mL)
(OD ₆₀₀ ≥ 0,5)
100 L volumen de fermentación
TSB + galactosa al 0,001 %
- 30 °C
- flujo de aire 100L/min (1 vvm)

Células I (Salmonella Typhi Ty21a, WT) o Células II (Salmonella Typhi Ty21a-pVAX10.VR2-1)
- presión no controlada
- pH 7,0 controlado con NaOH
- espuma controlada (Corning)
- pO ₂ ≥ 40% regulado por mezclador
- mezclador a mínimo 200 rpm
- sin alimentación de glucosa
- OD _{600nm} final (final de la fase de crecimiento exponencial)
- Enfriamiento a al menos 25 °C antes de la cosecha
filtrado de flujo cruzado
- 10 veces concentración
- 10 veces intercambio de regulador en diafiltración con sacarosa al 15%, solución de ascorbato al 0,45% pH 7,2, seguido por concentración adicional hasta 1/20 vol. de cosecha original
almacenar a 2-8 °C hasta llenar por aproximadamente 24 horas

- En más detalle: los cultivos (medio TSB mas 25 µg/ml de kanamicina) se inoculan cada uno con diferentes muestras de cepas de salmonella (Ty21a vacío y Ty21a recombinante (pVAX10.VR2-1). En las muestras de células de producción se utiliza medio TSB que contiene 2,5-3,0 g/l de glucosa, preferiblemente 2,5 g/l. En un medio de control se omite la glucosa. Además, el medio contiene kanamicina, preferiblemente 25 µg/ml. Los cultivos se incuban a 30 °C ± 2 °C con agitación hasta que se alcanza una densidad óptica de OD_{600nm} > 0,1. Se describen más detalles en la sección de Ejemplos.
- 5
- Controles en proceso para el primer y segundo pasos de precultivo, al finalizar los tiempos de incubación, incluye análisis del crecimiento bacteriano midiendo OD_{600nm}, pH y CFU/ml, así como, si corresponde, determinación de la estabilidad del plásmido (PST) y examen bacteriano. El último análisis se basa en un ensayo de agar sangre para determinar las reacciones hemolíticas de microorganismos patógenos exigentes. El valor de CFU se evalúa antes y después de la filtración de flujo cruzado (CFF). Tras la formulación del concentrado bacteriano final, se midieron las UFC y el índice de refracción en la formulación con la concentración bacteriana más baja.
- 10
- El método de acuerdo con la invención, en el que se omite la alimentación con glucosa, requiere menos mano de obra y es más eficiente, dando como resultado rendimientos celulares mayores.
- 15
- 4) Influencia de la alimentación con glucosa durante el cultivo de células
- Se probó el crecimiento de células de Salmonella typhi Ty21a vacías y manipuladas, en un medio TSB o similar a TSB, cultivando las células entre 0 y 30 horas a 25-35 °C, preferiblemente 30 °C y un pH entre 6,5 y 7,5, preferiblemente 7,0. El crecimiento se midió en OD o en CFU/ml (unidades formadoras de colonias).
- 20
- Los resultados de estos experimentos muestran que la adición de glucosa no da como resultado mayores valores de OD/rendimientos de masa celular de la cepa de tipo salvaje a pesar del consumo de glucosa. Por el contrario, los matraces sin adición de glucosa alcanzaron valores de OD más altos (6 para el precultivo 1, 8 para el precultivo 2). Aproximadamente 1 hora después de la adición de glucosa, la OD permaneció estática (o incluso ligeramente disminuida) en comparación con el crecimiento sin adición de glucosa. En pulsos repetidos, el consumo de glucosa disminuyó, no se observó ningún efecto adicional/aditivo sobre el crecimiento. Los valores de pH también se vigilaron durante la fermentación, y en algunos experimentos se ajustaron al valor de pH inicial, si se podían observar cambios.
- 25

- 5 Sin la adición de glucosa, se observó un cambio de pH a alcalino después del agotamiento de la glucosa, mientras que con un pulso de glucosa el valor del pH disminuyó (comparar la Figura 8 para el precultivo 1 y la Figura 9 para el precultivo 2). Se observaron fenómenos en todos los precultivos utilizados, lo que indica que no hubo influencia del número de generación. La pulsación de glucosa se realizó de 1-5 veces (preferiblemente 1-3 veces) durante un tiempo promedio de cultivo de 30 horas como máximo. Usualmente, después de aproximadamente 5-15 horas, el crecimiento celular entró en la fase estacionaria después de la fase exponencial, dependiendo de las condiciones de inicio del cultivo celular. Si se cultivó un precultivo cultivado con pulso de glucosa en medio fresco, se observaron las mismas características de crecimiento (valores más altos de OD/cambio de pH a alcalino sin adición de glucosa).
- 10 Al omitir la alimentación con glucosa en la fase de crecimiento o incluso en el medio de inicio desde el principio, se puede observar un cambio de los valores de pH a alcalinos (de ca. 7 a ca. 8), aunque el sistema de medio está regulado. Puede ser favorable ajustar el valor de pH durante el crecimiento celular al pH inicial original de ca. 7,0.
- 15 Los resultados indicaron que las concentraciones de glucosa por encima de un límite comparablemente bajo (aproximadamente 2,5 g/l) desencadenan un cambio reversible en el metabolismo (glucosa). Sin desear estar limitado a ninguna teoría, se presume que una sustancia, aún no identificada, se secreta en el medio, lo que inhibe aún más crecimiento, incluso si la glucosa disminuye nuevamente por debajo del nivel de activación. Después de la inoculación en un nuevo medio, esta sustancia se diluye a una concentración por debajo de la efectividad. Se pueden obtener resultados muy similares, si el medio de inicio no contiene glucosa.
- 20 Curiosamente, se pueden obtener los mismos resultados no solo con Salmonella typhi Ty21a vacía sino también con la cepa manipulada de Salmonella typhi Ty21a, pVAX10.VR2-1 (VXM01), lo que indica que el efecto sorprendente no está influenciado por la construcción bacteriana manipulada artificialmente. Sin embargo, como se puede ver en la Figura 12, el crecimiento celular de la bacteria modificada sin alimentación con glucosa es, como se esperaba, más lento que el de la cepa de tipo salvaje, pero finalmente puede obtener los mismos valores de densidad óptica alta (OD 7-8) en comparación con la cepa de tipo salvaje, mientras que la cepa de Salmonella manipulada cultivada en presencia de glucosa mediante pulsos de glucosa nunca gana estos altos valores de densidad óptica y se detiene, por regla general, a una densidad celular de OD 3 o inferior.
- 25 Tanto la cepa vacía de S. typhi Ty21a, como la manipulada, muestran características de crecimiento comparables con respecto al crecimiento con y sin adición de glucosa.
- 30 En resumen, los resultados de la invención como se describió anteriormente y a continuación, muestran con ambas cepas, que la adición de glucosa no da como resultado rendimientos más altos de valores de OD/masa celular. Por el contrario, los matraces sin adición de glucosa alcanzaron valores de OD más altos. Sin la adición de glucosa, se observa un cambio de pH a alcalino después del agotamiento de la glucosa, mientras que con el pulso de glucosa el valor de pH cae. Uno de los efectos del cambio dependiente de la concentración de glucosa en el metabolismo durante el cultivo de Salmonella typhi Ty21a consiste, presumiblemente, en la excreción de una sustancia inhibidora en el medio de crecimiento, que hasta ahora no se conoce.
- 35 En un aspecto, la presente invención se refiere a un método para cultivar una cepa mutante atenuada de Salmonella typhi que alberga una mutación con pérdida de función en el gen galE y que comprende al menos una copia de una molécula de ADN recombinante que comprende un casete de expresión, que comprende la etapa de cultivar la cepa en un medio regulado que comprende peptona a un valor de pH de inicio aproximadamente neutro a escala de fermentación, en el que no se agrega glucosa al medio durante la fermentación y la cantidad de glucosa se reduce a cero antes de alcanzar la fase estacionaria, y en el que el volumen del medio es al menos aproximadamente 10 litros.
- 40 En el contexto de la presente invención, el término "comprende" o "que comprende" significa "que incluye, pero no se limita a". El término está destinado a ser de composición abierta, para especificar la presencia de cualquier característica, elementos, enteros, pasos o componentes indicados, pero no para excluir la presencia o adición de una o más características, elementos, enteros, pasos, componentes o grupos de los mismos. El término "que comprende" incluye así los términos más restrictivos "que consisten en" y "esencialmente que consiste en".
- 45 En el contexto de la presente invención, el término "alrededor de" o "aproximadamente" significa dentro del 20%, alternativamente dentro del 10%, incluyendo dentro del 5% de un valor o intervalo dado. Alternativamente, especialmente en sistemas biológicos, el término "alrededor de" significa dentro de aproximadamente un registro (es decir, un orden de magnitud), que incluye dentro de un factor de dos de un valor dado.
- 50 En el contexto de la presente invención, los términos "crecimiento" y "cultivo" se usan como sinónimos y se refieren a la propagación de microorganismos en medios que conducen a su crecimiento.
- 55 En el contexto de la presente invención, el término "fermentación" se refiere al cultivo a gran escala de microorganismos, realizado típicamente en un fermentador, es decir, un aparato que mantiene las condiciones óptimas para el crecimiento de dichos microorganismos, para la producción de alto rendimiento de un producto microbiano deseado, incluidos los metabolitos y los propios microorganismos.
- En el contexto de la presente invención, el término "atenuado" se refiere a una cepa bacteriana de virulencia reducida en comparación con la cepa bacteriana original, que no alberga la mutación atenuante. Las cepas bacterianas

atenuadas han perdido preferiblemente su virulencia pero conservan su capacidad de inducir inmunidad protectora. Las bacterias atenuadas se pueden encontrar de forma natural o pueden producirse en el laboratorio, por ejemplo, mediante la adaptación a un nuevo medio o cultivo celular o pueden producirse mediante tecnología de ADN recombinante.

5 En el contexto de la presente invención, el término "cepa mutante" se refiere a una cepa bacteriana que alberga una mutación en su genoma. En este contexto, el término "mutación" se refiere a un cambio en una secuencia de ácido nucleico, que incluye mutaciones puntuales, inserciones, deleciones, translocaciones e inversiones.

10 En el contexto de la presente invención, el término "molécula de ADN recombinante" se refiere a una construcción de ADN modificada genéticamente, preferiblemente compuesta de fragmentos de ADN de origen diferente. La molécula de ADN recombinante puede ser un ácido nucleico lineal, o preferiblemente, un plásmido de ADN recombinante circular generado al introducir un marco de lectura abierto de interés en un plásmido de vector de expresión. El marco de lectura abierto es preferiblemente un antígeno heterólogo. El antígeno heterólogo es preferiblemente un antígeno cancerígeno. El antígeno cancerígeno es preferiblemente una proteína receptora de VEGF. En el contexto de la presente invención, el término "antígeno heterólogo" se refiere a un antígeno derivado de una especie que no sea Salmonella typhi.

15 En el contexto de la presente invención, el término "casete de expresión" se refiere a una unidad de ácido nucleico que comprende al menos un gen bajo el control de secuencias reguladoras que controlan su expresión. Los casetes de expresión comprendidos en la cepa mutante atenuada de Salmonella typhi pueden mediar preferiblemente la transcripción del marco de lectura abierto incluido en las células diana. Los casetes de expresión típicamente comprenden un promotor, al menos un marco de lectura abierto y una señal de terminación de la transcripción.

20 En el contexto de la presente invención, el término "peptona" se refiere a una mezcla de productos de escisión que comprende aminoácidos y péptidos producidos por hidrólisis de materiales que contienen proteínas, por ejemplo por hidrólisis parcial ácida o enzimática de mezclas de proteínas nativas.

25 En el contexto de la presente invención, el término "valor de pH aproximadamente neutro" se refiere a un valor de pH desde aproximadamente 5 a aproximadamente 9, preferiblemente desde aproximadamente 6 a aproximadamente 8, más preferiblemente desde aproximadamente 6,5 a aproximadamente 7,5, lo más preferiblemente de aproximadamente 7,0.

30 Los medios adecuados para el método de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, medio TSB estándar así como medio TSB de origen no animal. El medio TSB estándar conocido en la técnica está compuesto por peptona de caseína pancreática, peptona de harina de soja, hidrogenofosfato de dipotasio (regulador), cloruro de sodio y glucosa (= dextrosa) como fuente de energía en una concentración inicial de 2,5 g/l. Un ejemplo de medio TSB adecuado de origen no animal es caldo CASO de origen no animal constituido por peptona derivada de origen no animal, hidrogenofosfato de dipotasio (regulador), cloruro de sodio y glucosa en una concentración inicial de 2,5 g/l.

35 En el contexto de la presente invención, el término "fase estacionaria" se refiere a la etapa de crecimiento bacteriano después de la fase exponencial o logarítmica, en el que la densidad celular en el medio de crecimiento permanece aproximadamente constante. El término "antes de alcanzar la fase estacionaria" se refiere a cualquier punto de tiempo antes de la fase estacionaria e incluye la fase de disminución (es decir, la primera fase del crecimiento bacteriano durante el cual las bacterias se adaptan a las condiciones de crecimiento) y la fase exponencial. Sorprendentemente se descubrió que el cultivo de cepas mutantes atenuadas de Salmonella typhi de acuerdo con el método de la presente invención prolonga la fase de crecimiento exponencial. Al cultivar la cepa mutante atenuada Salmonella typhi Ty21a con una cantidad de glucosa inicial que se agota durante la fase de crecimiento exponencial sin adición de glucosa durante el proceso de fermentación, la fase estacionaria se alcanza no antes que después de 9 horas de cultivo, preferiblemente después de 9 a 20 horas de cultivo, más preferiblemente después de 9 a 15 horas después del cultivo, más preferiblemente después de 9 a 12 horas después del cultivo.

45 En el contexto de la presente invención, el término "la glucosa se agota" significa que la cantidad inicial de glucosa en el medio se consume (es decir, se absorbe y se metaboliza) por la bacteria.

En una realización particular, la cepa mutante atenuada de Salmonella typhi es Salmonella typhi Ty21 a.

50 En una realización particular, el casete de expresión es un casete de expresión eucariota. Se ha demostrado que la cantidad de antígeno heterólogo requerida para inducir una respuesta inmune adecuada puede ser tóxica para la bacteria y dar como resultado la muerte celular, la sobre atenuación o la pérdida de expresión del antígeno heterólogo. El uso de un casete de expresión eucariota que no se expresa en el vector bacteriano, sino solo en la célula diana, supera este problema de toxicidad.

55 En el contexto de la presente invención, el término "casete de expresión eucariota" se refiere a un casete de expresión que permite la expresión del marco de lectura abierto en una célula eucariota. Un casete de expresión eucariota comprende secuencias reguladoras que pueden controlar la expresión de un marco de lectura abierto en una célula eucariota, preferiblemente un promotor y una señal de poliadenilación. Los promotores y las señales de poliadenilación incluidas en las moléculas de ADN recombinante comprendidas por la cepa de Salmonella typhi para uso como una

- vacuna de la presente invención se seleccionan preferiblemente para que sean funcionales dentro de las células del sujeto a inmunizar. Ejemplos de promotores útiles en la cepa mutante atenuada de *Salmonella typhi* de la presente invención, especialmente en la producción de una vacuna de ADN para promotores y señales de poliadenilación incluidas en las moléculas de ADN recombinante compuestas por la cepa *Salmonella typhi* para uso como vacuna de
- 5 la presente invención se seleccionan preferiblemente para que sean funcionales dentro de las células del sujeto a inmunizar. Ejemplos de promotores útiles en la cepa de *Salmonella typhi* mutante atenuada de la presente invención, especialmente en la producción de una vacuna de ADN para humanos, incluyen, pero no se limitan a, promotores del virus de simio 40 (SV40), promotor del virus del tumor mamario de ratón (MMTV), virus de inmunodeficiencia humana (VIH) tal como el promotor de repetición terminal larga de VIH (LTR), virus Moloney, citomegalovirus (CMV) tal como
- 10 el promotor temprano inmediato de CMV, virus de Epstein Barr (EBV), virus de sarcoma de Rouse (RSV) así como promotores de genes humanos tales como actina humana, miosina humana, hemoglobina humana, creatina muscular humana y metalotioneína humana. En una realización particular, el casete de expresión eucariota contiene el promotor de CMV. En el contexto de la presente invención, el término "promotor de CMV" se refiere al promotor de citomegalovirus temprano inmediato.
- 15 Los ejemplos de señales de poliadenilación adecuadas, especialmente para la producción de una vacuna de ADN para humanos, incluyen, pero no se limitan a, el sitio de poliadenilación de BGH, señales de poliadenilación de SV40 y señales de poliadenilación de LTR. En una realización particular, el casete de expresión eucariota incluido en la molécula de ADN recombinante comprendida por la cepa mutante atenuada de *Salmonella typhi* de la presente invención comprende el sitio de poliadenilación BGH.
- 20 Además de los elementos reguladores necesarios para la expresión de un gen heterólogo, tal como un antígeno heterólogo, como promotores y señales de poliadenilación, también se pueden incluir otros elementos en la molécula de ADN recombinante. Dichos elementos adicionales incluyen potenciadores. El potenciador puede ser, por ejemplo, el potenciador de actina humana, miosina humana, hemoglobina humana, creatina muscular humana y potenciadores virales tales como los de CMV, RSV y EBV.
- 25 Las secuencias reguladoras y los codones generalmente dependen de las especies, por lo que para maximizar la producción de proteínas, las secuencias reguladoras y los codones se seleccionan preferiblemente para que sean eficaces en la especie a inmunizar. La persona experimentada en la técnica puede producir moléculas de ADN recombinante que son funcionales en una especie dada.
- En una realización particular, el casete de expresión codifica una proteína receptora de VEGF.
- 30 Las proteínas receptoras de VEGF son receptoras de tirosina quinasas específicas de células endoteliales que pueden ser enlazadas por el factor de crecimiento endotelial vascular del ligando (VEGF) que las hace dimerizarse y activarse por transfosforilación. Hay tres subtipos principales de VEGFR, VEGFR-1 (o FLT1), VEGFR-2 (o KDR, FLK1) y VEGFR-3 (o FLT4). El VEGFR-2 parece mediar casi todas las respuestas celulares conocidas al VEGF. Los receptores de VEGF enlazados a membrana tienen una porción extracelular que consta de 7 dominios de tipo
- 35 inmunoglobulina, una única región transmembrana que se extiende y una porción intracelular que contiene un dominio de tirosina quinasa dividido. Los transcritos de VEGFR también dan lugar a variantes de empalme alternativas que codifican proteínas receptoras de VEGF solubles. La familia de factores de crecimiento VEGF abarca 6 miembros de la familia, VEGF-A a E y PGF. En una realización preferida, el casete de expresión eucariota codifica una proteína receptora de VEGF seleccionada del grupo que consiste en VEGFR-2 humano y un homólogo del mismo que comparte
- 40 al menos aproximadamente 80% de homología con el mismo.
- En el contexto de la presente invención, el término "homólogo" de VEGFR-2 humano se refiere a una proteína receptora de VEGF que difiere en la secuencia de aminoácidos y/o la secuencia de ácidos nucleicos que codifica la secuencia de aminoácidos de VEGFR-2 humano. El homólogo de VEGFR-2 humano puede ser de origen natural, por ejemplo, un homólogo de VEGFR-2 de una especie diferente, o un homólogo de VEGFR-2 manipulado. Se sabe que
- 45 el uso de codones es diferente entre especies. Por lo tanto, cuando se expresa una proteína heteróloga en una célula diana, puede ser necesario, o al menos útil, adaptar la secuencia de ácido nucleico al uso de codón de la célula diana. Los métodos para diseñar y construir homólogos de proteínas receptoras de VEGF son bien conocidos por cualquier persona de experiencia ordinaria en la técnica.
- 50 Un homólogo de VEGFR-2 puede contener una o más mutaciones que comprenden una adición, una deleción y/o una sustitución de uno o más aminoácidos. De acuerdo con la enseñanza de la presente invención, dichos aminoácidos eliminados, añadidos y/o sustituidos pueden ser aminoácidos consecutivos o pueden estar intercalados sobre la longitud de la secuencia de aminoácidos del homólogo de VEGFR-2 funcional. De acuerdo con las enseñanzas de la presente invención, puede añadirse, eliminarse y/o sustituirse cualquier cantidad de aminoácidos, siempre que el homólogo y el VEGFR-2 humano compartan al menos aproximadamente el 80% de homología. En realizaciones
- 55 particulares, el homólogo de VEGFR-2 humano tiene una homología de secuencia de al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 85%, al menos aproximadamente 90%, o más particularmente de al menos aproximadamente 95% y una identidad de secuencia de al menos aproximadamente 60%, al menos aproximadamente 65%, al menos aproximadamente 70% y lo más particularmente de al menos aproximadamente 75%. Los métodos y algoritmos para determinar la identidad de secuencia y/u homología, que incluyen la comparación de homólogos que
- 60 tienen deleciones, adiciones y/o sustituciones con respecto a una secuencia original, son bien conocidos por las

personas con experiencia ordinaria en la técnica. En el nivel de ADN, las secuencias de ácido nucleico que codifican el homólogo de VEGFR-2 humano pueden diferir en gran medida debido a la degeneración del código genético.

En aún otra realización preferida, el casete de expresión eucariota codifica VEGFR-2 humano de la secuencia de aminoácidos como se encuentra en la SEQ ID NO 1.

- 5 En el contexto de la presente invención, "peptona de origen no animal" se refiere a una mezcla de productos de escisión producidos por hidrólisis parcial ácida o enzimática de proteína nativa que no es de origen animal. Preferiblemente, la proteína nativa es de origen vegetal. La peptona de origen no animal comprende únicamente componentes que no se derivan directamente de animales eucariotas.
- El volumen del medio es de al menos aproximadamente 10 litros.
- 10 En ciertas realizaciones, el volumen del medio es de al menos aproximadamente 10 litros, o 30 litros, o 50 litros, o 100 litros hasta un máximo de aproximadamente 10.000 litros, o 1.000 litros, o 800 litros o 500 litros.
- En realizaciones particulares, el volumen del medio es desde aproximadamente 100 litros a aproximadamente 500 litros, más particularmente de aproximadamente 100 litros, aproximadamente 150 litros, aproximadamente 200 litros, aproximadamente 250 litros, aproximadamente 300 litros, aproximadamente 400 litros o aproximadamente 500 litros.
- 15 En ciertas realizaciones, la concentración de glucosa inicial corresponde a la del medio bacteriano mínimo o menos.
- En ciertas realizaciones, la concentración de glucosa inicial es desde aproximadamente 0 g/l a aproximadamente 4 g/l.
- En realizaciones particulares, la concentración de glucosa inicial es aproximadamente 0 g/l, aproximadamente 0,5 g/l, aproximadamente 1 g/l, aproximadamente 1,5 g/l, aproximadamente 2 g/l, aproximadamente 2,5 g/l, aproximadamente 3 g/l, aproximadamente 3,5 g/l o aproximadamente 4 g/l.
- 20 En realizaciones particulares, la concentración de glucosa inicial es aproximadamente 0 g/l, aproximadamente 0,5 g/l, aproximadamente 1 g/l, aproximadamente 1,5 g/l, aproximadamente 2 g/l, aproximadamente 2,5 g/l, aproximadamente 3 g/l, aproximadamente 3,5 g/l o aproximadamente 4 g/l.
- 25 En ciertas realizaciones, el valor de pH inicial es de al menos aproximadamente 5, aproximadamente 6, o aproximadamente 6,5 hasta un máximo de menos de aproximadamente 9, aproximadamente 8 o aproximadamente 7,5.
- En realizaciones particulares, el valor de pH inicial es desde aproximadamente 6,5 a aproximadamente 7,5, de manera mas particular aproximadamente 7,0.
- 30 En una realización particular, el valor de pH se ajusta durante el cultivo a un valor de pH desde aproximadamente 6 a aproximadamente 8, particularmente a desde aproximadamente 6,5 a aproximadamente 7,5.
- En una realización particular, el valor de pH se ajusta desde al menos aproximadamente 6, o 6,5 hasta un máximo de aproximadamente 8, o aproximadamente 7,5 durante la fermentación.
- En una realización particular, el valor de pH se ajusta a desde aproximadamente 6,5 a aproximadamente 7,5 durante la fermentación, más particularmente a aproximadamente 7,0.
- 35 En una realización particular, el progreso del crecimiento se determina midiendo la densidad óptica (OD).
- En el contexto de la presente invención, el término "densidad óptica" o "turbidez" de un material se refiere a la proporción logarítmica de la radiación que cae sobre dicho material a la radiación transmitida a través de dicho material para una longitud de onda dada. La densidad óptica se mide preferiblemente usando un espectrofotómetro.
- 40 Preferiblemente, la densidad óptica puede usarse como una medida de la concentración de células, preferiblemente bacterias, en una suspensión. Cuando la luz visible pasa a través de una suspensión celular, la luz se dispersa. Una mayor dispersión indica un mayor número de células. Típicamente, se mide la densidad óptica a una longitud de onda de 600 nm (OD₆₀₀). La densidad óptica a una longitud de onda particular de un cultivo bacteriano trazada frente al tiempo de cultivo proporciona una curva de crecimiento que puede usarse para delinear las diversas fases del crecimiento bacteriano y para determinar el tiempo de duplicación del cultivo bacteriano. La curva de crecimiento es
- 45 característico para un tipo dado de bacterias cultivadas bajo condiciones dadas en un medio de cultivo dado. La medición de la densidad óptica de una suspensión celular puede por lo tanto utilizarse para monitorear la etapa de crecimiento bacteriano. La medición de la densidad óptica se puede usar para determinar el punto final del procedimiento de cultivo, es decir, la etapa de crecimiento bacteriano, en la que las células se van a cosechar, típicamente la fase de crecimiento medio logarítmico.
- 50 En una realización preferida, el progreso del crecimiento se determina mediante el control in situ de la densidad óptica del cultivo o tomando muestras y midiendo la densidad óptica de las muestras. La monitorización in situ de la densidad óptica de un cultivo bacteriano utilizando dispositivos en línea o in situ permite un control constante, continuo y no

invasivo del crecimiento celular, minimiza el riesgo de contaminación y elimina la necesidad de una extracción incómoda y laboriosa de muestras.

5 Sorprendentemente se descubrió que el crecimiento de cepas mutantes atenuadas de *Salmonella typhi* de acuerdo con el método de la presente invención produce valores de densidad óptica de aproximadamente 6,0 a aproximadamente 8,0 en el inicio de la fase estacionaria. En comparación, el cultivo de la misma cepa en un proceso de fermentación similar pero en el que se agrega glucosa durante la fermentación para mantener un nivel de glucosa aproximadamente estable de aproximadamente 1 g/l a aproximadamente 4 g/l produce valores de densidad óptica de aproximadamente 3 a aproximadamente 5,5. Por lo tanto, se encontró sorprendentemente que cultivar una cepa mutante atenuada de *Salmonella typhi* sin adición de glucosa al medio durante la fermentación y con una cantidad de glucosa inicial en el medio que se agota antes de alcanzar la fase estacionaria produce una densidad óptica incrementada en el inicio de la fase estacionaria en comparación con un proceso de fermentación con adición de glucosa.

En otra realización, el progreso del crecimiento se determina midiendo la densidad celular.

15 En una realización preferida, la densidad celular se determina microscópicamente o midiendo la resistencia eléctrica o mediante citometría de flujo. La densidad celular puede determinarse microscópicamente contando manualmente las células usando una cámara de recuento o un hemocitómetro. La medición de la densidad celular con base en la resistencia eléctrica se realiza preferiblemente usando un contador Coulter. La medición de la densidad celular mediante citometría de flujo se logra permitiendo que las células pasen un rayo láser en una corriente estrecha, que las golpea una a una. Un detector de luz recoge la luz que se refleja desde las células.

20 Sorprendentemente se descubrió que el crecimiento de cepas mutantes atenuadas de *Salmonella typhi* de acuerdo con el método de la presente invención produce valores de densidad celular de aproximadamente 5×10^{14} a aproximadamente 8×10^{14} en el inicio de la fase estacionaria. En comparación, el cultivo de la misma cepa en un proceso de fermentación similar pero en el que se agrega glucosa durante la fermentación para mantener un nivel de glucosa aproximadamente estable de aproximadamente 1 g/l a aproximadamente 4 g/l proporciona valores de densidad celular de aproximadamente 5×10^{13} a 1×10^{14} . Por lo tanto, se encontró sorprendentemente que cultivar una cepa mutante atenuada de *Salmonella typhi* sin adición de glucosa al medio durante la fermentación y con una cantidad de glucosa inicial en el medio que se agota antes de alcanzar la fase estacionaria produce un aumento de densidad celular al inicio de la fase estacionaria en comparación con un proceso de fermentación con adición de glucosa.

30 La densidad óptica de una suspensión celular por debajo de aproximadamente 0,4 es directamente proporcional a su densidad celular. Por lo tanto, se puede crear una curva de calibración trazando la densidad óptica contra la densidad de la célula. Dicha curva de calibración puede usarse para estimar la densidad celular de una suspensión celular midiendo su densidad óptica.

35 En otra realización, el progreso del crecimiento se determina midiendo el valor de unidades formadoras de colonias (CFU) tomando muestras y cultivando en placa de agar. Mediante este método, solo se cuentan las células viables ya que solo las células viables pueden formar colonias en una placa de agar.

40 Sorprendentemente se descubrió que cultivar cepas mutantes atenuadas de *Salmonella typhi* de acuerdo con el método de la presente invención produce valores de CFU de aproximadamente 6×10^9 a aproximadamente 8×10^9 en el inicio de la fase estacionaria. En comparación, el cultivo de la misma cepa en un proceso de fermentación similar pero en el que se agrega glucosa durante la fermentación para mantener un nivel de glucosa aproximadamente estable de aproximadamente 1 g/l a aproximadamente 4 g/l produce valores de CFU de aproximadamente 2×10^9 a 5×10^9 . Por lo tanto, se encontró sorprendentemente que cultivar una cepa mutante atenuada de *Salmonella typhi* sin adición de glucosa al medio durante la fermentación y con una cantidad de glucosa inicial en el medio que se agota antes de alcanzar la fase estacionaria no solo produce un aumento de la densidad celular al inicio de la fase estacionaria, pero también produce un mayor número de células viables en comparación con un proceso de fermentación con adición de glucosa.

En una realización particular, las células se cosechan antes de alcanzar una densidad óptica de aproximadamente 6.

En una realización preferida, las células se cosechan a una densidad óptica de aproximadamente 5 a aproximadamente 6.

50 El casete de expresión que codifica VEGFR-2 humano, bajo el control del promotor de CMV.

En una realización preferida, el VEGFR-2 humano tiene la secuencia de ácido nucleico que se encuentra en la SEQ ID NO 2.

55 También se describe aquí una cepa mutante atenuada de *Salmonella typhi* que carece de actividad galactosa epimerasa y que comprende al menos una copia de una molécula de ADN recombinante que comprende un casete de expresión, que puede obtenerse mediante un método para hacer crecer la cepa, que comprende la etapa de cultivar la cepa en un medio regulado que comprende peptona a un valor de pH inicial aproximadamente neutro a escala de

fermentación, en el que la cantidad de glucosa en el medio durante las fermentaciones se ajusta de modo que la cantidad de glucosa se reduce a cero antes de alcanzar la fase estacionaria.

Particularmente, no se agrega glucosa al medio durante la fermentación y la cantidad inicial de glucosa se agota antes de alcanzar la fase estacionaria.

- 5 Particularmente, el casete de expresión es un casete de expresión eucariota.

Particularmente, el casete de expresión codifica una proteína receptora de VEGF.

Particularmente, el casete de expresión eucariota codifica una proteína receptora de VEGF seleccionada del grupo que consiste en VEGFR-2 humano y un homólogo del mismo que comparte al menos aproximadamente 80% de homología con el mismo.

- 10 Particularmente, el casete de expresión eucariota codifica VEGFR-2 humano de la secuencia de aminoácidos como se encuentra en la SEQ ID NO 1.

Particularmente, la cepa mutante atenuada es *Salmonella typhi* Ty21a y la molécula de ADN recombinante comprende el gen de resistencia a kanamicina, el ori pMB1 y un casete de expresión eucariota que codifica VEGFR-2 humano bajo el control del promotor de CMV.

- 15 Particularmente, el VEGFR-2 humano tiene la secuencia de ácido nucleico que se encuentra en la SEQ ID NO 2.

También se describe aquí que la presente invención se refiere a una cepa mutante atenuada de *Salmonella typhi* Ty21a que comprende al menos una copia de una molécula de ADN recombinante que comprende un casete de expresión eucariota que codifica una proteína receptora de VEGF para uso como vacuna.

- 20 En el contexto de la presente invención, el término "vacuna" se refiere a un agente que es capaz de inducir una respuesta inmune en un sujeto tras la administración. Una vacuna puede preferiblemente prevenir, mejorar o tratar una enfermedad. Preferiblemente, dicha vacuna comprende una cepa mutante atenuada de *Salmonella typhi*, preferiblemente *S. typhi* Ty21a. Preferiblemente, la vacuna comprende además al menos una copia de una molécula de ADN recombinante que comprende un casete de expresión, preferiblemente que codifica un antígeno heterólogo. Dicha vacuna comprende un vector, por ejemplo una cepa bacteriana atenuada, como vehículo de administración para un ADN que codifica un antígeno heterólogo se denomina vacuna de ADN.

- 25 Particularmente, el casete de expresión eucariota codifica una proteína receptora de VEGF seleccionada del grupo que consiste en VEGFR-2 humano y un homólogo del mismo que comparte al menos aproximadamente 80% de homología con el mismo.

- 30 Particularmente, el casete de expresión eucariota codifica VEGFR-2 humano de la secuencia de aminoácidos como se encuentra en la SEQ ID NO 1.

- 35 También se describe aquí un método para aumentar el crecimiento celular de una cepa de vacuna mutante atenuada de *Salmonella*, inmovilizando la actividad de galactosa epimerasa, cultivando la cepa en un medio regulado que comprende esencialmente digestores enzimáticos de caseína y harina de soja y una cantidad de glucosa inicial de no más de 2,5-3,0 g/L a un valor de pH inicial de 6,5-7,5, en el que el cultivo se lleva a cabo omitiendo cualquier alimentación de glucosa adicional en el caldo de fermentación hasta la fase estacionaria de crecimiento celular, no manteniendo así el nivel de glucosa original en el caldo, dicho aumento del crecimiento celular, que se logra únicamente mediante el agotamiento completo de la glucosa durante la fermentación, se mide por densidad óptica (OD) y tiene un valor de 7,5-8,0 en la fase estacionaria finalmente obtenible (preferiblemente obtenida después de 18-20 horas), en comparación con la OD 5,0 a 5,5 en un proceso de fermentación respectivo bajo las mismas condiciones, en el que sin embargo la glucosa se alimenta durante la fermentación para mantener un nivel de glucosa permanente en el caldo de fermentación de 2,0 a 3,0 g/L.

- 40 Particularmente, el crecimiento celular máximo se obtiene después de 20 horas de cultivo.

Particularmente, se logra una densidad celular de 5×10^{14} - 8×10^{14} al omitir cualquier alimentación con glucosa durante la fermentación, en comparación con 5×10^{13} a 1×10^{14} cuando se agrega glucosa durante el cultivo.

- 45 Particularmente, se alcanza un valor de unidad formadora de colonias (CFU) de 6×10^9 a 8×10^9 por ml después de la fermentación al omitir cualquier alimentación de glucosa durante la fermentación, en comparación con 2×10^9 a 5×10^9 después de la alimentación de glucosa durante la fermentación.

- 50 Particularmente, el valor de pH se ajusta durante la fermentación a 7,0. Al omitir la alimentación de glucosa en la fase de crecimiento o incluso en el medio de inicio desde el principio, se puede observar un cambio de los valores de pH a alcalinos (desde ca. 7 a ca. 8), aunque el sistema de medio está regulado. Puede ser favorable ajustar el valor de pH durante el crecimiento celular al pH de inicio original de ca. 7,0.

Particularmente, el medio es Caldo de Soja Trípico (TSB) o un medio que proporciona nutrientes iguales o similares.

Particularmente, la cepa de vacuna mutante atenuada de Salmonella es Salmonella Typhi Ty21a.

5 También se describe aquí un método de producción de una cepa de vacuna de cáncer atenuada mutante de Salmonella typhi Ty21a, en el que la cepa lleva múltiples copias de un ADN plasmídico que codifica un casete de expresión eucariota del receptor 2 del factor de crecimiento endotelial vascular humano (VEGFR-2 o FLK-1), comprendiendo el método un método para aumentar el crecimiento celular de una cepa de vacuna mutante atenuada de Salmonella.

Particularmente, dicho ADN plasmídico es un ADN plasmídico de 7.580 pb que comprende el ADNc de VEGFR-2 que está bajo el control del promotor de CMV, el gen de resistencia a kanamicina y el ori pMB1, y que se designa como pVAX10.VR2-1.

10 Breve descripción de figuras y tablas

Figura 1: secuencia de aminoácidos de VEGFR-2 codificada por ADNc clonado en el plásmido pVAX10.VR2-1

En una realización particular, dicho ADN plásmido es un ADN plásmido de 7.580 bp que comprende el ADNc de VEGFR-2 que está bajo el control del promotor CMV, el gen de resistencia a la kanamicina y el ori pMB1, y que se designa como pVAX10.VR2-1.

15 Breve descripción de figuras y tablas

Figura 1: secuencia de aminoácidos de VEGFR-2 codificada por ADNc clonado en el plásmido pVAX10.VR2-1

Figura 2: Mapa del plásmido de pVAX10.VR2-1

Figura 3: Descripción del proceso de fabricación de Salmonella typhi Ty2a (pVAX10.VR2-1)

Figura 4: Diagrama de flujo del aislamiento de S. Typhi Ty21a

20 Figura 5: Crecimiento del precultivo 1 y 2 de Salmonella typhi Ty21a con/sin kanamicina

Figura 6: Crecimiento de cultivos (precultivo 1) de Salmonella typhi Ty21a (vacío) con pulso de glucosa (ajustado a la concentración final de glucosa de 2,5 g/l) y sin pulso de glucosa. El crecimiento celular se determinó mediante medición de densidad óptica a 600 nm (OD600). Las flechas indican la adición de glucosa (pulsación). El eje X representa el tiempo de cultivo en horas (h); el eje y representa la densidad celular medida en unidades OD y la concentración de glucosa (glc) en g/l.

25 Figura 7: Crecimiento de cultivos (precultivo 1) de Salmonella typhi Ty21a (vacío) con pulso de glucosa (ajustado a la concentración final de glucosa de 2,5 g/l) y sin pulso de glucosa. El crecimiento celular se determinó mediante medición de densidad óptica a 600 nm (OD600). Las flechas indican la adición de glucosa (pulsación). El eje X representa el tiempo de cultivo en horas (h); el eje y representa la densidad celular medida en unidades OD y el cambio de valor de pH.

30 Figura 8: Crecimiento de cultivos (precultivo 2) de Salmonella typhi Ty21a (vacío) con pulso de glucosa (ajustado a la concentración final de glucosa de 2,5 g/l) y sin pulso de glucosa. El crecimiento celular se midió como densidad óptica a 600 nm (OD600).

35 Las flechas indican la adición de glucosa (pulsación). El eje X representa el tiempo de cultivo en horas (h); el eje y representa la densidad celular medida en unidades OD y la concentración de glucosa (glc) en g/l.

Figura 9: Crecimiento de cultivos (precultivo 2) de Salmonella typhi Ty21a (vacío) con pulso de glucosa (ajustado a una concentración final de glucosa de 2,5 g/l) y sin pulso de glucosa. El crecimiento celular se midió como densidad óptica a 600 nm (OD600). Las flechas indican la adición de glucosa (pulsación). El eje X representa el tiempo de cultivo en horas (h); el eje y representa la densidad celular medida en unidades OD y el cambio de valor de pH.

40 Figura 10: Crecimiento de cultivos (precultivo 3, inóculo cebado con glucosa del precultivo 1) de Salmonella typhi Ty21a (vacío) con pulso de glucosa (ajustado a la concentración final de glucosa de 2,5 g/l) y sin pulsos de glucosa. El crecimiento celular se determinó mediante medición de densidad óptica a 600 nm (OD600). Las flechas indican la adición de glucosa (pulsación). El eje X representa el tiempo de cultivo en horas (h); el eje y representa la densidad celular medida en unidades OD y la concentración de glucosa (glc) en g/L

45 Figura 11: Crecimiento de cultivos (precultivo 3, inóculo cebado con glucosa del precultivo 1) de Salmonella typhi Ty21a (vacío) con pulso de glucosa (ajustado a la concentración final de glucosa de 2,5 g/l) y sin pulso de glucosa. El crecimiento celular se determinó mediante medición de densidad óptica a 600 nm (OD600). Las flechas indican la adición de glucosa (pulsación). El eje X representa el tiempo de cultivo en horas (h); el eje y representa la densidad celular medida en unidades OD y el cambio de valor de pH.

Figura 12: Crecimiento de la cepa de tipo salvaje (precultivo 1) de *Salmonella typhi* Ty21a en comparación con la cepa de producción de vacunas contra el cáncer manipulada (*Salmonella typhi* Ty21a: pVAX10.VR2-1, VXM01) con pulso de glucosa (ajustado a la concentración final de glucosa de 2,5 g/l) y sin pulsos de glucosa. El crecimiento celular se midió como densidad óptica a 600 nm (OD600). Las flechas indican la adición de glucosa (pulsación). El eje X representa el tiempo de cultivo en horas (h); el eje y representa la densidad celular medida en unidades OD.

Figura 13: Crecimiento de la cepa de tipo salvaje (precultivo 2) de *Salmonella typhi* Ty21a en comparación con la cepa de producción de vacunas contra el cáncer manipulada (*Salmonella typhi* Ty21a: pVAX10.VR2-1, VXM01) con pulso de glucosa (ajustado a la concentración final de glucosa de 2,5 g/l) y sin pulso de glucosa. El crecimiento celular se determinó mediante medición de densidad óptica a 600 nm (OD600). Las flechas indican la adición de glucosa (pulsación). El eje X representa el tiempo de cultivo en horas (h); el eje y representa la densidad celular medida en unidades OD.

Tabla 1: Proceso de fabricación

Tabla 2: Proceso de fabricación

Tabla 3: Resultados de la medición de OD600 durante el proceso de fermentación

Tabla 4: Concentración de glucosa durante el proceso de fermentación

Tabla 5: cambio de valor de pH durante el proceso de fermentación

Ejemplos

Ejemplo 1: Aislamiento de la cepa Ty21a de *Salmonella typhi* para la preparación del Lote de Semillas de Investigación (RSL)

El primer paso en la preparación de la RSL consistió en el aislamiento de la cepa atenuada de *Salmonella typhi* Ty21a de las cápsulas Typhoral L® seguida de la transformación de las bacterias atenuadas con el ADN plasmídico (pVAX10.VR2-1).

Las cápsulas de Typhoral L® comercialmente disponibles, que contienen una cepa atenuada de *Salmonella* entérica serovar typhi Ty21a, se usaron para preparar el caldo de *S. typhi* para usar en los estudios recombinantes indicados a continuación. El proceso consistió en inocular un medio de cultivo líquido con parte del contenido de las cápsulas y luego cultivar en placa el cultivo líquido en un medio de agar con el fin de aislar las colonias bacterianas individuales. Se aislaron colonias individuales y se cultivaron en medio de cultivo líquido. Dos cultivos, específicamente, VAX.Ty21-1 y VAX.Ty21-2, se formularon a continuación con glicerol, se hicieron alícuotas (1 ml) y se almacenaron a $-75\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$ en espera de su uso. La identidad de cada uno de los dos cultivos se confirmó posteriormente.

Ejemplo 2: construcción de plásmido

El principio de síntesis de plásmidos se basa en la síntesis de genes in vitro de doble cadena con los siguientes pasos:

- La secuencia de plásmido pVAX10-VR2.1 completa de 7,58 kB se subdividió (mediante análisis de software) en 5 secciones de ~1,5 kB. Cada sección se subdividió en oligonucleótidos de 40-50 bp teniendo cada uno regiones superpuestas entre oligonucleótidos de ambas cadenas
- Los oligonucleótidos sintetizados in vitro se fosforilaron luego mediante incubación con polinucleótido quinasa T4
- Después del proceso de recocido de superposición de oligonucleótidos bajo condiciones apropiadas, la enzima Taq ADN ligasa conectó los oligonucleótidos alineados
- Una vez completada la etapa de ligado, se realizó PCR usando cebadores recocidos en posiciones hacia afuera, para aumentar el rendimiento de los fragmentos del plásmido ligado (~1,5kB)
- Se realizó una electroforesis en gel de agarosa preparativa para aislar los productos de PCR
- Los productos de PCR aislados se clonaron en vectores TOPO (Invitrogen K#4575-40) y se transformaron en células TOP10 de *E. coli* para la propagación
- Después del aislamiento del plásmido TOPO, se realizó una restricción y verificación de la secuencia
- Los fragmentos alineados aislados se ensamblaron mediante PCR solapada. Este proceso fue seguido por el ensamblaje lineal del plásmido pVAX10.VR2-1
- Después de la restricción del digestor XhoI (el sitio de restricción simple está presente en el plásmido pVAX10.VR2-1, véase la Figura 2.1.S.1.2.2-1) y el enlace covalente mediante la ligasa T4, *E. coli* se transformó con el plásmido circular para la propagación
- Después de la verificación final de la secuencia del plásmido, el plásmido pVAX10.VR2-1 se transformó en la cepa bacteriana *S. typhi* Ty21a.

El plásmido pVAX10.VR2-1 se sintetizó así con éxito (sin desviación a la secuencia de referencia). Este plásmido se usó adicionalmente para transformar los aislados de la cepa bacteriana de *S. typhi* Ty21a (Vax.Ty21-1 y Vax.Ty21-2).

ES 2 650 269 T3

Ejemplo 3: Procesos de fabricación

La siguiente Tabla 2 resume los procesos de fabricación con/sin alimentación de glucosa durante la fermentación.

Etapa de producción	Proceso variante A: con alimentación con glucosa	Proceso variante A: sin alimentación con glucosa
Precultivo	CÉLULAS (con/sin plásmido pVAX10.VR2-1)	CÉLULAS (con o sin plásmido pVAX10.VR2-1)
	↓	↓
	350 mL TSB + kanamicina (1mL)	2 x 500 ml TSB + kanamicina (500µL) (OD ₆₀₀ >0,3)
Cuarto limpio clase D y A en D	↓	↓
	5 x 550 mL TSB + kanamicina (50mL)	10 x 1000 ml TSB + kanamicina (75mL)
	(OD ₆₀₀ ≥ 0,5)	(OD ₆₀₀ ≥ 0,5)
Fermentación	30L volumen de fermentación	100 L volumen de fermentación
	TSB + 0,001 % galactosa	TSB + 0,001 % galactosa
	- 30 °C	- 30 °C
	- flujo de aire 2 l/min (0,07 wvm)	- flujo de aire 100L/min (1 vvm)
	- presión 1 bar	- presión no controlada
	- pH 7,0 controlado con NaOH	- pH 7,0 controlado con NaOH
	- pO ₂ ≥ 40% regulado por mezclador	- espuma controlada (Corning)
Cuarto limpio clase D	- alimentación con glucosa Σ 5-8 g/l	- pO ₂ ≥ 40% regulado por mezclador
	- Final OD _{600nm} ~ 2,7 (objetivo 6 - 10)	- mínimo de mezclado 200 rpm
	- enfriamiento a 15 °C antes de la cosecha	- sin alimentación con glucosa
		- OD _{600nm} final (fin de la fase de crecimiento exponencial)
		- enfriamiento a al menos 25°C antes de la cosecha
cosecha/ concentración/ lavado	filtración de flujo cruzado	filtración de flujo cruzado
	- 10 veces concentración	- 10 veces concentración
	10 veces intercambio de regulador en diafiltración con solución de sacarosa al 15%, seguido de	10 veces el intercambio de regulador en la diafiltración con sacarosa al 15%, solución de ascorbato al 0,45% pH 7,2,

ES 2 650 269 T3

Etapa de producción	Proceso variante A: con alimentación con glucosa	Proceso variante A: sin alimentación con glucosa
	concentración adicional a 1/15 vol. de cosecha original	seguido de una concentración adicional de 1/20 vol. de cosecha original
		almacenamiento* a 2-8 °C hasta llenado aproximadamente 24 horas,
Cuarto limpio clase D	- Formulación agregando ascorbato a la concentración final de 0,45%	
	almacenamiento a 2-8 °C hasta llenado aproximadamente 24 horas	
Dilución/ llenado de frascos	Llenado manual de 150 frascos de 5 diluciones	Llenado manual de 150 frascos de 5 diluciones
	- Ajuste de CFU	- Ajuste de CFU
	- 300mL de suspensión → llenado de 150 frascos	- 300mL de suspensión → llenado de 150 frascos
	- Dilución de 30mL de suspensión 270 mL solución de formulación, llenado de 150 2 R frascos de vidrio	- Dilución de 30mL de suspensión 270 mL solución de formulación, llenado de 150 2 R frascos de vidrio
		- cuatro diluciones y llenado de 150 frascos hasta 1:10.000
Cuarto limpio clase A en B	- cuatro diluciones y llenado de 150 frascos hasta 1:10.000	- cerrar los frascos con tapones de caucho y tapas de aluminio
	- cerrar los frascos con tapones de caucho y tapas de aluminio	- almacenamiento a ≤ -70 °C
	- almacenamiento a $-75^{\circ}\text{C} \pm 10^{\circ}\text{C}$	

5 El proceso de crecimiento bacteriano se llevó a cabo en 2 x 350 ml de medio TSB que contenía además 25 µg/ml de kanamicina. Se inocularon dos matraces Erlenmeyer de 2L con deflectores, cada uno con una alícuota (1 ml) de Salmonella typhi Ty21a y Ty21a (pVAX10.VR2-1). Los cultivos se incubaron a 30 °C ± 2 °C con agitación (140 rpm) hasta que se alcanzó una Densidad Óptica $OD_{600nm} > 0,1$. La cosecha bacteriana (50 ml) del primer cultivo se usó para inocular un segundo cultivo (precultivo 2), 6 x 550 ml de medio TSB con kanamicina (25 µg/ml) contenido en matraces Fernbach de 3L con deflectores. Los cultivos se incubaron a 30 °C ± 2 °C con agitación (180 rpm) hasta que una OD a 600 nm del cultivo bacteriano alcanzó un valor de $\geq 0,3$. Al finalizar el tiempo de incubación, se inoculó el cultivo principal (medio TSB con galactosa al 0,001%) preparado en un fermentador de acero inoxidable controlado con un volumen de trabajo de 27 litros, con el precultivo 2 (5 matraces de cultivo bacteriano agrupados) y se incubaron a 30 °C con la siguiente configuración: flujo de aire a 2 l/min, presión a 1 bar, pH 7,0, $pO_2 \geq 40\%$.

10 Una mitad de las muestras de cultivo se alimentó con glucosa en una cantidad que dio una concentración final de 2,0 g/l a 3,0 g/l en el medio de cultivo inicial. La alimentación con glucosa se llevó a cabo después de 3-5 horas después del inicio de la fermentación y se repitió varias veces cada 3-5 horas.

15 La otra mitad de las muestras de cultivo se trataron de manera idéntica pero sin ninguna alimentación de glucosa durante el cultivo de las células de Salmonella. Como control, se probó un medio de cultivo que no contenía ninguna glucosa desde el primer comienzo (medio TSB sin glucosa).

20 El cultivo bacteriano se concentró por filtración de flujo cruzado (CFF)/diafiltración contra una solución de sacarosa al 15%. Se llevaron a cabo cinco diluciones del concentrado bacteriano final. El producto bacteriano final se dividió en alícuotas (1 ml) en viales 2R, los viales se cerraron, se marcaron, se taparon y se almacenaron a $-75^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$.

Los controles en el proceso para el primer y segundo paso de precultivo, al finalizar los tiempos de incubación, incluyeron el análisis del crecimiento bacteriano midiendo OD_{600nm}, pH y CFU/ml, así como la determinación de la estabilidad del plásmido (PST) y examinación bacteriana. El último análisis se basó en un ensayo de agar sangre para determinar las reacciones hemolíticas de microorganismos patógenos exigentes. El valor de CFU se evaluó antes y después del CFF. Tras la formulación del concentrado bacteriano final, se midieron las CFU y el índice de refracción en la formulación con la concentración bacteriana más baja.

Ejemplo 4: Crecimiento de *Salmonella typhi* TY21a (pVAX10.VR2-1) con y sin kanamicina

La producción de la vacuna de cáncer bacteriano viva se basa en la fermentación de una cepa Ty21a de *Salmonella* entérica serovar typhi (que comprende el plásmido pVAX10.VR2-1). Después del crecimiento, la suspensión celular debe concentrarse por filtración de flujo cruzado y lavarse por diafiltración. Se deben llenar cinco diluciones diferentes de suspensión de células lavadas en viales 2 R de vidrio.

Los objetivos de estas pruebas de crecimiento en matraz fueron:

- verificar la tasa de crecimiento para el precultivo 1 y 2 para planificar la tabla de tiempos de ejecución de producción
- investigar la influencia de la alimentación con glucosa para lograr una alta concentración celular (valores de OD₆₀₀)

Los experimentos se realizaron a partir de los bancos de células maestras de *Salmonella* entérica typhi Ty21a y *Salmonella* entérica typhi Ty21a (pVAX10.VR2-1) (=cepa VMX01). El inóculo para la fermentación se preparó mediante un precultivo de dos pasos (VK): el precultivo 1 se inoculó directamente de MCB; el precultivo 2 se inoculó mediante un volumen mayor fuera del precultivo 1. Se realizaron pruebas de crecimiento para evaluar el transcurso del tiempo para el cultivo del precultivo en matraces Erlenmeyer de 2 litros (precultivo 1) y matraces Fernbach Corning de 3 litros (precultivo 2). El precultivo se realizó con y sin kanamicina para obtener información sobre el crecimiento/fase de crecimiento exponencial en ambas condiciones.

El crecimiento de estos cinco matraces se compara en la Figura 5:

- VK1a: 500 ml de Medio TSB en matraces Corning de 3 litros + 0,5 ml de MCB, 30 °C, 120 rpm
- VK1b: 500 ml de Medio TSB en matraces Corning de 3 litros + 0,5 ml MCB, 30 °C, 120 rpm
- VK2: 1.000 ml de Medio TSB en matraces Corning de 3 litros + 75 ml VK1b (OD 1,6), 30 °C, 120 rpm
- VK1a k: 500 ml de Medio TSB + 25 mg/l de sulfato de kanamicina en matraces Corning de 2 litros + 0,5 ml MCB, 30 °C, 120 rpm
- VK1 b k: 500 ml de Medio TSB + 25 mg/l de sulfato de kanamicina en matraces Corning de 3 litros + 0,5 ml MCB, 30 °C, 120 rpm
- VK2a k: 1.000 ml de Medio TSB + 25 mg/l de sulfato de kanamicina en matraces Corning de 3 litros + 75 ml VK1 a k (OD 1,8), 30 °C, 120 rpm
- VK2b k: 1.000 ml de Medio TSB + 25 mg/l de sulfato de kanamicina en matraces Corning de 3 litros + 75 ml VK1 a k (OD 1,8), 30 °C, 120 rpm

Los resultados en la Figura 5 muestran que no hay diferencias significativas entre el crecimiento con y sin kanamicina, así como en el crecimiento en matraces Corning de 2 litros o 3 litros, respectivamente. El tiempo de cultivo para el precultivo 1 a 30 °C debe estar entre aproximadamente 15 a 23 horas (OD₆₀₀ ~1-4) para inocular el precultivo 2 con células en fase exponencial. Se alcanzó una OD₆₀₀ mínima para el precultivo 2 (> 0,5) después de 2-3 horas; la fase de crecimiento exponencial se caracteriza por valores de OD₆₀₀ entre 0,5 y 3,0.

Ejemplo 5: Crecimiento de *Salmonella typhi* TY21a (vacío) con y sin alimentación de glucosa

Las pruebas de crecimiento con tres precultivos (1, 2, 3) se realizaron en matraces Erlenmeyer de 2 litros y cultivo en dos etapas como se hizo con la cepa de producción.

El precultivo 1 se inocula directamente desde RCB; el precultivo 2 es inoculado por un volumen mayor fuera del precultivo 1. Debido a la ausencia de resistencia a la kanamicina codificada por el plásmido, se omitió el antibiótico selectivo en los medios de cultivo. Para evaluar la influencia del paso del precultivo (número de generación), se realizaron adiciones repetidas de glucosa en el precultivo 1 así como en el precultivo 2, ambos en comparación con los cultivos "no pulsados". Además, el precultivo 1 pulsado con glucosa se usó como inóculo para el precultivo 2 para el seguimiento de la reversibilidad del impacto metabólico mediado por la concentración de glucosa. El precultivo 3 representa el precultivo 1 cultivado con alimentación con glucosa (pulsado) inoculado en medio TSB fresco (con o sin glucosa).

Las designaciones de muestra que se usan en las Figuras 6-11 son las siguientes:

- VK1a: 500 ml de Medio TSB en matraces Corning de 2 litros + 0,5 ml RCB, 30 °C, 120 rpm
- VK1b: 500 ml de Medio TSB en matraces Corning de 2 litros + 0,5 ml RCB, 30 °C, 120 rpm + adición de glucosa
- VK2a: 500 ml de Medio TSB en matraces Corning de 2 litros + 38 ml VK1a (OD 5,4), 30 °C, 120 rpm
- 5 • VK2b : 500 ml de Medio TSB en matraces Corning de 2 litros + 38 ml VK1a (OD 5,4), 30 °C, 120 rpm + adición de glucosa
- VK3a: 500 ml de Medio TSB en matraces Corning de 2 litros + 38 ml VK1 b (OD 5,1; 5 horas después de la primera adición de glucosa) 30 °C, 120 rpm
- 10 • VK3b: 500 ml de Medio TSB en matraces Corning de 2 litros + 38 ml VK1 b (OD 5,1; 5 horas después de la primera adición de glucosa) 30 °C, 120 rpm + adición de glucosa.

Los resultados de estos experimentos muestran que la adición de glucosa no da como resultado mayores valores de OD/rendimientos de masa celular de la cepa de tipo salvaje a pesar del consumo de glucosa. Por el contrario, los matraces sin adición de glucosa alcanzaron valores de OD más altos (6 para el precultivo 1, 8 para el precultivo 2). Aproximadamente 1 hora después de la adición de glucosa, la OD permaneció estática (o incluso ligeramente disminuida) en comparación con el crecimiento sin adición de glucosa. En pulsos repetidos el consumo de glucosa disminuyó, no se observó ningún efecto adicional/aditivo sobre el crecimiento.

15 Sin la adición de glucosa, se observó un cambio de pH a alcalino después del agotamiento de la glucosa, mientras que con el pulso de glucosa el valor del pH disminuyó (comparar la Figura 8 para el precultivo 1 y la Figura 9 para el precultivo 2). Se observaron fenómenos en ambos precultivos (VK1, VK2), lo que indica que no hay influencia del número de generación.

20 Cuando se inoculó un precultivo cultivado con pulso de glucosa en medio fresco (dilución 1:14, VK3, Figura 10, Figura 11), se observaron las mismas características de crecimiento (valores más altos de OD/cambios de pH a alcalinos sin adición de glucosa).

25 Los resultados indicaron que las concentraciones de glucosa por encima de un límite comparablemente bajo (aproximadamente 2,5 g/l) desencadenan un cambio reversible en el metabolismo (glucosa). Presumiblemente, una sustancia se secreta entonces en un medio que inhibe un crecimiento adicional, incluso si la glucosa disminuye nuevamente por debajo del nivel de activación. Después de la inoculación en medio nuevo (VK3) esta sustancia se diluye a una concentración por debajo de la efectividad.

30 **Ejemplo 6:** Crecimiento de la producción manipulada de la cepa de la vacuna contra el cáncer Salmonella typhi Ty21a (pVAX10.VR2-1) (= VXM01) con y sin alimentación con glucosa.

35 El mismo enfoque experimental que se describe en el Ejemplo 5 se llevó a cabo con la cepa de producción de vacuna contra el cáncer VXM01. La única diferencia del Ejemplo 5 es que la cepa se transformó con el plásmido pVAX10.VR2-1. Estas investigaciones se realizaron para respaldar la hipótesis de que las características de crecimiento de la cepa de producción S. typhi Ty21a:pVAX10-VR2.1 (p) con respecto al metabolismo de la glucosa no están influenciadas por el plásmido, sino una característica de la cepa vacía. El crecimiento y el pulso de glucosa de ambas cepas se compara en la Figura 11 y la Figura 12.

40 Los resultados muestran, que las características de crecimiento de ambas cepas (cepa de producción de S. typhi Ty21a vacía y manipulada) son comparables. No se observó ninguna indicación de la influencia del plásmido. Además, aunque las células cultivadas sin glucosa muestran una morfología diferente en comparación con las células cultivadas en la presencia de glucosa, estas no muestran aumento de la lisis celular y no disminuyen la estabilidad del plásmido (en el caso de las células manipuladas) en comparación con las células cultivadas con glucosa.

Tabla 3: Resultados de la medición de OD600 durante el proceso de fermentación

Tiempo de Cultivación	OD ₆₀₀ -resultados						
[h]	VK1 a	VK1b	VK2	VK1a k	VK1b k	VK2a k	VK2b k
0	0,001	0,003	0,1	0,0	0,0	0,2	0,2
1			0,3			0,3	0,3

ES 2 650 269 T3

Tiempo de Cultivación	OD ₆₀₀ -resultados						
[h]	VK1 a	VK1b	VK2	VK1a k	VK1b k	VK2a k	VK2b k
2,0			0,5			0,7	0,6
3,0	0,003		1,0			1,2	1,2
4,0			1,6			1,7	1,6
5,0	0,005		2,4			2,5	2,3
6,0			3,4			3,1	3,1
7,0			3,8			3,7	3,7
7,5	0,010					3,7	4,5
8,0			4,5				
9,0	0,026						
10,0							
11,0							
12,0							
13,0							
14,0							
15,0		1,6		1,8	2,1		
16,0		2,2		2,6	2,8		
17,0		2,8		2,8	3		
18,0		3,2			3,1		
19,0		3,7			3,0		
20,0							
21,0		5,1		4,2	3		
22,0							
23,0		6,1		5,3	3,1		
24,0	5,9		7,3			3,8	8
25,0	6,3						
26,0	6,9						

ES 2 650 269 T3

Tiempo de Cultivación	OD ₆₀₀ -resultados						
[h]	VK1 a	VK1b	VK2	VK1a k	VK1b k	VK2a k	VK2b k
27,0	7,3						
28,0	7,6						
30,0	7,5						
39,0		7,0		7,6	3,2		

Tabla 4: Concentración de glucosa durante el proceso de fermentación

Tiempo de Cultivación	Concentración de glucosa [g/l]			
[h]	VK1a k	VK1b k	VK2a k	VK2b k
0	2,4	2,4	2,5	2,6
1			2,5	
2,0			2,4	
3,0			2,3	
4,0			1,7	
5,0			4,8	1,0
6,0			3,9	0,1
7,0			3,1	
7,5				
8,0			2,2	
9,0				
10,0				
11,0				
12,0				
13,0				
14,0				
15,0	1,4	1,1		
16,0	0,4	0,1		

ES 2 650 269 T3

Tiempo de Cultivación	Concentración de glucosa [g/l]			
[h]	VK1a k	VK1b k	VK2a k	VK2b k
17,0		3,8		
18,0		3,2		
19,0		2,5		
20,0				
21,0		1,6		
22,0				
23,0		0,8		
24,0			0	
25,0				
26,0				
27,0				
28,0				
30,0				
39,0		0,0		

Tabla 5: cambio de valor de pH durante el proceso de fermentación

Tiempo de incubación	Valores de pH			
[h]	VK1a k pH	VK1b k pH	VK2a k pH	VK2b k pH
0	6,8	6,8	6,5	6,5
1			6,4	6,4
2,0			6,4	6,4
3,0			6,5	6,5
4,0			6,0	6,0
5,0			6,2	6,2
6,0			5,8	5,91
7,0				

ES 2 650 269 T3

Tiempo de incubación	Valores de pH			
[h]	VK1a k pH	VK1b k pH	VK2a k pH	VK2b k pH
7,5				
8,0			5,4	5,9
9,0				
10,0				
11,0				
12,0				
13,0				
14,0				
15,0	5,7	5,6		
16,0	5,6	5,6		
17,0	5,7	5,4		
18,0	5,8	4,4		
19,0	5,7	5,3		
20,0				
21,0	6,1	5,2		
22,0				
23,0	6,6	5,1		
24,0			5,7	8,28
25,0				
26,0				
27,0				
28,0				
30,0				
39,0	8,0	5,1		

Listado de secuencias

<110> VAXIMM AG
 Lubenau, Heinz
 Siede, Holger
 Janssen, Renate
 5 springer, Marco
 <120> Método para producir cepas de Salmonela atenuadas de alto rendimiento
 <130> 109312P855PC
 <140> PCT/EP2012/xxxxxx
 <141> 2012-12-21
 10 <150> EP 11400061.5
 <151> 2011-12-22
 <150> EP 12004995.2
 <151> 2012-07-05
 <160> 2
 15 <170> Patenteln versión 3,5
 <210> 1
 <211> 1356
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 20 <400> 1
 Met Gln Ser Lys Val Leu Leu Ala Val Ala Leu Trp Leu Cys Val Glu
 1 5 10 15
 Thr Arg Ala Ala Ser Val Gly Leu Pro Ser Val Ser Leu Asp Leu Pro
 20 25 30
 Arg Leu Ser Ile Gln Lys Asp Ile Leu Thr Ile Lys Ala Asn Thr Thr
 35 40 45
 Leu Gln Ile Thr Cys Arg Gly Gln Arg Asp Leu Asp Trp Leu Trp Pro
 50 55 60
 Asn Asn Gln Ser Gly Ser Glu Gln Arg Val Glu Val Thr Glu Cys Ser
 65 70 75 80
 Asp Gly Leu Phe Cys Lys Thr Leu Thr Ile Pro Lys Val Ile Gly Asn
 85 90 95
 Asp Thr Gly Ala Tyr Lys Cys Phe Tyr Arg Glu Thr Asp Leu Ala Ser
 100 105 110
 Val Ile Tyr Val Tyr Val Gln Asp Tyr Arg Ser Pro Phe Ile Ala Ser
 115 120 125
 Val Ser Asp Gln His Gly Val Val Tyr Ile Thr Glu Asn Lys Asn Lys
 130 135 140

ES 2 650 269 T3

Thr Val Val Ile Pro Cys Leu Gly Ser Ile Ser Asn Leu Asn Val Ser
 145 150 155 160
 Leu Cys Ala Arg Tyr Pro Glu Lys Arg Phe Val Pro Asp Gly Asn Arg
 165 170 175
 Ile Ser Trp Asp Ser Lys Lys Gly Phe Thr Ile Pro Ser Tyr Met Ile
 180 185 190
 Ser Tyr Ala Gly Met Val Phe Cys Glu Ala Lys Ile Asn Asp Glu Ser
 195 200 205
 Tyr Gln Ser Ile Met Tyr Ile Val Val Val Val Gly Tyr Arg Ile Tyr
 210 215 220
 Asp Val Val Leu Ser Pro Ser His Gly Ile Glu Leu Ser Val Gly Glu
 225 230 235 240
 Lys Leu Val Leu Asn Cys Thr Ala Arg Thr Glu Leu Asn Val Gly Ile
 245 250 255
 Asp Phe Asn Trp Glu Tyr Pro Ser Ser Lys His Gln His Lys Lys Leu
 260 265 270
 Val Asn Arg Asp Leu Lys Thr Gln Ser Gly Ser Glu Met Lys Lys Phe
 275 280 285
 Leu Ser Thr Leu Thr Ile Asp Gly Val Thr Arg Ser Asp Gln Gly Leu
 290 295 300
 Tyr Thr Cys Ala Ala Ser Ser Gly Leu Met Thr Lys Lys Asn Ser Thr
 305 310 315 320
 Phe Val Arg Val His Glu Lys Pro Phe Val Ala Phe Gly Ser Gly Met
 325 330 335
 Glu Ser Leu Val Glu Ala Thr Val Gly Glu Arg Val Arg Ile Pro Ala
 340 345 350
 Lys Tyr Leu Gly Tyr Pro Pro Pro Glu Ile Lys Trp Tyr Lys Asn Gly
 355 360 365
 Ile Pro Leu Glu Ser Asn His Thr Ile Lys Ala Gly His Val Leu Thr
 370 375 380
 Ile Met Glu Val Ser Glu Arg Asp Thr Gly Asn Tyr Thr Val Ile Leu
 385 390 395 400
 Thr Asn Pro Ile Ser Lys Glu Lys Gln Ser His Val Val Ser Leu Val
 405 410 415

ES 2 650 269 T3

Val Tyr Val Pro Pro Gln Ile Gly Glu Lys Ser Leu Ile Ser Pro Val
 420 425 430

Asp Ser Tyr Gln Tyr Gly Thr Thr Gln Thr Leu Thr Cys Thr Val Tyr
 435 440 445

Ala Ile Pro Pro Pro His His Ile His Trp Tyr Trp Gln Leu Glu Glu
 450 455 460

Glu Cys Ala Asn Glu Pro Ser Gln Ala Val Ser Val Thr Asn Pro Tyr
 465 470 475 480

Pro Cys Glu Glu Trp Arg Ser Val Glu Asp Phe Gln Gly Gly Asn Lys
 485 490 495

Ile Glu Val Asn Lys Asn Gln Phe Ala Leu Ile Glu Gly Lys Asn Lys
 500 505 510

Thr Val Ser Thr Leu Val Ile Gln Ala Ala Asn Val Ser Ala Leu Tyr
 515 520 525

Lys Cys Glu Ala Val Asn Lys Val Gly Arg Gly Glu Arg Val Ile Ser
 530 535 540

Phe His Val Thr Arg Gly Pro Glu Ile Thr Leu Gln Pro Asp Met Gln
 545 550 555 560

Pro Thr Glu Gln Glu Ser Val Ser Leu Trp Cys Thr Ala Asp Arg Ser
 565 570 575

Thr Phe Glu Asn Leu Thr Trp Tyr Lys Leu Gly Pro Gln Pro Leu Pro
 580 585 590

Ile His Val Gly Glu Leu Pro Thr Pro Val Cys Lys Asn Leu Asp Thr
 595 600 605

Leu Trp Lys Leu Asn Ala Thr Met Phe Ser Asn Ser Thr Asn Asp Ile
 610 615 620

Leu Ile Met Glu Leu Lys Asn Ala Ser Leu Gln Asp Gln Gly Asp Tyr
 625 630 635 640

Val Cys Leu Ala Gln Asp Arg Lys Thr Lys Lys Arg His Cys Val Val
 645 650 655

Arg Gln Leu Thr Val Leu Glu Arg Val Ala Pro Thr Ile Thr Gly Asn
 660 665 670

Leu Glu Asn Gln Thr Thr Ser Ile Gly Glu Ser Ile Glu Val Ser Cys
 675 680 685

ES 2 650 269 T3

Thr Ala Ser Gly Asn Pro Pro Pro Gln Ile Met Trp Phe Lys Asp Asn
 690 695 700
 Glu Thr Leu Val Glu Asp Ser Gly Ile Val Leu Lys Asp Gly Asn Arg
 705 710 715
 Asn Leu Thr Ile Arg Arg Val Arg Lys Glu Asp Glu Gly Leu Tyr Thr
 725 730 735
 Cys Gln Ala Cys Ser Val Leu Gly Cys Ala Lys Val Glu Ala Phe Phe
 740 745 750
 Ile Ile Glu Gly Ala Gln Glu Lys Thr Asn Leu Glu Ile Ile Ile Leu
 755 760 765
 Val Gly Thr Ala Val Ile Ala Met Phe Phe Trp Leu Leu Val Ile
 770 775 780
 Ile Leu Arg Thr Val Lys Arg Ala Asn Gly Gly Glu Leu Lys Thr Gly
 785 790 795 800
 Tyr Leu Ser Ile Val Met Asp Pro Asp Glu Leu Pro Leu Asp Glu His
 805 810 815
 Cys Glu Arg Leu Pro Tyr Asp Ala Ser Lys Trp Glu Phe Pro Arg Asp
 820 825 830
 Arg Leu Lys Leu Gly Lys Pro Leu Gly Arg Gly Ala Phe Gly Gln Val
 835 840 845
 Ile Glu Ala Asp Ala Phe Gly Ile Asp Lys Thr Ala Thr Cys Arg Thr
 850 855 860
 Val Ala Val Lys Met Leu Lys Glu Gly Ala Thr His Ser Glu His Arg
 865 870 875 880
 Ala Leu Met Ser Glu Leu Lys Ile Leu Ile His Ile Gly His His Leu
 885 890 895
 Asn Val Val Asn Leu Leu Gly Ala Cys Thr Lys Pro Gly Gly Pro Leu
 900 905 910
 Met Val Ile Val Glu Phe Cys Lys Phe Gly Asn Leu Ser Thr Tyr Leu
 915 920 925
 Arg Ser Lys Arg Asn Glu Phe Val Pro Tyr Lys Thr Lys Gly Ala Arg
 930 935 940
 Phe Arg Gln Gly Lys Asp Tyr Val Gly Ala Ile Pro Val Asp Leu Lys
 945 950 955 960

ES 2 650 269 T3

Arg Arg Leu Asp Ser Ile Thr Ser Ser Gln Ser Ser Ala Ser Ser Gly
 965 970 975
 Phe Val Glu Glu Lys Ser Leu Ser Asp Val Glu Glu Glu Glu Ala Pro
 980 985 990
 Glu Asp Leu Tyr Lys Asp Phe Leu Thr Leu Glu His Leu Ile Cys Tyr
 995 1000 1005
 Ser Phe Gln Val Ala Lys Gly Met Glu Phe Leu Ala Ser Arg Lys
 1010 1015 1020
 Cys Ile His Arg Asp Leu Ala Ala Arg Asn Ile Leu Leu Ser Glu
 1025 1030 1035
 Lys Asn Val Val Lys Ile Cys Asp Phe Gly Leu Ala Arg Asp Ile
 1040 1045 1050
 Tyr Lys Asp Pro Asp Tyr Val Arg Lys Gly Asp Ala Arg Leu Pro
 1055 1060 1065
 Leu Lys Trp Met Ala Pro Glu Thr Ile Phe Asp Arg Val Tyr Thr
 1070 1075 1080
 Ile Gln Ser Asp Val Trp Ser Phe Gly Val Leu Leu Trp Glu Ile
 1085 1090 1095
 Phe Ser Leu Gly Ala Ser Pro Tyr Pro Gly Val Lys Ile Asp Glu
 1100 1105 1110
 Glu Phe Cys Arg Arg Leu Lys Glu Gly Thr Arg Met Arg Ala Pro
 1115 1120 1125
 Asp Tyr Thr Thr Pro Glu Met Tyr Gln Thr Met Leu Asp Cys Trp
 1130 1135 1140
 His Gly Glu Pro Ser Gln Arg Pro Thr Phe Ser Glu Leu Val Glu
 1145 1150 1155
 His Leu Gly Asn Leu Leu Gln Ala Asn Ala Gln Gln Asp Gly Lys
 1160 1165 1170
 Asp Tyr Ile Val Leu Pro Ile Ser Glu Thr Leu Ser Met Glu Glu
 1175 1180 1185
 Asp Ser Gly Leu Ser Leu Pro Thr Ser Pro Val Ser Cys Met Glu
 1190 1195 1200
 Glu Glu Glu Val Cys Asp Pro Lys Phe His Tyr Asp Asn Thr Ala
 1205 1210 1215

ES 2 650 269 T3

Gly Ile Ser Gln Tyr Leu Gln Asn Ser Lys Arg Lys Ser Arg Pro
 1220 1225 1230
 Val Ser Val Lys Thr Phe Glu Asp Ile Pro Leu Glu Glu Pro Glu
 1235 1240 1245
 Val Lys Val Ile Pro Asp Asp Asn Gln Thr Asp Ser Gly Met Val
 1250 1255 1260
 Leu Ala Ser Glu Glu Leu Lys Thr Leu Glu Asp Arg Thr Lys Leu
 1265 1270 1275
 Ser Pro Ser Phe Gly Gly Met Val Pro Ser Lys Ser Arg Glu Ser
 1280 1285 1290
 Val Ala Ser Glu Gly Ser Asn Gln Thr Ser Gly Tyr Gln Ser Gly
 1295 1300 1305
 Tyr His Ser Asp Asp Thr Asp Thr Thr Val Tyr Ser Ser Glu Glu
 1310 1315 1320
 Ala Glu Leu Leu Lys Leu Ile Glu Ile Gly Val Gln Thr Gly Ser
 1325 1330 1335
 Thr Ala Gln Ile Leu Gln Pro Asp Ser Gly Thr Thr Leu Ser Ser
 1340 1345 1350
 Pro Pro Val
 1355

<210> 2

<211> 4071

<212> ADN

5 <213> Homo sapiens

<400> 2

```

atgcagagca aggtgctgct ggccgctgcc ctgtggctct gcgtaggagac ccgggccgcc      60
tctgtggggtt tgcttagtgt ttctcttgat ctgccaggc tcagcatata aaaagacata      120
cttacaatta aggctaatac aactcttcaa attacttgca ggggacagag ggacttggac      180
tggctttggc ccaataatca gagtggcagt gagcaaaggg tggagggtgac tgagtgcagc      240
gatggcctct tctgtaagac actcacaatt ccaaaagtga tcggaaatga cactggagcc      300
tacaagtgct tctaccggga aactgacttg gcctcgggtca tttatgtcta tgttcaagat      360
tacagatctc catttattgc ttctgttagt gaccaacatg gagtcgtgta cactactgag      420
aacaaaaaca aaactgtggt gattccatgt ctcgggtcca tttcaaatct caacgtgtca      480
ctttgtgcaa gataccaga aaagagattt gttcctgatg gtaacagaat ttcctgggac      540
agcaagaagg gctttactat tccagctac atgatcagct atgctggcat ggtcttctgt      600
gaagcaaaaa ttaatgatga aagttaccag tctattatgt acatagttgt cgttgtaggg      660
  
```

ES 2 650 269 T3

tataggattt atgatgtggt tctgagtc	tctcatggaa ttgaaactatc	tgttggagaa	720
aagcttgtct taaattgtac agcaagaact	gaactaaatg tggggattga	cttcaactgg	780
gaataccctt cttcgaagca tcagcataag	aaacttghtaa accgagacct	aaaaaccag	840
tctgggagtg agatgaagaa atttttgagc	accttaacta tagatggtgt	aaccggagt	900
gaccaaggat tgtacacctg tgcagcatcc	agtgggctga tgaccaagaa	gaacagcaca	960
tttgtcaggg tccatgaaaa accttttggt	gcttttgtaa gtggcatgga	atctctggtg	1020
gaagccacgg tgggggagcg tgtcagaatc	cctgcgaagt accttgggta	cccacccca	1080
gaaataaaat ggtataaaaa tggaaataccc	cttgagtcca atcacacaat	taaagcgggg	1140
catgtactga cgattatgga agtgagtgaa	agagacacag gaaattacac	tgtcatcctt	1200
accaatccca tttcaaagga gaagcagagc	catgtggtct ctctggttgt	gtatgtccca	1260
ccccagattg gtgagaaatc tctaactctct	cctgtggatt cctaccagta	cggcaccact	1320
caaacgctga catgtacggt ctatgccatt	cctccccgc atcacatcca	ctggtattgg	1380
cagttggagg aagagtgcgc caacgagccc	agccaagctg tctcagtgc	aaaccatac	1440
ccttgtgaag aatggagaag tgtggaggac	ttccagggag gaaataaaat	tgaagttaat	1500
aaaaatcaat ttgctctaata tgaaggaaaa	aacaaaactg taagtaccct	tgttatccaa	1560
gcggcaaatg tgtcagcttt gtacaaatgt	gaagcggctca acaaagtcgg	gagaggagag	1620
agggtgatct cttccacgt gaccaggggt	cctgaaatta ctttgcaacc	tgacatgcag	1680
cccactgagc aggagagcgt gtctttgtgg	tgcactgcag acagatctac	gtttgagaac	1740
ctcacatggt acaagcttgg cccacagcct	ctgccaatcc atgtgggaga	gttgcccaca	1800
cctgtttgca agaacttgg tactctttgg	aaattgaatg ccaccatggt	ctctaatagc	1860
acaaatgaca ttttgatcat ggagcttaag	aatgcatcct tgcaggacca	aggagactat	1920
gtctgccttg ctcaagacag gaagaccaag	aaaagacatt gcgtggtcag	gcagctcaca	1980
gtcctagagc gtgtggcacc cacgatcaca	ggaaacctgg agaatcagac	gacaagtatt	2040
ggggaagca tcgaagtctc atgcacggca	tctgggaatc cccctccaca	gatcatgtgg	2100
tttaaagata atgagaccct tgtagaagac	tcaggcattg tattgaagga	tgggaaccgg	2160
aacctcacta tccgcagagt gaggaaggag	gacgaaggcc tctacacctg	ccaggcatgc	2220
agtgttcttg gctgtgcaaa agtggaggca	ttttcataa tagaagggtc	ccaggaaaag	2280
acgaacttgg aaatcattat tctagtaggc	acggcgggtga ttgccatggt	cttctggcta	2340
cttctgtca tcacctacg gaccgttaag	cgggccaatg gaggggaact	gaagacaggc	2400
tacttgtcca tcgtcatgga tccagatgaa	ctcccattgg atgaacattg	tgaacgactg	2460
ccttatgatg ccagcaaatg ggaattcccc	agagaccggc tgaagctagg	taagcctctt	2520
ggccgtggtg cctttggcca agtgattgaa	gcagatgcct ttggaattga	caagacagca	2580
acttgcagga cagtagcagt caaaatgttg	aaagaaggag caacacacag	tgagcatcga	2640
gctctcatgt ctgaactcaa gatcctcatt	catattggtc accatctcaa	tggtgtcaac	2700

ES 2 650 269 T3

```

cttctagggtg cctgtaccaa gccaggaggg ccactcatgg tgattgtgga attctgcaaa 2760
tttgaaacc tgtccactta cctgaggagc aagagaaatg aatttgtccc ctacaagacc 2820
aaaggggac gattccgtca agggaaagac tacgttggag caatccctgt ggatctgaaa 2880
cggcgcttg acagcatcac cagtagccag agctcagcca gctctggatt tgtggaggag 2940
aagtcctca gtgatgtaga agaagaggaa gtcctgaag atctgtataa ggacttcttg 3000
accttgagc atctcatctg ttacagcttc caagtggcta agggcatgga gttcttgga 3060
tcgcgaaagt gtatccacag ggacctggcg gcacgaaata tcctcttatc ggagaagaac 3120
gtggttaaaa tctgtgactt tggcttgccc cgggatattt ataaagatcc agattatgtc 3180
agaaaaggag atgctcgcct ccctttgaaa tggatggccc cagaaacaat ttttgacaga 3240
gtgtacacaa tccagagtga cgtctgtctt tttggtggtt tgctgtggga aatattttcc 3300
ttaggtgctt ctccatatcc tggggtaaag attgatgaag aattttgtag gcgattgaaa 3360
gaaggaacta gaatgagggc ccctgattat actacaccag aaatgtacca gaccatgctg 3420
gactgctggc acggggagcc cagtcagaga cccacgtttt cagagttggt ggaacatttg 3480
ggaaatctct tgcaagctaa tgctcagcag gatggcaaag actacattgt tcttccgata 3540
tcagagactt tgagcatgga agaggattct ggactctctc tgcttacctc acctgtttcc 3600
tgtatggagg aggaggaagt atgtgacccc aaattccatt atgacaacac agcaggaatc 3660
agtcagtatc tgcagaacag taagcgaaag agccggcctg tgagtgtaaa aacatttgaa 3720
gatatcccgt tagaagaacc agaagtaaaa gtaatcccag atgacaacca gacggacagt 3780
ggtatggttc ttgcctcaga agagctgaaa actttggaag acagaaccaa attatctcca 3840
tcttttggtg gaatggtgcc cagcaaaagc agggagtctg tggcatctga aggctcaaac 3900
cagacaagcg gctaccagtc cggatatcac tccgatgaca cagacaccac cgtgtactcc 3960
agtgaggaag cagaactttt aaagctgata gagattggag tgcaaaccgg tagcacagcc 4020
cagattctcc agcctgactc ggggaccaca ctgagctctc ctctgttta a 4071

```

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para cultivar una cepa mutante atenuada de *Salmonella typhi* que alberga una mutación con pérdida de función en el gen galE y que comprende al menos una copia de una molécula de ADN que comprende un casete de expresión eucariota, que comprende la etapa de cultivar la cepa en un medio regulado que comprende peptona a un valor de pH de inicio aproximadamente neutro a escala de fermentación, en el que no se agrega glucosa al medio durante la fermentación y la cantidad inicial de glucosa se agota antes de alcanzar la fase estacionaria, y en el que el volumen del medio es al menos aproximadamente 10 litros.
- 10 2. El método de la reivindicación 1, en el que dicha cepa mutante atenuada de *Salmonella typhi* es *Salmonella typhi* Ty21a.
- 15 3. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en el que el casete de expresión eucariota codifica una proteína receptora de VEGF, preferiblemente una proteína receptora de VEGF seleccionada del grupo que consiste en VEGFR-2 humano y un homólogo del mismo que comparte al menos aproximadamente 80% homología con la misma, particularmente en donde el VEGFR-2 humano tiene la secuencia de aminoácidos como se encuentra en la SEQ ID NO 1.
- 20 4. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el medio regulado comprende peptona de origen no animal, preferiblemente en el que dicho medio regulado es caldo de soja tréptico (TSB) de origen no animal.
- 25 5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el volumen del medio es desde aproximadamente 10 litros a aproximadamente 10.000 litros, preferiblemente desde aproximadamente 30 litros a aproximadamente 1.000 litros, más preferiblemente desde aproximadamente 100 litros a aproximadamente 500 litros.
- 30 6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la concentración de glucosa inicial corresponde a la del medio bacteriano mínimo o menos, preferiblemente en el que la concentración de glucosa inicial es desde aproximadamente 0 g/l a aproximadamente 4 g/l.
- 35 7. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el valor de pH inicial es desde aproximadamente 5 a menos de aproximadamente 9, preferiblemente desde aproximadamente 6 a aproximadamente 8, más preferiblemente desde aproximadamente 6,5 a aproximadamente 7,5.
- 40 8. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el valor de pH se ajusta durante dicho cultivo a un valor de pH de aproximadamente 6 a aproximadamente 8, preferiblemente a un valor de pH de aproximadamente 6,5 a aproximadamente 7,5.
9. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que el progreso del crecimiento se determina mediante (i) medición de la densidad óptica (OD), preferiblemente mediante (ia) monitorización in-situ de la densidad óptica del cultivo o mediante (ib) tomar muestras y medir la densidad óptica de las muestras, o (ii) medir la densidad celular, preferiblemente (iia) microscópicamente o (iib) midiendo la resistencia eléctrica, o (iic) por citometría de flujo, o por (iii) medir el valor de las unidades formadoras de colonias (UFC) tomando muestras y cultivando en placas de agar.
10. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que las células se cosechan antes de alcanzar una densidad óptica de aproximadamente 6, preferiblemente a una densidad óptica de aproximadamente 5 a aproximadamente 6.
11. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que la cepa mutante atenuada de *Salmonella typhi* es *Salmonella typhi* Ty21a y la molécula de ADN comprende el gen de resistencia a kanamicina, pMB1 ori y un casete de expresión eucariota que codifica VEGFR-2 humana, bajo el control del promotor de CMV, particularmente en el que el ácido nucleico VEGFR-2 humano tiene la secuencia que se encuentra en la SEQ ID NO 2.

ES 2 650 269 T3

Figura 1:

10	20	30	40	50	60
MQSKVLLAVA	LWLCVETRAA	SVGLPSVSLD	LPRLSIQKDI	LTIKANTTLQ	ITCRGQRDL
70	80	90	100	110	120
WLWPNNQSGS	EQRVEVTECS	DGLFCKTLTI	PKVIGNDTGA	YKCFYRETDL	ASVIYVYVQD
130	140	150	160	170	180
YRSPFIASVS	DQHGCVVYITE	NKNKTVVIPC	LGSISNLNVS	LCARYPEKRF	VPDGNRISWD
190	200	210	220	230	240
SKKGFTIPSY	MISYAGMVFC	EAKINDESYQ	SIMYIVVVVG	YRIYDVVLSL	SHGIELSVGE
250	260	270	280	290	300
KLVLNCTART	ELNVGIDFNW	EYPSSKHQHK	KLVNRDLKTQ	SGSEMKKFLS	TLTIDGVTRS
310	320	330	340	350	360
DQGLYTCAAS	SGLMTKKNST	FVRVHEKPFV	AFGSGMESLV	EATVGERVRI	PAKYLGYPPP
370	380	390	400	410	420
EIKWYKNGIP	LESNHTIKAG	HVLTIMEVSE	RDTGNYTVIL	TNPISKEKQS	HVVSLVVYVP
430	440	450	460	470	480
POIGEKLIS	PVDSYQYGT	QTLTCTVYAT	PPPHIHWWY	QLEEECANEP	SQAVSVTNPY
490	500	510	520	530	540
PCEEWRSVED	FQGGNKIEVN	KNQFALIEGK	NKTVSTLVIQ	AANVSALYKC	EAVNKVGRGE
550	560	570	580	590	600
RVISFHVTRG	PEITLQPDQ	PTEQESVSLW	CTADRSTFEN	LTWYKLGPOP	LPIHVGELPT
610	620	630	640	650	660
PVCKNLDTLW	KLNATMFSNS	TNDILIMELK	NASLQDQGDY	VCLAQDRKTK	KRHCVVRLT
670	680	690	700	710	720
VLERVAPTIT	GNLENQTTSI	GESIEVSCTA	SGNPPPQIMW	FKDNETLVED	SGIVLKDGNR.

ES 2 650 269 T3

Figura 1 (continuación):

730	740	750	760	770	780
NLTIRRVKRE	DEGLYTCQAC	SVLGCAKVEA	FFIIEGAQEK	TNLEIIILVG	TAVIAMFFWL
790	800	810	820	830	840
LLVIILRTVK	RANGGELKTG	YLSIVMDPDE	LPLDEHCERL	PYDASKWEFP	RDRLKLGKPL
850	860	870	880	890	900
GRGAFGQVIE	ADAFGIDKTA	TCRTVAVKML	KEGATHSEHR	ALMSELKILI	HIGHHLNVVN
910	920	930	940	950	960
LLGACTKPGG	PLMVIVEFCK	FGNLSTYLRS	KRNEFVPYKT	KGARFRQGKD	YVGAI PVDLK
970	980	990	1000	1010	1020
RRLDSITSSQ	SSASSGFVEE	KSLSDVEEEE	APEDLYKDFL	TLEHLICYSF	QVAKGMEFLA
1030	1040	1050	1060	1070	1080
SRKCIHRDLA	ARNILLSEKN	VVKICDFGLA	RDIYKDPDYV	RKGDARLPLK	WMA PETIFDR
1090	1100	1110	1120	1130	1140
VYTIQSDVWS	FGVLLWEIFS	LGASPYPGVK	IDEEFCRRLK	EGTRMRAPDY	TTPEMYQTML
1150	1160	1170	1180	1190	1200
DCWHGEPQR	PTFSELVEHL	GNLLQANAQQ	DGKDYIVLPI	SETLSMEEDS	GLSLPTSPVS
1210	1220	1230	1240	1250	1260
CMEEEEVCDP	KFHYDNTAGI	SOYLQNSKRK	SRPVSVKTFE	DIPLEEPEVK	VIPDDNQ TDS
1270	1280	1290	1300	1310	1320
GMVLASEELK	TLEDRTKLSP	SFGGMVPSKS	RESVASEGSN	QTSGYQSGYH	SDDTDTTVYS
1330	1340	1350			
SEEAELLKLI	EIGVQTGSTA	QILQPDSGTT	LSSPPV		

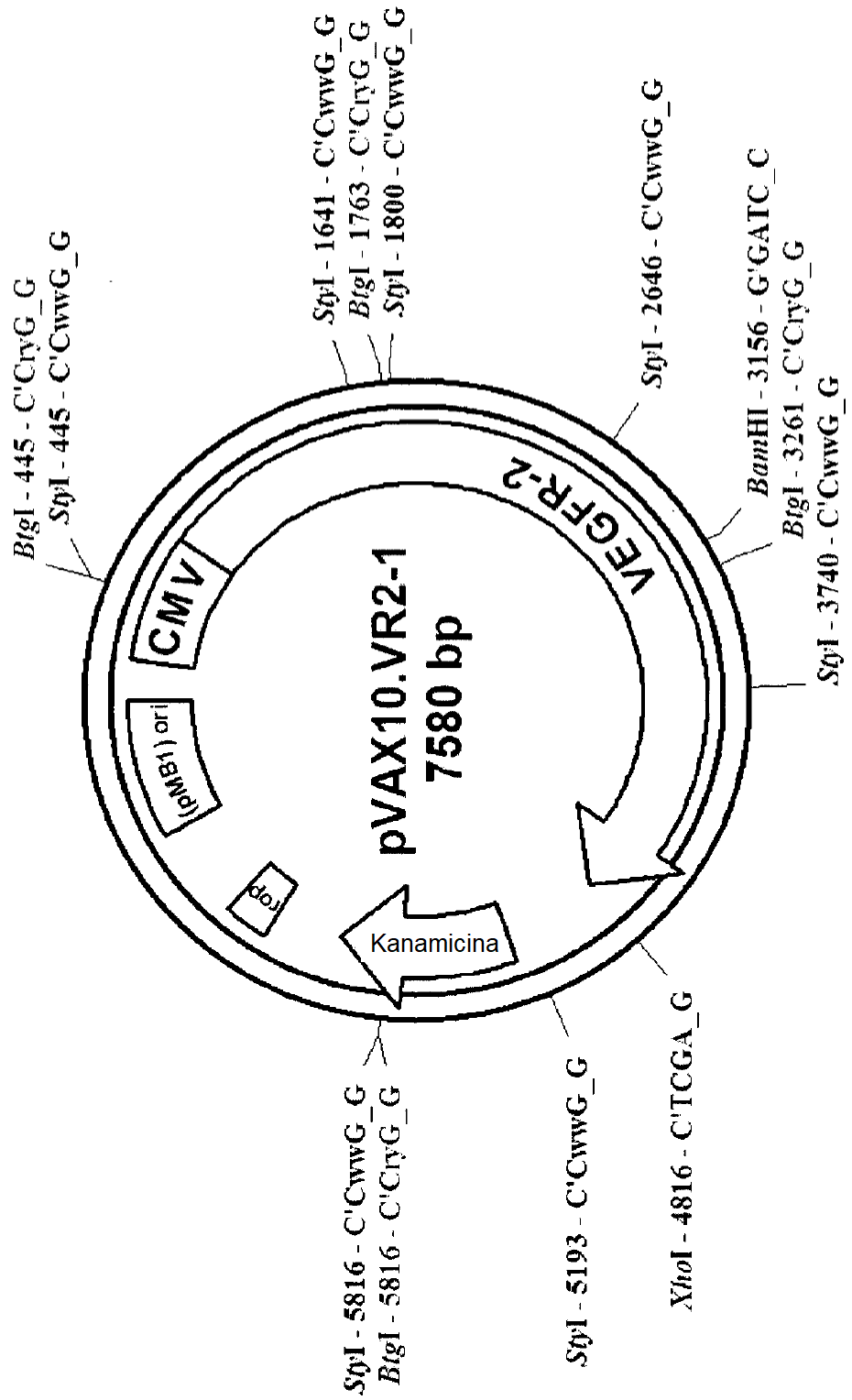


Figura 2:

Figura 3:

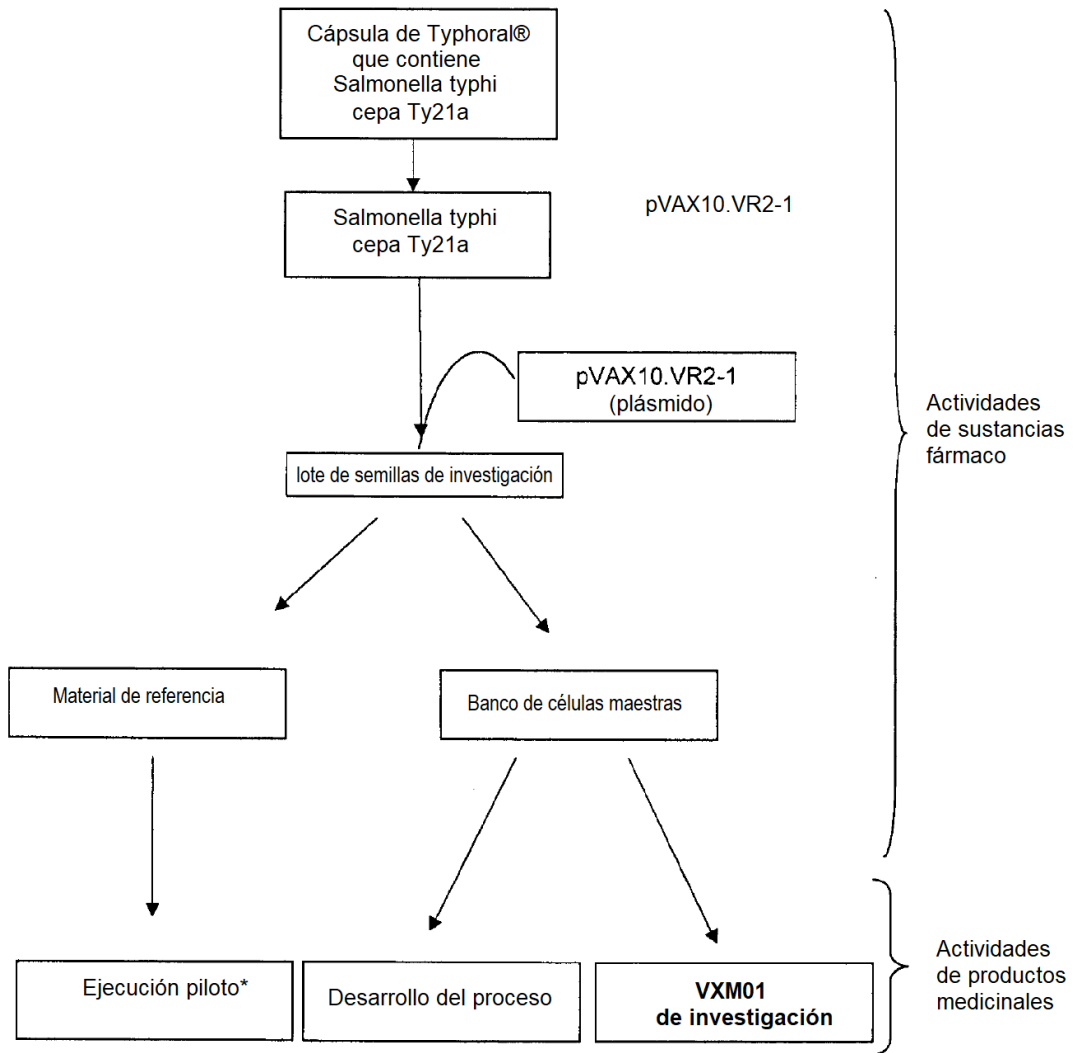


Figura 4:

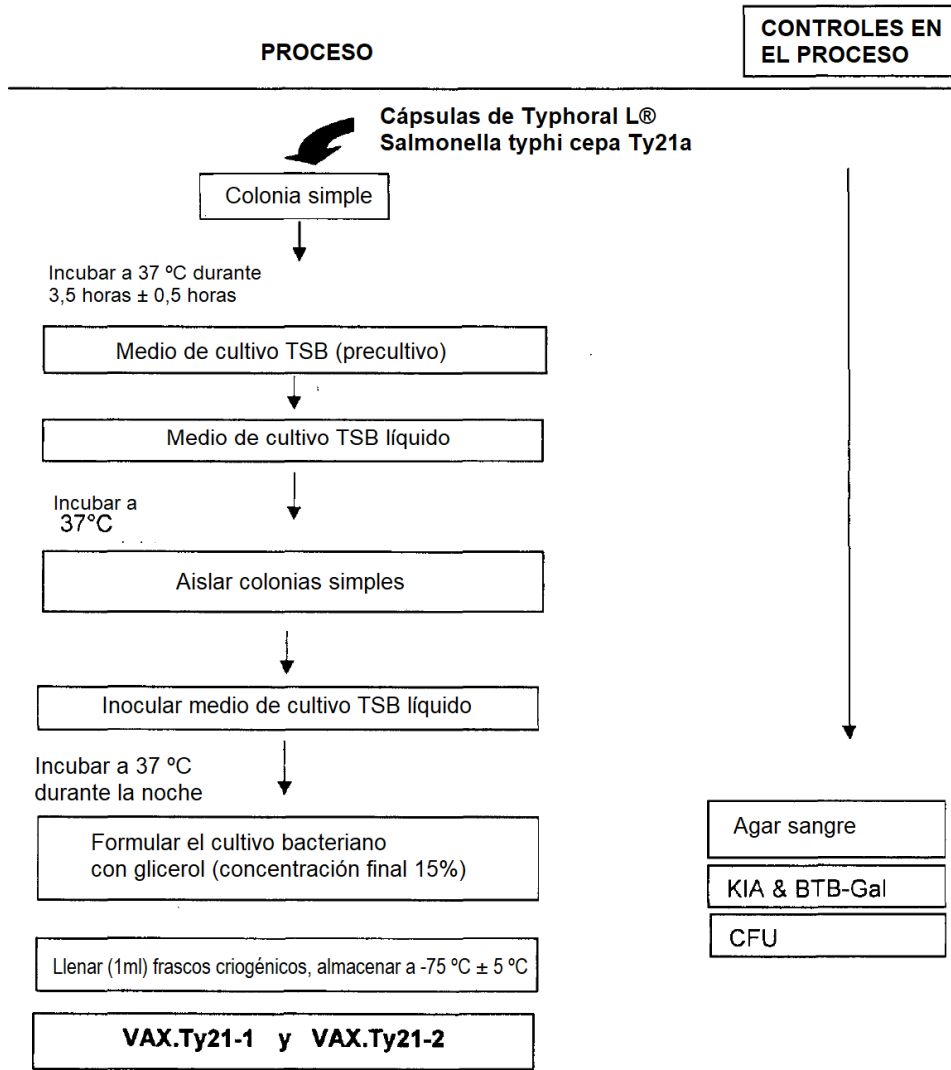


Figura 5:

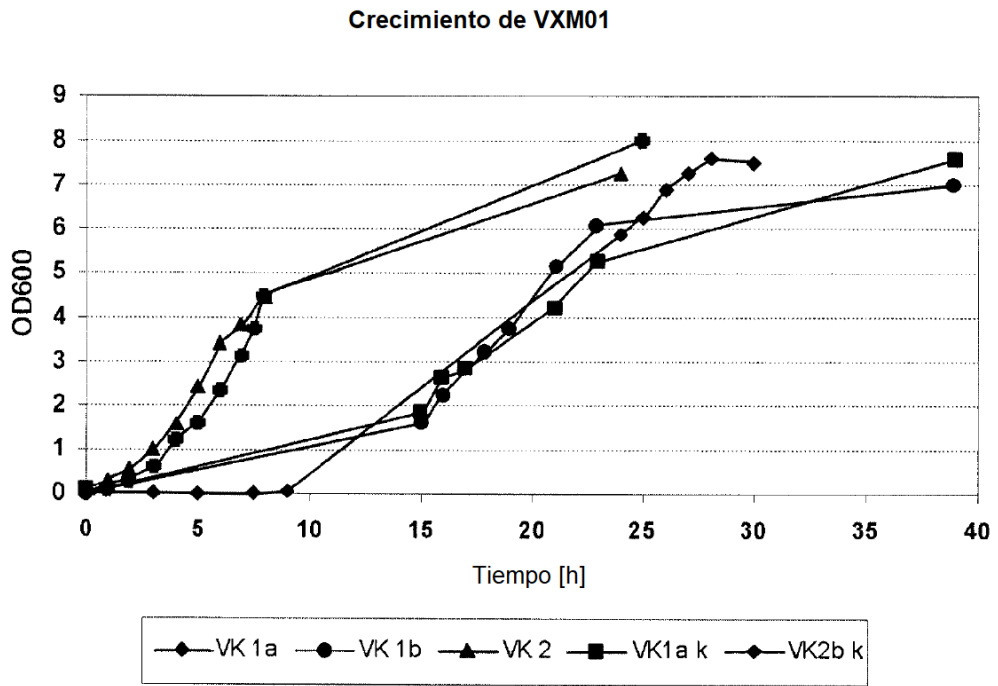


Figura 6:

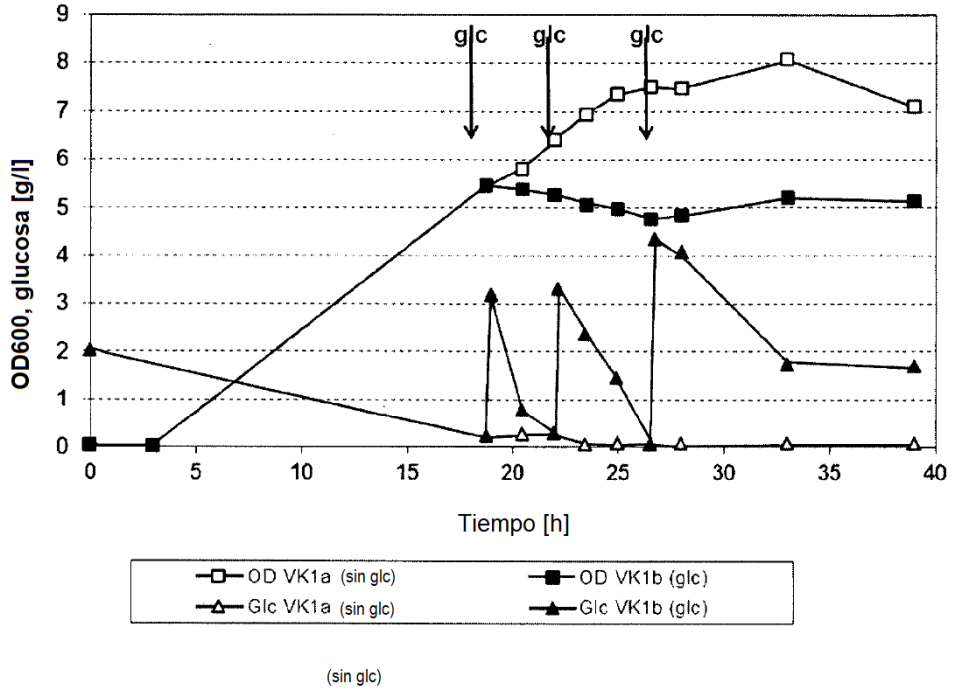


Figura 7:

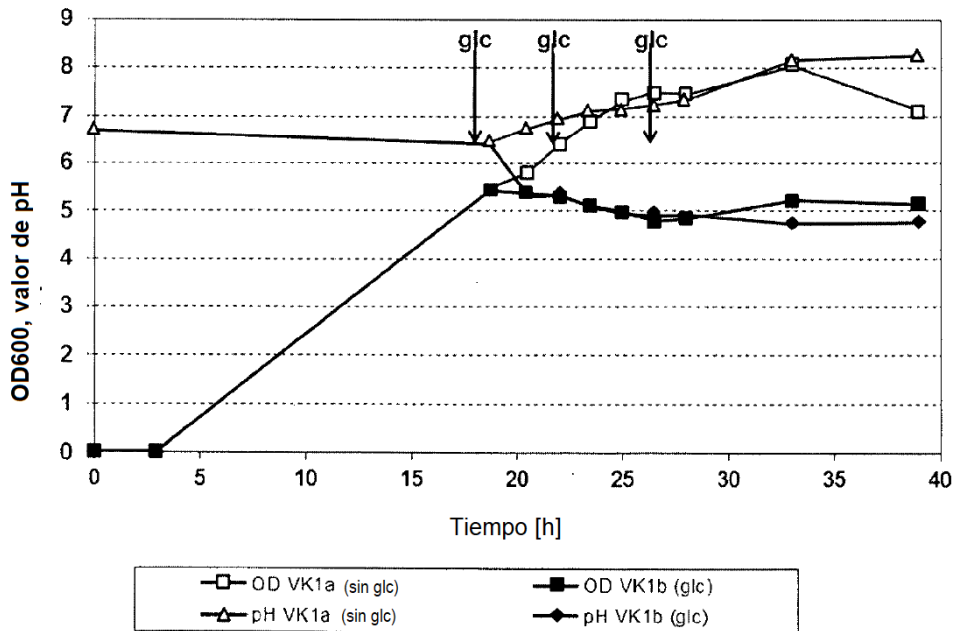


Figura 8:

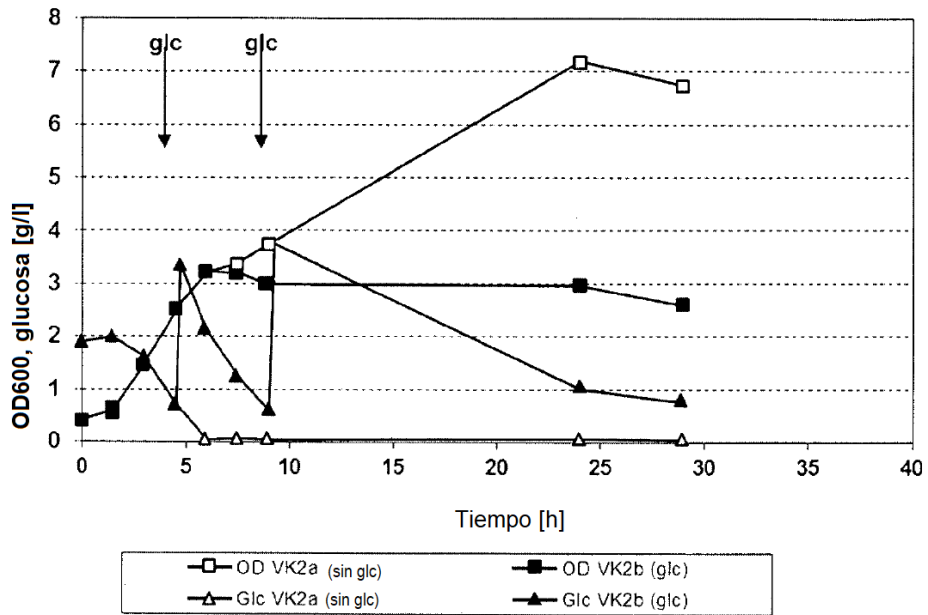


Figura 9:

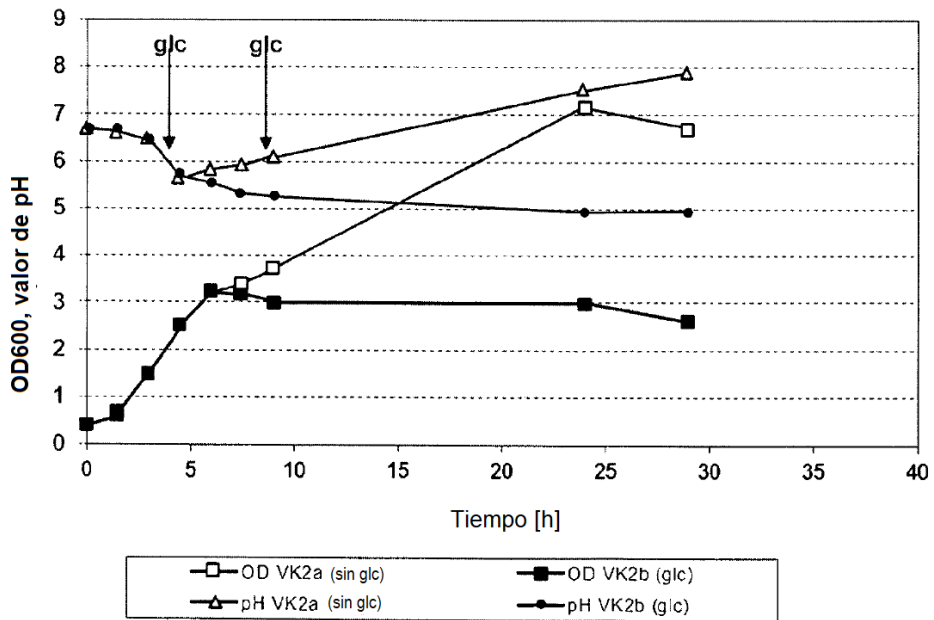


Figura 10:

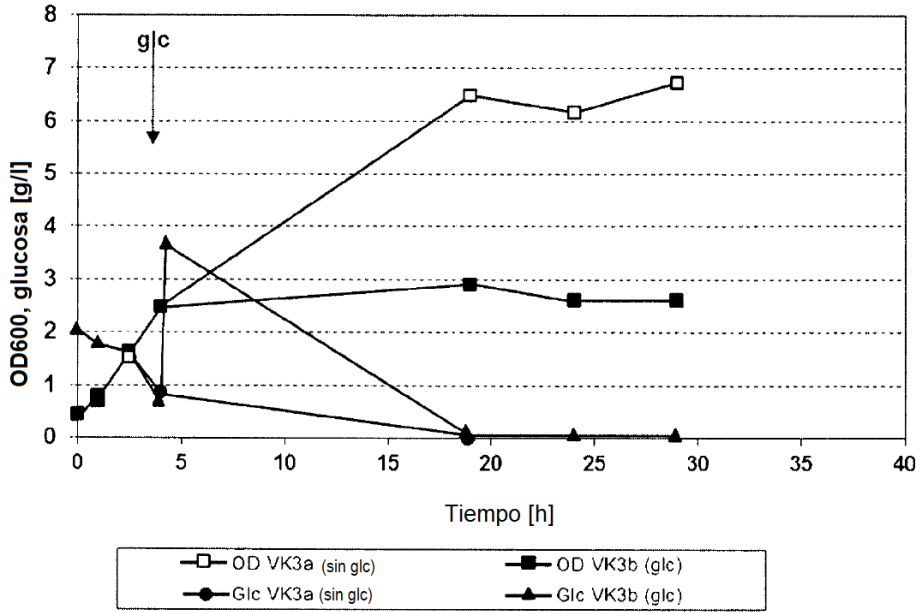


Figura 11:

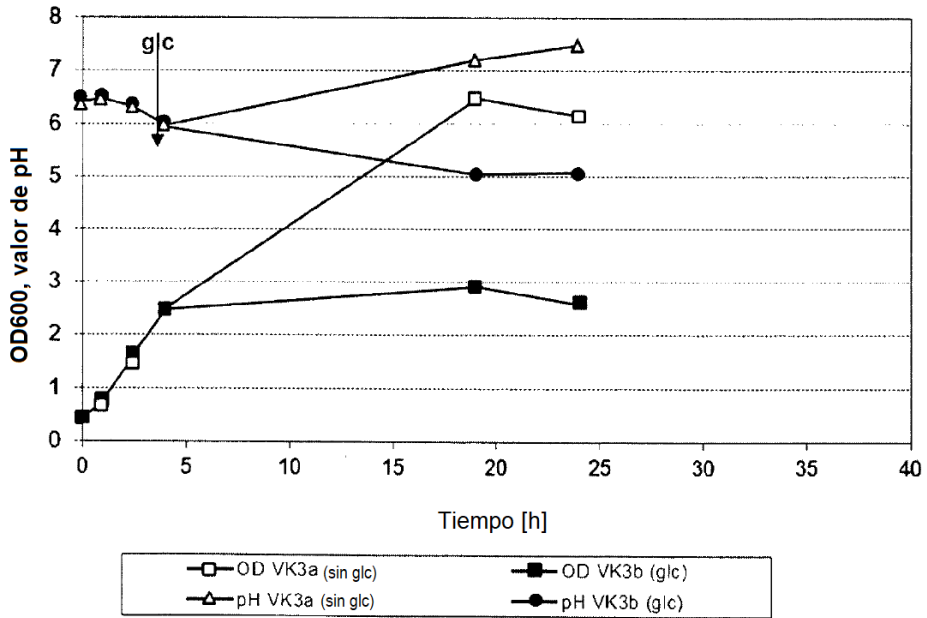


Figura 12:

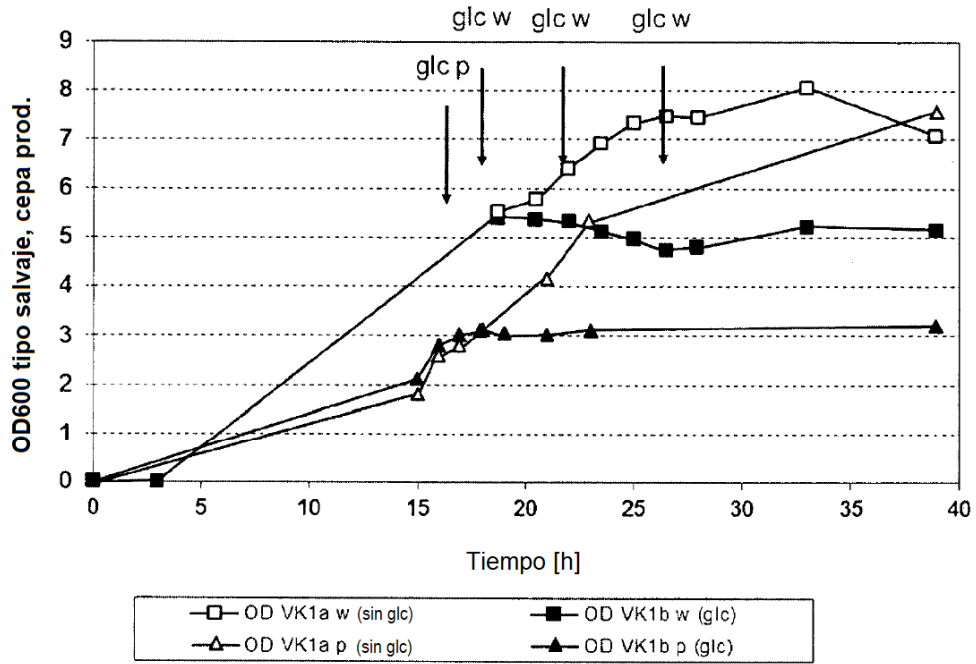


Figura 13:

