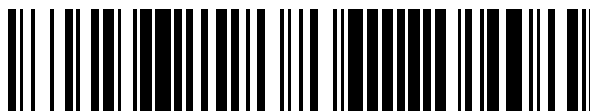


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 778 727**

51 Int. Cl.:

C12N 7/00 (2006.01)

C12N 7/01 (2006.01)

C12N 15/74 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.08.2015 PCT/US2015/046758**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.03.2016 WO16033088**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.08.2015 E 15836904 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.01.2020 EP 3186368**

54 Título: **Partículas de transducción no replicativas y sistemas indicadores basados en partículas de transducción**

30 Prioridad:

25.08.2014 US 201462041539 P
07.08.2015 US 201562202653 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
11.08.2020

73 Titular/es:

GENEWEAVE BIOSCIENCES INC. (100.0%)
983 University Avenue, Bldg. B200
Los Gatos, CA 95032, US

72 Inventor/es:

REY, DIEGO, ARIEL;
REHFUSS, MARC y
LIU, XIAOWEN

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 778 727 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

Partículas de transducción no replicativas y sistemas indicadores basados en partículas de transducción

5

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

Campo de la invención

10 La invención se refiere a procedimientos y composiciones para empaquetar y liberar moléculas indicadoras de transducción no replicativas en células para detectar genes diana en las células.

Descripción de la técnica relacionada

15 Una partícula de transducción se refiere a un virus que puede liberar un ácido nucleico no vírico en una célula. Los sistemas indicadores basados en virus se han usado para detectar la presencia de células y se basan en la fase lisógena del virus para permitir la expresión de una molécula indicadora de la célula. Estos sistemas indicadores basados en virus usan partículas de transducción con capacidad de replicación que expresan moléculas indicadoras y provocan que una célula diana emita una señal detectable.

20 Sin embargo, se ha demostrado que el ciclo lítico del virus es perjudicial para los ensayos indicadores basados en virus. Carrière, C. *et al.*, *Conditionally replicating luciferase reporter phages: Improved sensitivity for rapid detection and assessment of drug susceptibility of Mycobacterium tuberculosis*. Journal of Clinical Microbiology, 1997. **35(12)**: p. 3232-3239. Carrière *et al.* desarrollaron fagos indicadores de luciferasa de *M. tuberculosis* / bacilo de Calmette-Guérin (BCG) que tienen sus ciclos líticos suprimidos a 30 °C, pero activos a 37 °C. Usando este sistema, Carrière *et al.* han demostrado la detección de BCG usando indicadores de fagos con un ciclo lítico suprimido.

30 Sin embargo, existen desventajas asociadas con la supresión, pero no con la eliminación, de las funciones de replicación del bacteriófago en los ensayos indicadores basados en bacteriófago. En primer lugar, controlar las funciones de replicación del bacteriófago impone condiciones limitantes de ensayo. Por ejemplo, el ciclo lítico del fago indicador phAE40 usado por Carrière *et al.* se reprimía cuando el fago se usaba para infectar células a la temperatura no permisiva de 30 °C. Este requisito de temperatura impuso condiciones limitantes en el ensayo indicador en que la temperatura óptima para las bacterias diana era 37 °C. Estas condiciones limitantes dificultan el rendimiento óptimo del ensayo.

35 Además, las funciones de replicación del virus son difíciles de controlar. La replicación del virus se debe suprimir durante el uso de las partículas de transducción como sistema indicador. Por ejemplo, la actividad lítica del fago indicador phAE40 del que informó Carrière *et al.* se redujo, pero no se eliminó, dando como resultado una caída en la señal de luciferasa en el ensayo. Carrière *et al.* destacaron las posibles causas de la caída resultante en la señal del indicador, tal como los genes intactos expresados en el fago y las limitaciones de temperatura del ensayo, todo derivado del hecho de que no se eliminó el ciclo lítico del indicador del fago.

40 Se puede esperar que los ensayos indicadores que dependen del ciclo lisógeno natural de los fagos presenten actividad lítica esporádicamente. Además, los ensayos que se basan en el ciclo lisógeno del fago pueden ser propensos a inmunidad por sobreinfección de las células diana ya lisogenizadas con un fago similar, así como a los sistemas de restricción del huésped naturales que se dirigen al ácido nucleico del virus entrante, limitando por tanto la gama de huéspedes de estos fagos indicadores.

45 En otros ejemplos, los sistemas de producción de partículas de transducción se diseñan para empaquetar moléculas de ácido nucleico exógenas, pero la partícula de transducción a menudo contiene una combinación de moléculas de ácido nucleico exógenas y moléculas de ácido nucleico vírico de la descendencia natural. El virus natural puede presentar actividad lítica que es un obstáculo para el rendimiento del ensayo, y la actividad lítica del virus se debe eliminar para purificar las partículas de transducción. Sin embargo, en general esta purificación no es posible. En el documento US 2009/0155768 A, titulado *Reporter Plasmid Packaging System for Detection of Bacteria*, Scholl *et al.* describen el desarrollo de dicho sistema de partículas de transducción. El producto del sistema es una combinación de partículas de transducción indicadoras y bacteriófagos naturales (figura 8 en la referencia). Aunque los autores indican que la partícula de transducción y el bacteriófago natural se pueden separar por ultracentrifugación, esta separación solo es posible en un sistema donde la partícula de transducción y el virus natural presenten densidades diferentes que permitan la separación por ultracentrifugación. Aunque esta característica la presente el sistema de empaquetamiento basado en bacteriófago T7 descrito en la referencia, esta no es una característica que sea aplicable en general a otros sistemas víricos. Es común que la maquinaria de empaquetamiento vírica presente empaquetamiento completo, que daría como resultado virus natural y partículas de transducción que presentan densidades indistinguibles que no se pueden separar por ultracentrifugación. Los sistemas de empaquetamiento víricos también dependen de una cantidad mínima de empaquetamiento como requisito para un ensamblaje estructural del virus apropiado que dé como resultado virus natural y partículas de transducción con densidades indistinguibles.

Por tanto, existe una necesidad de partículas de transducción no replicativas que no experimenten los efectos perjudiciales de las funciones líticas del virus y la posibilidad de estar limitadas por la inmunidad por sobreinfección y los mecanismos de restricción del huésped que se dirigen a las moléculas de ácido nucleico vírico y las funciones víricas, pudiendo limitar todo ello el rendimiento del ensayo indicador al incrementar los límites de detección y dar como resultado resultados falsos negativos.

Incluso cuando se han genomanipulado partículas de transducción, los procedimientos para usar las partículas de transducción para detectar e informar de la presencia de moléculas de ácido nucleico diana en las células tienen limitaciones. Algunos procedimientos requieren la alteración de la célula y técnicas engorrosas para aislar y detectar transcritos en el lisado. Los procedimientos de detección incluyen el uso de sondas marcadas, tales como anticuerpos, aptámeros o sondas de ácido nucleico. Las sondas marcadas dirigidas a un gen diana pueden dar como resultado una unión no específica a dianas no pretendidas o generar señales que tienen una alta proporción señal/ruido. Por lo tanto, existe una necesidad de procedimientos específicos, eficaces y exactos para detectar e informar de moléculas de ácido nucleico endógenas en las células.

En consecuencia, se necesitan procedimientos y sistemas para generar partículas de transducción no replicativas que permitan el empaquetamiento y la expresión de moléculas indicadoras en las células, mientras se elimina el virus de la descendencia con capacidad de replicación. También se necesitan procedimientos eficaces y exactos para detectar moléculas en las células usando las moléculas indicadoras expresadas.

SUMARIO DE LA INVENCIÓN

En el presente documento se divulga un sistema de empaquetamiento de células bacterianas para empaquetar una molécula de ácido nucleico indicadora en una partícula de transducción no replicativa (NRTP) para su introducción en una célula bacteriana, comprendiendo el sistema de empaquetamiento una célula huésped, que comprende (1) un genoma de bacteriófago que comprende un primer gen que comprende una alteración, en el que en ausencia de la alteración, el primer gen codifica un primer componente esencial de una actividad enzimática relacionada con el empaquetamiento y comprende una primera secuencia del sitio de inicio del empaquetamiento, en el que la actividad enzimática relacionada con el empaquetamiento reconoce el primer sitio de inicio del empaquetamiento, en el que la alteración evita el reconocimiento de la primera secuencia del sitio de inicio del empaquetamiento por la actividad enzimática relacionada con el empaquetamiento esencial, y en el que la alteración reduce el nivel de la actividad enzimática relacionada con el empaquetamiento esencial, y (2) una molécula de ácido nucleico indicadora que comprende un gen indicador, un replicón lítico P1, un segundo gen que codifica el primer componente de la actividad enzimática relacionada con el empaquetamiento esencial y un tercer gen que codifica un segundo componente de la actividad enzimática relacionada con el empaquetamiento esencial, en la que el segundo gen comprende la primera secuencia del sitio de inicio del empaquetamiento no alterada, en la que la primera secuencia del sitio de inicio del empaquetamiento se configura para facilitar el empaquetamiento de un replicón de la molécula de ácido nucleico indicadora en la NRTP.

En un modo de realización, el bacteriófago comprende una pluralidad de genes alterados, en los que, en ausencia de las alteraciones, cada uno codifica un componente esencial de la actividad enzimática relacionada con el empaquetamiento. En un modo de realización, cada uno de la pluralidad de genes alterados del bacteriófago se complementa con un gen funcional, no alterado, codificado por la molécula de ácido nucleico indicadora. En otro modo de realización, la alteración es por medio de delección, inserción, mutación o remplazo.

En otro modo de realización, la molécula de ácido nucleico indicadora comprende un gen de terminasa pequeño y un gen de terminasa grande. En otro modo de realización, los genes de terminasa comprenden un gen *pacA* y un gen *pacB* del bacteriófago P1 de *Enterobacteriaceae*. En algunos modos de realización, al menos uno de dicho segundo conjunto de genes de bacteriófago comprende la secuencia de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 6. En un modo de realización, los genes de terminasa comprenden un gen *terS* y un gen *terL* de un bacteriófago $\phi 11$ o $\phi 80\alpha$ de *S. aureus*. En otro modo de realización, los genes de terminasa comprenden un gen *terA* y un gen *terB* de un bacteriófago ϕ EF11 de *E. faecalis*.

En algunos modos de realización, la actividad enzimática relacionada con el empaquetamiento es una actividad terminasa. En un modo de realización, el segundo gen y el tercer gen son genes de terminasa. En un modo de realización, el segundo gen es un gen *pacA* y en el que el tercer gen es un gen *pacB*. En un modo de realización, la molécula de ácido nucleico indicadora comprende la secuencia de SEQ ID NO: 1. En un modo de realización, el segundo gen es un gen *terA* y el tercer gen es un gen *terB*. En un modo de realización, la molécula de ácido nucleico indicadora comprende la secuencia de SEQ ID NO: 6. En un modo de realización, el segundo gen es un gen *terS* y en el que el tercer gen es un gen *terL*. En un modo de realización, la molécula de ácido nucleico indicadora comprende la secuencia de SEQ ID NO: 4.

En algunos modos de realización, el segundo gen y el tercer gen están enlazados de forma funcional a un promotor condicional. En un modo de realización, el promotor condicional comprende la secuencia de SEQ ID NO: 9. En un modo de realización, el promotor condicional es un promotor natural de un gen de terminasa del genoma de

bacteriófago. En algunos modos de realización, la expresión del segundo gen o el tercer gen se inhibe en ausencia de activación del ciclo lítico del bacteriófago, y en los que la expresión del segundo gen o el tercer gen se activa tras la activación del ciclo lítico del bacteriófago. En determinados modos de realización, el segundo gen y el tercer gen son genes de terminasa naturales del genoma de bacteriófago, y en los que el promotor condicional es un promotor natural de los genes de terminasa.

En algunos modos de realización, el genoma de bacteriófago comprende un gen indicador. En algunos modos de realización, el genoma de bacteriófago comprende además un gen de resistencia a antibióticos. En un modo de realización, el gen indicador codifica un marcador detectable o un marcador seleccionable. En un modo de realización, el gen indicador se selecciona del grupo que consiste en: enzimas que median reacciones de luminiscencia (luxA, luxB, luxAB, luc, ruc, nluc), enzimas que median reacciones colorimétricas (lacZ, HRP), proteínas fluorescentes (GFP, eGFP, YFP, RFP, CFP, BFP, mCherry, proteínas fluorescentes en el infrarrojo cercano), péptidos de afinidad (His-tag, 3X-FLAG) y marcadores seleccionables (ampC, tet(M), CAT, erm). En un modo de realización, el gen indicador altera un gen de terminasa. En determinados modos de realización, el gen de resistencia a antibióticos es un gen de resistencia a kanamicina. En algunos modos de realización, el gen indicador está enlazado de forma funcional a un promotor constitutivo. En un modo de realización adicional, el promotor constitutivo es Pblast.

En un modo de realización, la alteración comprende una inserción en o remplazo de la primera secuencia del sitio de inicio del empaquetamiento con un gen que codifica un marcador seleccionable. En determinados modos de realización, el gen que codifica el marcador seleccionable está enlazado de forma funcional a un promotor constitutivo. En un modo de realización, la alteración comprende una inserción en o remplazo de la primera secuencia del sitio de inicio del empaquetamiento con un gen que codifica un marcador detectable. En un modo de realización, el gen que codifica el marcador detectable se selecciona del grupo que consiste en: luxA, luxB y luxAB. En algunos modos de realización, el gen que codifica el marcador detectable está enlazado de forma funcional a un promotor constitutivo, por ejemplo, Pblast. En determinados modos de realización, el primer gen comprende un locus del gen pacA, y en el que la alteración comprende un gen luxAB y un gen kan insertado en el locus del gen pacA. En algunos modos de realización, el genoma de bacteriófago comprende SEQ ID NO: 12.

En algunos modos de realización, la molécula de ácido nucleico indicadora comprende un origen de replicación. En un modo de realización, el replicón de la molécula de ácido nucleico indicadora comprende un concatámero susceptible de empaquetarse en la partícula de transducción no replicativa. En determinados modos de realización, la primera secuencia del sitio de inicio del empaquetamiento no alterada comprende un punto de unión concatamérico. En algunos modos de realización, el replicón es un replicón lítico del bacteriófago P1 de *Enterobacteriaceae*.

En un modo de realización, el replicón comprende un promotor P53 controlado por represor C1, una molécula de antisentido del promotor P53, un gen repL y una delección sin cambio de pauta de lectura de un gen kilA. En otro modo de realización, el replicón comprende la secuencia de SEQ ID NO: 2. En un modo de realización, el replicón es un replicón pBHR1 o un derivado del replicón pBHR1. En otro modo de realización, el replicón comprende la secuencia de SEQ ID NO: 3. En un modo de realización, la molécula de ácido nucleico indicadora comprende la secuencia de SEQ ID NO: 4. En un modo de realización, el replicón de la molécula de ácido nucleico indicadora se deriva de un origen de replicación del plásmido pT181 de *S. aureus*. En un modo de realización, el replicón de la molécula de ácido nucleico indicadora comprende la secuencia de SEQ ID NO: 5. En un modo de realización, la molécula de ácido nucleico indicadora comprende la secuencia que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 6. En un modo de realización, el replicón de la molécula de ácido nucleico indicadora se deriva de un origen de replicación del plásmido repB de *Enterococcus*. En un modo de realización, el replicón de la molécula de ácido nucleico indicadora comprende la secuencia de SEQ ID NO: 7. En un modo de realización, el replicón de la molécula de ácido nucleico indicadora se deriva de un origen de replicación del plásmido pDL278 de *Enterococcus*. En un modo de realización, el replicón de la molécula de ácido nucleico comprende la secuencia de SEQ ID NO: 8. En un modo de realización, la primera secuencia del sitio de inicio del empaquetamiento no alterada comprende un sitio pac. En un modo de realización, la primera secuencia del sitio de inicio del empaquetamiento no alterada comprende un sitio cos.

En un modo de realización, el genoma de bacteriófago comprende un bacteriófago P1 de *Enterobacteriaceae*. En un modo de realización, el genoma de bacteriófago comprende un bacteriófago $\phi 80\alpha$ o un bacteriófago $\phi 11$ de *S. aureus*. En un modo de realización, el genoma de bacteriófago comprende un bacteriófago $\phi EF11$ de *E. faecalis*.

En un modo de realización, la célula bacteriana comprende una célula de *E. coli*. En un modo de realización, la célula bacteriana comprende una célula de *S. aureus*. En un modo de realización, la célula bacteriana comprende una célula de *E. faecalis*. En un modo de realización, la célula bacteriana comprende una célula gramnegativa. En un modo de realización, la célula bacteriana comprende una célula grampositiva.

En un modo de realización, el gen indicador codifica un marcador detectable o un marcador seleccionable. En algunos modos de realización, el gen indicador se selecciona del grupo que consiste en: enzimas que median reacciones de luminiscencia (luxA, luxB, luxAB, luc, ruc, nluc), enzimas que median reacciones colorimétricas (lacZ,

HRP), proteínas fluorescentes (GFP, eGFP, YFP, RFP, CFP, BFP, mCherry, proteínas fluorescentes en el infrarrojo cercano), péptidos de afinidad (His-tag, 3X-FLAG) y marcadores seleccionables (amp^r, tet(M), CAT, erm).

En un modo de realización, la molécula de ácido nucleico indicadora comprende un aptámero. En un modo de realización, la molécula de ácido nucleico indicadora comprende una secuencia de transcrito de ácido nucleico que es complementaria a una segunda secuencia en la molécula de ácido nucleico indicadora.

En un modo de realización, la secuencia de transcrito de ácido nucleico es complementaria a un transcrito celular. En otro modo de realización, la secuencia de transcrito de ácido nucleico comprende una secuencia de represión en *cis*. En un modo de realización, la molécula de ácido nucleico indicadora está enlazada de forma funcional a un promotor. En otro modo de realización, el promotor se selecciona para que contribuya a la reactividad de una molécula indicadora expresada a partir de la molécula de ácido nucleico indicadora en la célula bacteriana. En algunos modos de realización, el replicón de la molécula de ácido nucleico indicadora comprende una secuencia de transcrito de ácido nucleico que es complementaria a una segunda secuencia en la réplica de la molécula de ácido nucleico indicadora.

También se proporciona en el presente documento un procedimiento para empaquetar una molécula de ácido nucleico indicadora en una partícula de transducción no replicativa, que comprende (1) proporcionar condiciones al sistema de empaquetamiento de células bacterianas como se divulga en el presente documento que induzcan una fase lítica del genoma de bacteriófago para producir partículas de transducción no replicativas empaquetadas con la molécula de ácido nucleico indicadora; y (2) recoger la partícula de transducción no replicativa que comprende la molécula de ácido nucleico indicadora. En algunos modos de realización, la partícula de transducción no replicativa no contiene un genoma de bacteriófago replicado. En algunos modos de realización, la partícula de transducción no replicativa comprende una parte del genoma de bacteriófago debido a recombinación con la molécula de ácido nucleico indicadora, y en la que la parte del genoma de bacteriófago comprende el gen indicador.

También se proporciona en el presente documento una composición que comprende la partícula de transducción no replicativa que comprende un replicón de la molécula de ácido nucleico indicadora producida por el procedimiento divulgado en el presente documento.

También se divulga en el presente documento un sistema de empaquetamiento de células bacterianas para empaquetar una molécula de ácido nucleico en una partícula de transducción no replicativa, comprendiendo la célula bacteriana (1) un genoma de bacteriófago que comprende una primera secuencia del sitio de inicio del empaquetamiento, en el que la primera secuencia del sitio de inicio del empaquetamiento es alterada por un gen que codifica un indicador, y (2) una molécula de ácido nucleico indicadora que comprende una segunda secuencia del sitio de inicio del empaquetamiento que facilita el empaquetamiento de un replicón de la molécula de ácido nucleico indicadora en la partícula de transducción no replicativa, en la que la molécula de ácido nucleico indicadora forma un replicón configurado para empaquetarse en la partícula de transducción no replicativa.

También se divulga en el presente documento un sistema de empaquetamiento de células bacterianas para empaquetar una molécula de ácido nucleico indicadora en una partícula de transducción no replicativa (NRTP) para su introducción en una célula, comprendiendo el sistema de empaquetamiento una célula huésped, que comprende (1) un genoma de bacteriófago que comprende un primer par de genes de terminasa, en el que al menos uno del primer par de genes de terminasa se altera, haciendo que el gen de terminasa alterado no sea funcional, y (2) una molécula de ácido nucleico indicadora que comprende un gen indicador y un segundo par de genes de terminasa que complementa el primer par de genes de terminasa, en la que cada uno del segundo par de genes de terminasa es funcional, y en la que el segundo par de genes de terminasa facilita el empaquetamiento de un replicón de la molécula de ácido nucleico indicadora en la NRTP.

También se divulga en el presente documento un sistema de empaquetamiento de células bacterianas para empaquetar una molécula de ácido nucleico indicadora en una partícula de transducción no replicativa (NRTP) para su introducción en una célula, comprendiendo el sistema de empaquetamiento una célula huésped, que comprende (1) un genoma de bacteriófago que comprende un primer par de genes de terminasa, en el que solo uno del primer par de genes de terminasa se altera, haciendo que el gen de terminasa alterado no sea funcional, y (2) una molécula de ácido nucleico indicadora que comprende un gen indicador y un segundo gen de terminasa que complementa el primer gen de terminasa, en la que el segundo gen de terminasa es funcional, y en la que el segundo gen de terminasa facilita el empaquetamiento de un replicón de la molécula de ácido nucleico indicadora en la NRTP.

También se divulga que, en algunos sistemas de empaquetamiento de partículas de transducción no replicativas, se puede empaquetar ADN vírico recombinado con ADN plasmídico. En dichos sistemas, un lisado producido por el sistema de empaquetamiento puede contener dos especies de partículas de transducción, (1) partículas de transducción que portan ADN plasmídico y (2) partículas de transducción que portan ADN vírico. En dichos sistemas, la última especie de partículas de transducción no contribuye a la producción de señales cuando se usa el lisado como un sistema indicador para la detección de células diana. Por tanto, en el presente documento se divulga un sistema indicador mejorado basado en partículas de transducción no replicativas, en el que se ha incorporado un gen indicador al genoma vírico de modo que ambas especies de partículas de transducción puedan producir

señales.

BREVE DESCRIPCIÓN DE VARIAS VISTAS DE LOS DIBUJOS

- 5 Estos y otros rasgos característicos, aspectos y ventajas de la presente invención se entenderán mejor con respecto a la siguiente descripción y los dibujos adjuntos, donde:

10 La figura 1 ilustra un ejemplo de alteración del gen *pacA* en el bacteriófago P1 mediante la inserción de un gen de resistencia a kanamicina dentro del gen *pacA* por medio de intercambio alélico, de acuerdo con un modo de realización.

La figura 2 ilustra un esquema de un plásmido indicador complementario que porta genes *pacA* y *pacB* bajo el control del promotor del gen *pacA* natural, de acuerdo con un modo de realización.

15 La figura 3 ilustra un ejemplo del diseño y la función de un sistema de empaquetamiento que comprende una célula de *E. coli* lisogenizada con el bacteriófago P1 que tiene un gen *pacA* alterado, portando la célula también un plásmido que contiene *pacA* y *pacB*, de acuerdo con un modo de realización.

20 La figura 4 ilustra un ejemplo del diseño y la función de un sistema de empaquetamiento que comprende una célula de *E. coli* lisogenizada con el bacteriófago P1 que tiene un gen *pacA* alterado, donde la alteración se logra por medio de la inserción de un gen de resistencia a kanamicina y los genes de luciferasa bacteriana *luxAB*, portando la célula también un plásmido que contiene *pacA* y *pacB*, de acuerdo con un modo de realización.

25 La figura 5 representa un sistema para el uso de NRTP para la detección de inductores que se dirigen a promotores de genes dentro de células viables, de acuerdo con un modo de realización de la invención.

La figura 6 representa un sistema indicador que incluye una molécula de ácido nucleico indicadora (por ejemplo, plásmido) que se construye para detectar VanR, el inductor del promotor del gen de resistencia a vancomicina (*vanA*) en *Enterococcus faecium* (o *E. faecalis*), de acuerdo con un modo de realización de la invención. El plásmido indicador porta un gen indicador que está enlazado de forma funcional al promotor del gen *vanA*.

35 La figura 7 representa un sistema indicador que incluye una molécula de ácido nucleico indicadora construida para detectar TcdD, el inductor de los promotores de los genes de las toxinas A y B (*tcdA* y *tcdB*, respectivamente) de *C. difficile*, de acuerdo con un modo de realización de la invención. La molécula de ácido nucleico indicadora incluye un gen indicador que está enlazado de forma funcional al promotor del gen *tcdA*.

40 La figura 8 representa un sistema indicador que incluye una molécula de ácido nucleico indicadora construida para detectar SarS, el inductor del promotor del gen de la proteína A (*spa*) en *S. aureus*, de acuerdo con un modo de realización de la invención. La molécula de ácido nucleico indicadora incluye los genes de luciferasa bacteriana *luxA* y *luxB* enlazados de forma funcional al promotor del gen *spa* (*P_{spa}*).

La figura 9 muestra un diagrama de emparejamiento de bases entre el transcrito diana y la secuencia de represión en *cis* del transcrito indicador.

45 La figura 10 muestra una tabla de datos obtenidos al medir la producción de luz (ULR) de colonias de células transducidas. Las células que eran resistentes a espectinomicina (*SpecR*) se transdujeron con ADN plasmídico, mientras que las células que eran resistentes a kanamicina (*KanR*) se transdujeron con ADN de P1. Los datos obtenidos tras emplear un lisado producido a partir de una célula que contiene P1 sin *luxAB* integrado en su genoma (1505) dieron como resultado transductantes *KanR* que en general no produjeron luz, mientras que los datos obtenidos tras emplear un lisado producido a partir de una célula que contiene P1 con *luxAB* integrado en su genoma (1525) dieron como resultado transductantes *KanR* que produjeron luz.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

55 I. Definiciones

Los términos usados en las reivindicaciones y la memoria descriptiva se definen como se establece a continuación, a menos que se especifique de otro modo.

60 Como se usa en el presente documento, "molécula de ácido nucleico indicadora" se refiere a una secuencia de nucleótidos que comprende una molécula de ADN o ARN. La molécula de ácido nucleico indicadora puede ser una molécula natural o una molécula artificial o sintética. En algunos modos de realización, la molécula de ácido nucleico indicadora es exógena a una célula huésped y se puede introducir en una célula huésped como parte de una molécula de ácido nucleico exógena, tal como un plásmido o vector. En determinados modos de realización, la molécula de ácido nucleico indicadora puede ser complementaria de un gen diana en una célula. En otros modos de realización, la molécula de ácido nucleico indicadora comprende un gen indicador que codifica una molécula

indicadora (por ejemplo, enzima indicadora, proteína). En algunos modos de realización, la molécula de ácido nucleico indicadora se denomina "construcción indicadora" o "construcción indicadora de ácido nucleico".

Una "molécula indicadora" o "indicador" se refiere a una molécula (por ejemplo, ácido nucleico o proteína) que confiere a un organismo un fenotipo detectable o seleccionable. El fenotipo detectable puede ser colorimétrico, fluorescente o luminiscente, por ejemplo. Las moléculas indicadoras se pueden expresar a partir de genes indicadores que codifican enzimas que median reacciones de luminiscencia (luxA, luxB, luxAB, luc, ruc, nluc), genes que codifican enzimas que median reacciones colorimétricas (lacZ, HRP), genes que codifican proteínas fluorescentes (GFP, eGFP, YFP, RFP, CFP, BFP, mCherry, proteínas fluorescentes en el infrarrojo cercano), moléculas de ácido nucleico que codifican péptidos de afinidad (His-tag, 3X-FLAG) y genes que codifican marcadores seleccionables (ampC, tet(M), CAT, erm). La molécula indicadora se puede usar como un marcador para la captación exitosa de una molécula de ácido nucleico o secuencia exógena (plásmido) en una célula. La molécula indicadora también se puede usar para indicar la presencia de un gen diana, una molécula de ácido nucleico diana, una molécula intracelular diana o una célula, como se describe en el presente documento. De forma alternativa, la molécula indicadora puede ser un ácido nucleico, tal como un aptámero o una ribozima.

En algunos aspectos de la invención, la molécula de ácido nucleico indicadora está enlazada de forma funcional a un promotor. En otros aspectos de la invención, el promotor se puede elegir o diseñar para que contribuya a la reactividad y reactividad cruzada del sistema indicador en base a la actividad del promotor en células específicas (por ejemplo, especies específicas) y no en otras. En determinados aspectos, la molécula de ácido nucleico indicadora comprende un origen de replicación. En otros aspectos, la elección del origen de replicación puede contribuir de forma similar a la reactividad y reactividad cruzada del sistema indicador, cuando la replicación de la molécula de ácido nucleico indicadora dentro de la célula diana contribuye a o es necesaria para la producción de señales indicadoras en base a la actividad del origen de replicación en células específicas (por ejemplo, especies específicas) y no en otras. En algunos modos de realización, la molécula de ácido nucleico indicadora forma un replicón que se puede empaquetar como ADN concatamérico en un virus de la descendencia durante la replicación del virus.

Como se usa en el presente documento, un "transcrito diana" se refiere a una parte de una secuencia de nucleótidos de una secuencia de ADN o una molécula ARNm que se forma naturalmente por una célula diana, incluyendo la formada durante la transcripción de un gen diana y un ARNm que es un producto del procesamiento de ARN de un producto de transcripción principal. El transcrito diana también se puede denominar transcrito celular o transcrito natural.

Como se usa en el presente documento, el término "transcrito" se refiere a una longitud de secuencia de nucleótidos (ADN o ARN) transcrita a partir de una secuencia molde o gen de ADN o ARN. El transcrito puede ser una secuencia de ADNc transcrita a partir de un molde de ARN o una secuencia de ARNm transcrita a partir de un molde de ADN. El transcrito puede ser codificante o no codificante de proteínas. El transcrito también se puede transcribir a partir de una construcción de ácido nucleico genomanipulado.

Un transcrito derivado de una molécula de ácido nucleico indicadora se puede denominar "transcrito indicador". El transcrito indicador puede incluir una secuencia indicadora y una secuencia de represión en *cis*. El transcrito indicador puede tener secuencias que forman regiones de complementariedad, de modo que el transcrito incluye dos regiones que forman una estructura bicatenaria (por ejemplo, una región bicatenaria intermolecular). Una región se puede denominar "secuencia de represión en *cis*" y tiene complementariedad con una parte o la totalidad de un transcrito diana y/o una secuencia indicadora. Una segunda región del transcrito se denomina "secuencia indicadora" y puede tener complementariedad con la secuencia de represión en *cis*. La complementariedad puede ser complementariedad completa o complementariedad sustancial. La presencia y/o unión de la secuencia de represión en *cis* con la secuencia indicadora puede formar una conformación en el transcrito indicador, que puede bloquear la expresión adicional de la molécula indicadora. El transcrito indicador puede formar estructuras secundarias, tales como una estructura en horquilla, de modo que las regiones dentro del transcrito indicador que sean complementarias entre sí puedan hibridar entre sí.

"Introducir en una célula", cuando se refiere a una molécula de ácido nucleico o una secuencia exógena (por ejemplo, un plásmido, un vector, una construcción), significa facilitar la captación o absorción en la célula, como se entiende por los expertos en la técnica. La absorción o captación de construcciones o transcritos de ácido nucleico se puede producir a través de procesos celulares activos o difusivos sin ayuda, o mediante agentes o dispositivos auxiliares que incluyen por medio del uso de bacteriófagos, virus y partículas de transducción. El significado de este término no se limita a las células *in vitro*; una molécula de ácido nucleico también se puede "introducir en una célula", en la que la célula forma parte de un organismo vivo. En dicho caso, la introducción en la célula incluirá la liberación en el organismo. Por ejemplo, para la liberación *in vivo*, las moléculas, construcciones o vectores de ácido nucleico de la invención se pueden inyectar en un sitio de tejido o administrar sistémicamente. La introducción *in vitro* en una célula incluye procedimientos conocidos en la técnica, tales como electroporación y lipofección. Otros enfoques se describen en el presente documento o se conocen en la técnica.

Una "partícula de transducción" se refiere a un virus que puede liberar una molécula de ácido nucleico no vírico en

una célula. El virus puede ser un bacteriófago, un adenovirus, etc.

Una "partícula de transducción no replicativa" se refiere a un virus que puede liberar una molécula de ácido nucleico no vírico en una célula, pero no puede empaquetar su propio genoma vírico replicado en la partícula de transducción. El virus puede ser un bacteriófago, un adenovirus, etc.

Un "plásmido" es una pequeña molécula de ADN que está físicamente separada de, y se puede replicar independientemente de, el ADN cromosómico dentro de una célula. Los plásmidos, que se encuentran más comúnmente como pequeñas moléculas circulares de ADN bicatenario en bacterias, a veces están presentes en arqueas y organismos eucariotas. Los plásmidos se consideran replicones, que se pueden replicar de forma autónoma dentro de un huésped adecuado.

Un "vector" es una molécula de ácido nucleico usada como vehículo para transportar artificialmente material genético exógeno a otra célula, donde se puede replicar y/o expresar.

Un "virus" es un pequeño agente infeccioso que se replica solo en el interior de las células vivas de otros organismos. Las partículas víricas (conocidas como viriones) incluyen dos o tres partes: i) el material genético hecho de moléculas de ADN o ARN que transportan información genética; ii) una cubierta proteínica que protege estos genes; y, en algunos casos, iii) una envoltura de lípidos que rodea la cubierta proteínica.

Como se usa en el presente documento, el término "complemento" se refiere a una secuencia no alterada que está en presencia de una secuencia idéntica que se ha alterado, o a la relación de la secuencia no alterada con la secuencia alterada. En un modo de realización, el complemento comprende un gen codificado en un polinucleótido en una célula que es funcional y con capacidad de expresión, y expresa una proteína con la misma función que un gen alterado en un bacteriófago antes de la alteración. En algunos modos de realización, el gen del complemento tiene más de un 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia con el gen de bacteriófago alterado antes de la alteración, es decir, el gen de bacteriófago natural. En algunos modos de realización, el gen del complemento es idéntico al gen de bacteriófago alterado antes de la alteración, es decir, el gen de bacteriófago natural. En algunos modos de realización, el gen del complemento comprende una secuencia polinucleotídica que se ha eliminado del bacteriófago. En algunos modos de realización, el gen del complemento se refiere a un gen que codifica la maquinaria de empaquetamiento de un bacteriófago en un plásmido, donde el mismo gen se ha alterado en un bacteriófago. Por tanto, se requiere que el plásmido esté en presencia de un bacteriófago con un gen de la maquinaria de empaquetamiento mutado para proporcionar la maquinaria de empaquetamiento necesaria para empaquetar un polinucleótido en una partícula de transducción.

Como se usa en el presente documento, el término "actividad enzimática relacionada con el empaquetamiento" se refiere a uno o más polipéptidos cruciales para la interacción con una secuencia del sitio de inicio del empaquetamiento para empaquetar un polinucleótido en una partícula de transducción. En algunos modos de realización se requiere un par de genes de terminasa para dicha interacción, en los que cada terminasa codifica una actividad enzimática relacionada con el empaquetamiento. En algunos modos de realización, la actividad enzimática está codificada por un gen *terS* y/o *terL* de un bacteriófago $\phi 11$ o $\phi 80\alpha$ de *S. aureus*, un gen *terA* y *terB* de un bacteriófago ϕ Ef11 de *E. faecalis* o un gen *pacA* y *pacB* del bacteriófago P1 de *Enterobacteriaceae*. En estos modos de realización, cada uno del par de genes de terminasa expresa una actividad enzimática relacionada con el empaquetamiento, y se requiere una versión funcional de ambos para empaquetar un polinucleótido con el sitio de inicio del empaquetamiento. En algunos modos de realización, la alteración de uno de los genes de una pluralidad de genes asociados con una actividad enzimática relacionada con el empaquetamiento elimina la actividad enzimática relacionada con el empaquetamiento. En algunos modos de realización, los dos de un par de genes de terminasa están alterados en el bacteriófago, lo que altera, por tanto, el conjunto completo de genes que codifican la actividad enzimática relacionada con el empaquetamiento en el bacteriófago.

"MRSA" se refiere a *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina.

"MSSA" se refiere a *Staphylococcus aureus* sensible a meticilina.

El término "mejorar" se refiere a cualquier resultado terapéuticamente beneficioso en el tratamiento de un estado de enfermedad, por ejemplo, un estado de enfermedad, que incluye profilaxis, disminución de la gravedad o progresión, remisión o cura de la misma.

El término "*in situ*" se refiere a procesos que se producen en una célula viva que crece separada de un organismo vivo, por ejemplo, que crece en cultivo hístico.

El término "*in vivo*" se refiere a procesos que se producen en un organismo vivo.

El término "mamífero", como se usa en el presente documento, incluye tanto humanos como no humanos e incluye, pero no se limita a, seres humanos, primates no humanos, caninos, felinos, murinos, bovinos, equinos y porcinos.

En general, "G", "C", "A" y "U" representan cada uno un nucleótido que contiene guanina, citosina, adenina y uracilo como base, respectivamente. "T" y "dT" se usan de manera intercambiable en el presente documento y se refieren a un desoxirribonucleótido en el que la nucleobase es timina, por ejemplo, desoxirribotimina. Sin embargo, se entenderá que el término "ribonucleótido" o "nucleótido" o "desoxirribonucleótido" también se puede referir a un nucleótido modificado, como se detalla adicionalmente a continuación, o a un resto de remplazo sustituto. El experto en la técnica sabe muy bien que la guanina, la citosina, la adenina y el uracilo se pueden remplazar por otros restos sin alterar sustancialmente las propiedades de emparejamiento de bases de un oligonucleótido que comprende un nucleótido que lleva dicho resto de remplazo. Por ejemplo, sin limitación, un nucleótido que comprende inosina como su base se puede emparejar con nucleótidos que contienen adenina, citosina o uracilo. Por tanto, los nucleótidos que contienen uracilo, guanina o adenina se pueden remplazar en las secuencias de nucleótidos de la invención por un nucleótido que contiene, por ejemplo, inosina. Las secuencias que comprenden dichos restos de remplazo son modos de realización de la invención.

Como se usa en el presente documento, el término "complementario", cuando se usa para describir una primera secuencia de nucleótidos en relación con una segunda secuencia de nucleótidos, se refiere a la capacidad de un oligonucleótido o polinucleótido que comprende la primera secuencia de nucleótidos de hibridar y formar una estructura bicatenaria en determinadas condiciones con un oligonucleótido o polinucleótido que comprende la segunda secuencia de nucleótidos, como entenderá el experto en la técnica. Las secuencias complementarias también se describen como unidas entre sí y caracterizadas por afinidades de unión.

Por ejemplo, una primera secuencia de nucleótidos se puede describir como complementaria de una segunda secuencia de nucleótidos cuando las dos secuencias hibridan (por ejemplo, se reasocian) en condiciones de hibridación rigurosas. Las condiciones de hibridación incluyen temperatura, fuerza iónica, pH y concentración de disolvente orgánico para las etapas de reasociación y/o lavado. El término "condiciones de hibridación rigurosas" se refiere a condiciones en las que una primera secuencia de nucleótidos hibridará preferentemente con su secuencia diana, por ejemplo, una segunda secuencia de nucleótidos y, en menor medida, o en absoluto, a otras secuencias. Las condiciones de hibridación rigurosas dependen de la secuencia y son diferentes con diferentes parámetros ambientales. En general, las condiciones de hibridación rigurosas se seleccionan para que sean aproximadamente 5 °C más bajas que el punto de fusión térmico (T_f) para la secuencia de nucleótidos a una fuerza iónica y pH definidos. La T_f es la temperatura (a una fuerza iónica y pH definidos) a la que un 50 % de las primeras secuencias de nucleótidos hibridan con una secuencia diana perfectamente emparejada. Una guía extensa sobre la hibridación de ácidos nucleicos se encuentra, por ejemplo, en Tijssen (1993) *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology-Hybridization with Nucleic Acid Probes*, parte I, cap. 2, "Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid probe assays", Elsevier, N.Y. ("Tijssen"). Se pueden aplicar otras condiciones, tales como condiciones fisiológicamente pertinentes que se pueden encontrar dentro de un organismo. El experto en la técnica podrá determinar el conjunto de condiciones más apropiadas para una prueba de complementariedad de dos secuencias de acuerdo con la aplicación final de los nucleótidos hibridados.

Esto incluye el emparejamiento de bases del oligonucleótido o polinucleótido que comprende la primera secuencia de nucleótidos con el oligonucleótido o polinucleótido que comprende la segunda secuencia de nucleótidos en toda la longitud de la primera y segunda secuencia de nucleótidos. Dichas secuencias se pueden denominar "completamente complementarias" entre sí en el presente documento. Sin embargo, cuando una primera secuencia se denomina "sustancialmente complementaria" con respecto a una segunda secuencia en el presente documento, las dos secuencias pueden ser completamente complementarias, o pueden formar uno o más, pero en general no más de 4, 3 o 2 pares de bases con emparejamiento erróneo tras la hibridación, mientras que conservan la capacidad de hibridar en las condiciones más pertinentes para su aplicación final. Sin embargo, cuando dos oligonucleótidos se diseñan para formar, tras la hibridación, uno o más salientes monocatenarios, dichos salientes no se considerarán emparejamientos erróneos con respecto a la determinación de complementariedad. Por ejemplo, un ARNbc que comprende un oligonucleótido de 21 nucleótidos de longitud y otro oligonucleótido de 23 nucleótidos de longitud, en el que el oligonucleótido más largo comprende una secuencia de 21 nucleótidos que es completamente complementaria a la del oligonucleótido más corto, aún se puede denominar "completamente complementario" para los propósitos descritos en el presente documento.

Las secuencias "complementarias", como se usan en el presente documento, también pueden incluir, o estar formadas en su totalidad por, pares de bases distintos de Watson y Crick y/o pares de bases formados por nucleótidos no naturales y modificados, con la condición de que los requisitos anteriores con respecto a su capacidad de hibridación se cumplan. Dichos pares de bases distintos de Watson y Crick incluyen, pero sin limitarse a, el emparejamiento de bases oscilantes o de Hoogsteen G:U.

Los términos "complementario", "completamente complementario" y "sustancialmente complementario" en el presente documento se pueden usar con respecto al emparejamiento de bases entre dos hebras de un ARNbc, o entre la hebra de antisentido de un ARNbc y una secuencia diana, entre hebras complementarias de una secuencia de ARN monocatenario o una secuencia de ADN monocatenario, como se entenderá a partir del contexto de su uso.

Como se usa en el presente documento, una "estructura bicatenaria" comprende dos secuencias de ácido nucleico antiparalelas y sustancialmente complementarias. Las secuencias complementarias en una construcción de ácido

nucleico, entre dos transcritos, entre dos regiones dentro de un transcrito o entre un transcrito y una secuencia diana pueden formar una "estructura bicatenaria". En general, la mayoría de los nucleótidos de cada hebra son ribonucleótidos, pero como se describe en detalle en el presente documento, cada una o ambas de las hebras también pueden incluir al menos un nucleótido que no es ribonucleótido, por ejemplo, un desoxirribonucleótido y/o un nucleótido modificado. Las dos hebras que forman la estructura bicatenaria pueden ser partes diferentes de una molécula de ARN más grande, o pueden ser moléculas de ARN separadas. Cuando las dos hebras forman parte de una molécula más grande y, por lo tanto, están conectadas por una cadena ininterrumpida de nucleótidos entre el extremo 3' de una hebra y el extremo 5' de la otra hebra respectiva que forma la estructura bicatenaria, la cadena de ARN de conexión se denomina "bucle de horquilla". Cuando las dos hebras están conectadas covalentemente por medios distintos de una cadena ininterrumpida de nucleótidos entre el extremo 3' de una hebra y el extremo 5' de la otra hebra respectiva que forma la estructura bicatenaria, la estructura de conexión se denomina "conector". Las hebras de ARN pueden tener el mismo número o un número diferente de nucleótidos. El número máximo de pares de bases es el número de nucleótidos en la hebra más corta de la estructura bicatenaria menos cualquier saliente que esté presente en la estructura bicatenaria. En general, la estructura bicatenaria tiene entre 15 y 30 o entre 25 y 30, o entre 18 y 25, o entre 19 y 24, o entre 19 y 21, o 19, 20 o 21 pares de bases de longitud. En un modo de realización, la estructura bicatenaria tiene 19 pares de bases de longitud. En otro modo de realización, la estructura bicatenaria tiene 21 pares de bases de longitud. Cuando se usan dos ARN diferentes en combinación, las longitudes de la estructura bicatenaria pueden ser idénticas o pueden diferir.

Como se usa en el presente documento, el término "región de complementariedad" se refiere a la región en la hebra de antisentido que es sustancialmente complementaria a una secuencia, por ejemplo, una secuencia diana, como se define en el presente documento. Cuando la región de complementariedad no es completamente complementaria a la secuencia diana, los emparejamientos erróneos se toleran más en las regiones terminales y, si están presentes, en general están en una región o regiones terminales, por ejemplo, dentro de los 6, 5, 4, 3 o 2 nucleótidos del extremo 5' y/o 3'.

El término "porcentaje de identidad", en el contexto de dos o más secuencias de ácido nucleico o polipeptídicas, se refiere a dos o más secuencias o subsecuencias que tienen un porcentaje especificado de nucleótidos o residuos aminoacídicos que son iguales, cuando se comparan y alinean para una correspondencia máxima, como se mide usando uno de los algoritmos de comparación de secuencias descritos a continuación (por ejemplo, BLASTP y BLASTN u otros algoritmos disponibles para los expertos) o por inspección visual. Dependiendo de la aplicación, el porcentaje de "identidad" puede existir en una región de la secuencia que se está comparando, por ejemplo, en un dominio funcional o, de forma alternativa, existir en toda la longitud de las dos secuencias que se van a comparar.

Para la comparación de secuencias, típicamente una secuencia actúa como una secuencia de referencia con la que se comparan las secuencias de prueba. Cuando se usa un algoritmo de comparación de secuencias, las secuencias de prueba y de referencia se introducen en un ordenador, se designan las coordenadas de subsecuencia, si es necesario, y se designan los parámetros del programa de algoritmo de secuencias. A continuación, el algoritmo de comparación de secuencias calcula el porcentaje de identidad de secuencia para la(s) secuencia(s) de prueba en relación con la secuencia de referencia, en base a los parámetros del programa designados.

Se puede llevar a cabo la alineación óptima de secuencias para su comparación, por ejemplo, mediante el algoritmo de homología local de Smith y Waterman, Adv. Appl. Math. 2:482 (1981), mediante el algoritmo de alineación de homología de Needleman y Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443 (1970), mediante el procedimiento de búsqueda de similitud de Pearson y Lipman, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 85:2444 (1988), mediante implementaciones informatizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA en el Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, Wis.) o mediante inspección visual (véase en general Ausubel *et al.*, más abajo).

Un ejemplo de un algoritmo que es adecuado para determinar el porcentaje de identidad de secuencia y la similitud de secuencia es el algoritmo BLAST, que se describe en Altschul *et al.*, J. Mol. Biol. 215:403-410 (1990). El programa informático para realizar los análisis por BLAST está disponible públicamente a través del National Center for Biotechnology Information (www.ncbi.nlm.nih.gov/).

El término "cantidad suficiente" significa una cantidad suficiente para producir un efecto deseado, por ejemplo, una cantidad suficiente para producir una señal detectable de una célula.

El término "cantidad terapéuticamente eficaz" es una cantidad que es eficaz para mejorar un síntoma de una enfermedad. Una cantidad terapéuticamente eficaz puede ser una "cantidad profilácticamente efectiva", ya que la profilaxis se puede considerar un tratamiento.

Se debe tener en cuenta que, como se usan en la memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un(o)", "una" y "el/la" incluyen referentes plurales a menos que el contexto lo indique claramente de otro modo.

II. Ciclo lisógeno y lítico de virus

Los virus experimentan ciclos lisógenos y líticos en una célula huésped. Si se adopta el ciclo lisógeno, el cromosoma del fago se puede integrar en el cromosoma bacteriano, o puede establecerse por sí mismo como un plásmido estable en el huésped, donde puede permanecer inactivo durante largos periodos de tiempo. Si se induce el lisógeno, el genoma del fago se escinde del cromosoma bacteriano e inicia el ciclo lítico, que culmina en la lisis de la célula y la liberación de partículas de fago. El ciclo lítico da lugar a la producción de nuevas partículas de fago que se liberan por lisis del huésped.

Determinados fagos moderados pueden presentar actividad lítica, y la propensión a esto puede variar con diversas bacterias huésped. Para ilustrar este fenómeno, se examinó la actividad lítica de dos fagos de *S. aureus* moderados en diez aislados clínicos de MRSA por medio de un ensayo en placa (tabla 1). El fago $\phi 11$ presentó actividad lítica en 10 de los 10 aislados clínicos de MRSA y $\phi 80\alpha$ presentó actividad lítica en seis de los 10 aislados clínicos de MRSA. Por tanto, se puede esperar que los ensayos indicadores que dependen del ciclo lisógeno natural de los fagos presenten actividad lítica esporádicamente.

Tabla 1: Actividad lítica (indicada por la letra "x") de los fagos moderados $\phi 11$ y $\phi 80\alpha$ de *S. aureus* en diez aislados clínicos de MRSA

Aislado de MRSA	$\phi 11$	$\phi 80\alpha$
1	x	
2	x	
3	x	x
4	x	x
5	x	x
6	x	
7	x	x
8	x	
9	x	x
10	x	x

Además, los ensayos indicadores basados en virus, tales como los indicadores basados en fagos, pueden experimentar reactividad limitada (es decir, inclusión analítica) debido a los límites en la gama de huéspedes de los fagos provocados por mecanismos de resistencia a los fagos basados en el huésped y derivados del profago. Estos mecanismos de resistencia están dirigidos al ácido nucleico del fago natural que pueden dar como resultado la degradación o la inhibición de otro modo del ADN y las funciones del fago. Dichos mecanismos de resistencia incluyen sistemas de restricción que escinden el ADN del fago y sistemas de CRISPR que inhiben los transcritos derivados del fago.

Tanto la actividad lítica como la resistencia a los fagos pueden inhibir los ensayos basados en fagos indicadores. La actividad lítica puede inhibir la señal al destruir o inhibir de otro modo la capacidad de la célula de generar una señal detectable y, por tanto, afectar a los límites de detección al reducir la cantidad de señal detectable o evitar la generación de una señal detectable. Los mecanismos de resistencia a fagos pueden limitar la gama de huéspedes del fago y limitar la inclusión del indicador basado en fago, afectando de forma similar a los límites de detección al reducir la cantidad de señal detectable o evitar la generación de una señal detectable. Tanto la actividad lítica como la resistencia a fagos provocadas por la incorporación del ADN del fago en un fago indicador pueden dar lugar a resultados falsos negativos en ensayos que incorporan estos indicadores de fagos.

III. Procedimientos para producir partículas de transducción no replicativas (NRTP)

Procedimientos basados en alteración/complementación para producir partículas de transducción no replicativas.

En el presente documento se divulgan sistemas de empaquetamiento de partículas de transducción no replicativas basados en la alteración de un componente del genoma de un virus que la maquinaria de empaquetamiento vírica reconoce como el elemento desde el que se inicia el empaquetamiento genómico durante la producción vírica. En un modo de realización, esta alteración altera un sitio de inicio del empaquetamiento de un bacteriófago, y también altera una función terminasa. Los ejemplos de los elementos alterados incluyen la secuencia del sitio pac de bacteriófagos de tipo pac y la secuencia del sitio cos de bacteriófagos de tipo cos. En un modo de realización, cuando la secuencia del sitio de inicio del empaquetamiento dentro del fago se altera, el fago no puede producir terminasas funcionales. En un ejemplo, el sitio pac se codifica dentro de una secuencia del gen pacA, y las funciones terminasa requieren una PacA y una PacB funcionales. En el modo de realización, el ADN plasmídico se

empaqueta en una cápside de fago complementando dichas terminasas alteradas e incluyendo un sitio de inicio del empaquetamiento reconocible en el ADN plasmídico. El bacteriófago puede ser cualquier bacteriófago, tal como un bacteriófago P1 o ϕ EF11 de *Enterobacteriaceae*, o un bacteriófago ϕ 80 α o un bacteriófago ϕ 11 de *S. aureus*.

Los sitios de inicio del empaquetamiento a menudo se encuentran dentro de regiones codificantes de genes que son esenciales para la producción de virus. En algunos modos de realización, una región del genoma del bacteriófago se altera por una inserción, remplazo, delección o mutación que altera el sitio de inicio del empaquetamiento. Los ejemplos de alteraciones que logran esto incluyen, pero no se limitan a, un acontecimiento de intercambio alélico que reemplaza una secuencia en el genoma del bacteriófago que contiene la secuencia del sitio de inicio del empaquetamiento por otra secuencia, tal como la de un gen de resistencia a antibióticos, o la delección completa de los genes de terminasa pequeños y grandes. En un ejemplo que emplea los genes de terminasa *pacA* y *pacB*, *pacA* se puede alterar de manera que cause efectos polares que también alteren la expresión de *pacB* y/o la función terminasa global mediada por *PacA* y *PacB*. Otros ejemplos pueden incluir genes de terminasa, también pueden incluir genes *terS* y *terL* del bacteriófago ϕ 11 o ϕ 80 α de *S. aureus*, o los genes *terS* y *terL* del bacteriófago ϕ Ef11 de *E. faecalis*. En un modo de realización, un gen de terminasa incluye SEQ ID NO: 10, un gen *pacA* de P1 en el que una parte de la secuencia del gen que contiene el sitio *pac* se ha reemplazado por un gen de resistencia a kanamicina. La figura 1 ilustra un ejemplo de la alteración del gen *pacA* en el bacteriófago P1 mediante la inserción de un gen de resistencia a kanamicina dentro del gen *pacA* por medio de intercambio alélico.

En un ejemplo, el genoma de una célula se lisogeniza con un genoma vírico donde se ha alterado el sitio de inicio del empaquetamiento. En algunos modos de realización, la célula puede ser una célula de *E. coli*, una célula de *S. aureus* o una célula de *E. faecalis*. La célula puede ser gramnegativa o grampositiva. Se introduce un plásmido complementario (o molécula de ácido nucleico indicadora) en la célula, y el ADN plasmídico incluye al menos el gen que se ha alterado en el bacteriófago, así como la secuencia del sitio de inicio del empaquetamiento y, opcionalmente, genes adicionales del bacteriófago y un gen indicador, que puede codificar un marcador detectable y/o seleccionable. El plásmido se puede construir usando procedimientos encontrados en la solicitud internacional n.º WO2014/160418. En algunos modos de realización, la secuencia del sitio de inicio del empaquetamiento incluye un sitio *pac* o un sitio *cos*. En un modo de realización, la secuencia del sitio de inicio del empaquetamiento incluye la secuencia de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 6. Uno o más genes del plásmido se pueden enlazar de forma funcional a un promotor, tal como un promotor inducible (que se puede inducir cuando se inicia el empaquetamiento induciendo el bacteriófago). En algunos modos de realización, el promotor puede ser un promotor natural de un gen de terminasa pequeño o un gen de terminasa grande. En un modo de realización, el promotor natural puede estar controlado por el bacteriófago y, por tanto, actúa eficazmente como un promotor condicional inducido durante el empaquetamiento. En un modo de realización, el promotor comprende la secuencia de SEQ ID NO: 9.

La figura 2 ilustra un esquema de un plásmido que porta los genes *pacA* y *pacB*. La figura 3 ilustra un ejemplo del diseño y la función de un sistema de empaquetamiento compuesto por una célula de *E. coli* lisogenizada con el bacteriófago P1 que tiene un gen *pacA* alterado. La célula también porta un plásmido que contiene los genes *pacA* y *pacB*. En un modo de realización, los genes *pacA* y *pacB* en el plásmido derivan del bacteriófago P1 de *Enterobacteriaceae*. Cuando el virus mutado experimenta un ciclo lítico, las proteínas de empaquetamiento víricas producidas a partir del genoma del bacteriófago o (si está alterado) del plásmido complementario, empaquetan un replicón del ADN plasmídico en la unidad de empaquetamiento debido a su sitio de inicio del empaquetamiento, y se producen partículas de transducción no replicativa que portan el ADN plasmídico replicado.

En un modo de realización, el replicón es un replicón lítico del bacteriófago P1 de *Enterobacteriaceae*. El replicón también puede ser un replicón pBHR1 o un derivado del replicón pBHR1, derivado de un origen de replicación del plásmido pT181 de *S. aureus*, derivado de un origen de replicación del plásmido *repB* de *Enterococcus* o derivado de un origen de replicación del plásmido pDL278 de *Enterococcus*. En otro modo de realización, el replicón incluye un promotor P53 controlado por represor C1, una molécula de antisentido del promotor P53, un gen *repL* y una delección sin cambio de pauta de lectura de un gen *kilA*. Un ejemplo de un replicón tiene la secuencia de SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7 o SEQ ID NO: 8.

En algunos modos de realización, es preferente que la interrupción/complementación se diseñe de modo que no exista homología entre el ADN vírico mutado y el ADN exógeno complementario. Esto se debe a que la falta de homología entre el ADN vírico mutado y el ADN exógeno complementario evita la posibilidad de recombinación homóloga entre las dos moléculas de ADN, que puede dar como resultado la reintroducción de una secuencia de empaquetamiento en el genoma del virus. Para lograr una falta de homología, una estrategia es eliminar todo el gen (o genes) que contiene(n) la secuencia del sitio de inicio del empaquetamiento del genoma del virus y, a continuación, complementar este gen con una molécula de ADN exógeno que preferentemente no contiene más que exactamente la secuencia de ADN que se eliminó del virus. En esta estrategia, la molécula de ADN complementaria se diseña para expresar el gen que se eliminó del virus. Se proporciona otro ejemplo de dicho sistema usando el bacteriófago ϕ 80 α , un fago de tipo *pac*. El genoma del fago se lisogeniza en una célula bacteriana huésped, y el genoma del fago incluye un gen de terminasa pequeño donde se ha eliminado el sitio *pac* de un profago ϕ 80 α de tipo *pac*. Un plásmido que incluye un gen de terminasa pequeño complementario con un sitio *pac* natural se transforma en la célula. Cuando se induce el ciclo lítico del profago lisogenizado, el sistema de empaquetamiento del

bacteriófago empaqueta el ADN plasmídico en componentes estructurales de bacteriófago de la descendencia, en lugar de empaquetar el ADN del bacteriófago natural. El sistema de empaquetamiento produce, por tanto, partículas de transducción no replicativas que portan ADN plasmídico.

5 En otro modo de realización, una región del genoma del bacteriófago se altera mediante una inserción que altera el sitio de inicio del empaquetamiento. En un modo de realización, la alteración comprende un gen indicador incorporado en el genoma del bacteriófago. En un modo de realización, la alteración comprende un marcador de resistencia y un gen indicador incorporado en el genoma del bacteriófago. En un modo de realización, la alteración se logra mediante un acontecimiento de intercambio alélico que reemplaza o altera una secuencia en el genoma del bacteriófago con un gen indicador. En un modo de realización, la alteración se logra mediante un acontecimiento de intercambio alélico que reemplaza o altera una secuencia en el genoma del bacteriófago con un marcador de resistencia y un gen indicador. En algunos modos de realización, el marcador de resistencia y/o el gen indicador están bajo el control de un promotor constitutivo.

15 La figura 4 ilustra un ejemplo del diseño y la función de un sistema de empaquetamiento compuesto por una célula de *E. coli* que comprende el bacteriófago P1 que tiene un gen *pacA* alterado en el que los genes *kan* y *luxAB* se han insertado en la secuencia del sitio *pac*. Como en la figura 3, la célula también porta un plásmido que contiene los genes *pacA* y *pacB*. Por lo tanto, si se produce recombinación entre el bacteriófago y el plásmido, el plásmido replicado insertado en la cápside de P1 para formar la NRTP todavía comprenderá un gen indicador.

20 En un modo de realización, el gen indicador codifica un marcador detectable o un marcador seleccionable. En otro modo de realización, dicho gen indicador se selecciona del grupo que consiste en enzimas que median reacciones de luminiscencia (*luxA*, *luxB*, *luxAB*, *luc*, *ruc*, *nluc*), enzimas que median reacciones colorimétricas (*lacZ*, *HRP*), proteínas fluorescentes (*GFP*, *eGFP*, *YFP*, *RFP*, *CFP*, *BFP*, *mCherry*, proteínas fluorescentes en el infrarrojo cercano), péptidos de afinidad (*His-tag*, *3X-FLAG*) y marcadores seleccionables (*ampC*, *tet(M)*, *CAT*, *erm*). En un modo de realización, el gen indicador es *luxA*. En algunos modos de realización, el marcador de resistencia comprende un gen de resistencia a antibióticos. En algunos modos de realización, el marcador de resistencia es un gen de resistencia a kanamicina (*kan*). En algunos modos de realización, el promotor constitutivo comprende *Pblast*. En algunos modos de realización, la alteración del genoma de bacteriófago se logra mediante un acontecimiento de intercambio alélico que reemplaza o altera una secuencia en el genoma del bacteriófago que contiene la secuencia del sitio de inicio del empaquetamiento.

35 En algunos modos de realización, la alteración del genoma de bacteriófago se logra mediante un acontecimiento de intercambio alélico que reemplaza o altera una secuencia en el genoma del bacteriófago que contiene la secuencia del sitio de inicio del empaquetamiento con un gen de resistencia a kanamicina (*kan*) y los genes de luciferasa bacteriana (*luxAB*) bajo el control de un promotor constitutivo (*Pblast*). En un modo de realización, el intercambio alélico se logra de manera análoga a la representada en la figura 1, en la que se transfieren un indicador o un indicador y un marcador de resistencia.

40 En un modo de realización, un par de genes de terminasa en un genoma bacteriófago, por ejemplo, *pacA* y *pacB*, *terA* y *terB*, o *terS* y *terL*, se alteran de manera que cause efectos polares que también alteren la expresión de uno de los genes de terminasa y/o la función terminasa general mediada por los genes de terminasa. En un modo de realización se proporciona una construcción que comprende *kan* y *luxAB* insertados en los locus del gen *pacA* en SEQ ID NO: 12. En un modo de realización, el bacteriófago alterado se complementa con un plásmido que comprende genes de terminasa, por ejemplo, *pacA* y *pacB*, *terA* y *terB* o *terS* y *terL*, del genoma del bacteriófago. En un modo de realización, el plásmido se introduce en una célula lisogenizada con el bacteriófago que tiene los genes de terminasa alterados. En un modo de realización, la célula es una célula de *E. coli*. En un modo de realización, el bacteriófago es el bacteriófago P1 de *Enterobacteriaceae*. En un modo de realización, los genes de terminasa en el plásmido se derivan del bacteriófago P1 de *Enterobacteriaceae*, es decir, los genes *pacA* y *pacB*. Cuando el virus mutado experimenta un ciclo lítico, las proteínas de empaquetamiento víricas producidas a partir del genoma del bacteriófago o (si está alterado) del plásmido complementario, empaquetan un replicón del ADN plasmídico en la unidad de empaquetamiento debido a que contiene un sitio de inicio del empaquetamiento, y se producen partículas de transducción no replicativa que portan el ADN plasmídico replicado.

55 En estos sistemas de delección/complementación se pueden producir dos especies de partículas de transducción que incluyen (1) partículas de transducción no replicativas que portan ADN plasmídico y (2) partículas de transducción no replicativas que portan ADN de P1, donde las últimas se pueden producir debido a la recombinación entre el ADN plasmídico y el ADN de P1. En un modo de realización donde el mutante de P1 no contiene *luxAB* insertado en el genoma de P1, las partículas de transducción no replicativas que portan ADN de P1 no contribuyen a la producción de señales cuando estas partículas de transducción liberan ADN en las células diana. Sin embargo, en un modo de realización donde el mutante de P1 contiene *luxAB* insertado en el genoma de P1, las partículas de transducción no replicativas que portan ADN de P1 contribuyen a la producción de señales cuando estas partículas de transducción liberan ADN en las células diana.

65 Por tanto, un modo de realización donde los genes *luxAB* se insertan en el genoma de P1 da como resultado un sistema indicador de partículas de transducción no replicativas mejorado.

IV. Indicadores

En algunos modos de realización, las NRTP y las construcciones de la invención comprenden una molécula de ácido nucleico indicadora que incluye un gen indicador. En algunos modos de realización, el bacteriófago de la invención incluye un gen indicador. El gen indicador puede codificar una molécula indicadora, y la molécula indicadora puede ser un marcador detectable o seleccionable. En determinados modos de realización, el gen indicador codifica una molécula indicadora que produce una señal detectable cuando se expresa en una célula.

En determinados modos de realización, la molécula indicadora puede ser una molécula indicadora fluorescente, tal como, pero sin limitarse a, una proteína fluorescente verde (GFP), una GFP potenciada, una proteína fluorescente amarilla (YFP), una proteína fluorescente azul verdosa (CFP), una proteína fluorescente azul (BFP), una proteína fluorescente roja (RFP) o mCherry, así como proteínas fluorescentes en el infrarrojo cercano.

En otros modos de realización, la molécula indicadora puede ser una enzima que media reacciones de luminiscencia (luxA, luxB, luxAB, luc, ruc, nluc, etc.). Las moléculas indicadoras pueden incluir una luciferasa bacteriana, una luciferasa eucariota, una enzima adecuada para detección colorimétrica (lacZ, HRP), una proteína adecuada para inmunodetección, tal como péptidos de afinidad (His-tag, 3X-FLAG), un ácido nucleico que funciona como un aptámero o que presenta actividad enzimática (ribozima), o un marcador seleccionable, tal como un gen de resistencia a antibióticos (ampC, tet(M), CAT, erm). Se pueden usar otras moléculas indicadoras conocidas en la técnica para producir señales para detectar ácidos nucleicos o células diana.

En otros aspectos, la molécula indicadora comprende una molécula de ácido nucleico. En algunos aspectos, la molécula indicadora es un aptámero con actividad de unión específica o que presenta actividad enzimática (por ejemplo, aptazima, ADNzima, ribozima).

Los indicadores y ensayos indicadores se describen más detalladamente en la sección V del presente documento.

Ensayos de NRTP e indicadores

Ensayo indicador de inductor

En algunos modos de realización, la invención comprende procedimientos para el uso de NRTP como moléculas indicadoras para su uso con inductores endógenos o naturales que se dirigen a promotores de genes dentro de células viables. Las NRTP de la invención se pueden genomanipular usando los procedimientos descritos en la sección III y a continuación en los ejemplos 1-2.

En algunos modos de realización, el procedimiento comprende emplear una NRTP como indicador, en el que la NRTP comprende un gen indicador que está enlazado de forma funcional a un promotor inducible que controla la expresión de un gen diana dentro de una célula diana. Cuando la NRTP que incluye el gen indicador se introduce en la célula diana, la expresión del gen indicador es posible por medio de la inducción del promotor del gen diana en la molécula de ácido nucleico indicadora.

La figura 5 representa un locus genómico de una célula diana 500 con dos genes, un gen que codifica un inductor 502 y un gen diana 503. También representa una molécula de ácido nucleico indicadora 504 que incluye un gen indicador 505 que está enlazado de forma funcional al promotor 506 del gen diana de la célula diana. La molécula de ácido nucleico indicadora 504 se puede introducir en la célula por medio de una NRTP. En la célula natural, cuando el gen inductor 502 se expresa y produce la proteína inductora 507, la proteína inductora 507 puede inducir el promotor 506 del gen diana que está enlazado de forma funcional al gen diana, provocando, por tanto, la expresión del gen diana y la producción del producto génico diana 508.

Cuando la molécula de ácido nucleico indicadora 504 está presente dentro del organismo diana, el inductor 507 también puede inducir el promotor 506 del gen diana presente dentro de la molécula de ácido nucleico indicadora 504, provocando, por tanto, la expresión del gen indicador 505 que da como resultado la producción de una molécula indicadora 509 que puede generar una señal detectable.

Por tanto, la producción de una señal detectable a partir de la molécula indicadora 509 es indicativa de la presencia de la célula, basada en la presencia de la proteína inductora 507 dentro de una célula diana.

Sistema indicador de VanR

En un modo de realización, el sistema indicador incluye NRTP que comprende una molécula de ácido nucleico indicadora (por ejemplo, plásmido). La molécula de ácido nucleico indicadora se puede construir para detectar VanR, el inductor del promotor del gen de resistencia a vancomicina (vanA) en *Enterococcus faecium* (o *E. faecalis*). El plásmido indicador porta un gen indicador que está enlazado de forma funcional al promotor del gen vanA.

La figura 6 describe el diseño y la función de un sistema indicador de VanR. La figura 6 representa una región del transposón Tn1546 601 que puede estar presente en *E. faecium*. El transposón Tn1546 puede incluir el gen inductor vanR 602 y el gen diana vanA 603. También se representa en la figura una molécula de ácido nucleico indicadora 604 que se puede empaquetar en una NRTP e introducir en la célula. La molécula de ácido nucleico indicadora 604 incluye un gen indicador 605 que está enlazado de forma funcional a un promotor P_H 606 que controla la expresión del operón vanHAX que incluye el gen vanA. En la célula natural, cuando el gen vanR 602 se expresa y produce la proteína VanR 607, VanR puede inducir P_H 606 en el transposón Tn1546, provocando, por tanto, la expresión del gen vanA y produciendo, por tanto, la proteína VanA 608. Cuando la molécula de ácido nucleico indicadora 603 (vector) está presente dentro del organismo diana, VanR también puede inducir P_H 606 dentro de la molécula de ácido nucleico indicadora 603, provocando, por tanto, la expresión de una molécula indicadora 609. Por tanto, la producción de una molécula indicadora es indicativa de la presencia de VanR dentro de una célula diana.

Los ejemplos de promotores que son adecuados para el desarrollo de un ensayo VRE incluyen: el promotor del gen vanA y un promotor del gen vanB. Arthur, M., *et al.*, *The VanS sensor negatively controls VanR-mediated transcriptional activation of glycopeptide resistance genes of Tn1546 and related elements in the absence of induction*. J. Bacteriol., 1997. **179**(1): p. 97-106.

Sistema indicador de TcdD

En otro modo de realización de este sistema se introduce una molécula de ácido nucleico indicadora en una célula usando una NRTP. La molécula de ácido nucleico indicadora se puede construir para detectar TcdD, el inductor de los promotores de los genes de las toxinas A y B (tcdA y tcdB, respectivamente) de *C. difficile*. La molécula de ácido nucleico indicadora incluye un gen indicador que está enlazado de forma funcional al promotor del gen tcdA.

La figura 7 describe el diseño y la función de un sistema indicador de TcdD, de acuerdo con un modo de realización de la invención. La figura 7 representa una región del transposón PaLoc 701 que puede estar presente en *C. difficile*. El transposón PaLoc puede contener el gen tcdD 702 y el gen diana tcdA 703. También se representa en la figura una molécula de ácido nucleico indicadora 704 (por ejemplo, vector) que se introduce en la célula usando una NRTP. La molécula de ácido nucleico indicadora 704 incluye el gen indicador 705 que está enlazado de forma funcional al promotor del gen tcdA (P_{tcdA}) 706.

En la célula natural, cuando el gen tcdD se expresa y produce la proteína TcdD 707, TcdD puede inducir P_{tcdA} 706 en el transposón PaLoc 701, provocando, por tanto, la expresión del gen tcdA 703 y produciendo, por tanto, la proteína toxina A 708.

Cuando la molécula de ácido nucleico indicadora 704 está presente dentro del organismo diana, TcdD también puede inducir P_{tcdA} 706 dentro del vector indicador, provocando, por tanto, la expresión de una molécula indicadora 709. Por tanto, la producción de una molécula indicadora 709 es indicativa de la presencia de TcdD dentro de una célula diana.

Los ejemplos de promotores adecuados para el desarrollo de un ensayo con *C. difficile* incluyen: el promotor del gen tcdA y el promotor del gen tcdB. Karlsson, S., *et al.*, *Expression of Clostridium difficile Toxins A and B and Their Sigma Factor TcdD Is Controlled by Temperature*. Infect. Immun., 2003. **71**(4): p. 1784-1793.

Células diana e inductores: Las células diana pueden incluir dianas de células eucariotas y procariotas e inductores asociados.

Sistemas de liberación de vector: La liberación del vector que contiene el ADN recombinante se puede realizar mediante sistemas abiológicos o biológicos. Incluyendo, pero sin limitarse a liposomas, partículas similivíricas, partículas de transducción derivadas de fagos o virus, y conjugación.

Sistema indicador de SarS basado en bacteriófago

En otro modo de realización de la invención se construye una molécula de ácido nucleico indicadora para detectar SarS, el inductor del promotor del gen de la proteína A (spa) en *S. aureus*. La molécula de ácido nucleico indicadora se puede introducir en la célula en una NRTP e incluye los genes de luciferasa bacteriana luxA y luxB enlazados de forma funcional al promotor del gen spa (P_{spa}). La molécula de ácido nucleico indicadora se libera en *S. aureus* por medio de una NRTP, por ejemplo. Si SarS está presente en la célula, inducirá la expresión de los genes luxAB, produciendo, por tanto, la enzima luciferasa que puede generar una señal luminiscente.

La figura 8 describe el diseño y la función de un sistema indicador de SarS, de acuerdo con un modo de realización de la invención. La figura 8 representa una región del genoma de *S. aureus* 801 que contiene el gen sarS 802 y el gen spa 803. También se representa en la figura una molécula de ácido nucleico indicadora (por ejemplo, vector) 804 liberada por NRTP en la célula y que incluye los genes indicadores luxAB 805 que están enlazados de forma funcional al promotor P_{spa} 806 que controla la expresión del gen spa 803.

En la célula natural, cuando el gen *sarS* 802 se expresa, produciendo la proteína SarS 807, la proteína puede inducir P_{spa} 806 en el transposón del genoma de *S. aureus*, provocando, por tanto, la expresión del gen *spa* 803 y produciendo la proteína A 808.

- 5 Cuando la molécula de ácido nucleico indicadora 804 está presente dentro del organismo diana, SarS 807 también puede inducir P_{spa} 806 dentro de la molécula de ácido nucleico indicadora 804, provocando, por tanto, la expresión de luxAB que da como resultado la producción de la enzima luciferasa 809 que puede generar una señal luminiscente. Por tanto, la producción de luciferasa es indicativa de la presencia de SarS dentro de una célula diana.
- 10 Otros sistemas indicadores para su uso con las NRTP descritas en el presente documento se describen en la publicación internacional PCT número: WO 2014/160418.

Mecanismo de cambio conformacional por represión en *cis* de la secuencia indicadora y por unión de un transcrito diana

- 15 Los mecanismos generales empleados en la invención son interacciones intermoleculares de moléculas de ácido nucleico que pueden dar como resultado dos mecanismos posteriores: (1) un cambio conformacional en la estructura secundaria de las moléculas de ácido nucleico y (2) un acontecimiento de escisión. En el presente documento se describen procedimientos para diseñar transcritos indicadores que pueden experimentar un cambio conformacional entre una conformación reprimida en *cis* y una conformación desreprimida, de modo que el cambio conformacional se induce por la unión de un transcrito diana al transcrito indicador.
- 20

- 25 Como se describe anteriormente, un transcrito indicador puede comprender una secuencia indicadora y diseñarse de modo que la traducción de la secuencia del gen indicador esté bloqueada por la represión en *cis* del sitio de unión al ribosoma (RBS) del gen indicador.

En algunos modos de realización, las siguientes herramientas se pueden usar para diseñar los transcritos indicadores de la invención.

- 30 1) La estructura secundaria de ARN se calcula usando un programa de estructura secundaria, tal como Mfold disponible en un servidor mantenido por The RNA Institute College of Arts and Sciences, University at Albany, State University of New York (servidor web Mfold para el plegamiento de ácidos nucleicos y la predicción de hibridación. Nucleic Acids Res. 31 (13), 3406-15, (2003)) (<http://mfold.rna.albany.edu/?q=mfold/RNA-Folding-Form>).
- 35 2) Las interacciones intermoleculares de ARN se calculan usando un programa informático tal como la predicción de interacción de ARN-ARN usando programación en enteros (RNA-RNA InterACTion prediction using Integer Programming, RactIP) disponible en un servidor mantenido por la Graduate School of Information Science, Nara Institute of Science and Technology (NAIST), Departamento de Biociencias e Informática, Universidad Keio de Japón (<http://rna.naist.jp/ractip/>).
- 40 3) La estructura secundaria de ARN se visualiza usando la miniaplicación de visualización para ARN (Visualization Applet for RNA, VARNA) (<http://varna.lri.fr/>), que es una miniaplicación ligera de Java especializada en dibujar la estructura secundaria de ARN.
- 45 Se puede generar una estructura secundaria del transcrito diana basada en la conformación de mínima energía calculada por MFold y visualizada con VARNA.

- 50 Las regiones de ARNmc o regiones diana se pueden identificar dentro del transcrito diana que puede ser ideal para la unión a un transcrito indicador. En algunos casos, la estructura secundaria del transcrito diana incluye una secuencia consenso o secuencia de bucle que se puede unir a una parte de la secuencia indicadora. Por ejemplo, en el transcrito de *mecA* de *S. aureus* resistente a meticilina existe un bucle terminal que incluye una secuencia consenso YUNR ("UUGG") que se puede usar para la unión a una secuencia de represión en *cis* de un transcrito indicador. El análisis de la estructura secundaria del transcrito diana puede revelar estas una o más regiones de ARNmc que pueden ser adecuadas para la unión a una secuencia de represión en *cis*. La secuencia de represión en *cis* del transcrito indicador se puede diseñar, a continuación, para que se una a estas una o más regiones de ARNmc.
- 55

- 60 En algunos modos de realización, la secuencia de represión en *cis* se puede diseñar para que se una al RBS de la secuencia indicadora en el transcrito indicador y formar una estructura en tallo-bucle dentro del transcrito indicador, de modo que la secuencia de represión en *cis* bloquee la unión de una ARN-polimerasa al RBS de la secuencia indicadora. Tras la unión de la secuencia de represión en *cis* a la región de ARNmc del transcrito diana, el RBS de la secuencia indicadora se puede exponer y se puede iniciar la traducción de la secuencia indicadora.

- 65 En algunos modos de realización, la secuencia de represión en *cis* del transcrito indicador se puede diseñar para colocarla en el extremo 5' de la secuencia indicadora y diseñarla para que genere una estructura en tallo-bucle en la secuencia indicadora, de modo que la secuencia de RBS de la secuencia indicadora se bloquee. La estructura en

tallo-bucle de represión en *cis* se puede diseñar para que bloquee la secuencia de RBS en base a la conformación de mínima energía del transcrito indicador, calculada por MFold y visualizada con VARNA. Las interacciones intermoleculares predichas entre el transcrito diana y la secuencia de represión en *cis* del transcrito indicador se pueden calcular mediante RactIP y visualizar mediante VARNA. Se puede dibujar un diagrama para visualizar el emparejamiento de bases entre el transcrito diana y la secuencia de represión en *cis* del transcrito indicador, como se muestra en la figura 9.

La interacción puede incluir el emparejamiento de bases entre 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 o 50 o más nucleótidos en la secuencia diana y la secuencia de represión en *cis*. La unión complementaria entre las dos secuencias puede ser completamente complementaria, sustancialmente complementaria o parcialmente complementaria. El emparejamiento de bases puede ser a través de secuencias o regiones de nucleótidos contiguos dentro de las secuencias diana y de represión en *cis*, por ejemplo, como se muestra en la figura 9.

Transcritos

Como se describe anteriormente, un "transcrito" es una longitud de secuencia de nucleótidos (ADN o ARN) transcrita a partir de una secuencia molde o gen de ADN o ARN. El transcrito puede ser una secuencia de ADNc transcrita a partir de un molde de ARN o una secuencia de ARNm transcrita a partir de un molde de ADN. El transcrito se puede transcribir a partir de una construcción de ácido nucleico genomanipulado. El transcrito puede tener regiones de complementariedad dentro de sí mismo, de modo que el transcrito incluya dos regiones que pueden formar una estructura bicatenaria intramolecular. Una región se puede denominar "secuencia de represión en *cis*" que se une a y bloquea la traducción de una secuencia indicadora. Una segunda región del transcrito se denomina "secuencia indicadora" que codifica una molécula indicadora, tal como un marcador detectable o seleccionable.

Los transcritos de la invención pueden ser una secuencia de transcrito que puede ser de 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o 25 nucleótidos de longitud. En otros modos de realización, el transcrito puede tener al menos 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 500, 1000, 1500, 2000, 3000, 4000, 5000 o más nucleótidos de longitud. La secuencia de represión en *cis* y la secuencia indicadora pueden ser de la misma longitud o de diferentes longitudes.

En algunos modos de realización, la secuencia de represión en *cis* está separada de la secuencia indicadora por 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60 o más nucleótidos espaciadores.

Vectores

En otro aspecto, los transcritos (incluyendo las secuencias de antisentido y de sentido) de la invención se expresan a partir de unidades de transcripción insertadas en vectores de ADN o ARN (véase, por ejemplo, Couture, A, *et al.*, *TIG.* (1996), 12:5-10; Skillern, A., *et al.*, publicación internacional PCT n.º WO 00/22113, Conrad, publicación internacional PCT n.º WO 00/22114 y Conrad, patente de EE. UU. n.º 6.054.299). Estas secuencias se pueden introducir como una construcción lineal, un plásmido circular o un vector vírico, incluyendo vectores basados en bacteriófagos, que se pueden incorporar y heredar como un transgén integrado en el genoma del huésped. El transcrito también se puede construir para permitir que se herede como un plásmido extracromosómico (Gassmann, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1995) **92**:1292).

Las secuencias de transcrito puede transcribirlas un promotor localizado en el plásmido de expresión. En un modo de realización, las secuencias de represión en *cis* y las secuencias indicadoras se expresan como una repetición invertida unida por una secuencia polinucleotídica conectora de modo que el transcrito tenga una estructura en tallo y bucle.

Los vectores de expresión recombinantes se pueden usar para expresar los transcritos de la invención. Los vectores de expresión recombinantes son, en general, plásmidos de ADN o vectores víricos. Los vectores víricos que expresan los transcritos se pueden construir basados en, pero sin limitarse a, virus adenoasociados (para una revisión, véase Muzyczka, *et al.*, *Curr. Topics Micro. Immunol.* (1992) 158:97-129); adenovirus (véase, por ejemplo, Berkner, *et al.*, *BioTechniques* (1998) 6:616), Rosenfeld *et al.* (1991, *Science* 252:431-434) y Rosenfeld *et al.* (1992), *Cell* 68:143-155); o alfavirus, así como otros conocidos en la técnica. Los retrovirus se han usado para introducir una variedad de genes en muchos tipos de células diferentes, incluyendo las células epiteliales, *in vitro* y/o *in vivo* (véase, por ejemplo, Eglitis, *et al.*, *Science* (1985) 230:1395-1398; Danos y Mulligan, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1998) 85:6460-6464; Wilson *et al.*, 1988, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:3014-3018; Armentano *et al.*, 1990, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:6141-6145; Huber *et al.*, 1991, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:8039-8043; Ferry *et al.*, 1991, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:8377-8381; Chowdhury *et al.*, 1991, *Science* 254:1802-1805; van Beusechem *et al.*, 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:7640-19; Kay *et al.*, 1992, *Human Gene Therapy* 3:641-647; Dai *et al.*, 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:10892-10895; Hwu *et al.*, 1993, *J. Immunol.* 150:4104-4115; patente de EE. UU. n.º 4.868.116; patente de EE. UU. n.º 4.980.286; solicitud PCT WO 89/07136; solicitud PCT WO 89/02468; solicitud PCT WO 89/05345; y solicitud PCT WO 92/07573). Los vectores retrovíricos recombinantes que pueden transducir y

expresar genes insertados en el genoma de una célula se pueden producir transfectando el genoma retroviral recombinante en líneas celulares de empaquetamiento adecuadas tales como PA317 y Psi-CRIP (Comette *et al.*, 1991, Human Gene Therapy 2:5-10; Cone *et al.*, 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6349). Los vectores adenovirales recombinantes se pueden usar para infectar una amplia variedad de células y tejidos en huéspedes susceptibles (por ejemplo, rata, hámster, perro y chimpancé) (Hsu *et al.*, 1992, J. Infectious Disease, 166:769) y también tienen la ventaja de no requerir células mitóticamente activas para la infección.

Se puede usar cualquier vector vírico que pueda aceptar las secuencias codificantes para el transcrito o los transcritos que se va(n) a expresar, por ejemplo, vectores derivados de adenovirus (AV); virus adenoasociados (AAV); retrovirus (por ejemplo, lentivirus (LV), rabdovirus, virus de la leucemia murina); virus del herpes y similares. El tropismo de los vectores víricos se puede modificar seudotipando los vectores con proteínas de la envoltura u otros antígenos de superficie de otros virus, o sustituyendo diferentes proteínas víricas de la cápside, según corresponda.

Por ejemplo, los vectores lentivirales presentados en la invención se pueden seudotipar con proteínas de superficie del virus de la estomatitis vesicular (VSV), de la rabia, del Ébola, de Mokola y similares. Los vectores de AAV presentados en la invención se pueden preparar para que se dirijan a diferentes células genomanipulando los vectores para que expresen diferentes serotipos de proteínas de la cápside. Las técnicas para construir vectores de AAV que expresen diferentes serotipos de proteínas de la cápside están dentro de las habilidades de la técnica; véase, por ejemplo, Rabinowitz J E *et al.* (2002), J Virol 76:791-801.

La selección de vectores víricos recombinantes adecuados para su uso en la invención, los procedimientos para insertar secuencias de ácido nucleico para expresar los transcritos en el vector y los procedimientos para liberar el vector vírico en las células de interés están dentro de las habilidades de la técnica. Véase, por ejemplo, Dornburg R (1995), Gene Therap. 2: 301-310; Eglitis M A (1988), Biotechniques 6: 608-614; Miller A D (1990), Hum Gene Therap. 1: 5-14; Anderson W F (1998), Nature 392: 25-30; y Robinson D A *et al.*, Nat. Genet. 33: 401-406.

Los vectores víricos se pueden derivar de AV y AAV. Un vector de AV adecuado para expresar los transcritos presentados en la invención, un procedimiento para construir el vector de AV recombinante y un procedimiento para liberar el vector en células diana se describen en Xia H *et al.* (2002), Nat. Biotech. 20: 1006-1010. Vectores AAV adecuados para expresar los transcritos presentados en la invención, los procedimientos para construir el vector de AV recombinante y los procedimientos para liberar los vectores en las células diana se describen en Samulski R *et al.* (1987), J. Virol. 61: 3096-3101; Fisher K J *et al.* (1996), J. Virol. 70: 520-532; Samulski R *et al.* (1989), J. Virol. 63: 3822-3826; patente de EE. UU. n.º 5.252.479; patente de EE. UU. n.º 5.139.941; solicitud de patente internacional n.º WO 94/13788; y solicitud de patente internacional n.º WO 93/24641.

El promotor que dirige la expresión del transcrito en un plásmido de ADN o un vector vírico presentado en la invención puede ser una ARN-polimerasa I eucariótica (por ejemplo, promotor de ARN ribosómico), ARN-polimerasa II (por ejemplo, promotor temprano de CMV o promotor de actina o promotor de ARNnp de U1) o, en general, el promotor de ARN-polimerasa III (por ejemplo, el promotor de ARNnp de U6 o de ARN de 7SK) o un promotor procariótico, por ejemplo, el promotor de T7, siempre que el plásmido de expresión también codifique la ARN-polimerasa T7 requerida para la transcripción a partir de un promotor de T7. El promotor también puede dirigir la expresión transgénica al páncreas (véase, por ejemplo, la secuencia reguladora de insulina para el páncreas (Bucchini *et al.*, 1986, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:2511-2515)).

Además, la expresión del transcrito se puede regular con precisión, por ejemplo, usando una secuencia reguladora inducible y sistemas de expresión tales como una secuencia reguladora que es sensible a determinados reguladores fisiológicos, por ejemplo, niveles de glucosa u hormonas en la circulación (Docherty *et al.*, 1994, FASEB J. 8:20-24). Dichos sistemas de expresión inducibles, adecuados para el control de la expresión transgénica en células o en mamíferos incluyen la regulación por ecdisona, por estrógeno, progesterona, tetraciclina, inductores químicos de dimerización e isopropil-beta-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG). Un experto en la técnica podría elegir la secuencia reguladora/promotora apropiada en base al uso previsto del transgén de ARNbc.

En general, los vectores recombinantes que pueden expresar moléculas de transcrito se liberan como se describe a continuación, y persisten en las células diana. De forma alternativa, se pueden usar vectores víricos que proporcionen expresión transitoria de las moléculas de transcrito. Dichos vectores se pueden administrar repetidamente según sea necesario. Una vez expresado, el transcrito se une al ARN diana y modula su función o expresión. La liberación de vectores que expresan el transcrito puede ser sistémica, tal como por administración intravenosa o intramuscular, por administración a células diana explantadas del paciente seguida de reintroducción en el paciente, o por cualquier otro medio que permita la introducción en una célula diana deseada.

Los plásmidos de ADN de expresión de transcrito se transfectan típicamente en células diana como un complejo con vehículos lipídicos catiónicos (por ejemplo, Oligofectamine) o vehículos basados en lípidos no catiónicos (por ejemplo, Transit-TKO™). La invención también contempla múltiples transfecciones lipídicas para atenuaciones mediadas por ARNbc dirigidas a diferentes regiones de un solo gen PROC o múltiples genes PROC durante un periodo de una semana o más. La introducción exitosa de vectores en células huésped se puede verificar usando

diversos procedimientos conocidos. Por ejemplo, la transfección transitoria se puede señalar con un indicador, tal como un marcador fluorescente, tal como la proteína fluorescente verde (GFP). La transfección estable de células *ex vivo* se puede garantizar usando marcadores que proporcionen a la célula transfectada resistencia a factores ambientales específicos (por ejemplo, antibióticos y fármacos), tal como resistencia a higromicina B.

La liberación del vector que contiene el ADN recombinante se puede realizar mediante sistemas abiológicos o biológicos. Incluyendo, pero sin limitarse a liposomas, partículas similivíricas, partículas de transducción derivadas de fagos o virus, y conjugación.

Indicadores para ensayo de transcrito

En algunos modos de realización, la construcción de ácido nucleico comprende una secuencia indicadora (por ejemplo, una secuencia de gen indicador). El gen indicador codifica una molécula indicadora que produce una señal cuando se expresa en una célula. En algunos modos de realización, la molécula indicadora puede ser un marcador detectable o seleccionable. En determinados modos de realización, la molécula indicadora puede ser una molécula indicadora fluorescente, tal como una proteína fluorescente verde (GFP), una proteína fluorescente amarilla (YFP), una proteína fluorescente azul verdosa (CFP), una proteína fluorescente azul (BFP) o una proteína fluorescente roja (RFP). En otros modos de realización, la molécula indicadora puede ser una proteína quimioluminiscente.

Las moléculas indicadoras pueden ser una luciferasa bacteriana, una luciferasa eucariota, una proteína fluorescente, una enzima adecuada para detección colorimétrica, una proteína adecuada para inmunodetección, un péptido adecuado para inmunodetección o un ácido nucleico que funciona como un aptámero o que presenta actividad enzimática.

Los marcadores seleccionables también se pueden usar como indicador. El marcador seleccionable puede ser un gen de resistencia a antibióticos, por ejemplo.

EJEMPLOS

A continuación hay ejemplos de modos de realización específicos para llevar a cabo la presente invención. Los ejemplos se ofrecen solo con propósitos ilustrativos y no pretenden limitar el alcance de la presente invención de ninguna manera. Se han realizado esfuerzos para garantizar la exactitud con respecto a los números usados (por ejemplo, cantidades, temperaturas, etc.), pero se debe permitir, por supuesto, algún error experimental y desviación.

La práctica de la presente invención empleará, a menos que se indique de otro modo, procedimientos convencionales de química de proteínas, bioquímica, técnicas de ADN recombinante y farmacología, dentro de las habilidades de la técnica. Dichas técnicas se explican completamente en la literatura. Véase, por ejemplo, T.E. Creighton, *Proteins: Structures and Molecular Properties* (W.H. Freeman and Company, 1993); A.L. Lehninger, *Biochemistry* (Worth Publishers, Inc., edición actual); Sambrook, *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2.^a edición, 1989); *Methods In Enzymology* (S. Colowick y N. Kaplan eds., Academic Press, Inc.); *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 18.^a edición (Easton, Pensilvania: Mack Publishing Company, 1990); Carey y Sundberg *Advanced Organic Chemistry* 3.^a Ed. (Plenum Press) Volúmenes A y B (1992).

Ejemplo 1: Sistema de empaquetamiento de alteración/complementación basado en intercambio alélico

Lo siguiente es un ejemplo del diseño y la construcción de un sistema de empaquetamiento basado en alteración/complementación basado en intercambio alélico para producir partículas de transducción no replicativas.

Los materiales utilizados para desarrollar el sistema de empaquetamiento se enumeran a continuación:

Cepas bacterianas:

- N1706, un lisógeno Tn9 c1-100 de P1 de la cepa K-12 de *E. coli*

Vectores:

- Y14439 (cadena principal de pBHR1)

Los siguientes números de acceso de GenBank (N.B., las secuencias denominadas por el número de acceso son las que figuran en la base de datos en la fecha de prioridad de esta solicitud) o las SEQ ID NO. se pueden usar para las secuencias de la cadena principal del vector y las secuencias de casete:

- X06758 (genes de luciferasa bacteriana luxAB)
- SEQ ID NO: 1 (genes pacA y pacB de P1 naturales que incluyen el promotor del gen pacA natural)

- SEQ ID NO: 2 (replicón lítico P1 que contiene el promotor P53 controlado por represor C1, la molécula de antisentido del promotor P53, los genes repL y una delección en el mismo marco del gen kilA)

- SEQ ID NO: 11 (promotor Pblast que dirige la expresión de luxAB)

Construcción de N1706(pacA::Kan): cepa mutada de pacA, también conocida como cepa 1505: Una secuencia ejemplar de una secuencia mutada de pacA se muestra en SEQ ID NO: 10. La mutación se puede lograr construyendo un sustrato de intercambio alélico compuesto por el gen de resistencia a kanamicina flanqueado por secuencias del gen pacA que flanquean ellas mismas la secuencia del gen pacA que se desea remplazar. El sustrato de intercambio alélico se puede producir por medio de síntesis génica y, a continuación, remplazando la secuencia natural en N1706 e insertando el gen Kan por medio de un intercambio alélico. Se determinó que la alteración también alteraba la capacidad del fago P1 mutado de empaquetar el ADN. La inducción del fago mutado dio como resultado la eliminación del fago de la descendencia, como se determina al comparar los valores de fago P1 por medio de un ensayo en placa a partir de lisados celulares producidos al inducir el fago natural frente al fago mutado. Además, cuando se introducía el plásmido complementario que expresa el gen pacA en el lisógeno mutante de P1 y se inducía el fago mutante a partir del transformante, no se recuperaban partículas de transducción en el lisado, lo que indica que el fago no podía empaquetar el plásmido complementario a pesar de que complementaba el gen pacA y el sitio pac.

Construcción del plásmido complementario: El plásmido complementario contiene el origen de replicación pBHR1 que presenta una amplia actividad gramnegativa, un marcador seleccionable para espectinomicina, los genes pacA y pacB del bacteriófago P1 naturales enlazados de forma funcional a la secuencia promotora del gen pacA natural, los genes luxA y luxB de *Aliivibrio fischeri* enlazados de forma funcional al promotor constitutivo de blastomicina (Pblast) y el replicón lítico P1 que contiene el promotor P53 controlado por represor C1, la molécula de antisentido del promotor P53, los genes repL y una delección sin cambio de pauta de lectura del gen kilA.

El plásmido se puede construir de una variedad de maneras que son conocidas por un experto en la técnica, incluyendo la obtención de casetes por medio de PCR de sus fuentes naturales o por medio de síntesis génica y ensamblaje del vector por medio de clonación tradicional basada en enzimas de restricción o técnicas alternativas tales como el ensamblaje de Gibson.

Sistema de empaquetamiento basado en complementación: El sistema de empaquetamiento incluye la cepa mutante de pacA 1505 complementada con el plásmido complementario. Como conoce un experto en la técnica, la manera de construir este sistema se puede lograr mediante transformación de 1505 con el plásmido complementario. El plásmido complementario se puede mantener en cultivos de 1505 transformada cultivando el transformante en presencia de 10 ug/ml de espectinomicina.

Producción de partículas de transducción que portan ADN plasmídico: Las partículas de transducción no replicativas que portan el plásmido complementario se pueden producir a partir de transformantes 1505 por medio de inducción térmica a 42 °C. La incubación a 42 °C da como resultado la inducción del ciclo lítico de P1 en el que el profago produce elementos estructurales del fago y empaqueta el ADN concatamérico del plásmido complementario formado por el replicón lítico en las partículas de fago de la descendencia. A diferencia de la complementación usando un plásmido complementario que solo expresaba el gen pacA que no daba como resultado la producción de partículas de transducción cuando los dos genes pacA y pacB se alteraban en el genoma del bacteriófago, el plásmido complementario que expresaba los dos genes pacA y pacB dio como resultado un lisado celular que contenía partículas de transducción no replicativas, consistiendo cada una de ellas en partículas de bacteriófago P1 que portan un concatámero lineal del plásmido complementario y, por tanto, demostrando que este plásmido complementario complementa con éxito la alteración del empaquetamiento.

Ejemplo 2: Sistema de empaquetamiento de alteración/complementación basado en intercambio alélico mejorado

En un ejemplo que emplea un bacteriófago P1 de *Enterobacteriaceae* que comprende los genes de terminasa pacA y pacB, pacA se alteró de manera que provocara efectos polares que también alteran la expresión de pacB y/o la función terminasa global mediada por PacA y PacB. La construcción final en la que se insertan kan y luxAB en los locus del gen pacA se incluye en SEQ ID NO: 12.

El genoma del bacteriófago con pacAB alterado se complementó a continuación con el plásmido representado en la figura 2. La figura 4 ilustra el diseño y la función de un sistema de empaquetamiento compuesto por una célula de *E. coli* lisogenizada con el bacteriófago P1 que tiene un gen pacA alterado. La célula también contenía un plásmido que contiene los genes pacA y pacB. En este ejemplo, los genes pacA y pacB en el plásmido se derivaron del bacteriófago P1 de *Enterobacteriaceae*. Cuando el virus mutado estaba en el ciclo lítico, las proteínas de empaquetamiento víricas se producían a partir del plásmido complementario, que empaquetaba un replicón del ADN plasmídico en la unidad de empaquetamiento debido a su sitio de inicio del empaquetamiento, y se producían partículas de transducción no replicativas que portaban el ADN plasmídico replicado.

En estos sistemas de delección/complementación se produjeron dos especies de partículas de transducción que incluyen (1) partículas de transducción no replicativas que portan ADN plasmídico y (2) partículas de transducción no replicativas que portan ADN de P1, donde las últimas se pueden producir debido a la recombinación entre ADN plasmídico y el ADN de P1. Cuando el mutante de P1 no contenía luxAB insertado en el gen pacA, las partículas de transducción no replicativas que portaban ADN de P1 no contribuían a la producción de señales cuando estas partículas de transducción liberaban ADN en las células diana. Sin embargo, cuando el mutante de P1 contenía luxAB insertado en el gen pacA, las partículas de transducción no replicativas que portaban ADN de P1 contribuían a la producción de señales cuando estas partículas de transducción liberaban ADN en las células diana (véase la figura 10).

Por lo tanto, cuando se insertan los genes luxAB en el genoma de P1 y se integran con el sistema generador de NRTP descrito en el presente documento, se ha proporcionado un sistema indicador de partículas de transducción no replicativas mejorado.

Lo siguiente proporciona detalles adicionales del diseño y construcción del sistema de empaquetamiento basado en alteración/complementación basado en intercambio alélico para producir partículas de transducción no replicativas descrito en este ejemplo.

Los materiales utilizados para desarrollar el sistema de empaquetamiento se enumeran a continuación:

Cepas bacterianas:

- N1706, un lisógeno Tn9 c1-100 de P1 de la cepa K-12 de *E. coli*

Vectores:

- Y14439 (cadena principal de pBHR1)

Los siguientes números de acceso de GenBank (N.B., las secuencias denominadas por el número de acceso son las que figuran en la base de datos en la fecha de prioridad de esta solicitud) o las SEQ ID NO. se pueden usar para las secuencias de la cadena principal del vector y las secuencias de casete:

- X06758 (genes de luciferasa bacteriana luxAB)
- SEQ ID NO: 1 (genes pacA y pacB de P1 naturales que incluyen el promotor del gen pacA natural)
- SEQ ID NO: 2 (replicón lítico P1 que contiene el promotor P53 controlado por represor C1, la molécula de antisentido del promotor P53, los genes repL y una delección en el mismo marco del gen kilA)
- SEQ ID NO: 11 (promotor Pblast que dirige la expresión de luxAB)

Construcción de N1706(pacA::Kan luxAB): cepa mutada de pacA, también conocida como cepa 1525: se realizó como sigue:

Una secuencia ejemplar de una secuencia de pacA mutada se muestra en SEQ ID NO: 12. Se generó una secuencia mutada de pacA como se proporciona en SEQ ID NO: 12 construyendo un sustrato de intercambio alélico compuesto del gen de resistencia a kanamicina (Kan) y los genes luxAB bajo el control del promotor Pblast y flanqueado por secuencias génicas de pacA que flanquean ellas mismas la secuencia del gen pacA. El sustrato de intercambio alélico se produjo por medio de síntesis génica. A continuación, la secuencia de pacA natural en N1706 se reemplazó por medio de inserción de los genes Kan y luxAB por medio de un intercambio alélico. Se determinó que la alteración también alteraba la capacidad del fago P1 mutado de empaquetar el ADN. La inducción del fago mutado dio como resultado la eliminación del fago de la descendencia, como se determina al comparar los valores de fago P1 por medio de un ensayo en placa a partir de lisados celulares producidos al inducir el fago natural frente al fago mutado.

Construcción del plásmido complementario: El plásmido complementario contenía el origen de replicación pBHR1 que presenta una amplia actividad gramnegativa, un marcador seleccionable para espectinomicina, los genes pacA y pacB del bacteriófago P1 naturales enlazados de forma funcional a la secuencia promotora del gen pacA natural, los genes luxA y luxB de *Aliivibrio fischeri* enlazados de forma funcional al promotor constitutivo de blasticilina (Pblast), el replicón lítico P1 que contiene el promotor P53 controlado por represor C1, la molécula de antisentido del promotor P53, los genes repL y una delección sin cambio de pauta de lectura del gen kilA.

El plásmido se puede construir de una variedad de maneras que son conocidas por un experto en la técnica, incluyendo la obtención de casetes por medio de PCR de sus fuentes naturales o por medio de síntesis génica y ensamblaje del vector por medio de clonación tradicional basada en enzimas de restricción o técnicas alternativas tales como el ensamblaje de Gibson.

Sistema de empaquetamiento basado en complementación: El sistema de empaquetamiento incluye la cepa mutante de pacA 1525 complementada con el plásmido complementario. Como conoce un experto en la técnica, la manera de construir este sistema se puede lograr mediante transformación de la cepa 1525 con el plásmido complementario. El plásmido complementario se puede mantener en cultivos de 1525 transformada cultivando el transformante en presencia de 10 ug/ml de espectinomicina.

Producción de partículas de transducción que portan ADN plasmídico: Las partículas de transducción no replicativas que portan el plásmido complementario se pueden producir a partir de transformantes 1525 por medio de inducción térmica a 42 °C. La incubación a 42 °C da como resultado la inducción del ciclo lítico de P1 en el que el profago produce elementos estructurales del fago y empaqueta el ADN concatamérico del plásmido complementario formado por el replicón lítico en las partículas de fago de la descendencia. El plásmido complementario que expresa los dos genes pacA y pacB dio como resultado un lisado celular que contenía partículas de transducción no replicativas, consistiendo cada una de ellas en partículas de bacteriófago P1 que portan un concatámero lineal del plásmido complementario y demostrando, por tanto, que este plásmido complementario complementa con éxito la alteración del empaquetamiento.

Además de las partículas de transducción que portan ADN plasmídico, el sistema produjo partículas de transducción que portan ADN de P1. Las partículas de transducción que portan ADN de P1 pueden surgir por medio de recombinación entre el ADN plasmídico y el ADN de P1. La presencia de partículas de transducción que portan ADN de P1 se evaluó exponiendo las células diana al lisado de este sistema y cribando por la presencia de células transducidas que se propagan en medios selectivos que incorporan kanamicina, mientras que las partículas de transducción que portan ADN plasmídico se evaluaron de manera similar en base a la resistencia a espectinomicina. La figura 10 muestra una tabla de datos obtenidos al medir la producción de luz (ULR) de colonias de células transducidas. Las células que eran resistentes a espectinomicina (SpecR) se transdujeron con ADN plasmídico, mientras que las células que eran resistentes a kanamicina (KanR) se transdujeron con ADN de P1. Los datos de 1505 se obtuvieron de líneas de empaquetamiento que no tienen luxAB insertado en el genoma de P1, mientras que los de 1525 se obtuvieron de líneas de empaquetamiento que tienen luxAB insertado en el genoma de P1. Como se puede observar a partir de los datos, todos los transductantes de SpecR produjeron luz, mientras que todos los transductantes de KanR produjeron luz solo para los transducidos a partir de 1525.

Por tanto, 1525 representa un sistema indicador basado en partículas de transducción no replicativas mejorado donde las partículas de transducción que portan tanto ADN plasmídico como ADN vírico pueden producir luz.

REFERENCIAS CITADAS

1. Michael G. Schmidt, D.A.S., Caroline Westwater, Joseph W. Dolan, Brian D. Hoel, Philip A. Werner, James S. Norris, Laura M. Kasman, *Nucleic Acid Delivery and Expression*, 2005.
2. Kreiswirth, B.N. *et al.*, The toxic shock syndrome exotoxin structural gene is not detectably transmitted by a prophage. *Nature*, 1983. 305(5936): p. 709-712.
3. Ubeda, C. *et al.*, Specificity of staphylococcal phage and SaPI DNA packaging as revealed by integrase and terminase mutations. *Molecular Microbiology*, 2009. 72(1): p. 98-108.
4. Otsuji, N. *et al.*, Induction of Phage Formation in the Lysogenic *Escherichia coli* K-12 by Mitomycin C. *Nature*, 1959. 184(4692): p. 1079-1080.
5. Brantl, S. (2007) Regulatory mechanisms employed by cis-encoded antisense RNAs. *Curr. Opin. Microbiol.* 10, 102-109.
6. Isaacs, F.J. *et al.* (2004) Engineered riboregulators enable post-transcriptional control of gene expression. *Nat. Biotechnol.* 22, 841-847.
7. Pfeiffer, V. *et al.* (2009) Coding sequence targeting by MicC RNA reveals bacterial mRNA silencing downstream of translational initiation. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 16, 840-846.
8. Opdyke, J.A. *et al.* (2004) GadY, a small-RNA regulator of acid response genes in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 186, 6698-6705.
9. Carrière, C., *et al.*, *Conditionally replicating luciferase reporter phages: Improved sensitivity for rapid detection and assessment of drug susceptibility of Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Clinical Microbiology*, 1997. 35(12): p. 3232-3239.
10. Merten, O.-W. y M. Al-Rubeai, *Viral Vectors for Gene Therapy: Methods and Protocols*. *Methods in Molecular Biology*. Vol. 737. 2011.
11. Lofdahl, S., J.E. Sjöström, y L. Philipson, *CLONING OF RESTRICTION FRAGMENTS OF DNA FROM STAPHYLOCOCCAL BACTERIOPHAGE-PHI-11*. *Journal of Virology*, 1981. 37(2): p. 795-801.
12. Charpentier, E., *et al.*, *Novel Cassette-Based Shuttle Vector System for Gram-Positive Bacteria*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2004. 70(10): p. 6076-6085.
13. Novick, R.P., I. Edelman, y S. Lofdahl, *Small staphylococcus-aureus plasmids are transduced as linear multimers that are formed and resolved by replicative processes*. *Journal of Molecular Biology*, 1986. 192(2): p. 209-220.
14. Westwater, C., *et al.*, Development of a P1 phagemid system for the delivery of DNA into Gram-negative bacteria. *Microbiology*, 2002. 148(4): p. 943-950.
15. Norris, J.U., *et al.*, *Tissue-Specific and Pathogen-Specific Toxic Agents and Ribozymes*. 1999.
16. Maiques, E., *et al.*, Role of Staphylococcal Phage and SaPI Integrase in Intra- and Interspecies SaPI Transfer. *J. Bacteriol.*, 2007. 189(15): p. 5608-5616.
17. Frees, D., *et al.*, Clp ATPases are required for stress tolerance, intracellular replication and biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. *Molecular Microbiology*, 2004. 54(5): p. 1445-1462.
18. Arnaud, M., A. Chastanet, y M. Debarbouille, New Vector for Efficient Allelic Replacement in Naturally Nontransformable, Low-GC-Content, Gram-Positive Bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2004. 70(11): p. 6887-6891.
19. Tormo, M.A., *et al.*, *Staphylococcus aureus* Pathogenicity Island DNA Is Packaged in Particles Composed of Phage Proteins. *J. Bacteriol.*, 2008. 190(7): p. 2434-2440.
20. Arthur, M., *et al.*, The VanS sensor negatively controls VanR-mediated transcriptional activation of glycopeptide resistance genes of Tn1546 and related elements in the absence of induction. *J. Bacteriol.*, 1997. 179(1): p. 97-106.
21. Karlsson, S., *et al.*, Expression of *Clostridium difficile* Toxins A and B and Their Sigma Factor TcdD Is Controlled by Temperature. *Infect. Immun.*, 2003. 71(4): p. 1784-1793.
22. Daniel Sobek, J.R., *Enzyme detection system with caged substrates*, 2007, Zymera, Inc.

23. Samie Jaffrey, J.P., Coupled recognition/detection system for in vivo and in vitro use, 2010, Cornell University.

5 24. Good, L., Translation repression by antisense sequences. Cellular and Molecular Life Sciences, 2003. 60(5): p. 854-861.

25. Sabine, B., Antisense-RNA regulation and RNA interference. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression, 2002. 1575(1-3): p. 15-25.

Listado de secuencias extraoficial

> SEQ ID NO: 1 pacA y pacB (negrita: promotor, subrayado: pacA, sin formato: pacB)

ATGTGACTTTCGTTACCCTCGCGTCAAAAAGAGTTTTTACGAAAGGAA
GCATAAGTGACCTGGGACGATCACAAGAAGAATTTTGCTCGCCTGGCGCGAGAT
GGTGGTTACACCATCGCACAGTATGCCGCCGAGTTTAATCTTAACCCTAATACCG
CACGTCGTTATCTCCGTGCCTTCAAAGAAGACACCAGGACTACGGACAGCCGCA
AGCCAAATAAGCCAGTCAGGAAGCCACTAAAAAGCATGATCATTGATCACTCTA
ATGATCAACATGCAGGTGATCACATTGCGGCTGAAATAGCGGAAAAACAAAGAG
TTAATGCCGTTGTCAGTGCCGCAGTCGAGAATGCGAAGCGCCAAAAATAAGCGCA
TAAATGATCGTTCAGATGATCATGACGTGATCACCCGCGCCACCGGACCTTACG
TGATCGCCTGGAACGCGACACCCTGGATGATGATGGTGAACGCTTTGAATTTCGAA
GTTGGCGATTACCTGATAGATAACGTTGAAGCGCGGAAGGCCGCGCGCGCTATG
TTGCGTCGGTCCGGGGCCGATGTTCTGGAAACCACTCTTCTGGAAAAGTCTCTTT
CTCATCTCCTTATGCTGGAGAACGCCAGGGATACGTGTATTGCGCTGGTGCAGGA
AATGCGCGATCAGCAAAAAGACGATGATGAAGGTACTCCGCCTGAATACCGTAT
CGCGAGCATGCTAAACAGCTGTTCCGCGCAGATAAGCAGCCTGATCAACACCAT
TTACAGCATCCGGAATAACTATCGAAAAGAAAGCCGGGAGGCGGAAAAGCACG
CTTTATCTATGGGGCAAGCTGGCATTGTAAAGCTGGCATAACGAACGAAAGCGTGA
AAATAACTGGTCAGTGCTGGAAGCGGCTGAATTCATCGAGGCGCATGGAGGAAA
AGTGCCGCCCTGATGCTGGAGCAAATCAAAGCCGATCTGCGTGCTCCTAAGACC
AATACCGATGATGAGGAAAACCAAACAGCATCTGGCGCTCCATCACTTGAAGAT
CTGGATAAAATCGCGCGAGAACGGGCCGCCAGCCGCCGCGCTGATGCCGCATTG
TGGATTGAGCATCGTAGAGAAGAAATTGCCGATATCGTCGATACAGGTGGTTAT
GGTGATGTGATGCGGAAGGCATATCAAACGAAGCATGGCTTGAACAGGATCTG
GACGAAGACGAGGAGGAAGACGAAGAAGTTACCCGCAAACGTACGGGGATGA
TGATTAAATGGCCAGAAGTTGCGTAACGGACCCACGTTGGCGCGAGCTTGTGGC
GCTATATCGTTATGACTGGATTGCGGCCGCTGATGTGTTGTTTGGGAAGACACCA
ACCTGGCAGCAGGATGAGATCATTGAGTCCACGCAGCAGGACGGCAGTTGGACA
AGTGTGACCTCCGGCCATGGTACTGGTAAATCGGATATGACGAGTATCATTGCAA
TACTCTTCATCATGTTTTTCCCCGGCGCTCGCGTCATTCTGGTCGCTAACAAAAGA
CAGCAAGTCCTTGATGGTATTTTCAAATACATAAAGAGCAATTGGGCTACTGCTG
TTAGCAGATTCCCGTGGTTGTGCAAGTATTTCACTTACAGAAACGTCTTTTTTT
GAGGTGACTGGCAAGGGTGTGGGACAATATTGATAAAGTCCTGTGCTCCCGGA
AATGAGGAGGCGTTGGCTGGTGAACACGCCGATCATCTTGTATATCATCGACG
AAGCGTCGGGTGTGAGTGATAAAGCATTAGTGATGATAACAGGTGCGCTGACCG
GTAAGGATAACCGTATTCTGCTTCTTTCCAGCCTACGCGACCTTCAGGCTATTTT
TACGATTCACACCACAGACTAGCTATTCGCCCGGGAAATCCTGATGGATTGTTTA
CTGCGATAATACTGAATAGTGAAGAATCTCCGCTTGATAGATGCAAAATTTATACG
AGCAAACTTGCGGAGTATGGCGGTCGTGATAACCCCATGTACATGATCAAAGT
ACGTGGTGAATTTCCCAAATCTCAAGATGGCTTTCTTCTTGGTCGTGATGAGGTT
GAGCGGGCGACGCGGCGAAAGGTCAAGATTGCCAAAGGATGGGGCTGGGTTGC
ATGTGTTGACGTTGCTGGTGGCACAGGACGAGATAAGTCCGTTATTAATATCATG
ATGGTGTCCGGCCAGCGAAATAAACGCCGTGTAATCAACTATCGTATGCTGGAAT
ACACAGACGTTACAGAAACGCAGTTAGCCGCCAAGATTTTCGCAGAATGTAACC
CAGAACGGTTCCCGAACATAACCATAGCTATTGATGGCGATGGCTTGGGGAAAT
CGACGGCTGATCTAATGTACGAACGCTATGGCATTACCGTCCAGCGTATCCGCTG
GGGTAAAAAGATGCACAGCCGTGAAGATAAAAGCCTTTATTTTCGATATGCGCGC

TTTCGCGAATATTCAGGCGGCAGAAGCTGTAAAATCAGGGCGTATGAGGCTTGA
TAAGGGGGCTGCGACTATAGAGGAAGCATCAAAGATACCGGTAGGGATAAATTC
CGCAGGTCAATGGAAGGTGATGTCAAAGGAAGATATGAAGAAAAAACTCAACCT
GCACTACCCGGACCATTGGGATACATATTGTTTCGCTATGTTGGCGAACTATGTT
CCCCAAGATGAAGTGCTTAGCGTCGAAGACGAAGCGCAGGTTGATGAAGCTCTG
GCATGGCTTAATGAATAA

> SEQ ID NO: 2 replicón lítico P1 que contiene el promotor P53 controlado por represor C1, la molécula de antisentido del promotor P53, los genes repL y una delección sin cambio de pauta de lectura del gen kilA

5

CACTATAGGGCGAATTGGCGGAAGGCCGTCAAGGCCGCATTTGGGCCCGG
CGCGCCGGATCCGCTAGCTCTAGACTGGCAGGTTTCTGAGCAGATCGTCCAACCC
GATCTGGATCGGGTCAGAAAAATTTGCTCTAATAAATTTCTGTTTTCTAAGTGCAA
AGAATCACCATTTTCGAGCTGGTGATTGAAGGTTGATGCAAATTTGGAGAAAAAA
TGCAACAAACATTCAATGCGGATATGAATATATCAAACCTTCATCAAAATGTCGA
TCCTTCAACCACTCTGCCCGTTATTTGTGGTGTTGAAATTACGACCGACCGCGCTG
GCCGTTACAACCTTAATGCTCTACACAGAGCGAGCGGACTCGGTGCCCATAAAG
CGCCAGCTCAATGGCTAAGAACGCTGTCAGCTAAACAGCTCATCGAAGAGCTTG
AAAAAGAACTATGCAGAATTGCATAGTTTCGTTTACAAGCAATGGAAGCAGGA
TTTCTTTACGACTCGTATAACCGGCAAAGGTCAGCAGTGGCTGATGAAGCGATT
GCTTGATGCTGGTGCTGGTACCTGTCGCGGCAACGCGCTAACAGACGTAGTAA
GAACCACCAGCATTGTAATGCTGGCTAAAGTCACCTTTCCTGAGCTGTATAACGAT
GAGCGATTTTACTTTTTCTGGCTATGAATTGGCCTGCTTTGTAAACACACTCCGGTC
TATCCCGTAGCGCCGGGCATATCCTGTCGCAATGTGCAAATCTCGCGGCAACAAC
CAGTGAATACTTCATTACAAAGCCTCACCGCCTGATCGCGGCAGAACTGGTTAT
AGCCAATCAACCGTCGTTTCGTGCATTCCGTGAAGCTGTAAACAAAGGAATTCTGT
CTGTAGAGATTGTTATCGGCGATCACCGTGAACGTCGCGCTAACCTGTACCGGTT
TACACCATCCTTTTTTGGCCTTCGCACAACAAGCCAAAAATGCGCTGATAGAAAGC
AAATTAAGATCTCTTCAGCGGCAACCAAGGTTAAAGCTGTTCTCGCTAAGACAT
TGGCTTTATTTAATTTTTTATCCACACCCCCATGTCAAATGATACCCCCTCCCC
TGTCAGGATGACGTGGCAATAAAGAATAAGAAGTCACAAGTTAAAAAAACAAA
AAGATCAGTTTCCGGCGGTGCCGGAACAACCAGCCTCAAAAAATTGACTTCATG
GATCGCTAAGGCAAAAGCAAAGGCTGACAATCTGCGGTTATCCAAAAAACGCAC
TCAAAAACATGAGTTCAAGCAGAAAGTAGAGGCGGCTGCGCGGAAATATGCTTA
CCTGAAGAACAAGCGTTCGCCTGATATTGGCGGGATATCAAACCTTCGATAACCTA
CCGCATTGCATGACGGTAAACGAAGCTCTTAATGCGGTTTTAGCCAAAAATAAA
GATAACGAACAATGGGGTATACCGGCAGGATTCAGAGGGTAATGAATTGCTCTA
ATTATAACCATGCATACTTTCAACACCTCTAGTTTGCCATGAGGCAAACCTCATAG
GTGTCCTGGTAAGAGGACACTGTTGCCAAAACTGGACGCCCCATTATTGCAATTA
ATAAACAACTAACGGACAATTCTACCTAACAATAAGTGGCTTAAAAAAACCCGC
CCCGGCGGGTTTTTTTATCTAGAGCTAGCGGATCCGGCGCGCCGGGCCCTTCTGG
GCCTCATGGGCCTTCCGCTCACTGCCCCGCTTTCCAG

> SEQ ID NO: 3 replicón pBHR1 (negrita: ORF)

TTGACTGCCACTTTTACGCAACGCATAATTGTTGTCGCGCTGCCGAAAAGT
TGCAGCTGATTGCGCATGGTGCCGCAACCGTGCGGCACCCCTACCGCATGGAGA
TAAGCATGGCCACGCAGTCCAGAGAAATCGGGCATTCAAGCCAAGAACAAGC
CCGGTCACTGGGTGCAAACGGAACGCAAAGCGCATGAGGCGTGGGCCGGG
CTTATTGCGAGGAAACCCACGGCGGCAATGCTGCTGCATCACCTCGTGGCG
CAGATGGGCCACCAGAACGCCGTGGTGGTCAGCCAGAAGACACTTTCCAAG
CTCATCGGACGTTCTTTGCGGACGGTCCAATACGCAGTCAAGGACTTGGTG
GCCGAGCGCTGGATCTCCGTCGTGAAGCTCAACGGCCCCGGCACCGTGTCG
GCCTACGTGGTCAATGACCGCGTGGCGTGGGGCCAGCCCCGCGACCAGTTG
CGCCTGTCGGTGTTCAGTGCCGCCGTGGTGGTTGATCACGACGACCAGGAC
GAATCGCTGTTGGGGCATGGCGACCTGCGCCGCATCCCGACCTGTATCCG
GGCGAGCAGCAACTACCGACCGGCCCCGGCGAGGAGCCGCCAGCCAGCC
CGGCATTCCGGGCATGGAACCAGACCTGCCAGCCTTGACCGAAACGGAGGA
ATGGGAACGGCGCGGGCAGCAGCGCCTGCCGATGCCCCGATGAGCCGTGTTT
TCTGGACGATGGCGAGCCGTTGGAGCCGCCGACACGGGTCACGCTGCCGCG
CCGGTAG

> SEQ ID NO: 4 genes terS y terL de $\phi 80\alpha$ (negrita: ORF de terS, subrayado: ORF de terL)

5

TTTTAAAAAGCGTATAGCGCGAGAGTTGGTGGTAAATGAAATGAACGAA
 AAACAAAAGAGATTTCGCAGATGAATATATAATGAATGGATGTAATGGTAAAA
 AAGCAGCAATTTTCAGCAGGTTATAGTAAGAAAAACAGCAGAGTCTTTAGCAAG
 TCGATTGTTAAGAAATGTTAATGTTTCGGAATATATTAAAGAACGATTAGAA
 CAGATACAAGAAGAGCGTTTAATGAGCATTACAGAAGCTTTAGCGTTATCTG
 CTTCTATTGCTAGAGGAGAACCTCAAGAGGCTTACAGTAAGAAATATGACCA
 TTTAAACGATGAAGTGGAAAAAGAGGTTACTTACACAATCACACCAACTTTT
 GAAGAGCGTCAGAGATCTATTGACCACATACTAAAAGTTCATGGTGCGTATA
TCGACAAAAAAGAAATTACTCAGAAGAATATTGAGATTAATATTGGTGAGTA
CGATGACGAAAGTTAAATTAAACTTTAACAAACCATCTAATGTTTTCAACAGAA
ACATATTCGAAATACTAACCAATTACGATAACTTCACTGAAGTACATTACGGTGG
AGGTTTCGAGTGGTAAGTCTCACGGCGTTATACAAAAAGTTGTACTTAAAGCATTG
CAAGACTGGAAATATCCTAGGCGTATACTATGGCTTAGAAAAAGTCCAATCAACA
ATTAAAGATAGTTTTATTCGAAGATGTCAAAGATTGTTTGATAAACTTCGGTATTT
GGGACATGTGCCTTTGGAATAAGACTGATAACAAAGTTGAATTGCCAAACGGCG
CAGTTTTTTTTGTTTAAAGGATTAGATAACCCAGAGAAAAATAAAGTCGATAAAAG
GCATATCAGACATAGTCATGGAAGAAGCGTCTGAATTCACACTAAATGATTACA
CGCAATTAACGTTGCGTTTGAGGGAGCGTAAACACGTGAATAAGCAAATATTTTT
GATGTTTAACCCAGTATCTAAACTGAATTGGGTTTATAAGTATTTCTTTGAACATG
GTGAACCAATGGAAAATGTCATGATTAGACAATCTAGTTATCGAGATAATAAGTT
TCTTGATGAAATGACACGACAAAACCTTAGAGTTGTTAGCAAATCGTAATCCAGCA
TATTACAAAATTTATGCGTTAGGTGAATTTTCTACACTAGACAAATTGGTTTTCCC
TAAGTATGAAAAACGTTTAATAAAATAAAGATGAGTTAAGACATTTACCTTCTTAT
TTTGGATTGGACTTTGGCTACGTTAATGATCCTAGTGCTTTTATACATTCTAAAAT
AGATGTAAAGAAAAAGAAGTTATACATCATTGAAGAGTATGTTAAACAAGGTAT
GCTGAATGATGAAATAGCTAATGTCATAAAGCAACTTGGTTATGCTAAAGAAGA
AATTACAGCAGATAGTGCAGAACAAAAAAGTATAGCTGAATTAAGGAATCTAGG
GCTTAAAAGGATTTTACCAACCAAAAAAGGGAAGGGCTCGGTTGTACAAGGGTT
ACAATTCTTAATGCAATTTGAAATCATTGTTGATGAACGTTGTTTCAAGACTATTG
AAGAGTTTGACAACCTACACATGGCAAAAGGACAAAGATACAGGTGAATATACCA
ATGAACCAGTAGATACATACAATCATTGTATCGATTTCGTTGCGTTATTCAGTGGA
ACGATTCTACAGACCGGTTAGAAAACGCACAAATGTCAGTTCGAAAGTTGACAC
AATAAAATCTCTAGGATTATAGGAGGGAACAAATGTTAAAAGTAAACGAATTTG
 AAACAGAT

> SEQ ID NO: 5 pT181

TTTGCGGAAAGAGTTAGTAAGTTAACAGAAGACGAGCCAAACCTAAATGG
 TTTAGCAGGAAACTTAGATAAAAAAATGAATCCAGAATTATATTCAGAACAGGA
 ACAGCAACAAGAGCAACAAAAGAATCAAAAACGAGATAGAGGTATGCACTTAT
 AGAACATGCATTTATGCCGAGAAAACCTTATTGGTTGGAATGGGCTATGTGTTAGC
 TAACTTGTTAGCGAGTTGGTTGGACTTGAATTGGGATTAATCCCAAGAAAGTACC
 GGCTCAACAACCCATAAAGCCCTGTAGGTTCCGNCCAATAAGGAAATTGGAATA
 AAGCAATAAAAGGAGTTGAAGAAATGAAATTCAGAGAAGCCTTTGAGAATTTTA
 TAACAAGTAAGTATGTACTTGGTGTTTTAGTAGTCTTAACTGTTTACCAGATAAT
 ACAAATGCTTAAATAAAAAAAGACTTGATCTGATTAGACCAAATCTTTTGATAGT
 GTTATATTAATAACAAAATAAAAAAGGAGTCGCTCACGCCCTACCAAAGTTTGTGA
 ACGACATCATTCAAAGAAAAAAACACTGAGTTGTTTTTATAATCTTGTATATTTA
 GATATTAAACGATATTTAAATATACATCAAGATATATATTTGGGTGAGCGATTAC
 TTAACGAAATTGAGATTAAGGAGTCGATTTTTTATGTATAAAAAACAATCATGCA
 AATCATTCAAATCATTTGGAAAATCACGATTTAGACAATTTTTCTAAAACCGGCT
 ACTCTAATAGCCGGTTGGACGCACATACTGTGTGCATATCTGATCCAAAATTAAG
 TTTTGATGCAATGACGATCGTTGGAAATCTCAACCGAGACAACGCTCAGGCCCTT
 TCTAAATTTATGAGTGTAGAGCCCCAAATAAGACTTTGGGATATTCTTCAAACAA
 AGTTTAAAGCTAAAGCACTTCAAGAAAAAGTTTATATTGAATATGACAAAGTGA
 AAGCAGATAGTTGGGATAGACGTAATATGCGTATTGAATTTAATCCAAACAAAC
 TTACACGAGATGAAATGATTTGGTTAAAACAAAATATAATAAGCTACATGGAAG
 ATGACGGTTTTACAAGATTAGATTTAGCCTTTGATTTTGAAGATGATTTGAGTGA
 CTACTATGCAATGTCTGATAAAGCAGTTAAGAAAACCTATTTTTTATGGTCGTAAT
 GGTAAGCCAGAAACAAAATATTTTGGCGTGAGAGATAGTAATAGATTTATTAGA
 ATTTATAATAAAAAAGCAAGAACGTAAAGATAATGCAGATGCTGAAGTTATGTCT
 GAACATTTATGGCGTGTAGAAATCGAACTTAAAAGAGATATGGTGGATTACTGG
 AATGATTGCTTTAGTGATTTACATATCTTGCAACCAGATTGGAAAACCTATCCAAC
 GCACTGCGGATAGAGCAATAGTTTTTATGTTATTGAGTGATGAAGAAGAATGGG
 GAAAGCTTCACAGAAATTCTAGAACAAAATATAAGAATTTGATAAAAGAAATTT
 CGCCAGTCGATTTAACGGACTTAATGAAATCGACTTTAAAAGCGAACGAAAAAC
 AATTGCAAAAACAAATCGATTTTTTGGCAACATGAATTTAAATTTTGGAAATAGTG
 TACATATTAATATTACTGAACAAAATGATATATTTAAACTATTCTAATTTAGGA
 GGATTTTTTTATGAAGTGTCTATTTAAAAATTTGGGGAATTTATATGAGGTGAAA
 GAATAATTTACCCCTATAAACTTTAGCCACCTCAAGTAAAGAGGTAATAATTGTTT
 AGTTTATATAAAAAATTTAAAGGTTTGTTTTATAGCGTTTTATTTTGGCTTTGTAT
 TCTTTCATTTTTTTAGTGTATTAATGAAATGGTTTTAAATGTTTCTTTACCTGATAT
 TGCAAATCATTTTAATACTACTCCTGGAATTACAACTGGGTAAACACTGCATAT
 ATGTTAACTTTTTCGATAGGAACAGCAGTATATGGAAAATTATCTGATTATATAA
 ATATAAAAAAATTGTTAATTATTGGTATTAGTTTGAGCTGTCTTGGTTCATTGATT
 GCTTTTATTGGGCCCACCTAGGCAAATATGCTCTTACGTGCTATTATTTAAGTGAC
 TATTTAAAAGGAGTTAATAAATATGCGGCAAGGTATTCTTAAATAAACTGTCAAT
 TTGATAGCGGGAACAAATAATTAGATGTCCTTTTTTAGGAGGGCTTAGTTTTTTGT
 ACCCAGTTTAAAGAATACCTTTATCATGTGATTCTAAAGTATCCAGAGAATATCTG
 TATGCTTTGTATACCTATGGTTATGCATAAAAAATCCCAGTGATAAAAGTATTTAT
 CACTGGGATTTTTATGCCCTTTTGGGTTTTTGAATGGAGGAAAATCACATGAAAA
 TTATTAATATTGGAGTTTTAGCTCATGTTGATGCAGGAAAAACTACCTTAACAGA
 AAGCTTATTATATAACAGTGGAGCGATTACAGAATTAGGAAGCGTGGACAAAGG
 TACAACGAGGACGGATAATACGCTTTTAGAACGTCAGAGAGGAATTACAATTCA
 GACAGGAATAACCTCTTTTCAGTGGGAAAATACGAAGGTGAACATCATAGACAC
 GCCAGGACATATGGATTTCTTAGCAGAAGTATATCGTTCATTATCAGTTTTAGAT
 GGGGCAATTCTACTGATTTCTGCAAAAGATGGCGTACAAGCACAACTCGTATAT

TATTTTCATGCACTTAGGAAAATGGGGATTCCCACAATCTTTTTTATCAATAAGATT
 GACCAAAATGGAATTGATTTATCAACGGTTTATCAGGATATTAAAGAGAACTTT
 CTGCCGAAATTGTAATCAAACAGAAGGTAGAACTGTATCCTAATATGTGTGTGAC
 GAACTTTACCGAATCTGAACAATGGGATACGGTAATAGAGGGAAACGATAACCT
 TTTAGAGAAATATATGTCCGGTAAATCATTAGAAGCATTGGAACCTCGAACAAGA
 GGAAAGCATAAGATTTTCTGAAATTTGTTCTCTGTTCCCTCTTTATCATGGAAGTGCA
 AAAAGTAATATAGGGATTGATAACCTTATAGAAGTTATTACTAATAAATTTTATT
 CATCAACACATCGAGGTCCGTCTGAACTTTGCGGAAATGTTTTCAAAATTGAATA
 TACAAAAAAAAGACAACGTCTTGCATATATACGCCTTTATAGTGGAGTACTACAT
 TTACGAGATTCCGGTTAGAGTATCAGAAAAAGAAAAAATAAAAGTTACAGAAATG
 TATACTTCAATAAATGGTGAATTATGTAAGATTGATAGAGCTTATTCTGGAGAAA
 TTGTTATTTTGCAAAATGAGTTTTTTGAAGTTAAATAGTGTCTTGGAGATACAAA
 ACTATTGCCACAGAGAAAAAAGATTGAAAATCCGCACCCTCTACTACAAACAAC
 TGTTGAACCGAGTAAACCTGAACAGAGAGAAATGTTGCTTGATGCCCTTTTGGAA
 ATCTCAGATAGTGATCCGCTTCTACGATATTACGTGGATTCTACGACACATGAAA
 TTATACTTTCTTTCTTAGGGAAAGTACAAATGGAAGTGATTAGTGCCTGTTGCA
 AGAAAAGTATCATGTGGAGATAGAATAAAAGAGCCTACAGTCATTTATATGGA
 GAGACCGTTAAAAAATGCAGAATATACCATTACATCGAAGTGCCGCCAAATCC
 TTTCTGGGCTTCCATTGGTTTATCTGTATCACCGCTTCCGTTGGGAAGTGGAATGC
 AGTATGAGAGCTCGGTTTCTCTTGATACTTAAATCAATCATTTCAAAATGCAGT
 TATGGAAGGGGTACGCTATGGTTGCGAACAAGGATTATATGGTTGGAATGTGAC
 GGATTGTAAAATCTGTTTTAAGTACGGTTTATACTATAGCCCTGTTAGTACTCCAG
 CAGATTTTTCGGATGCTTACTCCTATTGTACTGGAGCAAGCCTTTAGAAAAGCTGG
 AACAGAATTGTTAGAGCCATATCTTAGTTTTAAAGTTTTATGCACCACAGGAATAT
 CTTTCNCGGGCATATAACGATGCTCCCAAATATTGTGCAAATATCGTAAATACTC
 AACTGAAAAATAATGAGGTCATTATTATTGGAGAAATTCCTGCTCGATGTATTCA
 AGATTATCGCAATGATTTAACTTTTTTTACAAATGGGCTTAGTGTTTGTTTAGCAG
 AGCTAAAAGGATATCAGGTTACCACTGGCGAACCTGTTTGCCAGACCCGCTCGTCT
 AAATAGTCGGATAGATAAAGTAAGATATATGTTCAATAAAATAACTTAGTGCGTT
 TTATGTTGTTATATAAATATGGTTTCTTATTAAATAAGATGAAATATTCTTTAATA
 TAGATTTGAATTAAAGTGGAAGGAGGAGATTGTTATTATAAACTACAAGTGGA
 TATTGTGTCCTATTTGTGGAAATAAAACAAGACTACGAATACGAGTGGATACTAT
 ACTTAAAAATTTCCCTTTATACAGCCCCAAATGTAAGAACGAACTTTAATTAAT
 GTTCAAAAAATGAATATAATAACAATCAAAGAGCCAGACGCCAAGACGCAGAGC
 CGATAATTTGAGAAATGAACTCTCATCTTATCGGCTCTTTTTGTTTATCTGAATT
 TTAAGTACTAGCCTTCAATATTTC

> SEQ ID NO: 6 terA y terB de Ef11 (negrita: ORF de terA, subrayado: ORF de terB)

CTC AATTCAACAAGTATTGTGAGGTGGTGTATATGTCAGATGGATAAAA
 AGGAACAAGCAAAGAAATATTATGAAAAAGGTTGGAAATACAAGGATATTTTC
 CGAAAAGCTTTCTGTACCTCTCAACACATTGAAGTCATGGAGAAAACGTGAT
 AAATGGGAAAAGAGGGGGGTGCAACCAAAGAGGTGCAACCTACAAATAGGGGT
 GCACCTAAAGGTAATCAAAATGCTATAGGCAATAAAGGTAATAGTCGAGCCT
 CGCCACCAAAAAGAAATAAGAATGCTGTAAAACTGGCGAATACGAAACAAT
 ATTTGCCGATATGTTATCTGACGAAGAAAAGGACATCTATTCTACTATGAAT
 GATGATCCTTTTTTTTATTTTGGATGAAGAAATAAGAATCCTGAAAATTCGCC
 AATATAGAATGCTTAAACGCATAAAAGATGCAGAGGCTGGCTTAAATGATGA
 AGAAGTTGAACGTTTGCAGCAGCTTCGCAAAGTTAAAGAGCCATCGGTAATT
 GATGGGAAAATGGTTACTGTTAAGAGAGAAAGTTTTAAAAGATGTACAAGTCA
 CTCGTAAAACATTTAGAAAGTTAGATGACATCCTGGCTATTGAAGATGCGTT
 GACTCGCGTTAGCAATCAATTAATAAAGGCGATTAAAGCAACAAAAAGAATTA
 TTGTCGACAGATAAAAAATCTCTTTTAATGGAGGCTCAAATTGAGAAGATAA
 AGCTTGAGACAGACAAATTAAGTGGCGGATCATCTAACGATGAAGCTGACT
 CTTGGAAACAAGCAGTTATAAATGCAGCAAATAAGCGGGCGGTGGAAGAAA
 ATGAATAAGAGTTTATTCGTTTGGCGATATTGGTGCAGCAATTGATTACTACTA
 CGATAAACAGTTGCTTTTTTGT CAGGATATTTTGCATCTTGATCCAGATGAATGG
 CAGGATAAGGTCTTGGATGATTTGGCTAAATTC CCAAAAAGTCTCAGTTAGATCAG
 GGCAGGGTGTTGGAAAAACGGCGTTGGAGGCTGGTGCTATTCTTTGGTTTCTAAC
 ATGCCGGCCATATGCAAAAGTAATAGCAACTGCTCCGACGATGAAACAATTATA
 CGATGTTCTATGGGCAGAAGTGGCTAAGTGGCTGAATAACAGCTTGATTAAAGA
 CTTACTTAAATGGACCAAGACGAAAATTTATATGGTTGGCGATTCAGAACGATGG
 TTTGCTACAGCTCGAACAGCAACTAAACCAGAAAAATATGCAAGGATTTACAGAA
 GACCATATGTTAATAGTGGTTGATGAAGCATCAGGTGTTGCTGATCCCATTATGG
 AAGCAATATTAGGTACTCTTTCAGGATTTGACAATAAATTACTAATGTGTGGGAA
 CCCCACAATATTGAAGGGGTTTTTTATGATTCCGCATAATACAGATAGAGACAAG
 TATAGAACGCACAAAGTTTCTAGTTACGATAGCAAACGTACTAACAAAGAAAAT
 ATTCAAATGCTCATCGATAAGTATGGTGAGAATAGCGATGTAGCTCGTGTTCGTA
 TTTATGGTGAATTTCCCAAAGGCGCACTTGATTCAATTTATCAGCCTTGAAATTGTT
 GAGTTTGCCAAAGATATTAATATTTCTGATTCAGAATTA AACATGTTAGAGAAG
 GACACATAGGTGTCGATGTGGCTCGTTTTGGTGATGATTCAACGATAGTATTTCC
 TAGAATCGGAGCTAAAGCATTGCCATTTGAAAAATATAGTAAGCAAGATACCAT
 GCAGACCACTGGTCGAGTTTTAAAAGCGGCCGAAAAGGATGATGGATGACTATCC
 TACAATAAAAAAAGTGTTTCATCAAAGTAGATGATACAGGTGTTGGTGGAGGTGT
 TACTGATAGACTTAAAGAAGTAATTAGCGATGAAAAACTTCCCTATGAAGTAATT
 CCGGTAAATAATGGAGAATCTTCTACAGACGATTATTATGCAAATAAAGGAACA
 CAAATATGGGGAGATGTTAAAGAACTGTTAGAACAAAACATTTCCAATTCGATT
 AATGGTCAAGGGCCGACGATAGAACTTCTGATAATGCAAATCTAATCAAAGAA
 TTGAGCACACGTAAATTTAAAATGACTAGCAATGGAAAAATCCGTTTAGAAAGT
 AAAGAAGATATGAAAAAGCGTAATGTTGGCAGTCCAGATATTGCTGATGCGTTA
 ACGTTAGCGTTTTACGAGCCATTTAGACCAGAACCTATAAACGTTAAAAAAGCTA
 TTAATACGTTCAAAAAATTAGGATTAAGTAGGTGATAGAGTGAATAATAAATTAT
 TGAACGGTTCTAGATTTGAT

> SEQ ID NO: 7 repB

GATCTTTTGCCCATTTTATTTTTATAAAATGGGCAGGTGGCGTTTGTGTAA
AGCAAATCGACACAATCCAAAGGGGATAAAAGGGGAAAGTGAAACTTCCCCCTT
TTCAAGCCACATTGTAATACAAGAACGAAGTGTTTTGTATTACAATGTGATAGCT
TGCAGTATTTATGGTTTTATATGGTCTATTTTGTGTGAGGATTGTAACCGAATAG
GGCGCAATGCTTATTACAAAATCAATGACAAAGGGCGATTGAGGAATGAGCGCT
GAGGCATTTTATCTTTGAGTAAGTTATTGATGGATCAGAAAAATGTATCACAAAT
TGAAACAAAGACTCACTCATTTAAGAGAAGCTACTATCATGAAATTTTGTGTG
TGATAAGCAACTTCTAATACACGATTTTATGCCATTACATCACTCGTTTTTAGAGT
GATGTGTAAGTGCGCATTGCACTCTTTTTTTACGAAACAAGCCGACCAGCGTTTG
AAACTTTTTAGTTTTTCATCATTCTATTTTAAAACGTTCTAAAACTCGATTTAAGC
GACTTTAATTCGAAACTGTCTATTTGTTCAAAGGGAGCATTAGAATGCTTAAAC
GAGCTTTTAAGGGGGTTTAAATTGATTTTGAATTGAATAGCTTGTGTAAAGTTGT
AAAAAAAACAAGTTAAACAAAGTATCAGTTTTCCATTTAAGGGTTGTTAGGGCTT
GCCCTGACCGTCTGTAAGACGCTTGATTGCATGATATGAGTATTTAGCTAGTCAA
ACAGTTAAAACAGCTTATATGAGCAATTAGAGGGAATCCAATAAATTCCTAAAA
GCGGTTTTGATCTTTTCTTTTAGCGAGTGAACGCTGCAAGTAAAATGTGAGCGTT
CACTCGCTCACTCCTTTTTTTGATGACTTTGACCTTTGGTTTTAAATTTTTGAAAA
AAATAAAAAATAGGCGAAGCCTATTATATATTTATCTTATATATTTAATCTTTTA
TTCTTTTGCGTCAAAAAAAAAATCAATATTTTCAAGGCTTTATAGAATTATATACC
AACAAAAAACTGTGTATATACCAACAAAAAACTGTGCATACACCAACAAAAAAC
TGTGCATATACCAACTTCTTTGTTTGTTCGTTGGTATATAATGATATAATAAAAG
CATGAAGAATCTCTCTACGAAAAGTGTTTCTTCATGCTTATCTAACTCACTCAC
AAAGGAGCAGTTTTCTatgtctagtatatcaaaaaatgaacctaatcaaaagcaggtgcaaaccttgaacgaattgtcaa
aacgaaaagtagtgaacataattcttaattaccagtaattgcgaaaatggataaaacgccactgaaaatgttgaattagccgtgtctgt
attaataccgaagaaccacccaaagatcatacggtttatctctcaaaagaagaattgttgcctttttaagggtatctgataatgacaaacat
agtcgttttaacaagcagtagagaatatgcaaaaacaagcctttttcaaatgaagaagaagtaggttaaaggattaaatttaggagat
tgttccattccatatgtcgagtggacagattatcatgatgacgtaaaaattgaatttcacgtgaaatcatgccctacttaattaatctaaaa
caaaatttcacgcaacatgcttctgatattgcagagctgaatagcaaaactctattatcttgtaccgttgggtatccatgaattataacc
aatacagcattatagttataagggcggacggagagaagaacaagtgaagcctaccgcaatcctaccatttcaatgcgagaattacg
agaaatgacggatacagttgatgaatacccccgtttagatagattagaacatagagttttaaagaaccaatagaagaaattaacgaaaa
cacctctttaacgtgacgtatgacaagataaaaaaaggacgaagcattgattctattgtctttcatatcacgaaaaaacgtcgagcagat
gataacagctacaagttagaagataaagattatcaatccgacaaaaggagaaaaatcaagaaatgaagctgacttattaaaacaggcaat
ggaaagcaagtacacacgattattgattgaaaactttcttattccctcttgaaatgacggacacggcacttatggcaggtttgcaaaag
aacgtctatccgttgatgacgagftaaaggaattaagaggattgaatgggtcaaagaccactgtcttatatatctagcaaaaaagaag
cctattctaaacgaatgtagcgaagtatctgaaaaagcaatcgagcaatattctacctacgggttaaaaggcaggacttaaacatgagt
gaGAACTT

> SEQ ID NO: 8 pDL278

TGGCGATTCTGAGACCTCTGAGAGGCTCTCAGAGCTATCTAAAGCTGAGG
 GATATATAAATACCTTAGAAAAATTATTCGAAGAGCTTAGAAGCGAAAAATAGAGC
 GTTTAGAGCGCGAGGGGCTGAAATTAGAAAAACTAAAAACACAAATAGCTGACC
 TAAAAATCATGTCTGAGAAAGAACTAGCGGCTATTACCCCTAAAAAAGGCGTGT
 TCGGTAAAGAATATGTGGAATTGACTAAAGAGCAGTTTGAAGAATTTAAAGGGC
 TGATATACCGAAGCAGAAACCTTGTTTCATCAAAAAGAGCTAGAGAATGAGCAAT
 TAAGGCGGATAGTGCCTCTGAGACGCTCTAAACGTTTGAAGCGAGTTGGAACG
 AGCTAAAGAAAAAAGTAAGGGAGAGAGCATAGAGCGTCTTAGGAACGAAAAATA
 GAGCGCTTAGAAGTGAAAACTCAGTTTTGAGACAGCAAAATGACAAAATGCTAG
 GAAAACTGAAAGAGTTTATGCCAGATAAAGCCTTAAAAAATTTTATATCAGAGTT
 AAGAGCTATTCAGCCAATCGTAAGGGTAGTTAAACGAGTGATTGAAAAAGGGCT
 AGGCCTTTGAGCGATTTATGCCGTGAAAGCTAATTGACAATAAGCAAGGGCAAA
 GTACGCTAGGACGTGACGAGCCGAAAGGCTTTAGCGTTTCGAGCCGACACGGAC
 AAAGGACGTCCGCCCTTGGTTACTTGTTGTCAATTAGACCATGGAATAAAGTAAG
 CGGACATGGTATAATAGCTAGGTCGCAACGTTCTTTTCGCTAAGTTACGAACTTAG
 ATTGGAGGTGAGCGCTGTGAAGACTTTCCTAGAACTTGTTTTGATACCTTTTGTG
 GTTGGCGTTGCTGCAGAGGTAAGTGCTGATTGGTTGATTTCGGTATGTTTCGAAACA
 AACGCGACAAAAATTAACCTGAGTTCTTTTTGAGGACAAAAAAGAAAGACAGTA
 GTTCCAGCTACTGTTTTTTTTGCGTTGTGCTATTCGTTTCCTAGAACTTCTAGCGTT
 AAAATTATTATACCACGTTTGGATTTAGAAAGTCAAAATTTGAGGTTTTAGGGGT
 GAATTTTTTCGTGAAACGAAAAAGAGGGCTGAAAAGCCCTTAAAAACCCAATTGC
 GTAGCAAGGGTTTTTTCTTATCTTGATACATATAGAAATAATGAGTTTTTTTATTT
 TCTTGTTTTAAAGCACCTCAAACCCTTGATATTGCTGGGTTTTTAGGTAACAAAA
 AAGCCCTTGCAATTTAATAAAATAAAGTTTATAATTTAAGTGTTCAATTTAAAT
 AATAAACTTAGGAGAATTGCAGGAACTTTTTATATACTCAAAAAAATTTTTTTG
 CAAGAAAATTATAACATGACAGGTACTGAAAATCAAGTCTTTAAGGACTATTCTA
 AGAATGGCAAAGATAGAAAGTGCGGAGAACGCAAGTTAAAAAATATTGAGCTTG
 CTGGTCGTTTAGAGCGTTTAGGATATCGTTTCGTTTGAACGGGTCTATCAATGTGC
 CGAAGTGTTGAAGTTTATCGAACAACAAGACGGCACGAAAAAACTCTATCAGTC
 TTATTTTTGCAAAAATAAGCTCTGCCCAATTTGTAACCTGGAGACGGTCAatgaagtatg
 cttatcaagctgaattagtgtgtaaatagaacgaatgaacgctatccaaaagtcgctttctcttttgaccttgacgattaagaacattagt
 gtgaaaaatfaataaatcaatttcagaaatagggcgagcttttaatecgtcttatgaaatacaagaaagtcgataaaaatgttattggctatt
 tgcgagccactgaggttaacttattcaactgagcatgagaattatcacctcatttgcatgtattgttattgtgaaatctagctattttactgga
 aataatacaaaattacatttagccaagaagaatggacgaaactatgggctaaggcgatgaaattggattatacacctgtagttgatattcga
 accgtcaaagctcataaacgtaaaaactgaagtcagctattatcgaaacagctaaatactctgttaagccttttgatgtagatacagaag
 atgtgacattattctctgaaatggcgaagaacggataacagaagatttaacgaatggttgcaccgaaaaaggcagattggttttgaa
 agttgttcaagaaaaatcaaggcgagtttagctcttgatgatgtcgaagaagggaatctgttcagaccggagcagaagaatctgcaga
 aagtactggctgtgaaattgttgccttttggaattgggatagaagaattttgtgaggttagCTGATGAGTAAACAGT
 ATCAGAATTAGCTCAAGAATTGGGAGTTAGTAGGCAGTATCTTAATCGGATTTTA
 TCGCAAAAATAATCTCGGTTCGAAAAAAGGGAATAAAAAAAGTAGTTTCCGATATG
 GACGAGAAAGTTATGCAAGGGTTTATTGTTTTCTAAATCTGATTACCAATTAGA
 ATGAATATTTCCCAAATATTAAATAATAAAACAAAAAAATTGAAAAAAGTGTTT
 CCACCATTTTTTCAATTTTTT

> SEQ ID NO: 9 promotor de nisina

5

AAACAGTCTTAATTCTATCTTGAGAAAGTATTGGTAATAATATTATTGTGCG
 ATAACGCGAGCATAATAAACGGCTCTGATTAAATTCTGAAGTTTGTTAGATACAA
 TGATTTTCGTTTCGAAGGAACACAAAATAAATTATAAGGAGGCACTCAAA

> SEQ ID NO: 10 alteración del sitio pac y del gen pacA con kanR (sin formato: secuencia del gen pacA,

subrayado: secuencia del gen *pacA* incluida en el sustrato de intercambio alélico, negrita: promotor del gen *kan*, cursiva: gen *kan*)

ACGATCACAAAGAAGAATTTTGCTCGCCTGGCGCGAGATGGTGGTTACACC
ATCGCACAGTATGCCGCCGAGTTTAATCTTAACCCTAATACCGCACGTCGTTATC
TCCGTGCCTTCAAAGAAGACACCAGGACTACGGACAGCCGCAAGCCAAATAAGC
CAGTCAGGAAGCCGGAATTGCCAGCTGGGGCGCCCTCTGGTAAGGTTGGGA
AGCCCTGCAAAGTAAACTGGATGGCTTTCTCGCCGCCAAGGATCTGATGGC
GCAGGGGATCAAGCTCTGATCAAGAGACAGGATGAGGATCGTTTCGCATGAT
TGAACAAGATGGATTGCACGCAGGTTCTCCGGCCGCTTGGGTGGAGAGGCTATTTCGG
CTATGACTGGGACACAACAGACAATCGGCTGCTCTGATGCCGCCGTGTTCCGGCTGTCA
GCGCAGGGGGCGCCCGGTTCTTTTTGTCAAGACCGACCTGTCCGGTGCCCTGAATGAA
CTGCAAGACGAGGCAGCGCGGCTATCGTGGCTGGCCACGACGGGCGTTCCTTGCGC
AGCTGTGCTCGACGTTGTCACTGAAGCGGGAAGGGACTGGCTGCTATTGGGCGAAGT
GCCGGGGCAGGATCTCCTGTCATCTCACCTTGCTCCTGCCGAGAAAGTATCCATCATG
GCTGATGCAATGCGGCGGCTGCATACGCTTGATCCGGCTACCTGCCCATTCGACCAC
CAAGCGAAACATCGCATCGAGCGAGCACGTACTCGGATGGAAGCCGGTCTTGTCGAT
CAGGATGATCTGGACGAAGAGCATCAGGGGCTCGCGCCAGCCGAACCTGTTCCGCCAGG
CTCAAGGCGAGCATGCCCGACGGCGAGGATCTCGTCGTGACCCATGGCGATGCCTGC
TTGCCGAATATCATGGTGGAAAATGGCCGCTTTTCTGGATTATCGACTGTGGCCGGC
TGGGTGTGGCGGACCGCTATCAGGACATAGCGTTGGCTACCCGTGATATTGCTGAAGA
GCTTGGCGGCGAATGGGCTGACCGCTTCCTCGTGCTTTACGGTATCGCCGCTCCCGA
TTTCGACGCGCATCGCCTTCTATCGCCTTCTTGACGAGTTCTTCTGAGCCCACCGGACC
TTACGTGATCGCCTGGAACGCGACACCCTGGATGATGATGGTGAACGCTTTGAAT
TCGAAGTTGGCGATTACCTGATAGATAACGTTGAAGCGCGGAAGGCCGCGCGCG
CTATGTTGCGTCGGTCCGGGGCCGATGTTCTGGAAACCACTCTTCTGGAAAAGTC
TCTTTCTCATCTCCTTATGCTGGAGAAC

5

> SEQ ID NO: 11 promotor Pblast

CGTCAGGTGGCACTTTTCGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTATT
TTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCCTGATAAATGC
TTCAATAATATTGAAAAGGAAGAGT

10

> SEQ ID NO: 12 locus del gen *pacA* de P1 con el gen *kan* y los genes *luxAB* insertados (en minúscula es la secuencia natural, en mayúscula es la secuencia de inserción)

atgtgacttttcggttacccctcgcggtcaaaaagagtttttacgaaaggaagcataagtg
 acctgggacgatcacaagaagaatttttgctcgctggcgcgagatggtggttacaccatcgc
 acagtatgcccgcgagtttaattcttaaccctaataccgcacgtcggttatctccgtgccttca
 aagaagacaccaggactacggacagccgcaagccaaataagccagtcaggaagAAGAGAAAG
 CAGGTAGCTTGCAGTGGGCTTACATGGCGATAGCTAGACTGGGCGGTTTTATGGACAGCAAG
 CGAACCGBAATTGCCAGCTGGGGCGCCCTCTGGTAAGGTTGGGAAGCCCTGCAAAGTAAACT
 GGATGGCTTTCTTGCCGCCAAGGATCTGATGGCGCAGGGGATCAAGATCTGATCAAGAGACA
 GGATGAGGATCGTTTTGCGATGATTGAACAAGATGGATTGCACGCAGGTTCTCCGGCCGCTTG
 GGTGGAGAGGCTATTTCGGCTATGACTGGGCACAACAGACAATCGGCTGCTCTGATGCCGCCG
 GTTCCGGCTGTCAGCGCAGGGGCGCCCGGTTCTTTTTGTCAAGACCGACCTGTCCGGTGCC
 CTGAATGAACTGCAGGACGAGGCAGCGCGGCTATCGTGGCTGGCCACGACGGGCGTTCTCTTG
 CGCAGCTGTGCTCGACGTTGTCACTGAAGCGGGAAGGGACTGGCTGCTATTGGGCGAAGTGC
 CGGGGCAGGATCTCCTGTCTATCCACCTTGCTCCTGCCGAGAAAGTATCCATCATGGCTGAT
 GCAATGCGGCGGCTGCATACGCTTGATCCGGCTACCTGCCCATTCGACCACCAAGCGAAACA
 TCGCATCGAGCGAGCACGTACTCGGATGGAAGCCGGTCTTGTCGATCAGGATGATCTGGACG
 AAGAGCATCAGGGGCTCGCGCCAGCCGAACTGTTCCGCGAGGCTCAAGGCGCGCATGCCCGAC
 GGCGAGGATCTCGTCGTGACCCATGGCGATGCCTGCTTGCCGAATATCATGGTGGAAAATGG
 CCGCTTTTCTGGATTTCATCGACTGTGGCCGGCTGGGTGTGGCGGACCGCTATCAGGACATAG
 CGTTGGCTACCCGTGATATTGCTGAAGAGCTTGCGCGCGAATGGGCTGACCGCTTCTCTCGTG
 CTTTACGGTATCGCCGCTCCCGATTTCGAGCGCATCGCCTTCTATCGCCTTCTTGACGAGTT
 CTTCTGAATTGAAAAAGGAAGAGTATGAGTATTCAACATTTCCGTGTGCGCCCTTATTCCCTT
 TTTTGCGGCATTTTGCCCTTCTGTTTTTGCTCACCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAAGATG
 CTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGATC
 CTTGAGAGTTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATG
 TGGCGCGGTATTATCCCGTATTGACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTCGCCGCATACACTATT
 CTCAGAATGACTTGTTGAGTACTCGTCAGGTGGCACTTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAACC
 CCTATTTGTTTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCCTG
 ATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTATGAAGTTTGGAATATTTGTTTTTCGT
 ATCAACCACCAGGTGAAACTCATAAGCAAGTAATGGATCGCTTTGTTCCGCTTGTTATCGCC
 TCAGAAGAGGTAGGGTTTGATACATATTGGACCTTAGAACATCATTTTACAGAGTTTGGTCT
 TACGGGAAATTTATTTGTTGCTGCGGCTAACCTGTTAGGAAGAACTAAAACATTAAATGTTG
 GCACTATGGGGGTTGTTATTCCGACAGCACACCCAGTTCGACAGTTAGAAGACGTTTTTATTA
 TTAGATCAAATGTGCAAAGGTCGTTTTTAATTTTGAACCGTTCGAGGGCTATACCATAAAGA
 TTTTCGAGTATTTGGTGTGATATGGAAGAGTCTCGAGCAATTACTCAAATTTCTACCAGA
 TGATAATGGAAGCTTACAGACAGGAACCATTAGCTCTGATAGTGATTACATTCAATTTCTCT
 AAGGTTGATGTATATCCCAAAGTGTACTCAAAAAATGTACCAACCTGTATGACTGCTGAGTC
 CGCAAGTACGACAGAATGGCTAGCAATACAAGGGCTACCAATGGTTCTTAGTTGGATTATTG
 GTACTAATGAAAAAAAAGCACAGATGGAACCTCTATAATGAAATTGCGACAGAATATGGTCAT
 GATATATCTAAAATAGATCATTGTATGACTTATATTTGTTCTGTTGATGATGATGCACAAAA
 GGCGCAAGATGTTTGTGCGGAGTTTCTGAAAAATTGGTATGACTCATATGTAAATGCGACCA
 ATATCTTTAATGATAGCAATCAAACCTCGTGGTTATGATTATCATAAAGGTCAATGGCGTGAT
 TTTGTTTTTACAAGGACATACAAACACCAATCGACGTGTTGATTATAGCAATGGTATTAACCC
 TGTAGGCACTCCTGAGCAGTGATTGAAATCATTCAACGTGATATTGATGCAACGGGTATTA
 CAAACATTACATGCGGATTTGAAGCTAATGGAACCTGAAGATGAAATAATTGCTTCCATGCGA
 CGCTTTATGACACAAGTCGCTCCTTTCTTAAAAGAACCTAAATAAAATTACTTATTTGATACT
 AGAGATAATAAGGAACAAGTTATGAAATTTGGATTATTTTTTCTAAACTTTTCAGAAAGATGG
 AATAACATCTGANGAAACGTTGGATAATATGGTAAAGACTGTCACGTTAATTGATTCAACTA
 AATATCATTTTAATACTGCCTTTGTTAATGAACATCACTTTTCAAAAAATGGTATTGTTGGA
 GCACCTATTACCGCAGCTGGTTTTTTTATTAGGGTTAACAAATAAATTACATATTGGTTTATT
 AAATCAAGTAATTACCACCCATCACCTGTACGTGTAGCAGAAGAAGCCAGTTTATTAGATC

AAATGTCAGAGGGACGCTTCATTCTTGGTTTTAGTGACTGCGAAAGTGATTTTCGAAATGGAA
 TTTTTTAGACGTCATATCTCATCAAGGCAACAACAATTTGAAGCATGCTATGAAATAAATTA
 TGACGCATTAACACTACAGGTTATTGTCATCCCCAAAACGACTTTTATGATTTTCCAAAGGTTT
 CAATTAATCCACACTGTTACAGTGAGAATGGACCTAAGCAATATGTATCCGCTACATCAAAA
 GAAGTCGTCATGTGGGCAGCGAAAAAGGCCTGCTTTAACAATTTAAGTGGGAGGATAATTT
 AGAAACCAAAGAACGCTATGCAATTCTATATAATAAAACAGCACACAATATGGTATTGATA
 TTTTCGGATGTTGATCATCAATTAACCTGTAATTGCGAACTTAAATGCTGATAGAAGTACGGCT
 CAAGAAGAAGTGAGAGAATACTTAAAAGACTATATCACTGAAACTTACCCTCAAATGGACAG
 AGATGAAAAAATTAACCTGCATTATTGAAGAGAATGCAGTTGGGTCTCATGATGACTATTATG
 AATCGACAAAATTAGCAGTGGA AAAACAGGGTCTAAAAATATTTTATTATCCTTTGAATCA
 ATGTCCGATATTTAAAGATGTAAAAGATATTATTGATATGTTGAACCAAAAAATCGAAATGAA
 TTTACCATAAAGTACTCACCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGgcccaccggacctta
 cgtgatcgctggaacgcgacaccctggatgatgatggggaacgctttgaattcgaagttgg
 cgattacctgatagataacggtgaagcgcggaaggccgcgcgcgctatggtgcgctcggtcg
 gggccgatggttctggaaccactcttctggaaggtctcttctcatctccttatgctggag
 aacgccagggatacgtgtattcgctggtgcaggaaatgcgcgatcgcaaaaagacgatga
 tgaaggtactccgctgaataccgtatcgcgagcatgctaaacagctgttccgcgcagataa
 gcagcctgatcaacaccatttacagcatccggaataactatcgaaaagaaagccgggaggcg
 gaaaagcacgctttatctatggggcaagctggcattgttaagctggcatacgaacgaaagcg
 tgaataaactggtcagtgctggaagcggctgaattcatcgaggcgcatggaggaaaagtgc
 cgccccgatgctggagcaaatcaaagccgatctgcgtgctcctaagaccaataccgatgat
 gaggaaaaccaaacagcatctggcgctccatcacttgaagatctggataaaatcgcgcgaga
 acggggccgcccagccgcccgcgctgatgccgcattgtggattgagcatcgtagagaagaaattg
 ccgatatcgctcgatacaggtggttatggtgatgtcgatgcggaaggcatatcaaacgaagca
 tggcttgaaacaggatctggacgaagacgaggaggaagacgaagaagttaccgcgaaactgta
 cgggggatgatgattaatggccagaagttgcgtaacggaccacgcttggcgcgagcttgtggc
 gctatatcgttatgactggattgcgggccgctgatgtgtgtgttgggaagacaccaacctggc
 agcaggatgagatcattgagtcacgcagcaggacggcagttggacaagtgtagacctccggc
 catggtactggtaaatcggatatgacgagtatcattgcaatactcttcatcatgtttttccc
 cggcgctcgcgctcattctggctcgctaacaaaagacagcaagtccttgatggatattttcaaat
 acataaagagcaattgggctactgctgttagcagattcccgtgggtgtcgaaagtatttcatt
 cttacagaaacgtctttttttgaggtgactggcaaggggtgttggacaatattgataaagtc
 ctgtcgtcccggaaatgaggaggcggttggctggtgaacacgccgatcatctcttgtatatca
 tcgacgaagcgtcgggtgtgagtgataaagcattcagtggtgataacaggtgcgctgaccggt
 aaggataaccgtattctgcttcttcccagcctacgcgaccttcaggctatttctacgatcc
 acaccacagactagctattcgcccgggaaatcctgatggattgtttactgcgataatactga
 atagtgaagaatctccgctttagatgcaaaatttatacagagcaaaaacttgcggagtatggc
 ggtcgtgataaccccatgtacatgatcaaagtacgtggtgaatttcccaaactcaagatgg
 ctttcttcttggctcgtgatgaggttgagcgggcgacgcggcgaaaggtcaagattgccaaag
 gatggggctgggttgcatgtgttgacgttgctgggtggcacaggacgagataagtcggttatt
 aatatcatgatggtgtccggccagcgaaataaacgccgtgtaatcaactatcgtatgctgga
 atacacagacgttacagaaacgcagttagccgccaagattttcgcagaatgtaaccagaaac
 ggttcccgaacataaccatagctattgatggcgatggcttggggaaatcgacggctgatcta
 atgtacgaacgctatggcattaccgtccagcgtatccgctggggtaaaaagatgcacagccg
 tgaagataaaaagcctttatttcgatatgcgcgcttccgcgaatattcaggcggcagaagctg
 taaaatcaggcgtatgaggcttgataagggggctgcgactatagaggaagcatcaaagata
 ccggtagggataaattccgcaggtcaatggaaggtgatgtcaaaggaagatatgaagaaaaa
 actcaacctgcactcaccggaccattgggatacatattgtttcgctatgttggcgaactatg
 tccccaagatgaagtgcttagcgtcgaagacgaagcgcaggttgatgaagctctggcatgg
 cttaatgaataa

LISTADO DE SECUENCIAS

	<110>	GENEWEAVE BIOSCIENCES, INC.
5	<120>	PARTÍCULAS DE TRANSDUCCIÓN NO REPLICATIVAS Y SISTEMAS INDICADORES BASADOS EN PARTÍCULAS DE TRANSDUCCIÓN
	<130>	28421-29681/PCT
10	<140> <141>	
	<150>	62/202.653
	<151>	07/08/2015
15	<150>	62/041.539
	<151>	25/08/2014
	<160>	12
20	<170>	PatentIn versión 3.5
	<210>	1
	<211>	2733
25	<212>	ADN
	<213>	Desconocido
	<220>	
	<223>	Descripción de desconocido: Secuencia del bacteriófago P1 de <i>Enterobacteriaceae</i>
30	<400>	1

```

atgtgacttt cgttaccctc gcgtcaaaaa gagtttttac gaaaggaagc ataagtgacc      60
tgggacgatc acaagaagaa ttttgctcgc ctggcgcgag atggtggtta caccatcgca      120
cagtatgccg ccgagtttaa tcttaaccct aataccgcac gtcgttatct ccgtgccttc      180
aaagaagaca ccaggactac ggacagccgc aagccaaata agccagtcag gaagccacta      240
aaaagcatga tcattgatca ctctaattgat caacatgcag gtgatcacat tgcggctgaa      300
atagcggaaa aacaaagagt taatgccgtt gtcagtgccg cagtcgagaa tgcgaagcgc      360
caaaataagc gcataaatga tcgttcagat gatcatgacg tgatcaccog cggccaccgg      420
accttacgtg atcgccctgga acgcgacacc ctggatgatg atggtgaacg ctttgaattc      480
gaagttggcg attacctgat agataacgtt gaagcgcgga aggccgcgcg cgctatgttg      540
cgtcgggtccg gggccgatgt tctggaaacc actcttcttg aaaagtctct ttctcatctc      600
cttatgctgg agaacgccag ggatacgtgt attcgcctgg tgcaggaaat gcgcgatcag      660
caaaaagacg atgatgaagg tactccgcct gaataccgta tcgcgagcat gctaaacagc      720
tgttccgcgc agataagcag cctgatcaac accatttaca gcatccggaa taactatcga      780
aaagaaagcc gggaggcgga aaagcacgct ttatctatgg ggcaagctgg cattgttaag      840
ctggcatacg aacgaaagcg tgaaaataac tggtcagtgc tggaagcggc tgaattcatc      900
gaggcgcatg gaggaaaagt gccgcccctg atgctggagc aaatcaaagc cgatctgcgt      960

```

ES 2 778 727 T3

gctcctaaga ccaataccga tgatgaggaa aaccaaacag catctggcgc tccatcaactt 1020
gaagatctgg ataaaatcgc gcgagaacgg gccgccagcc gccgcgctga tgccgcattg 1080
tggattgagc atcgtagaga agaaattgcc gatatcgtcg atacagggtgg ttatggtgat 1140
gtcgatgcgg aaggcatatc aaacgaagca tggcttgaac aggatctgga cgaagacgag 1200
gaggaagacg aagaagttac ccgcaaactg tacgggggatg atgattaaat ggccagaagt 1260
tgcgtaacgg acccacgttg gcgcgagctt gtggcgctat atcgttatga ctggattgcg 1320
gccgctgatg tgttgttttg gaagacacca acctggcagc aggatgagat cattgagtcc 1380
acgcagcagg acggcagttg gacaagtgtg acctccggcc atggtactgg taaatcggat 1440
atgacgagta tcattgcaat actcttcac atgtttttcc ccggcgctcg cgtcattctg 1500
gtcgctaaca aaagacagca agtccttgat ggtattttca aatacataaa gagcaattgg 1560
gctactgctg ttagcagatt ccogtggttg tcgaagtatt tcattcttac agaaacgtct 1620
ttttttgagg tgactggcaa ggggtgtttg acaatattga taaagtctcg tcgtcccgga 1680
aatgaggagg cgttggctgg tgaacacgcc gatcatctct tgtatatcat cgacgaagcg 1740
tcgggtgtga gtgataaagc attcagtgtg ataacagggt cgctgaccgg taaggataac 1800
cgtattctgc ttctttccca gcctacgcga ccttcaggct atttctacga ttcacaccac 1860
agactagcta ttgcgccggg aaatcctgat ggattgttta ctgcgataat actgaatagt 1920
gaagaatctc cgcttgtaga tgcaaaattt atacgagcaa aacttgcgga gtatggcggg 1980
cgtgataacc ccatgtacat gatcaaagta cgtggtgaat ttcccaaata tcaagatggc 2040
tttcttcttg gtcgtgatga ggttgagcgg gcgacgcggc gaaagggtcaa gattgcaaaa 2100
ggatggggct gggttgcatg tgttgacgtt gctggtggca caggacgaga taagtccgtt 2160
attaatatca tgatggtgtc cggccagcga aataaacgcc gtgtaatcaa ctatcgatg 2220
ctggaataca cagacgttac agaaacgcag ttagccgcca agattttcgc agaattgaac 2280
ccagaacggg tcccgaacat aaccatagct attgatggcg atggcttggg gaaatcgacg 2340
gctgatctaa tgtacgaacg ctatggcatt accgtccagc gtatccgctg gggtaaaaag 2400
atgcacagcc gtgaagataa aagcctttat ttogatatgc gcgctttcgc gaatattcag 2460
gcggcagaag ctgtaaaatc agggcgtatg aggcttgata agggggctgc gactatagag 2520
gaagcatcaa agataccggg agggataaat tccgcaggtc aatggaagggt gatgtcaaag 2580
gaagatatga agaaaaaact caacctgcac tcaccggacc attgggatac atattgtttc 2640
gctatgttgg cgaactatgt tcccgaagat gaagtgttta gcgtcgaaga cgaagcgag 2700
gttgatgaag ctctggcatg gcttaatgaa taa 2733

<210> 2

- 5 <211> 1727
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>

- 10 <223> Descripción de secuencia artificial: Polinucleótido sintético

<400> 2

cactataggg	cgaattggcg	gaaggccgctc	aaggccgcat	ttgggcccgg	cgcgccggat	60
ccgctagctc	tagactggca	ggtttctgag	cagatcgtec	aaccgatct	ggatcgggtc	120
agaaaaattt	gctctaataa	atttcgtttt	ctaagtgcga	agaatcacca	tttcgagctg	180
gtgattgaag	gttgatgcaa	atttgagaaa	aaaatgcaac	aaacattcaa	tgcggatatg	240
aatatatcaa	accttcatca	aaatgtcgat	ccttcaacca	ctctgcccgt	tatttgtggt	300
gttgaaatta	cgaccgaccg	cgctggccgt	tacaacctta	atgctctaca	cagagcgagc	360
ggactcgggtg	cccataaagc	gccagctcaa	tggctaagaa	cgctgtcagc	taaacagctc	420
atcgaagagc	ttgaaaaaga	aactatgcag	aattgcatag	tttcgttcac	aagcaatgga	480
agcaggattt	ctttcacgac	tcgtataacc	ggcaaaggctc	agcagtggct	gatgaagcga	540
ttgcttgatg	ctgggtgtgt	ggtagctgtc	gcggaacgc	gctaacagac	gtagtaagaa	600
ccaccagcat	tgtaatgctg	gctaaagtca	ctttcctgag	ctgtataacg	atgagcgatt	660
ttactttttc	tggctatgaa	ttggcctgtc	ttgtaacaca	ctccggtcta	tcccgtagcg	720
ccgggcatat	cctgtcgcaa	tgtgcaaata	tcgcggcaac	aaccagtga	tacttcattc	780
acaagcctca	ccgcctgata	gcggcagaaa	ctgggttatag	ccaatcaacc	gtcgttcgtg	840
cattccgtga	agctgtaaac	aaaggaattc	tgtctgtaga	gattgttatc	ggcgatcacc	900
gtgaacgtcg	cgctaacctg	taccggttta	caccatcctt	tttggccttc	gcacaacaag	960
ccaaaaatgc	gctgatagaa	agcaaattaa	agatctcttc	agcggcaacc	aaggttaaag	1020
ctgttctcgc	taagacattg	gctttattta	attttttatc	cacaccccca	tgtcaaaatg	1080
atacccctc	cccctgtcag	gatgacgtgg	caataaagaa	taagaagtca	caagttaaaa	1140
aaacaaaaag	atcagtttcc	ggcgggtccg	gaacaaccag	cctcaaaaaa	ttgacttcat	1200
ggatcgctaa	ggcaaaagca	aaggctgaca	atctgcgggt	atccaaaaaa	cgactcaaaa	1260
aacatgagtt	caagcagaaa	gtagaggcgg	ctgcgcggaa	atatgcttac	ctgaagaaca	1320
agcgttcgcc	tgatattggc	gggatatcaa	acttcgataa	cctaccgcat	tgcattgacg	1380
taaacgaagc	tcttaatgcg	gttttagcca	aaaataaaga	taacgaacaa	tggggtatac	1440
cggcaggatt	cagagggtaa	tgaattgctc	taattataac	catgcatact	ttcaaacact	1500
ctagtttgcc	atgaggcaaa	ctcatagggtg	tcctggtaag	aggacactgt	tgccaaaact	1560
ggacgcccc	ttattgcaat	taataaacia	ctaacggaca	attctacct	acaataagt	1620
gcttaaaaa	acccgcccc	gcggttttt	ttatctagag	ctagcggatc	cggcgcgcg	1680
5	ggcccttctg	ggcctcatgg	gccttccgct	cactgcccgc	tttccag	1727

<210> 3

<211> 773

<212> ADN

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Polinucleótido sintético

15 <400> 3

ES 2 778 727 T3

```

ttgactgccca ctttttacgca acgcataatt gttgtcgcgc tgccgaaaag ttgcagctga      60
ttgcgcgatgg tgccgcaacc gtgcggcacc cctaccgcat ggagataagc atggccacgc      120
agtccagaga aatcggcatt caagccaaga acaagcccgg tctactgggtg caaacggaac      180
gcaaagcgca tgagggcgtgg gccgggctta ttgcgaggaa acccacggcg gcaatgctgc      240
tgcatcacct cgtggcgag atggggcacc agaacgccgt ggtggtcagc cagaagacac      300
tttccaagct catcggacgt tctttgcgga cgggtccaata cgcagtcaag gacttggtgg      360
ccgagcgctg gatctccgtc gtgaagctca acggccccgg caccgtgtcg gcctacgtgg      420
tcaatgaccg cgtggcggtg ggccagcccc gcgaccagtt gcgcctgtcg gtgttcagtg      480
ccgccgtggt ggttgatcac gacgaccagg acgaatcgtt gttggggcat ggcgacctgc      540
gccgcatccc gacctgtat ccgggcgagc agcaactacc gaccggcccc ggcgaggagc      600
cgcccagcca gcccggcatt ccgggcgatg aaccagacct gccagccttg accgaaacgg      660
aggaatggga acggcgcggg cagcagcgcc tgccgatgcc cgatgagccg tgttttctgg      720
acgatggcga gccgttgag ccgccgacac gggtcacgct gccgcgccgg tag              773

```

5 <210> 4
 <211> 1785
 <212> ADN
 <213> Desconocido

10 <220>
 <223> Descripción de desconocido: Secuencia del bacteriófago P1 de *Enterobacteriaceae*
 <400> 4

```

ttttaaaaag cgtatagcgc gagagttggt ggtaaatgaa atgaacgaaa aaaaaagag      60
attcgagat gaatatataa tgaatggatg taatggtaaa aaagcagcaa tttcagcagg      120
ttatagtaag aaaacagcag agtcttttagc aagtcgattg ttaagaaatg ttaatgtttc      180
ggaatatatt aaagaacgat tagaacagat acaagaagag cgtttaatga gcattacaga      240
agcttttagcg ttatctgctt ctattgctag aggagaacct caagaggctt acagtaagaa      300
atatgaccat ttaaacgatg aagtggaaaa agaggttact tacacaatca caccaacttt      360

```

tgaagagcgt cagagatcta ttgaccacat actaaaagtt catggtgcgt atatcgacaa 420
aaaagaaatt actcagaaga atattgagat taatattggt gagtacgatg acgaaagtta 480
aattaaactt taacaaacca tctaattgtt tcaacagaaa catattcgaa atactaacca 540
attacgataa cttcactgaa gtacattacg gtggaggttc gagtggttaag tctcacggcg 600
ttatacaaaa agttgtactt aaagcattgc aagactggaa atatcctagg cgtatactat 660
ggcttagaaa agtccaatca acaattaaag atagtttatt cgaagatgtc aaagattgtt 720
tgataaaactt cgggtatttg gacatgtgcc tttggaataa gactgataac aaagttgaat 780
tgccaaacgg cgcagttttt ttgtttaaag gattagataa cccagagaaa ataaagtcga 840
taaaaggcat atcagacata gtcattggaag aagcgtctga attcacacta aatgattaca 900
cgcaattaac gttgcgtttg agggagcgt aacacgtgaa taagcaaata tttttgatgt 960
ttaaccagat atctaaactg aattgggttt ataagtattt ctttgaacat ggtgaaccaa 1020
tggaataatgt catgattaga caatctagtt atcgagataa taagtttctt gatgaaatga 1080
cacgacaaaa cttagagttg ttagcaaatc gtaatccagc atattacaaa atttatgcgt 1140
taggtgaatt ttctacacta gacaaattgg ttttccctaa gtatgaaaaa cgtttaataa 1200
ataaagatga gttaagacat ttaccttctt attttggtt ggactttggc tacgttaatg 1260
atcctagttc ttttatacat tctaaaatag atgtaaagaa aaagaagtta tacatcattg 1320
aagagtatgt taaacaagg atgctgaatg atgaaatagc taatgtcata aagcaacttg 1380
gttatgctaa agaagaaatt acagcagata gtgcagaaca aaaaagtata gctgaattaa 1440
ggaatctagg gcttaaaagg attttaccaa ccaaaaaagg gaagggtctg gttgtacaag 1500
ggttacaatt cttaatgcaa tttgaaatca ttgttgatga acgttggttc aagactattg 1560
aagagtttga caactacaca tggcaaaagg acaaagatac aggtgaatat accaatgaac 1620
cagtagatac atacaatcat tgtatcgatt cgttgcgtta ttcagtggaa cgattctaca 1680
gaccggttag aaaacgcaca aatgtcagtt cgaaagtga cacaataaaa tctctaggat 1740
tataggaggg aacaaatgtt aaaagtaaac gaatttgaaa cagat 1785

<210> 5
<211> 4681
5 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
10 <223> Descripción de secuencia artificial: Polinucleótido sintético

<220>
<221> base_modificada
<222> (301) .. (301)
15 <223> a, c, t, g, desconocida u otras

<220>
<221> base_modificada
<222> (4056) .. (4056)
20 <223> a, c, t, g, desconocida u otras

<400> 5

ES 2 778 727 T3

tttgcggaaa gagttagtaa gttaacagaa gacgagccaa acctaaatgg tttagcagga	60
aacttagata aaaaaatgaa tccagaatta tattcagaac aggaacagca acaagagcaa	120
caaaagaatc aaaaacgaga tagaggtatg cacttataga acatgcattt atgccgagaa	180
aacttattgg ttggaatggg ctatgtgtta gctaacttgt tagcgagttg gttggacttg	240
aattgggatt aatcccaaga aagtaccggc tcaacaaccc ataaagccct gtaggttccg	300
nccaataagg aaattggaat aaagcaataa aaggagttga agaaatgaaa ttcagagaag	360
cctttgagaa ttttataaca agtaagtatg tacttggtgt tttagtagtc ttaactgttt	420
accagataat acaaatgctt aaataaaaaa agacttgatc tgattagacc aaatcctttg	480
atagtgttat attaataaca aaataaaaag gagtcgctca cgccctacca aagtttgtga	540
acgacatcat tcaaagaaaa aaacactgag ttgtttttat aatcctgtat atttagatat	600
taaacgatat ttaaataatac atcaagatat atatttgggt gagcgattac ttaaacgaaa	660
ttgagattaa ggagtcgatt ttttatgtat aaaaacaatc atgcaaatca ttcaaatcat	720
ttggaaaatc acgatttaga caatttttct aaaaccggct actctaatag ccggttgga	780
gcacatactg tgtgcatatc tgatccaaaa ttaagttttg atgcaatgac gatcgttgga	840
aatctcaacc gagacaacgc tcaggccctt tctaaattta tgagtgtaga gccccaaata	900
agactttggg atattcttca aacaaagttt aaagctaaag cacttcaaga aaaagtttat	960
attgaatatg acaaagtga agcagatagt tgggatagac gtaatatgag tattgaattt	1020
aatccaaaca aacttacacg agatgaaatg atttggttaa aacaaaatat aataagctac	1080
atggaagatg acggttttac aagattagat ttagcctttg attttgaaga tgatttgagt	1140
gactactatg caatgtctga taaagcagtt aagaaaacta ttttttatgg tcgtaatggt	1200
aagccagaaa caaatatatt tggcgtgaga gatagtaata gatttattag aatttataat	1260
aaaaagcaag aacgtaaaga taatgcagat gctgaagtta tgtctgaaca tttatggcgt	1320
gtagaaatcg aacttaaaag agatatggtg gattactgga atgattgctt tagtgattta	1380
catatcttgc aaccagattg gaaaactatc caacgcactg cggatagagc aatagttttt	1440
atgttattga gtgatgaaga agaatgggga aagcttcaca gaaattctag aacaaaatat	1500
aagaatttga taaaagaaat ttcgccagtc gatttaacgg acttaatgaa atcgacttta	1560
aaagcgaacg aaaaacaatt gcaaaaacaa atcgattttt ggcaacatga atttaaat	1620
tggaaatagt gtacatatta atattactga acaaaaatga tatatttaaa ctattcta	1680

ttaggaggat ttttttatga agtgtctatt taaaaatttg gggaatttat atgaggtgaa	1740
agaataatth acccctataa acttttagcca cctcaagtaa agaggtaaaa ttgttttagtt	1800
tatataaaaa atttaaaggt ttgttttata gcgtttttatt ttggctttgt attctttcat	1860
tttttagtgt attaaatgaa atgggttttaa atgtttcttt acctgatatt gcaaatacatt	1920
ttaatactac tcctggaatt acaaactggg taaacactgc atatatgtta actttttcga	1980
taggaacagc agtatatgga aaattatctg attatataaa tataaaaaaa ttgttaatta	2040
ttggtattag tttagagctg cttggttcat tgattgcttt tattgggccc acctaggcaa	2100
atatgctctt acgtgctatt atttaagtga ctatttaaaa ggagttaata aatatgcggc	2160
aaggatttct taaataaact gtcaatttga tagcgggaac aaataattag atgtcctttt	2220
ttaggagggc ttagtttttt gtaccagtt taagaatacc tttatcatgt gattctaaag	2280
tatccagaga atatctgtat gctttgtata cctatggta tgcatataaa tcccagtgat	2340
aaaagtattt atcactggga tttttatgcc cttttgggtt ttggaatgga ggaaaatcac	2400
atgaaaatta ttaatatgg agtttttagct catgttgatg caggaaaaac taccttaaca	2460
gaaagcttat tatataacag tggagcgatt acagaattag gaagcgtgga caaaggtaca	2520
acgaggacgg ataatacgt tttagaacgt cagagaggaa ttacaattca gacaggaata	2580
acctcttttc agtgggaaaa tacgaaggtg aacatcatag acacgccagg acatatggat	2640
ttcttagcag aagtatatcg ttcattatca gtttttagatg gggcaattct actgatttct	2700
gcaaaagatg gcgtacaagc acaaactcgt atattatttc atgcacttag gaaaatgggg	2760
attcccacaa tcttttttat caataagatt gacccaaatg gaattgattt atcaacgggt	2820
tatcaggata ttaaagagaa actttctgcc gaaattgtaa tcaaacagaa ggtagaactg	2880
tatcctaata tgtgtgtgac gaactttacc gaatctgaac aatgggatac ggtaatagag	2940
ggaaacgata accttttaga gaaatatatg tccggtaaat cattagaagc attggaactc	3000
gaacaagagg aaagcataag atttcagaat tgttctctgt tccctcttta tcatggaagt	3060
gcaaaaagta atatagggat tgataacctt atagaagtta ttactaataa attttattca	3120
tcaacacatc gaggtccgtc tgaactttgc ggaaatgttt tcaaaattga atatacaaaa	3180
aaaagacaac gtcttgcata tatacgcctt tatagtggag tactacattt acgagattcg	3240
gtagagtat cagaaaaaga aaaaataaaa gttacagaaa tgtatacttc aataaatggt	3300
gaattatgta agattgatag agcttattct ggagaaattg ttattttgca aaatgagttt	3360
ttgaagttaa atagtgttct tggagataca aaactattgc cacagagaaa aaagattgaa	3420
aatccgcacc ctctactaca aacaactgtt gaaccgagta aacctgaaca gagagaaatg	3480
ttgcttgatg ccttttgga aatctcagat agtgatccgc ttctacgata ttacgtggat	3540

tctacgacac atgaaattat actttctttc ttagggaaag tacaaatgga agtgattagt 3600
gcactgttgc aagaaaagta tcatgtggag atagaactaa aagagcctac agtcatttat 3660
atggagagac cgttaaaaaa tgcagaatat accattcaca tcgaagtgcc gccaaatcct 3720
ttctgggctt ccattggttt atctgtatca ccgcttccgt tgggaagtgg aatgcagtat 3780
gagagctcgg tttctcttgg atacttaaat caatcatttc aaaatgcagt tatggaaggg 3840
gtacgctatg gttgcgaaca aggattatat ggttggaaatg tgacggattg taaaatctgt 3900
tttaagtacg gtttatacta tagccctgtt agtactccag cagattttcg gatgcttact 3960
cctattgtac tggagcaagc ctttagaaaa gctggaacag aattgttaga gccatatctt 4020
agttttaaag tttatgcacc acaggaatat ctttcncggg catataacga tgctcccaaa 4080
tattgtgcaa atatcgtaa tactcaactg aaaaataatg aggtcattat tattggagaa 4140
attcctgctc gatgtattca agattatcgc aatgatttaa ctttttttac aaatgggctt 4200
agtgtttgtt tagcagagct aaaaggatat caggttacca ctggcgaacc tgtttgccag 4260
accgctcgtc taaatagtcg gatagataaa gtaagatata tgttcaataa aataacttag 4320
tgcgttttat gttgttatat aaatatggtt tcttattaaa taagatgaaa tattctttaa 4380
tatagatttg aattaaagtg gaaaggagga gattgttatt ataaactaca agtggatatt 4440
gtgtcctatt tgtggaata aaacaagact acgaatacga gtggatacta tacttaaaaa 4500
tttcccttta tacagcccca aatgtaagaa cgaaacttta attaatgttc aaaaaatgaa 4560
tataataaca atcaaagagc cagacgcaa gacgcagagc cgataatttg agaaatgaaa 4620
ctctcatctt atcggctctt tttgtttatc tgaattttac tgactagcct tcaatatttc 4680
c 4681

<210> 6
<211> 2321
<212> ADN
<213> Desconocido

<220>
<223> Descripción de desconocido: Secuencia del bacteriófago P1 de *Enterobacteriaceae*

<400> 6

ctcaattcaa caagtattgt gaggtggtgt tatatgtcag atggataaaa aggaacaagc 60
aaagaaatat tatgaaaaag gttggaaata caaggatatt tccgaaaagc tttctgtacc 120
tctcaacaca ttgaagtcac ggagaaaacg tgataaatgg gaaagagggg gtgcaaccaa 180
agaggtgcaa cctacaaata ggggtgcacc taaaggtaat caaatgcta taggcaataa 240
aggtaatagt cgagcctcgc caccaaaaag aaataagaat gctgttaaaa ctggcgaata 300
cgaaacaata ttgcccata tgttatctga cgaagaaaag gacatctatt ctactatgaa 360

ES 2 778 727 T3

tgatgatcct ttttttattt tggatgaaga aataagaatc ctgaaaattc gccaatatag 420
 aatgcttaaa cgcataaaaag atgcagaggc tggcttaaat gatgaagaag ttgaacgttt 480
 gcagcagctt cgcaaagtta aagagccatc ggtaattgat gggaaaatgg ttactgttaa 540
 gagagaagtt ttaaaagatg tacaagtcac tcgtaaaaca tttagaaaagt tagatgacat 600
 cctggctatt gaagatgogt tgactogcgt tagcaatcaa ttaataaagg cgattaagca 660
 acaaaaagaa ttattgtcga cagataaaaa atctctttta atggaggctc aaattgagaa 720
 gataaagctt gagacagaca aattaagtgg cggatcatct aacgatgaag ctgactcttg 780
 gaaacaagca gttataaatg cagcaaataa gcgggcgggtg gaagaaaatg aataagagtt 840
 tattccgttt gccgatattg gtgcagcaat tgattactac tacgataaac cagttgcttt 900
 ttgtcaggat attttgcac ttgatccaga tgaatggcag gataaggtct tggatgattt 960
 ggctaaattc ccaaaagtct cagttagatc agggcagggt gttggaaaaa cggcgttgga 1020
 ggctggtgct attctttggt ttctaactg cggcccatat gcaaaagtaa tagcaactgc 1080
 tccgacgatg aaacaattat acgatgttct atgggcagaa gtggctaagt ggctgaataa 1140
 cagcttgatt aaagacttac ttaaatggac caagacgaaa atttatatgg ttggcgattc 1200
 agaacgatgg tttgctacag ctggaacagc aactaaacca gaaaatatgc aaggatttca 1260
 cgaagaccat atgttaatatg tggttgatga agcatcagggt gttgctgac ccattatgga 1320
 agcaatatta ggtactcttt caggatttga caataaatta ctaatgtgtg ggaaccccaa 1380
 caatattgaa ggggtttttt atgattcgca taatacagat agagacaagt atagaacgca 1440
 caaagtttct agttacgata gcaaacgtac taacaaagaa aatattcaaa tgctcatcga 1500
 taagtatggt gagaatagcg atgtagctcg tggtcgtatt tatggtgaat ttcccaaagg 1560
 cgcacttgat tcattttatca gccttgaaat tggtgagttt gccaaagata ttaatatctc 1620
 tgattcagaa ttaaaacatg ttagagaagg acacataggt gtcgatgtgg ctcgtttttg 1680
 tgatgattca acgatagtat ttccatagaat cggagctaaa gcattgccat ttgaaaaata 1740
 tagtaagcaa gataccatgc agaccactgg tcgagtttta aaagcggcga aaaggatgat 1800
 ggatgactat cctacaataa aaaaagtgtt catcaaagta gatgatacag gtgttggtgg 1860
 aggtgttact gatagactta aagaagtaat tagcgatgaa aaacttcctt atgaagtaat 1920
 tccggtaaat aatggagaat cttctacaga cgattattat gcaataaag gaacacaaat 1980
 atggggagat gttaaagaac tgtagaaca aaacatttcc aattcgatta atggtcaagg 2040
 gccgacgata gaacttcctg ataatgcaaa tctaatacaa gaattgagca cacgtaaatt 2100
 taaaatgact agcaatggaa aaatccgttt agaaagtaaa gaagatatga aaaagcgtaa 2160
 tgttggcagt ccagatattg ctgatgcgtt aacgttagcg ttttacgagc catttagacc 2220
 agaacctata aacgttaaaa aagctattaa tacgttcaaa aaattaggat taagtaggtg 2280
 atagagtga taataaatta ttgaacggtt ctgatttga t 2321

<210> 7
 <211> 2391
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

ES 2 778 727 T3

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Polinucleótido sintético

<400> 7

5

```

gatcttttgc ccatttttatt tttataaaat gggcaggtgg cgtttgtgta aagcaaatacg      60
acacaatcca aaggggataa aaggggaaag tgaaacttcc cccttttcaa gccacattgt      120
aatacaagaa cgaagtgttt tgtattacaa tgtgatagct tgcagtatth atggttttat      180
atgggtctatt ttgttgtgag gattgtaacc gaatagggcg caatgcttat tacaaaatca      240
atgacaaagg gcgattgagg aatgagcgct gaggcatttt atctttgagt aagttattga      300
tgatcagaa aaatgtatca caaattgaaa caaagactca ctcatthaag agaagctact      360
atcatgaaat tttgttgttg tgataagcaa cttctaatac acgattttta gccattacat      420
cactcgtttt tagagtgatg tgtaagtgcg cattgcactc tttttttacg aaacaagccg      480
accagcgttt gaaacttttt agtttttcat cattctatth taaaacgttc taaaactcga      540
tttaagcgac tttaattcga aactgtctat ttgttcaaag ggagcattaa gaatgcttaa      600
acgagctttt aaggggggttt aaattgattt tgaattgaat agcttgttgt aagttgtaaa      660
aaaaacaagt taaacaagt atcagttttc catttaaggg ttgttagggc ttgccctgac      720
cgtctgtaag acgcttgatt gcatgatatg agtatthtag tagtcaaaca gttaaaacag      780
cttatatgag caattagagg gaatccaata aattcctaaa agcgggtttg atcttttctt      840
ttagcgagtg aacgctgcaa gtaaaatgtg agcgttcact cgctcactcc tttttttgat      900
gactttgacc tttggtttta aatttttgaa aaaaataaaa aataggcgaa gcctattata      960
tatttatctt atatatttta atcttttatt cttttgcgtc aaaaaaaaaat caatattttc     1020
aaggctttat agaattatat accaacaaaa aactgtgtat ataccaacaa aaaactgtgc     1080
atacaccaac aaaaaactgt gcatatacca acttctttgt ttgtttcggt ggtatataat     1140
gatataataa aagcatgaag aatctctcta cgaaaagtgt ttcttcatgc ttatctaaac     1200
tcactcacia aggagcagtt ttctatgtct agtatatcaa aaaatgaacc taatcaaaag     1260
caggtgcaaa ccttgaacga attgtcaaaa cgaaaagtag tggaacataa ttctttaatt     1320
accagtattg cgaaaatgga taaaacgcca ctgaaaatgt ttgaattagc cgtgtcttgt     1380
attaataccg aagaaccacc caaagatcat acggtttatc totcaaaaga agaattgttt     1440
gcctttttta aggtatctga taatgacaaa catagtcgtt ttaaacaagc agtagagaat     1500

```

ES 2 778 727 T3

```

atgcaaaaac aagccttttt tcaaattaaa gaagaagtag gtaaaggatt taaatttagg 1560
agtattgttc ccattccata tgtcgagtgg acagattatc atgatgacgt aaaaattgaa 1620
tttcatcgtg aaatcatgcc ctacttaatt aatctaaaac aaaatttcac gcaacatgct 1680
ttgtctgata ttgcagagct gaatagcaaa tactctatta tcttgtaccg ttggttatcc 1740
atgaattata accaatacga gcattatagt tataagggcg gacggagaga agaacaagtg 1800
gaagcctacc gcaatcctac catttcaatg cgagaattac gagaaatgac ggatacagtt 1860
gatgaatacc cccgctttga tagattagaa catagagttt taaaagaacc aatagaagaa 1920
attaacgaaa acacctcttt taacgtgacg tatgacaaga taaaaaaagg acgaagcatt 1980
gattctattg tctttcatat cacgaaaaaa cgtcgagcag atgataacag ctacaagtta 2040
gaagataaag attatcaatc cgacaaagag gaaaaatcaa gaaatgaagc tgacttatta 2100
aaacaggcaa tggaaagcaa gtacacacga ttattgattg aaaactttct cttatcccct 2160
cttgaaatga cggacacggc acttatggca ggtttgcaaa agaacgtcta tccgttgtat 2220
gacgagttaa aggaattaag aggattgaat ggggtcaaag accacttgct ttatatatct 2280
agcaaaaaag aagcctattc taaacgcaat gtagcgaagt atctgaaaaa agcaatcgag 2340
caatatctac ctacggttaa aaggcaggac ttaaaccatg agtgagaact t 2391

```

<210> 8
 <211> 2596
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: Polinucleótido sintético
 <400> 8

```

tggcgattct gagacctctg agaggctctc agagctatct aaagctgagg gatataataa 60
taccttagaa aattattcga agagcttaga agcgaaaata gagcgtttag agcgcgaggg 120
gctgaaatta gaaaaactaa aaacacaaat agctgacctt aaaatcatgt ctgagaaaga 180
actagcggct attacccta aaaaaggcgt gttcggtaaa gaatatgtgg aattgactaa 240
agagcagttt gaagaattta aagggtgat ataccgaagc agaaaccttg ttcataaaaa 300
agagctagag aatgagcaat taaggcggat agtgccctctg agacgctcta aacggtttga 360
agcgagttgg aacgagctaa agaaaaaagt aaggagagaga gcatagagcg tcttaggaac 420
gaaaaatagag cgcttagaag tgaaaactca gttttgagac agcaaaatga caaatgcta 480
ggaaaactga aagagtttat gccagataaa gccttaaaaa attttatatc agagttaaga 540
gctattcagc caatcgtaag ggtagttaa cgagtgattg aaaaagggt aggcctttga 600
gcgatttatg ccgtgaaagc taattgacaa taagcaaggg caaagtacgc taggacgtga 660

```

ES 2 778 727 T3

cgagccgaaa ggcttttagcg tttcgagccg acacggacaa aggacgtccg cccttggtta 720
 cttgttgtca attagaccat ggaataaagt aagcggacat ggtataatag ctaggtcgca 780
 acgttctttc gctaagttac gaacttagat tggaggtgag cgctgtgaag actttcctag 840
 aacttgtttt gatacctttt gtggttggcg ttgctgcaga ggtaagtgtt gattggttga 900
 ttcggtatgt tcgaaacaaa cgcgacaaaa attaacctga gttctttttg aggacaaaaa 960
 agaaagacag tagttccagc tactgttttt tttgcgttgt gctattcgtt tcctagaact 1020
 tctagcgtta aaattattat accacgtttg gatttagaaa gtcaaaattt gaggttttag 1080
 ggggtgaattt ttogtgaaac gaaaaagagg gctgaaaagc ccttaaaaac ccaattgcgt 1140
 agcaaggggt ttttcttatt ttgatacata tagaaataat gagttttttt attttcttgt 1200
 tttaaagcac ctcaaacctt tgatattgct gggtttttag gtaacaaaaa agcccttgca 1260
 atttaataaa ataaagttaa taatttaagt gtccaattta aaataataaa cttaggagaa 1320
 ttgcaggaac ttttttatat actcaaaaaa atttttttgc aagaaaatta taacatgaca 1380
 ggtactgaaa atcaagtctt taaggactat tctaagaatg gcaaagatag aaagtggcga 1440
 gaacgcaagt taaaaaatat tgagcttgct ggtcgttttag agcgttttagg atatcgttcg 1500
 tttgaacggg tctatcaatg tgccgaagtg ttgaagttta tcgaacaaca agacggcacg 1560
 aaaaaactct atcagtctta tttttgcaaa aataagctct gcccaatttg taactggaga 1620
 cggatcaatga agtatgctta tcaagctgaa ttagtggtta atgaagcaat gaaacgctat 1680
 ccaaaaggct gctttctctt tttgaccttg acgattaaga acattagtgg tgaaaaatta 1740
 aataaatcaa tttcagaaat agggcgagct tttaatcgtc ttatgaaata caagaaagtc 1800
 gataaaaatg ttattggcta tttgcgagcc actgaggtta cttattcaac tgagcatgag 1860
 aattatcacc ctcatctgca tgtattgtta tttgtgaaat ctagctatct tactggaaat 1920
 aatacaaat acattagcca agaagaatgg acgaaactat gggctaaggc gatgaaattg 1980
 gattatacac ctgtagttga tattcgaacc gtcaaagctc ataaacgtaa aaacttgaag 2040
 tcagctatta tcgaaacagc taaatatcct gttaagcctt ttgatgtaga tacagaagat 2100
 gtgacattat tctctgaaat ggtcaaagaa cggataacag aagatttaac gaatggtttg 2160
 caccgaaaaa ggcagattgg ttttggaag ttgttcaaga aaatcaaggc ggagtttagt 2220
 cttgatgatg tcgaagaagg gaatcttgtt cagaccggag cagaagaatc tgcagaaagt 2280
 actggctcgtg aaattgttgc cttttggaat tgggatagaa agaattatct tgtgaggtag 2340
 ctgatgagta aaacagtatc agaattagct caagaattgg gagttagtag gcagtatctt 2400
 aatcggattt tatcgcaaaa taatctcggg cgaaaaaaag ggaataaaaa agtagtttcc 2460
 gatatggacg agaaagttat gcaaggggtt attgttttct aaaatctgat taccaattag 2520
 aatgaatatt tcccaaatat taaataataa aacaaaaaaa ttgaaaaaag tgtttccacc 2580
 attttttcaa tttttt 2596

<210> 9
 <211> 155
 <212> ADN

	<213>	Desconocido	
	<220>		
	<223>	Descripción de desconocido: Secuencia promotora de nisina	
5	<400>	9	
		aaacagtctt aattctatct tgagaaagta ttggtataa tattattgtc gataacgcga	60
		gcataataaa cggctctgat taaattctga agtttgtag atacaatgat ttcgttcgaa	120
		ggaactacaa aataaattat aaggaggcac tcaaa	155
10	<210>	10	
	<211>	1307	
	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia artificial	
15	<220>		
	<223>	Descripción de secuencia artificial: Polinucleótido sintético	
	<400>	10	
		acgatcacia gaagaatttt gctcgcttgg cgcgagatgg tgggtacacc atcgcacagt	60
		atgccgccga gtttaattctt aaccctaata ccgcacgtcg ttatctccgt gccttcaaag	120
		aagacaccag gactacggac agccgcaagc caaataagcc agtcaggaag ccggaattgc	180
		cagctggggc gccctctggt aagggtggga agccctgcaa agtaaaactgg atggctttct	240
		cgccgccaaag gatctgatgg cgcaggggat caagctctga tcaagagaca ggatgaggat	300
		cgtttcgcat gattgaacaa gatggattgc acgcagggtc tccggccgct tgggtggaga	360
		ggctattcgg ctatgactgg gcacaacaga caatcggtcg ctctgatgcc gccgtgttcc	420
		ggctgtcagc gcagggggcg ccggttcttt ttgtcaagac cgacctgtcc ggtgccctga	480
		atgaactgca agacgaggca gcgcggctat cgtggctggc cagcaggggc gttccttgcg	540
		cagctgtgct cgacgttgct actgaagcgg gaagggactg gctgctattg ggcgaagtgc	600
		cggggcagga tctcctgtca tctcaccttg ctcccgccga gaaagtatcc atcatggctg	660
		atgcaatgcg gcggctgcat acgcttgatc cggctacctg cccattcgac caccaagcga	720
		aacatcgcat cgagcgagca cgtactcgga tgggaagcgg tcttgctgat caggatgatc	780
		tggacgaaga gcatcagggg ctcgcgccag ccgaactgtt cgccaggctc aaggcgagca	840
		tgcccgacgg cgaggatctc gtcgtgacct atggcgatgc ctgcttgccg aatatcatgg	900
20		tggaaaatgg ccgcttttct ggattcatcg actgtggccg gctgggtgtg gcggaccgct	960
		atcaggacat agcgttggct acccgtgata ttgctgaaga gcttggcggc gaatgggctg	1020
		accgcttcct cgtgctttac ggtatcgccg ctcccgattc gcagcgcatc gccttctatc	1080
		gccttcttga cgagttcttc tgagcccacc ggaccttacg tgatcgccctg gaacgcgaca	1140
		ccctggatga tgatggtgaa cgctttgaat tcgaagttgg cgattacctg atagataacg	1200
		ttgaagcgcg gaaggccgcg cgcgctatgt tgcgtcggtc cggggccgat gttctggaaa	1260
		ccactcttct ggaaaagtct ctttctcatc tccttatgct ggagaac	1307
	<210>	11	

	<211>	131	
	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia artificial	
5	<220>		
	<223>	Descripción de secuencia artificial: Polinucleótido sintético	
	<400>	11	
		cgtcaggtgg cacttttcgg gaaatgtgcg cggaaccctt atttgtttat tttctaaata	60
		cattcaaata tgtatccgct catgagacaa taaccctgat aaatgcttca ataattattga	120
10		aaaggaagag t	131
	<210>	12	
	<211>	6145	
	<212>	ADN	
15	<213>	Secuencia artificial	
	<220>		
	<223>	Descripción de secuencia artificial: Polinucleótido sintético	
20	<220>		
	<221>	base_modificada	
	<222>	(2860) . . (2860)	
	<223>	a, c, t, g, desconocida u otras	
25	<400>	12	
		atgtgacttt cgttaccctc gcgtaaaaa gagtttttac gaaaggaagc ataagtgacc	60
		tgggacgata acaagaagaa ttttgctcgc ctggcgcgag atggtgggta caccatcgca	120
		cagtatgccg ccgagttaa tcttaaccct aataccgcac gtcgttatct ccgtgccttc	180
		aaagaagaca ccaggactac ggacagccgc aagccaaata agccagtcag gaagaagaga	240
		aagcaggtag cttgcagtgg gcttacatgg cgatagctag actgggagggt tttatggaca	300
		gcaagcgaac cggaattgcc agctggggcg ccctctggta aggttgggaa gccctgcaaa	360
		gtaaactgga tggctttctt gccgccaagg atctgatggc gcaggggatc aagatctgat	420
		caagagacag gatgaggatc gtttcgcata attgaacaag atggattgca cgcaggttct	480

ccggccgctt ggggtggagag gctattcggc tatgactggg cacaacagac aatcggctgc 540
 tctgatgccg ccgtgttccg gctgtcagcg caggggccc cggttctttt tgtcaagacc 600
 gacctgtccg gtgccctgaa tgaactgcag gacgaggcag cgcggctatc gtggctggcc 660
 acgacgggcg ttccttgcgc agctgtgctc gacgttgtca ctgaagcggg aagggactgg 720
 ctgctattgg gcgaagtgcc ggggcaggat ctctgtcat cccaccttgc tcctgccgag 780
 aaagtatcca tcatggctga tgcaatgcgg cggctgcata cgcttgatcc ggctacctgc 840
 ccattcgacc accaagcgaa acatcgcac gagcgcagc gtactcggat ggaagccggt 900
 cttgtcgatc aggatgatct ggacgaagag catcaggggc tcgcgccagc cgaactgttc 960
 gccaggctca aggcgcgat gcccgacggc gaggatctcg tcgtgacca tggcgatgcc 1020
 tgcttgccga atatcatggt ggaatatggc cgctttcttg gattcatcga ctgtggccgg 1080
 ctgggtgtgg cggaccgcta tcaggacata gcgttggcta cccgtgatat tgctgaagag 1140
 cttggcggcg aatgggtgta ccgcttcctc gtgctttacg gtatcgccgc tcccgattcg 1200
 cagcgcacgc ccttctatcg ccttcttgac gagttcttct gaattgaaaa aggaagagta 1260
 tgagtattca acatttccgt gtcgccctta ttcccttttt tgcggcattt tgccttcctg 1320
 tttttgctca ccagaaaacg ctggtgaaag taaaagatgc tgaagatcag ttgggtgcac 1380
 gagtgggtta catcgaaactg gatctcaaca gcggtgaagat ccttgagagt ttctgccccg 1440
 aagaacgttt tccaatgatg agcactttta aagttctgct atgtggcgcg gtattatccc 1500
 gtattgacgc cgggcaagag caactcggtc gccgcataca ctattctcag aatgacttgg 1560
 ttgagtactc gtcaggtggc acttttcggg gaaatgtgcg cggaaacctt atttgtttat 1620
 ttttctaaat acattcaaat atgtatccgc tcatgagaca ataacctga taaatgcttc 1680
 aataatattg aaaaaggaag agtatgaagt ttggaaatat ttgtttttcg tatcaaccac 1740
 cagggtgaaac tcataagcaa gtaatggatc gctttgttcg gcttggtatc gcctcagaag 1800
 aggtagggtt tgatacatat tggaccttag aacatcattt tacagagttt ggtcttacgg 1860
 gaaatttatt tgttgctgcg gctaacctgt taggaagaac taaaacatta aatggtggca 1920
 ctatgggggt tgttattccg acagcacacc cagttcgaca gttagaagac gttttattat 1980
 tagatcaaat gtcgaaaggc cgttttaatt ttggaacctg tcgagggcta taccataaag 2040
 attttcgagt atttggtggt gatatggaag agtctcgagc aattactcaa aatttctacc 2100
 agatgataat ggaaagctta cagacaggaa ccattagctc tgatagtgat tacattcaat 2160
 ttcctaaggc tgatgtatat cccaaagtgt actcaaaaaa tgtaccaacc tgtatgactg 2220
 ctgagtccgc aagtacgaca gaatggctag caatacaagg gctaccaatg gttcttagtt 2280
 ggattattgg tactaatgaa aaaaaagcac agatggaact ctataatgaa attgogacag 2340
 aatatggtca tgatatatct aaaatagatc attgtatgac ttatatattgt tctgttgatg 2400

ES 2 778 727 T3

atgatgcaca aaagggcgcaa gatgtttgtc gggagtttct gaaaaattgg tatgactcat	2460
atgtaaatgc gaccaatatc tttaatgata gcaatcaaac tcgtgggttat gattatcata	2520
aaggtcaatg gcgtgatttt gttttacaag gacatacaaa caccaatcga cgtgttgatt	2580
atagcaatgg tattaaccct gtaggcactc ctgagcagtg tattgaaatc attcaacgtg	2640
atattgatgc aacgggtatt acaaacatta catgcggatt tgaagctaag ggaactgaag	2700
atgaaataat tgcttccatg cgacgcttta tgacacaagt cgctcctttc ttaaaagaac	2760
ctaaataaat tacttatttg atactagaga taataaggaa caagttatga aatttggatt	2820
atTTTTtcta aactttcaga aagatggaat aacatctgan gaaacgttgg ataatatgg	2880
aaagactgtc acgttaattg attcaactaa atatcatttt aatactgcct ttgttaatga	2940
acatcacttt tcaaaaaatg gtattgttg agcacctatt accgcagctg gttttttatt	3000
agggttaaca aataaattac atattggttc attaaatcaa gtaattacca cccatcaccc	3060
tgtacgtgta gcagaagaag ccagtttatt agatcaaagtc tcagagggac gcttcattct	3120
tggTTTTagt gactgcgaaa gtgatttcga aatggaattt tttagacgtc atatctcatc	3180
aaggcaacaa caatttgaag catgctatga aataattaat gacgcattaa ctacaggtta	3240
ttgtcatccc caaaacgact tttatgattt tccaaagggt tcaattaatc cactgtta	3300
cagtgagaat ggacctaagc aatatgtatc cgctacatca aaagaagtcg tcatgtgggc	3360
agcgaaaaag gcactgcctt taacatttaa gtgggaggat aatttagaaa ccaaagaacg	3420
ctatgcaatt ctatataata aaacagcaca acaatatggg attgatattt cggatgttga	3480
tcatcaatta actgtaattg cgaacttaaa tgctgataga agtacggctc aagaagaagt	3540
gagagaatac ttaaaagact atatcactga aacttacctt caaatggaca gagatgaaaa	3600
aattaactgc attattgaag agaatgcagt tgggtctcat gatgactatt atgaatcgac	3660
aaaattagca gtggaaaaaa caggggtctaa aaatatTTta ttatcctttg aatcaatgtc	3720
cgatattaaa gatgtaaaag atattattga tatgttgaac caaaaaatcg aaatgaattt	3780
accataaagt actcaccagt cacagaaaag catcttacgg atgggcccac cggaccttac	3840
gtgatcgctt ggaacgcgac accctggatg atgatggatg acgctttgaa ttcgaaagtg	3900
gcgattacct gatagataac gttgaagcgc ggaaggcgc gcgcgctatg ttgcgtcgg	3960
ccggggccga tgttctggaa accactcttc tggaaaagtc tctttctcat ctcttatgc	4020
tggagaacgc cagggatagc tgtattcgcc tgggtgcagga aatgcgcgat cagcaaaaag	4080
acgatgatga aggtactccg cctgaatacc gtatcgcgag catgctaaac agctgttccg	4140
cgcagataag cagcctgatc aacaccattt acagcatccg gaataactat cgaaaagaaa	4200
gccgggaggc ggaaaagcac gctttatcta tggggcaagc tggcattggt aagctggcat	4260

ES 2 778 727 T3

acgaacgaaa gcgtgaaaat aactgggtcag tgctggaagc ggctgaattc atcgaggcgc	4320
atggaggaaa agtgccgccc ctgatgctgg agcaaatcaa agccgatctg cgtgctccta	4380
agaccaatac cgatgatgag gaaaacccaaa cagcatctgg cgctccatca cttgaagatc	4440
tgataaaaat cgcgcgagaa cgggcccgcga gccgcgcgcg tgatgcgcga ttgtggattg	4500
agcatcgtag agaagaaatt gccgatatcg tcgatacagg tggttatggg gatgtcgtg	4560
cgggaaggcat atcaaacgaa gcatggcttg aacaggatct ggacgaagac gaggaggaag	4620
acgaagaagt taccgcgaaa ctgtacgggg atgatgatta atggccagaa gttgcgtaac	4680
ggacccacgt tggcgcgagc ttgtggcgct atatcgttat gactggattg cggccgctga	4740
tgtgttgttt gggaagacac caacctggca gcaggatgag atcattgagt ccacgcagca	4800
ggacggcagt tggacaagtg tgacctcgg ccatgggtact ggtaaatcgg atatgacgag	4860
tatcattgca atactcttca tcatgttttt ccccgcgct cgcgtcattc tggtcgctaa	4920
caaaagacag caagtccttg atgggtatctt caaatacata aagagcaatt gggctactgc	4980
tgtagcaga ttcccggtgt tgtcgaagta tttcattctt acagaaacgt ctttttttga	5040
ggtgactggc aagggtgttt ggacaatatt gataaagtcc tgcgtcccg gaaatgagga	5100
ggcgttggtt ggtgaacacg ccgatcatct cttgtatatc atcgacgaag cgtcgggtgt	5160
gagtataaaa gcattcagtg tgataacagg tgcgctgacc ggtaaggata accgtattct	5220
gcttctttcc cagcctacgc gaccttcagg ctattttctac gattcacacc acagactagc	5280
tattcgcccg ggaaatcctg atggattgtt tactgcgata atactgaata gtgaagaatc	5340
tccgcttgta gatgcaaaat ttatacagc aaaaacttgcg gagtatggcg gtcgtgataa	5400
ccccatgtac atgatcaaag tacgtgggtga atttcccaa tctcaagatg gctttcttct	5460
tggtcgtgat gaggttgagc gggcgacgcg gcgaaaggtc aagattgcc aaggatgggg	5520
ctgggttgca tgtgttgacg ttgctgggtg cacaggacga gataagtcg ttattaatat	5580
catgatggtg tccggccagc gaaataaacg ccgtgtaatc aactatcgta tgctggaata	5640
cacagacgtt acagaaacgc agttagccgc caagattttc gcagaatgta acccagaacg	5700
gttcccgaac ataaccatag ctattgatgg cgatggcttg gggaaatcga cggctgatct	5760
aatgtacgaa cgctatggca ttaccgtcca gcgtatccgc tggggtaaaa agatgcacag	5820
ccgtgaagat aaaagccttt atttcgatat gcgcgctttc gcgaatattc aggcggcaga	5880
agctgtaaaa tcagggcgta tgaggcttga taagggggct gcgactatag aggaagcatc	5940
aaagataccg gtagggataa attccgcagg tcaatggaag gtgatgtcaa aggaagatat	6000
gaagaaaaaa ctcaacctgc actcaccgga ccattgggat acatattgtt tcgctatgtt	6060
ggcgaactat gttcccgaag atgaagtgt tagcgtcgaa gacgaagcgc aggttgatga	6120
agctctggca tggcttaatg aataa	6145

REIVINDICACIONES

1. Un sistema de empaquetamiento de células bacterianas para empaquetar una molécula de ácido nucleico indicadora en una partícula de transducción no replicativa (NRTP) para su introducción en una célula bacteriana, comprendiendo el sistema de empaquetamiento una célula huésped, que comprende:
 - un genoma de bacteriófago que comprende un primer gen que comprende una alteración, en el que, en ausencia de la alteración, el primer gen codifica un primer componente esencial de una actividad enzimática relacionada con el empaquetamiento y comprende una primera secuencia del sitio de inicio del empaquetamiento, en el que la actividad enzimática relacionada con el empaquetamiento reconoce el primer sitio de inicio del empaquetamiento, en el que la alteración evita el reconocimiento de la primera secuencia del sitio de inicio del empaquetamiento por la actividad enzimática relacionada con el empaquetamiento esencial, y en el que la alteración reduce el nivel de la actividad enzimática relacionada con el empaquetamiento esencial; y
 - una molécula de ácido nucleico indicadora que comprende un gen indicador, un replicón lítico P1, un segundo gen que codifica el primer componente de la actividad enzimática relacionada con el empaquetamiento esencial, y un tercer gen que codifica un segundo componente de la actividad enzimática relacionada con el empaquetamiento esencial, en la que el segundo gen comprende la primera secuencia del sitio de inicio del empaquetamiento no alterada, en la que la primera secuencia del sitio de inicio del empaquetamiento se configura para facilitar el empaquetamiento de un replicón de la molécula de ácido nucleico indicadora en la NRTP.
2. El sistema de empaquetamiento de células bacterianas de la reivindicación 1, en el que el bacteriófago comprende una pluralidad de genes alterados, en el que, en ausencia de las alteraciones, cada uno codifica un componente esencial de la actividad enzimática relacionada con el empaquetamiento y en el que cada uno de la pluralidad de genes alterados en el bacteriófago se complementa con un gen funcional, no alterado, codificado por la molécula de ácido nucleico indicadora.
3. El sistema de empaquetamiento de células bacterianas de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en el que la alteración es por medio de delección, inserción, mutación o remplazo.
4. El sistema de empaquetamiento de células bacterianas de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la actividad enzimática relacionada con el empaquetamiento es una actividad terminasa.
5. El sistema de empaquetamiento de células bacterianas de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el segundo gen y el tercer gen son genes de terminasa y en el que el segundo gen y el tercer gen están enlazados de forma funcional a un promotor condicional.
6. El sistema de empaquetamiento de células bacterianas de la reivindicación 5, en el que el promotor condicional es un promotor natural de un gen de terminasa del genoma del bacteriófago.
7. El sistema de empaquetamiento de células bacterianas de una cualquiera de las reivindicaciones 5 o 6, en el que la expresión del segundo gen o el tercer gen se inhibe en ausencia de activación del ciclo lítico del bacteriófago, y en el que la expresión del segundo gen o el tercer gen se activa tras la activación del ciclo lítico del bacteriófago.
8. El sistema de empaquetamiento de células bacterianas de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el genoma del bacteriófago comprende un gen indicador que codifica un marcador detectable o un marcador seleccionable y en el que el gen indicador está enlazado de forma funcional a un promotor constitutivo.
9. El sistema de empaquetamiento de células bacterianas de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que la alteración comprende una inserción en o remplazo de la primera secuencia del sitio de inicio del empaquetamiento con un gen que codifica un marcador seleccionable y en el que el gen que codifica el marcador seleccionable está enlazado de forma funcional a un promotor constitutivo.
10. El sistema de empaquetamiento de células bacterianas de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que la alteración comprende una inserción en o remplazo de la primera secuencia del sitio de inicio del empaquetamiento con un gen que codifica un marcador detectable.
11. El sistema de empaquetamiento de células bacterianas de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que la molécula de ácido nucleico indicadora comprende un origen de replicación.
12. El sistema de empaquetamiento de células bacterianas de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que el replicón de la molécula de ácido nucleico indicadora comprende un concatámero susceptible de empaquetamiento en la partícula de transducción no replicativa.
13. El sistema de empaquetamiento de células bacterianas de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en el que la primera secuencia del sitio de inicio del empaquetamiento no alterada comprende un punto de unión

concatamérico.

5 14. El sistema de empaquetamiento de células bacterianas de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en el que la molécula de ácido nucleico indicadora comprende una secuencia de transcrito de ácido nucleico que es complementaria a una segunda secuencia en la molécula de ácido nucleico indicadora.

10 15. El sistema de empaquetamiento de células bacterianas de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en el que el replicón de la molécula de ácido nucleico indicadora comprende una secuencia de transcrito de ácido nucleico que es complementaria a una segunda secuencia en la réplica de la molécula de ácido nucleico indicadora.

16. Un procedimiento para empaquetar una molécula de ácido nucleico indicadora en una partícula de transducción no replicativa, que comprende:

15 - proporcionar condiciones al sistema de empaquetamiento de células bacterianas de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15 que induzcan una fase lítica del genoma del bacteriófago para producir partículas de transducción no replicativas empaquetadas con la molécula de ácido nucleico indicadora; y

- recoger la partícula de transducción no replicativa que comprende la molécula de ácido nucleico indicadora.

20 17. Una composición que comprende la partícula de transducción no replicativa que comprende un replicón de la molécula de ácido nucleico indicadora producida a partir del procedimiento de la reivindicación 16.

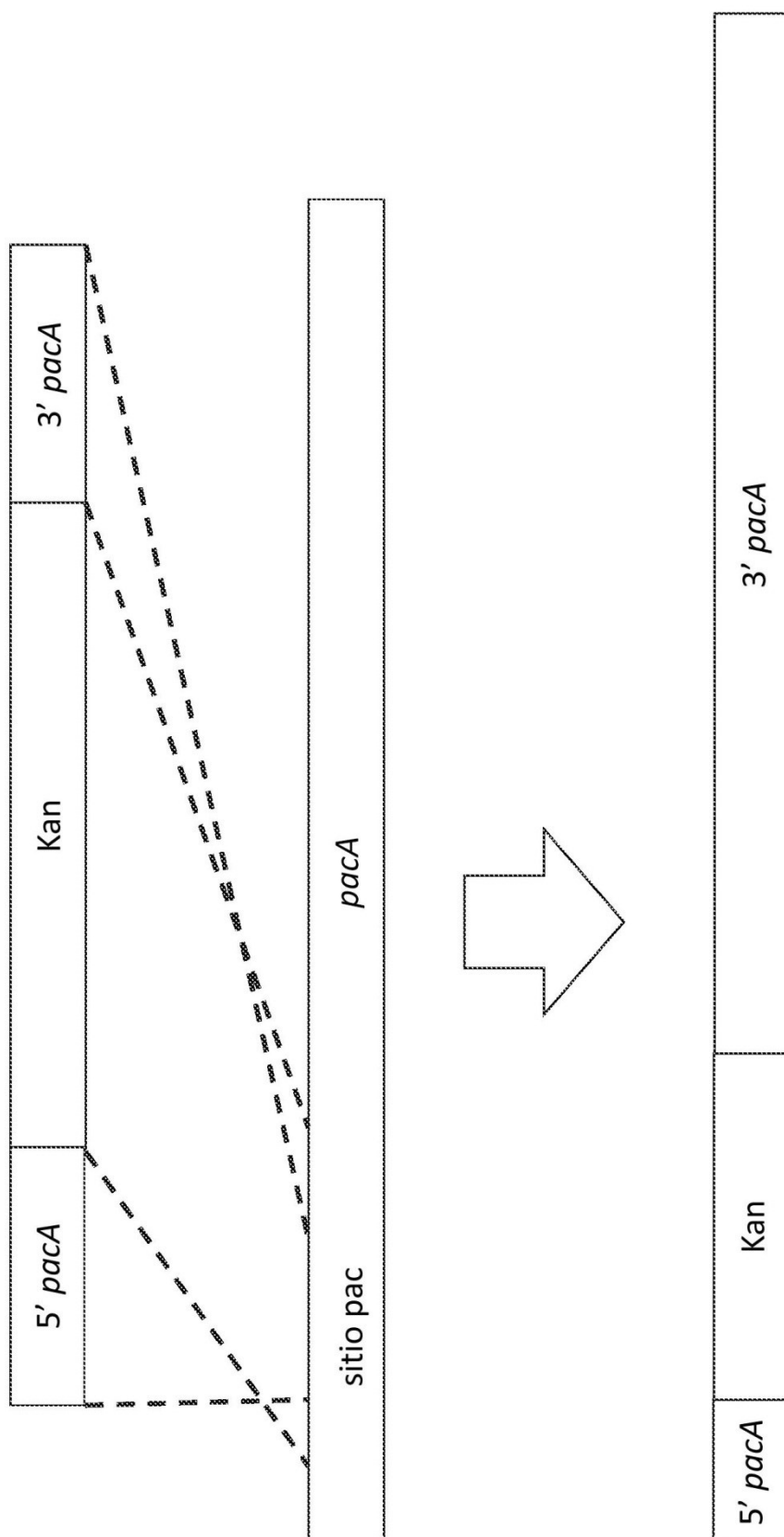


FIGURA 1

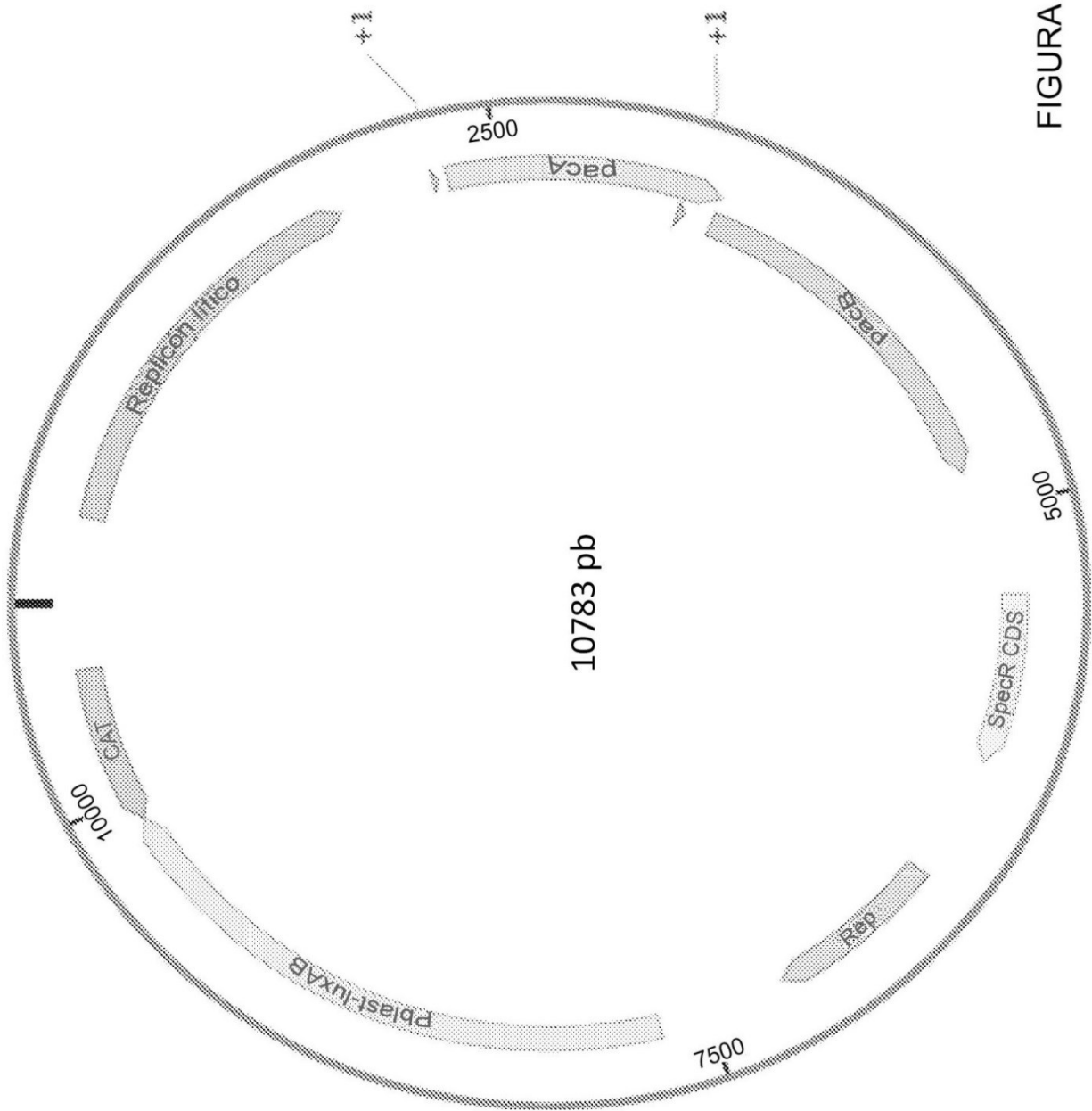


FIGURA 2

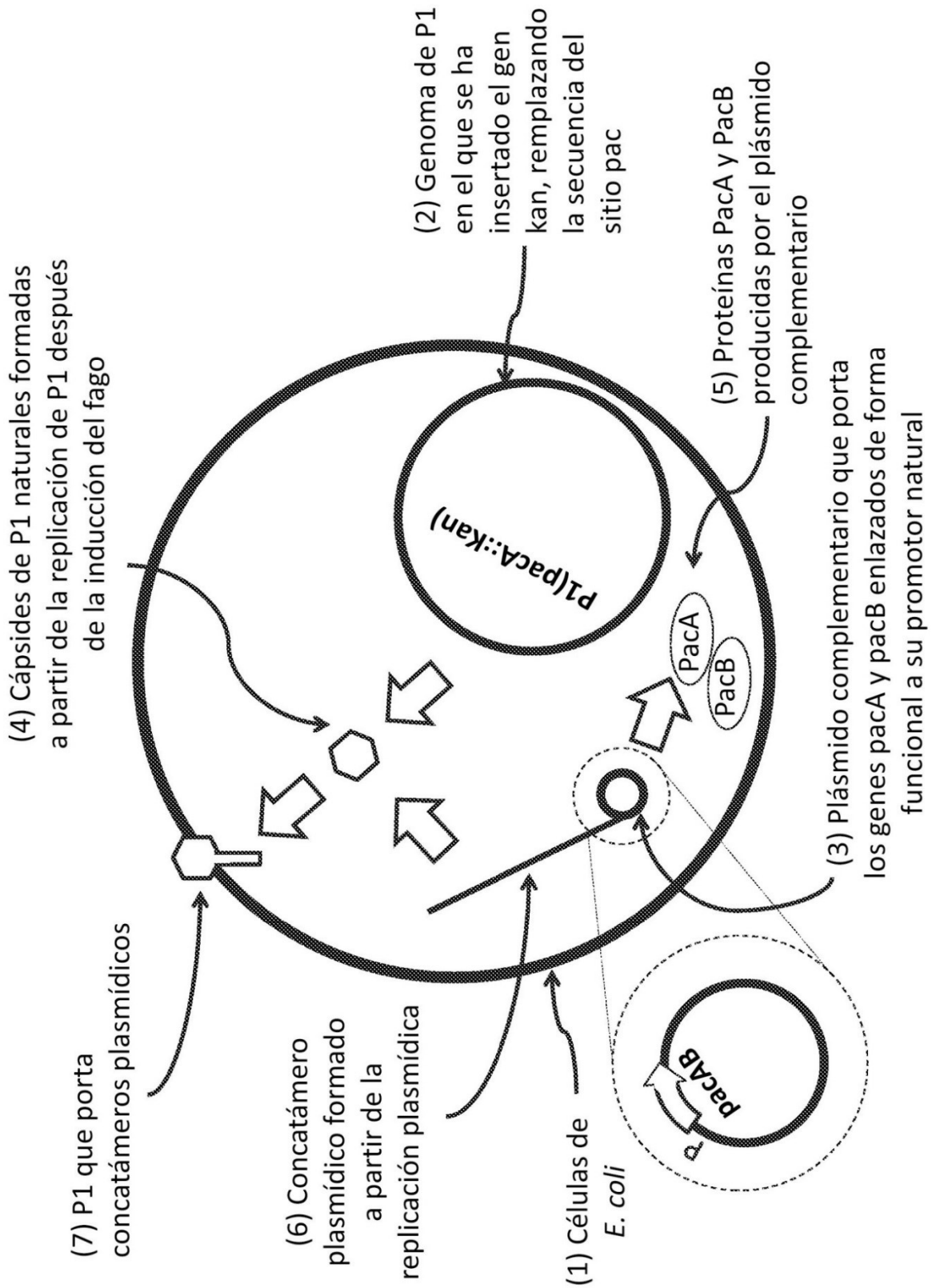


FIGURA 3

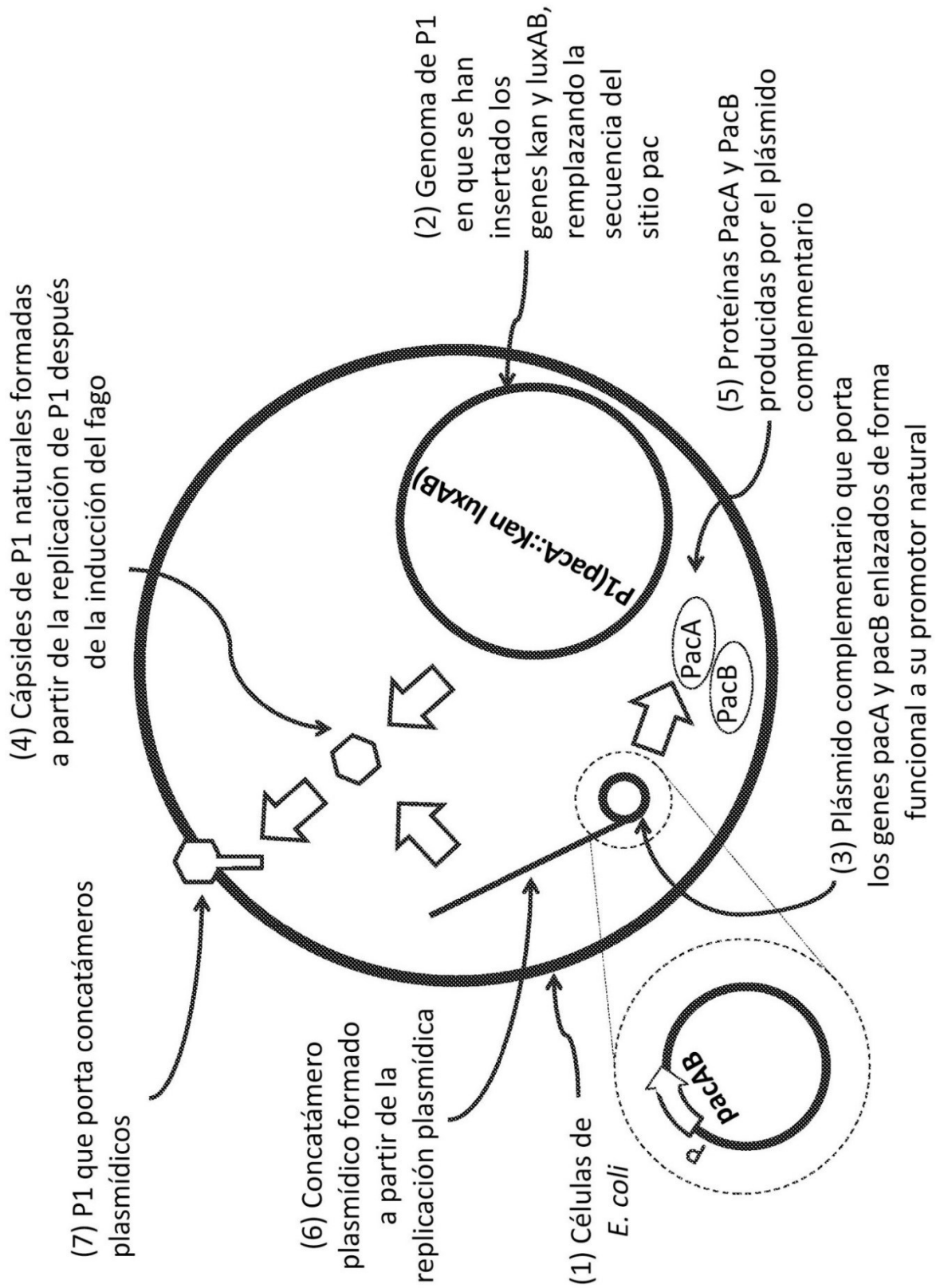


FIGURA 4

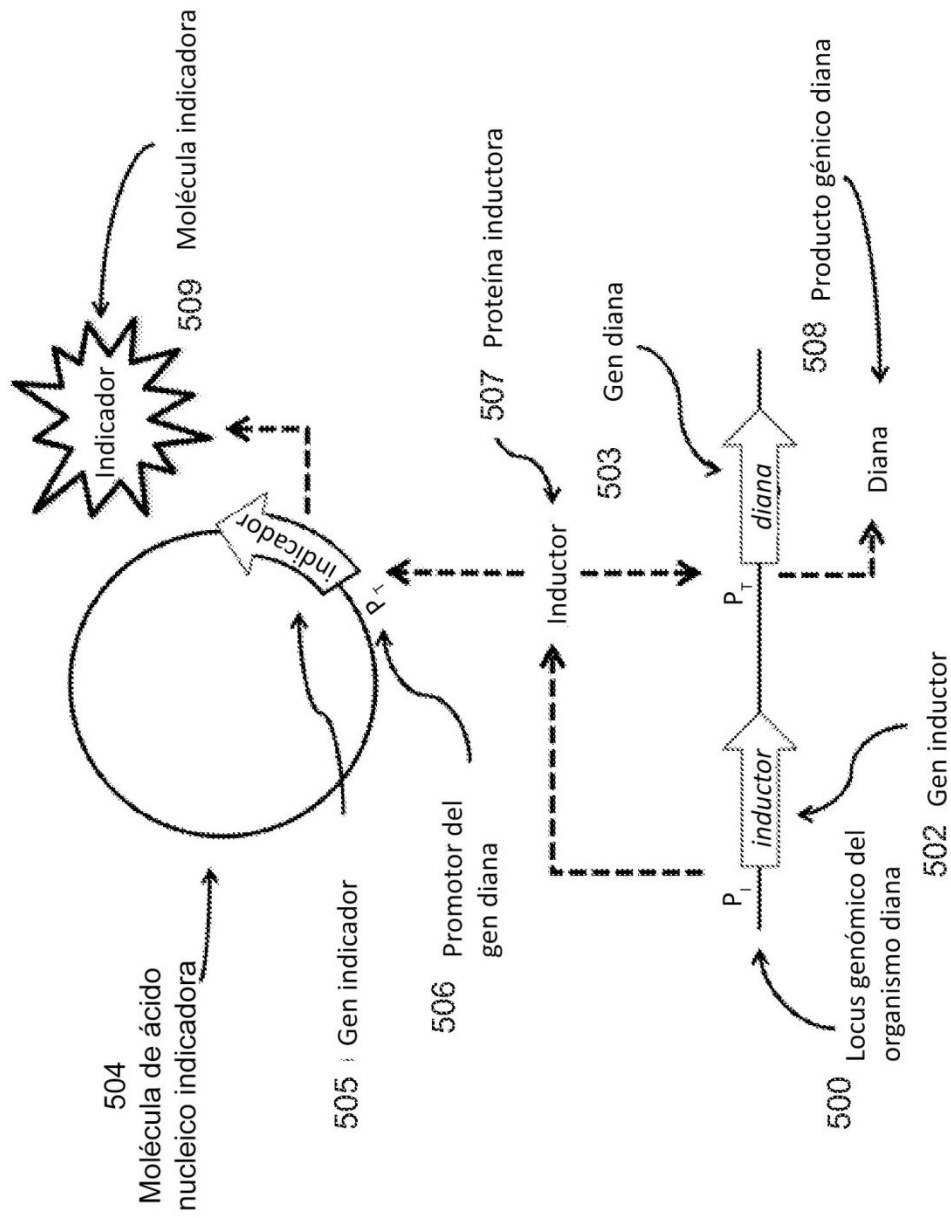


FIGURA 5

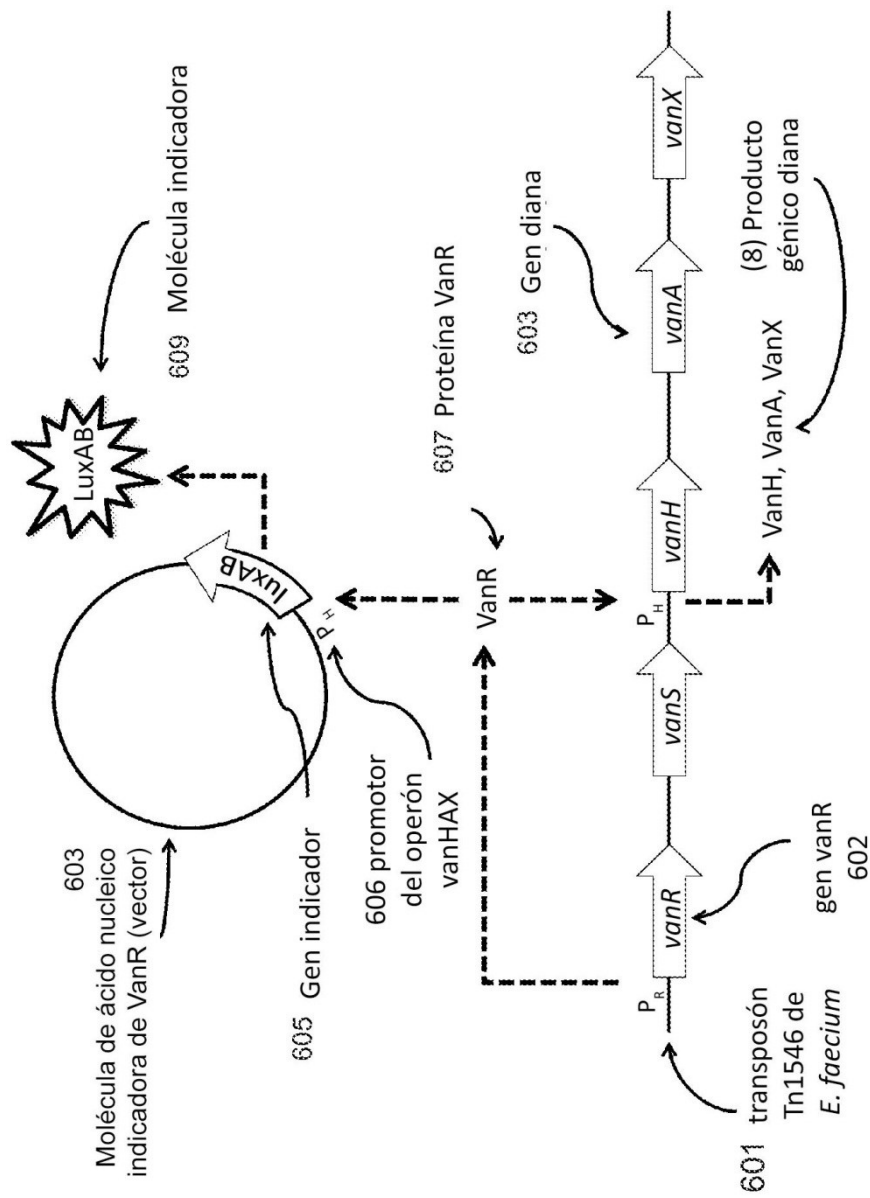


FIGURA 6

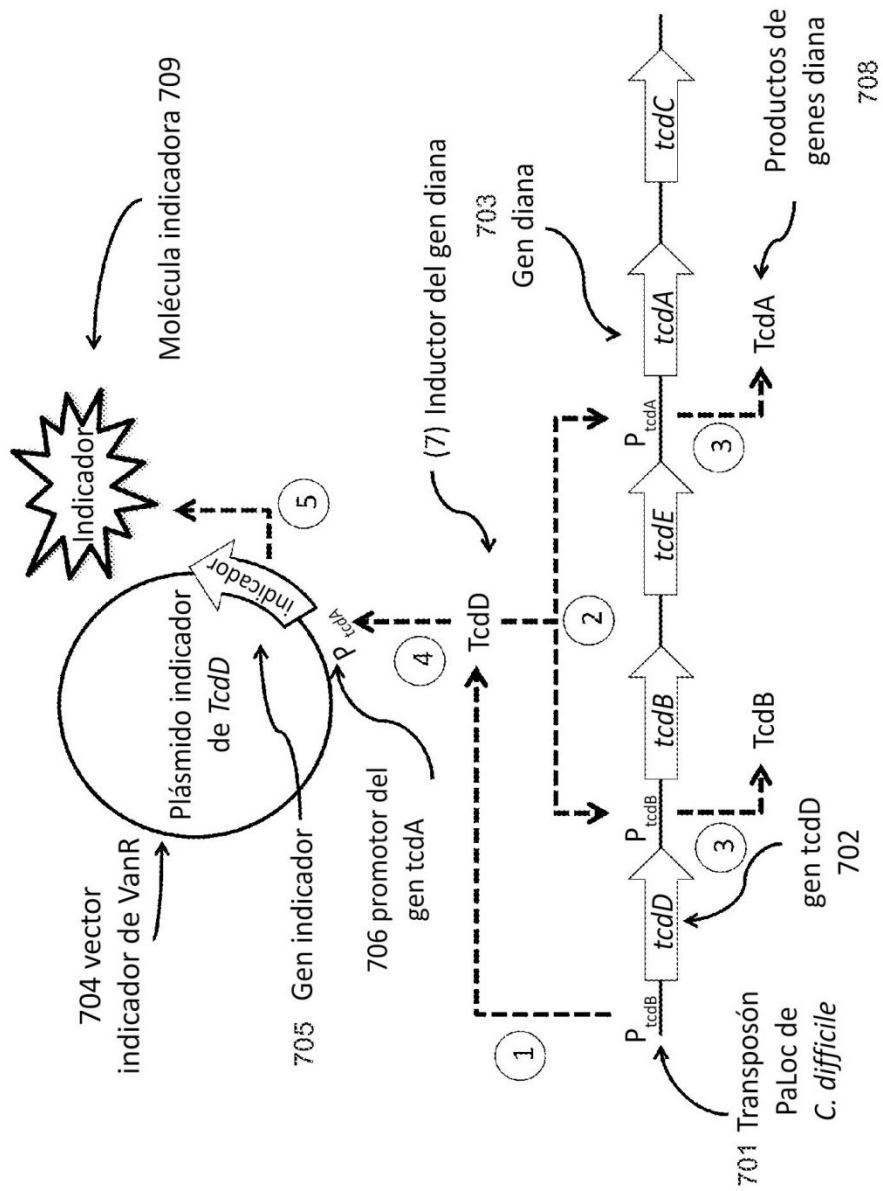


FIGURA 7

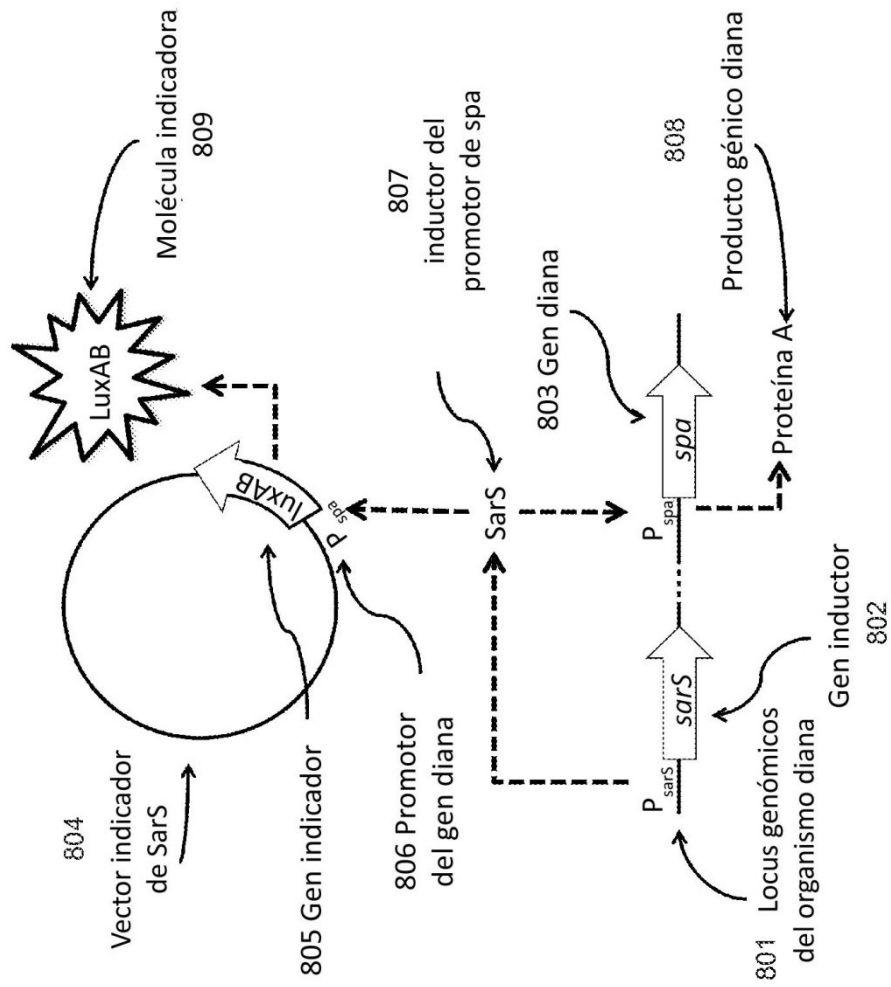


FIGURA 8

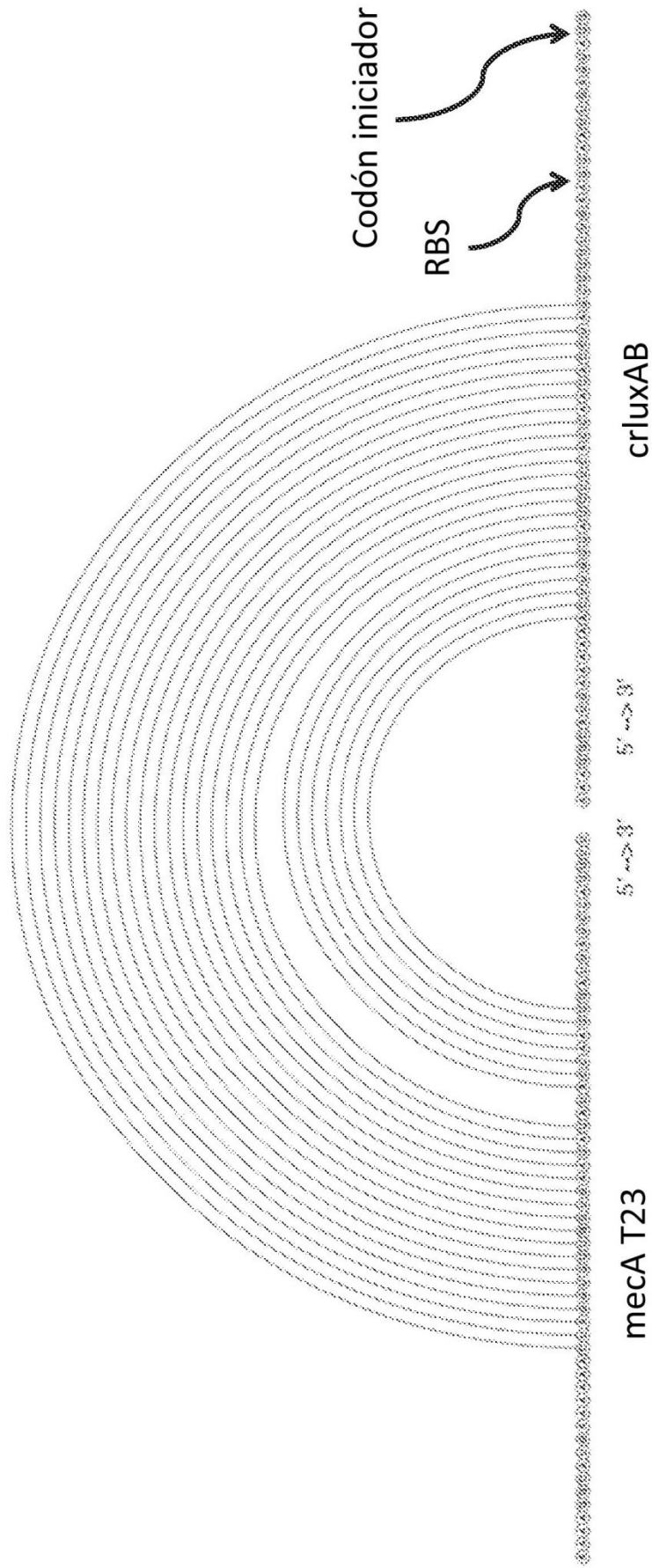


FIGURA 9

	1505	1525
KanR	3/12	12/12
SpecR	12/12	12/12

FIGURA 10