

(12)

SOLICITUD de PATENTE

(43) Fecha de publicación: **08/10/2020** (51) Int. Cl: **A61K 35/74** (2015.01)
A61K 38/16 (2006.01)
(22) Fecha de presentación: **13/07/2020** **C07K 14/195** (2006.01)
(21) Número de solicitud: **2020005875** **C07K 14/22** (2006.01)
C12N 1/20 (2006.01)
C12N 15/09 (2006.01)
C12N 15/10 (2006.01)
C12N 15/74 (2006.01)
C12N 15/85 (2006.01)

(86) Número de solicitud PCT: **US 2018/063880**

(87) Número de publicación PCT: **WO 2019/113096 (13/06/2019)**

(30) Prioridad(es): **05/12/2017 US 62/594,943**

(71) Solicitante:
BIOPLX, INC.
CENTRAL AVE., BOULDER 5777 #110 80301
COLORADO US

(72) Inventor(es):
Timothy W. STARZL
HOLMES PLACE, BOULDER 5205 COLORADO 80303
US
Todd D. TURNER
Ravi S. V. STARZL

(74) Representante:
FRANCISCO JAVIER UHTHOFF ORIVE
Avenida Paseo de la Reforma 509, Piso 22 Alcaldía
Cuauhtémoc Ciudad De México C.P. 06500 MX

(54) Título: **MÉTODOS Y COMPOSICIONES PARA PREVENIR LA INFECCIÓN MICROBIANA.**

(54) Title: **METHODS AND COMPOSITIONS TO PREVENT MICROBIAL INFECTION.**

(57) Resumen

Se proporcionan métodos y composiciones para influir de manera duradera en los ecosistemas microbiológicos (microbiomas) en un sujeto con el fin de prevenir la infección y reducir la recurrencia de la infección por microorganismos. En algunas modalidades, se proporcionan composiciones y métodos para la creación y el uso de cepas bacterianas modificadas molecularmente con el potencial de prevenir una variedad de infecciones por microorganismos.

(57) Abstract

Methods and compositions are provided for durably influencing microbiological ecosystems (microbiomes) in a subject in order to prevent infection and reduce recurrence of infection by microorganisms. In some embodiments, compositions and methods are provided for the creation and use of molecularly-modified bacterial strains with the potential to prevent a variety of microorganism infections.

MÉTODOS Y COMPOSICIONES PARA PREVENIR LA INFECCIÓN MICROBIANA

CAMPO DE LA INVENCION

Se proporcionan métodos y composiciones para influir de
5 manera duradera en los ecosistemas microbiológicos
(microbiomas) en un sujeto con el fin de resistir la
infección y reducir la recurrencia de la infección por un
microorganismo no deseado mediante la descolonización y el
reemplazo duradero por un microorganismo sintético. Se
10 proporcionan microorganismos sintéticos que pueden reemplazar
de manera duradera un microorganismo no deseado en
condiciones dérmicas o mucosas, y que contienen
modificaciones moleculares diseñadas para mejorar la
seguridad, por ejemplo, mediante la autodestrucción cuando se
15 exponen a condiciones sistémicas, mediante la reducción de la
posibilidad de adquirir virulencia o genes de resistencia
antibiótica, y/o mediante la producción de un producto
deseable en el sitio del ecosistema en un sujeto.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

20 El cuidado de la salud o la infección asociada a la
comunidad surge a menudo de la colonización de
microorganismos que superan las defensas del paciente. El uso
inapropiado de antibióticos puede conducir a un mal manejo
del microbioma. Una consecuencia involuntaria crítica de la
25 mala gestión del microbioma ha sido la aparición de

microorganismos resistentes a los antibióticos.

Cada individuo es hospedero de una vasta población de billones de microorganismos, compuestos por quizás 10,000 especies, tipos y cepas diferentes. Estos organismos
5 "comensales" se encuentran tanto en sitios externos (por ejemplo, dérmicos) como en sitios internos (por ejemplo, gastrointestinales), y son necesarios para la supervivencia de la especie humana. La "colonización" ocurre automáticamente a través de interacciones continuas con el
10 medio ambiente.

La colección de microorganismos constituye el "bioma", un sistema dinámico, estructurado y vivo que en muchos casos, y de muchas maneras, es esencial para nuestra salud y bienestar. Una estructura biómica es creada por una gran red
15 combinatoria de relaciones entre el hospedero, el medio ambiente y los componentes del bioma. El microbioma humano es un ecosistema. Tiene una estructura dinámica pero persistente: es "resistente" y tiene un estado base normal "saludable".

20 No obstante, en algunas circunstancias, el microbioma puede ser invadido y ocupado por microorganismos patógenos. Este tipo de "colonización" puede convertirse en un precursor de la "infección". Este tipo de alteración del microbioma puede causar enfermedades graves e incluso potencialmente
25 mortales.

Una consecuencia involuntaria de la mala gestión de nuestro bioma ha sido la aparición de la "resistencia a los antibióticos". Esto sucede cuando los antibióticos y antisépticos no eliminan completamente los microorganismos
5 diana. Los pocos sobrevivientes que muestran resistencia a estos materiales vuelven a crecer luego ("recolonizan"), preferentemente en un entorno abierto (o "nicho" vacante) ya libre de organismos competidores. Los organismos sobrevivientes luego dominan el espacio, generalmente
10 conservando esa resistencia para sus descendientes. Si se exponen a un nuevo agente inactivador, tenderán a desarrollar resistencia a este también. En solo unas pocas generaciones, estos microorganismos pueden desarrollar resistencia a muchos o todos los antibióticos conocidos, convirtiéndose en las
15 ahora famosas "superbacterias" y, mientras tanto, crean un nuevo y enorme problema de salud global.

Un fenómeno denominado "recurrencia" está en el centro del proceso que crea resistencia a los antibióticos. Si bien existen métodos para tratar la infección patógena, los
20 métodos para prevenir la recurrencia son efectivamente inexistentes.

Las infecciones bacterianas son el territorio de origen del fenómeno emergente "superbacterias". El uso excesivo y el uso indebido de antibióticos ha provocado que muchas cepas de
25 bacterias patógenas desarrollen resistencia a una cantidad

creciente de tratamientos con antibióticos, lo que creó un problema masivo de salud pública global. A medida que se aplica cada nueva variación de antibiótico para tratar estas superbacterias, el proceso inevitable de selección de cepas
5 resistentes comienza de nuevo y se desarrollan rápidamente variantes resistentes del patógeno. Desafortunadamente, en la actualidad las bacterias se están volviendo resistentes más rápido de lo que se pueden desarrollar nuevos antibióticos.

Además de cultivar resistencia a los antibióticos, y con
10 frecuencia causar efectos adversos para la salud en los receptores, los tratamientos con antibióticos también tienen el efecto no deseado de alterar todo el microbioma, que incluye las bacterias buenas y malas. Esto a menudo crea nuevos problemas, tales como abrir el microbioma a la
15 colonización por agentes patógenos inesperados después del tratamiento.

Sin embargo, las bacterias tienen menos margen para adaptarse a diferentes recursos, ya que estos requisitos son más básicos a nivel molecular y están definidos
20 intrínsecamente en el genoma. Esto permite que la ecología del microbioma se comporte más como un sistema "ideal", lo que lleva a la exclusión total de uno de los competidores de cepas idénticos del nicho.

La comunidad de organismos que colonizan el cuerpo
25 humano se denomina microbioma. El microbioma a menudo se

subdivide para su análisis en secciones de geografía (es decir, el microbioma de la piel en comparación con el microbioma gastrointestinal) o de filogenia (es decir, el microbioma bacteriano en comparación con el microbioma fúngico o protista).

Los antibióticos son medicamentos que salvan vidas, pero también pueden cambiar, desequilibrar y alterar el microbioma. El microbioma es una comunidad de gérmenes naturales en y sobre el cuerpo, en la piel, el intestino, la boca o el tracto respiratorio y en las vías urinarias. Un microbioma saludable ayuda a proteger contra la infección. Los antibióticos alteran el microbioma, y eliminan las bacterias "buenas" y "malas". Las bacterias resistentes a fármacos, tales como MRSA, CRE y *C. difficile*, pueden aprovechar esta alteración y multiplicarse. Con este crecimiento excesivo de bacterias resistentes, el cuerpo está preparado para la infección. Una vez que los sujetos son colonizados con bacterias resistentes, las bacterias resistentes pueden propagarse fácilmente a otros. Ver "Antibiotic Resistance (AR) Solutions Initiative: Microbiome, CDC Microbiome Fact Sheet 2016". www.cdc.gov/drugresistance/solutions-initiative/innovations-to-slow-AR.html.

Según el Centro para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC, por sus siglas en inglés), las principales

amenazas resistentes a fármacos en los Estados Unidos de América incluyen *Neisseria gonorrhoeae*, *Acinetobacter* resistente a múltiples fármacos, *Campylobacter* resistente a fármacos, *Candida* resistente a fluconazol, *Enterococcus* resistente a vancomicina (VRE, por sus siglas en inglés), *Pseudomonas Aeruginosa* resistente a múltiples fármacos, *Salmonella* no tifoidea resistente a fármacos, *Salmonella* serotipo typhi resistente a fármacos, *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA, por sus siglas en inglés), *Streptococcus pneumoniae* resistente a fármacos, tuberculosis resistente a fármacos, *Staphylococcus aureus* resistente a vancomicina, estreptococo de grupo A resistente a eritromicina, y estreptococo de grupo B resistente a clindamicina. Ver "Antibiotic/Antimicrobial Resistance (AR/AMR)", https://www.cdc.gov/drugresistance/biggest_threats.html.

Neisseria gonorrhoeae provoca gonorrea, una enfermedad de transmisión sexual que puede provocar secreción e inflamación en la uretra, el cuello uterino, la faringe o el recto. Hay alrededor de 820,000 infecciones por gonorrea por año. De estas, hay alrededor de 246,000 infecciones por gonorrea resistentes a fármacos: 188,600 resistentes a tetraciclina, 11,489 con susceptibilidad reducida a cefixima, 3,280 con susceptibilidad reducida a ceftriaxona y alrededor de 2,460 exhiben susceptibilidad reducida a azitromicina.

Acinetobacter es un tipo de bacteria gramnegativa que causa neumonía o infecciones del torrente sanguíneo en pacientes enfermos críticos. Muchas de estas bacterias se han vuelto muy resistentes a los antibióticos. Hay alrededor de 5 12,000 infecciones por Actinobacter por año, que incluyen alrededor de 7,300 infecciones por Actinobacter resistente a múltiples fármacos y 500 muertes.

La candidiasis es una infección micótica causada por levaduras del género Candida. Existen más de 20 especies de 10 levaduras Candida que pueden causar infección en seres humanos, la más común de estas es *Candida albicans*. Las levaduras Candida normalmente viven en la piel y las membranas mucosas sin causar infección. Sin embargo, el crecimiento excesivo o la invasión de estos microorganismos 15 pueden causar el desarrollo de síntomas. Los síntomas de la candidiasis varían según el área del cuerpo infectada. Candida es la cuarta causa más común de infecciones del torrente sanguíneo asociadas a la atención médica en los Estados Unidos de América. En algunos hospitales es la causa 20 más común. Estas infecciones tienden a ocurrir en los pacientes más enfermos. Hay alrededor de 46,000 infecciones por Candida por año, que incluyen alrededor de 3,400 infecciones por Candida resistentes a fluconazol y 220 muertes.

25 *Staphylococcus aureus* es un tipo común de bacteria que

se encuentra en la piel. Durante los procesos médicos en los que los pacientes requieren catéteres o respiradores o en los que se someten a procesos quirúrgicos, *Staphylococcus aureus* puede ingresar al cuerpo y causar infecciones. *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA) causa una variedad de enfermedades, desde infecciones de la piel y heridas hasta neumonía e infecciones del torrente sanguíneo que pueden causar sepsis y muerte. Las bacterias estafilococos, que incluyen MRSA, son una de las causas más comunes de infecciones asociadas a la atención médica. Hay alrededor de 80,461 infecciones graves por MRSA por año, y alrededor de 11,285 muertes por MRSA por año. Cuando *Staphylococcus aureus* se vuelve resistente a la vancomicina, hay pocas opciones de tratamiento disponibles debido a que las bacterias *Staphylococcus aureus* resistentes a vancomicina identificadas hasta la fecha también son resistentes a meticilina y otras clases de antibióticos. Ha habido al menos 13 casos de *Staphylococcus aureus* resistente a vancomicina en 4 estados desde 2002.

Streptococcus pneumoniae (*S. pneumoniae* o pneumococcus) es la principal causa de neumonía bacteriana y meningitis en los Estados Unidos de América. También es una causa importante de infecciones del torrente sanguíneo e infecciones de oídos y seno. Hay alrededor de 1,200,000 infecciones resistentes a fármacos por año, con alrededor de

19,000 hospitalizaciones en exceso y 7,000 muertes.

El estreptococo de grupo A (GAS) causa muchas enfermedades, que incluyen faringitis (faringitis estreptocócica), síndrome de shock tóxico estreptocócico, fascitis necrotizante (enfermedad "come carne"), fiebre escarlata, fiebre reumática e infecciones cutáneas, tales como impétigo. El estreptococo de grupo A es la principal causa de fascitis necrotizante (enfermedad "come carne"). Hay alrededor de 1-2.6 millones de infecciones estreptocócicas de garganta por año, que incluyen alrededor de 1,300 infecciones por estreptococo de grupo A resistente a fármacos por año y alrededor de 160 muertes.

El estreptococo de grupo B (GBS, por sus siglas en inglés) es un tipo de bacteria que puede causar enfermedades graves en personas de todas las edades, desde infecciones del torrente sanguíneo (sepsis) y neumonía hasta meningitis e infecciones de la piel. El estreptococo de grupo B es la principal causa de infecciones graves por microorganismos en los recién nacidos. Hubo alrededor de 27,000 casos graves de GBS en 2011, que incluyeron alrededor de 7,600 infecciones por estreptococos de grupo B resistentes a fármacos y alrededor de 440 muertes.

Los métodos del estado de la técnica para prevenir la infección y la transmisión de microorganismos resistentes a fármacos en individuos colonizados incluyen el cribado y el

aislamiento, la descolonización del microorganismo resistente a fármacos y/o la recolonización con un microorganismo susceptible a fármacos.

Los métodos del estado de la técnica que emplean solo la
5 supresión (descolonización), tal como el uso de antibióticos y agentes antimicrobianos, a menudo fracasan porque están sujetos a altas tasas de recurrencia. La descolonización a menudo es insuficiente cuando se usa sola para prevenir efectivamente la recurrencia y/o la transmisión del
10 microorganismo resistente a fármacos.

Entre los microorganismos patógenos que causan infecciones relacionadas con el cuidado de la salud, se ha dado prioridad al *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA) debido a su virulencia y espectro de
15 enfermedades, el perfil resistente a múltiples fármacos y el aumento de la prevalencia en entornos de atención médica. El MRSA es la causa más común de neumonía asociada a respirador e infección del sitio quirúrgico y la segunda causa más común de infección del torrente sanguíneo asociada a catéter
20 central.

Se demostró que las estrategias que involucran el cribado de nuevos pacientes hospitalarios para detectar MRSA y el aislamiento de aquellos que lo portan, con o sin descolonización, son en cierto modo eficaces para reducir la
25 transmisión. Sin embargo, este tipo de tratamiento es

bastante costoso y requiere alojamientos adicionales, con procesos especiales de contención e higiene.

La descolonización sola se ha usado en pacientes hospitalizados en un intento por reducir la transmisión y
5 prevenir la enfermedad en los portadores de *Staphylococcus aureus*. La descolonización puede implicar un régimen de varios días de agentes antibióticos y/o antisépticos, por ejemplo, mupirocina intranasal y baños de clorhexidina. La descolonización universal es un método empleado por algunos
10 hospitales donde todos los pacientes del hospital de la unidad de cuidados intensivos (ICU, por sus siglas en inglés) son lavados diariamente con clorhexidina y mupirocina intranasal, pero desde su uso generalizado, las tasas de infección por MRSA en EE. UU. no se han modificado
15 significativamente. Además, los microorganismos pueden desarrollar resistencia a la clorhexidina y la mupirocina tras exposiciones repetidas.

La descolonización cuando se usa sola puede no ser duradera porque el nicho vacante puede ser recolonizado con
20 microorganismos patógenos o resistentes a fármacos.

Por ejemplo, Shinefield et al., 1963, Amer J Dis Child 105, junio de 1963, 146-154, observaron que la colonización de recién nacidos con cepas de *Staphylococcus aureus* del complejo de fagos 52/52a/80/81 por contacto con un portador a
25 menudo fue seguido por una enfermedad en los bebés y sus

contactos familiares. Shinefield también observó que las medidas de control que usan agentes antisépticos o antimicrobianos aplicados al lactante conducen a la colonización con flora anormal, que consiste principalmente en estafilococos coagulasa negativos altamente resistentes y organismos gramnegativos, tales como *Pseudomonas* y *Proteus*. Shinefield intentó resolver el problema mediante colonización artificial de los recién nacidos con cepa estafilocócica 502a mediante inoculación nasal y/o umbilical. 502a es una cepa de *Staphylococcus aureus* coagulasa positiva de baja virulencia, susceptible a la penicilina e incapaz de ser inducida para producir beta-lactamasa. Se demostró que la presencia de otros estafilococos interfería con la adquisición de 502a. La persistencia de la colonización fue en el mejor de los casos de 35% después de 6 meses a un año.

Boris M. et al., "Bacterial Interference: Protection Against Recurrent Intrafamilial Staphylococcal Disease." *Amer J Dis Child* 115 (1968): 521-29, colonizó deliberadamente ~4000 infantes en las primeras horas de vida con *Staphylococcus aureus* 502a (narinas y muñón umbilical). Se observó una protección prácticamente completa de los bebés contra la infección con 80/81 (los bebés fueron monitoreados durante 1 año después de la inoculación). Aunque 5-15% de los bebés desarrollaron pequeñas vesículas emergentes de tratamiento que se resolvieron por sí mismas en los primeros

3 días posteriores al tratamiento. La descolonización previa mejora la persistencia de 502a hasta 5 veces en comparación con placebo (solución salina) $n = 63$. Los estudios controlados en furunculosis recurrente mostraron que la descolonización con antibióticos sistémicos + antimicrobianos nasales seguida de la aplicación de 502a redujo la enfermedad en 80% de los pacientes.

La recolonización con una cepa susceptible a fármacos puede no ser segura debido a que la cepa susceptible a fármacos aún puede causar una infección sistémica.

Shinefield et al., 1973, Microbiol Immunol, vol. 1, 541-547, informaron el uso de reemplazo bacteriano, que incluye la descolonización, en el tratamiento de pacientes con furunculosis recurrente. Los portadores de estafilococos crónicos fueron tratados con tratamiento de antibióticos, que incluía antibióticos sistémicos y aplicación de crema antimicrobiana en la mucosa nasal. En un estudio inicial, 31 pacientes recibieron únicamente tratamiento con antibióticos y mostraron una tasa de recurrencia de la cepa original de 74%. 18 pacientes recibieron tratamiento antibiótico seguido de inoculación con 502a y mostraron 27% de recurrencia de la cepa original. Un estudio más amplio de 587 pacientes dio como resultado una recurrencia de 21% de la cepa original después de 12 meses. Sin embargo, se observó una alta tasa de recidiva en pacientes con diabetes, eccema o acné. Se observó

la enfermedad asociada con 502a en 11 pacientes.

Aly et al., 1974 J Infect Dis 129(6) pp. 720-724, estudió la interferencia bacteriana en portadores de *Staphylococcus aureus*. Los portadores fueron tratados con
5 antibióticos y jabones antibacterianos y expuestos a la cepa 502a. Específicamente, el método de descolonización implicó dicloxacilina oral durante 8 días; neosporina en la nariz durante 8 días y triclorocabanilida. Se descubrió que era
necesaria una descolonización completa para obtener una buena
10 toma. El día 7 mostró una toma de 100%, pero el día 23 la toma se redujo de 60 a 80%. Los datos de persistencia fueron de 73% a las 23 semanas para sujetos bien descolonizados, y solo de 17% de persistencia para sujetos parcialmente descolonizados. Se descubrió la colonización conjunta en 5/12
15 sujetos el día 3, 2/12 sujetos el día 10 y 1/12 sujetos el día 35 y el día 70.

La descolonización, seguida de la recolonización con un microorganismo del mismo género, pero una especie diferente, puede no ser duradera debido a que el nicho vacante no está
20 adecuadamente ocupado por las diferentes especies.

El documento WO2009117310 A2, de George Liu, asignado al Centro Médico Cedars-Sinai, describe métodos para el tratamiento y la prevención de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina y *Staphylococcus aureus* sensible a
25 meticilina (MSSA) mediante el uso de un método de

descolonización/recolonización. En un ejemplo, los ratones se tratan con antibióticos para eliminar la flora existente, que incluye MRSA, y el área de superficie recién despejada se coloniza con bacterias del mismo género, pero de una especie diferente, tal como *Staphylococcus epidermidis*. No se proporcionan datos específicos sobre la recurrencia.

La administración de probióticos en un intento de tratar la infección por microorganismos patógenos puede no ser eficaz y puede no ser duradera porque el probiótico puede no colonizar permanentemente al sujeto.

La patente estadounidense N.º 6,660,262, de Randy McKinney, asignada a Bovine Health Products, Inc., describe composiciones antimicrobianas de amplio espectro que comprenden ciertos minerales, vitaminas, aminoácidos de cobalto, algas marinas y una especie de *Lactobacillus* para usarse en el tratamiento de infecciones microbianas en animales. Se realizaron ensayos de campo en ganado vacuno y caballos, pero no se identificó la cepa bacteriana infecciosa u otro agente infeccioso.

La patente estadounidense N.º 6,905,692, de Sean Farmer, asignada a Ganeden Biotech, Inc., describe composiciones tópicas que contienen ciertas combinaciones de bacterias *Bacillus* probióticas, esporas y productos extracelulares para su aplicación en la piel o la mucosa de un mamífero para inhibir el crecimiento de ciertas bacterias, levaduras,

hongos y virus. Se proporcionan composiciones que comprenden esporas de *Bacillus coagulans* o sobrenadantes de cultivo de especies de *Bacillus* y sobrenadantes de cultivo de *Pseudomonas lindbergii* en un vehículo, tal como aceite de emú. La descripción establece que, dado que los probióticos no colonizan de manera permanente al hospedero, estos deben ingerirse o aplicarse regularmente para que persistan las propiedades promotoras de la salud.

La patente estadounidense N.º 6,461,607, de Sean Farmer, asignada a Ganeden Biotech, Inc., describe bacterias productoras de ácido láctico, preferentemente, cepas de *Bacillus coagulans*, para el control de patógenos del tracto gastrointestinal en un mamífero. Se describen métodos para la cría selectiva y el aislamiento de cepas bacterianas probióticas productoras de ácido láctico que poseen resistencia a un antibiótico. Se describen métodos para tratar infecciones con una composición que comprende una bacteria productora de ácido láctico resistente a antibióticos y un antibiótico.

La patente estadounidense N.º 8,906,668, asignada a Seres Therapeutics, proporciona combinaciones binarias citotóxicas de 2 o más bacterias de diferentes unidades taxonómicas operativas (OTU, por sus siglas en inglés) para excluir de manera duradera una bacteria patógena. Las OTU se determinan al comparar las secuencias entre organismos, por

ejemplo, que comparten al menos 95% de identidad de secuencia de genes de ARN ribosómico 16S en al menos una región hipervariable.

Los métodos del estado de la técnica que emplean el
5 reemplazo del microorganismo patógeno original (recolonización) solo están sujetos a tasas de colonización pobres con el nuevo microorganismo. El proceso puede fallar si la recolonización se realiza incorrectamente. La recolonización eficaz es crucial pero no suficiente cuando se
10 usa sola para prevenir la recurrencia.

Los métodos del estado de la técnica que implican tanto la supresión (descolonización) del microorganismo patógeno original como el reemplazo (recolonización) con un nuevo microorganismo pueden dar una recurrencia variable del
15 microorganismo patógeno en función del método específico.

En lugar de librar una guerra imposible de ganar contra microorganismos patógenos comensales o resistentes a fármacos, un mejor enfoque puede ser manejar el microbioma: promover activamente "bacterias buenas" y la dinámica de su
20 sistema de apoyo, mientras se suprime selectivamente la recurrencia de organismos patógenos específicos. Son deseables los métodos mejorados para prevenir y reducir de manera segura y duradera la recurrencia de la infección por microorganismos no deseados, tales como microorganismos
25 virulentos, patógenos y/o resistentes a fármacos.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

Se proporcionan métodos y composiciones para influir de manera segura y duradera en los ecosistemas microbiológicos (microbiomas) en un sujeto para realizar una variedad de funciones, por ejemplo, que incluyen la reducción del riesgo de infección por un microorganismo no deseado, tal como un microorganismo virulento, patógeno y/o resistente a fármacos.

Los métodos se proporcionan en la presente para prevenir o reducir el riesgo de colonización, infección, recurrencia de colonización o recurrencia de una infección patógena por un microorganismo no deseado en un sujeto, que comprenden: descolonizar el microorganismo no deseado en al menos un sitio en el sujeto para reducir o eliminar la presencia del microorganismo no deseado del sitio; y reemplazar de manera duradera el microorganismo no deseado mediante la administración de un microorganismo sintético al al menos un sitio en el sujeto, en donde el microorganismo sintético puede integrarse de manera duradera con un microbioma del hospedero al ocupar el nicho previamente ocupado por el microorganismo no deseado; y opcionalmente promover la colonización del microorganismo sintético dentro del sujeto.

La descripción proporciona un método para eliminar y prevenir la recurrencia de un microorganismo no deseado en un sujeto que alberga un microbioma, que comprende (a) descolonizar el microbioma del hospedero; y (b) reemplazar de

manera duradera el microorganismo no deseado mediante la administración al sujeto de un microorganismo sintético que comprende al menos un elemento que imparte un atributo no nativo, en donde el microorganismo sintético es capaz de integrarse de manera duradera al microbioma del hospedero y ocupar el mismo nicho en el microbioma del hospedero que el microorganismo no deseado.

En algunas modalidades, la descolonización se realiza en al menos un sitio en el sujeto para reducir o eliminar sustancialmente la presencia detectable del microorganismo no deseado en el al menos un sitio.

En algunas modalidades, la presencia detectable de un microorganismo no deseado o un microorganismo sintético se determina a través de un método que comprende un método fenotípico y/o un método genotípico, opcionalmente en donde el método fenotípico se selecciona del grupo que consiste en reacciones bioquímicas, reacciones serológicas, susceptibilidad a agentes antimicrobianos, susceptibilidad a fagos, susceptibilidad a bacteriocinas y/o perfil de proteínas celulares. En algunas modalidades, el método genotípico se selecciona de una técnica de hibridación, perfil de plásmidos, análisis de polimorfismo de plásmidos, digestión de enzimas de restricción, reacción y separación mediante electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE, por sus siglas en inglés), ribotipado, reacción en cadena de

polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) y sus variantes, reacción en cadena de ligasa (LCR, por sus siglas en inglés) y sistema de amplificación basado en la transcripción (TAS, por sus siglas en inglés).

- 5 En algunas modalidades, el nicho es un entorno dérmico o mucoso que permite la colonización estable del microorganismo no deseado en el al menos un sitio en el sujeto.

 En algunas modalidades, la capacidad de integrarse de manera duradera al microbioma del hospedero se determina
10 mediante la presencia detectable del microorganismo sintético en el al menos un sitio durante un período de al menos dos semanas, al menos cuatro semanas, al menos seis semanas, al menos ocho semanas, al menos diez semanas, al menos 12 semanas, al menos 16 semanas, al menos 26 semanas, al menos
15 30 semanas, al menos 36 semanas, al menos 42 semanas o al menos 52 semanas después de la etapa de administración.

 En algunas modalidades, la capacidad de reemplazar de manera duradera el microorganismo no deseado se determina por la ausencia de presencia detectable del microorganismo no
20 deseado en el al menos un sitio durante un período de al menos dos semanas, al menos cuatro semanas, al menos seis semanas, al menos ocho semanas, al menos diez semanas, al menos 12 semanas, al menos 16 semanas, al menos 26 semanas, al menos 30 semanas, al menos 36 semanas, al menos 42 semanas
25 o al menos 52 semanas después de la etapa de administración.

En algunas modalidades, la capacidad de ocupar el mismo nicho se determina por la ausencia de colonización conjunta del microorganismo no deseado y el microorganismo sintético en el al menos un sitio después de la etapa de administración. En algunas modalidades, la ausencia de colonización conjunta se determina al menos dos semanas, al menos cuatro semanas, al menos seis semanas, al menos ocho semanas, al menos diez semanas, al menos 12 semanas, al menos 16 semanas, al menos 26 semanas, al menos 30 semanas, al menos 36 semanas, al menos 42 semanas o al menos 52 semanas después de la etapa de administración.

En algunas modalidades, el microorganismo sintético comprende al menos un elemento que imparte el atributo no nativo que se incorpora de manera duradera al microorganismo sintético. En algunas modalidades, el al menos un elemento que imparte el atributo no nativo se incorpora de manera duradera al microbioma del hospedero a través del microorganismo sintético.

En algunas modalidades, el al menos un elemento que imparte el atributo no nativo es una modificación molecular de interruptor de inactivación, modificación molecular de bloqueo de virulencia o modificación molecular de nanofábrica. En algunas modalidades, el microorganismo sintético comprende modificación molecular que está integrada a un cromosoma del microorganismo sintético. En algunas

modalidades, el microorganismo sintético comprende una modificación molecular de bloqueo de virulencia que impide la transferencia horizontal de genes del material genético desde el microorganismo no deseado.

5 En algunas modalidades, la muerte celular promedio medible del microorganismo sintético ocurre dentro de al menos un período preestablecido después de la inducción del primer promotor después del cambio de estado. En algunas modalidades, la muerte celular promedio medible ocurre dentro
10 de al menos un período preestablecido seleccionado del grupo que consiste en al menos 1, 5, 15, 30, 60, 90, 120, 180, 240, 300 o 360 min después del cambio de estado. En algunas modalidades, la muerte celular promedio medible es al menos 50% cfu, al menos 70%, al menos 80%, al menos 90%, al menos
15 95%, al menos 99%, al menos 99.5%, al menos 99.8% o al menos 99.9% de reducción de recuento de cfu después del período preestablecido. En algunas modalidades, el cambio de estado se selecciona de uno o más de pH, temperatura, presión osmótica, osmolalidad, nivel de oxígeno, concentración de
20 nutrientes, concentración de sangre, concentración de plasma, concentración de suero, concentración de metal, concentración de metal quelado, cambio de composición o concentración de uno o más factores inmunitarios, concentración de minerales y concentración de electrolitos. En algunas modalidades, el
25 cambio de estado es una mayor concentración y/o cambio en la

composición de sangre, suero o plasma en comparación con las condiciones fisiológicas (nicho) normales en el al menos un sitio en el sujeto.

En algunas modalidades, el microorganismo no deseado es
5 una cepa de *Staphylococcus aureus*, y en donde la presencia detectable se mide a través de un método que comprende obtener una muestra del al menos un sitio del sujeto, poner en contacto un agar cromogénico con la muestra, incubar el agar puesto en contacto y realizar el recuento de las cfu
10 positivas de la especie bacteriana después de un período predeterminado.

En algunas modalidades, se proporciona un método que comprende una etapa de descolonización que comprende administrar tópicamente un agente descolonizante a al menos
15 un sitio en el sujeto para reducir o eliminar la presencia del microorganismo no deseado del al menos un sitio.

En algunas modalidades, la etapa de descolonización comprende la administración tópica de un agente descolonizante, en donde no se administra simultáneamente
20 ningún agente antimicrobiano sistémico. En algunas modalidades, no se administra ningún agente antimicrobiano sistémico antes, de manera concurrente con o después de una semana, dos semanas, tres semanas, un mes, dos meses, tres meses, seis meses o un año de la primera administración
25 tópica del agente descolonizante o la administración del

microorganismo sintético. En algunas modalidades, el agente descolonizante se selecciona del grupo que consiste en un agente desinfectante, bactericida, antiséptico, astringente y antimicrobiano. En algunas modalidades, el agente

5 descolonizante se selecciona del grupo que consiste en alcoholes (alcohol etílico, alcohol isopropílico), aldehídos (glutaraldehído, formaldehído, agentes liberadores de formaldehído (noxitiolina = oximetilentiourea, tauolina, hexamina, dantoína), o-ftalaldehído), anilidas (triclocarbán

10 = TCC = 3,4,4'-triclorocarbanilida), biguanidas (clorhexidina, alexidina, biguanidas poliméricas (polihexametilen biguanidas con MW> 3,000 g/mol, vantocil), diamidinas (propamidina, isetionato de propamidina, diclorhidrato de propamidina, dibromopropamidina, isetionato

15 de dibromopropamidina), fenoles (fenticlor, p-cloro-m-xilenol, cloroxilenol, hexaclorofeno), bisfenoles (triclosán, hexaclorofeno), cloroxilenol (PCMX), compuestos de amonio cuaternario (cetrimida, cloruro de benzalconio, cloruro de cetilpiridinio), compuestos de plata (sulfadiazina de plata,

20 nitrato de plata), compuestos de peroxi (peróxido de hidrógeno, ácido peracético, peróxido de benzoílo), compuestos de yodo (povidona-yodo, poloxámero-yodo, yodo), agentes liberadores de cloro (hipoclorito de sodio, ácido hipocloroso, dióxido de cloro, dicloroisocianurato de sodio,

25 cloramina-T), compuestos de cobre (óxido de cobre),

isotretinoína, compuestos de azufre, extractos botánicos (*Melaleuca* spp. (aceite de árbol de té, (*Vaccinium* spp. (por ejemplo, proantocianidinas tipo A), *Cassia fistula* Linn, *Baekea frutesdens* L., *Melia azedarach* L., *Muntingia calabura*,
5 *Vitis vinifera* L, *Terminalia avicennioides* Guill & Perr., *Phyllanthus discoideus* Muel. Muel-Arg., *Ocimum gratissimum* Linn., *Acalypha wilkesiana* Muell-Arg., *Hypericum pruinatum* Boiss.&Bal., *Hypericum olympicum* L. e *Hypericum sabrum* L., *Hamamelis virginiana* (hamamelis), aceite de clavo de olor,
10 *Eucalyptus* spp., *rosmarinus officinalis* spp. (romero), *thymus* spp. (tomillo), *Lippia* spp. (orégano), lemongrass spp., *cinnamomum* spp., *geranium* spp., *lavendula* spp.), ácido aminolevulínico, y compuestos antibióticos tópicos (bacteriocinas; mupirocina, bacitracina, neomicina,
15 polimixina B, gentamicina).

En algunas modalidades, el agente antimicrobiano se selecciona del grupo que consiste en vancomicina, cefazolina, cefalotina, cefalexina, linezolid, daptomicina, clindamicina, lincomicina, mupirocina, bacitracina, neomicina, polimixina
20 B, gentamicina, prulifloxacin, ulifloxacin, fidaxomicina, minociclina, metronidazol, metronidazol, sulfametoxazol, ampicilina, trimetoprima, ofloxacin, norfloxacin, tinidazol, norfloxacin, ornidazol, levofloxacin, ácido nalidíxico, ceftriaxona, azitromicina, cefixima, ceftriaxona,
25 cefalexina, ceftriaxona, rifaximina, ciprofloxacina,

norfloxacin, ofloxacin, levofloxacin, gatifloxacin, gemifloxacin, prufloxacin, ulifloxacin, moxifloxacin, nistatina, anfotericina B, flucitosina, ketoconazol, posaconazol, clotrimazol, voriconazol, griseofulvin, nitrato
5 de miconazol y fluconazol.

En algunas modalidades, la descolonización comprende administrar tópicamente el agente descolonizante al menos una, dos, tres, cuatro, cinco o seis o más veces antes de la etapa de reemplazo. En algunas modalidades, la etapa de
10 descolonización comprende administrar el agente descolonizante al al menos un sitio hospedero en el sujeto de una a seis o más veces o de dos a cuatro veces a intervalos de entre 0.5 y 48 horas, y en donde la etapa de reemplazo se realiza después de la etapa de descolonización final.

En algunas modalidades, se proporciona un método que comprende descolonizar un microorganismo no deseado y reemplazarlo con un microorganismo sintético que comprende la administración tópica de una composición que comprende al menos 10^5 , al menos 10^6 , al menos 10^7 , al menos 10^8 , al menos
15 10^9 , al menos 10^{10} o al menos 10^{11} CFU de la cepa sintética y un portador aceptable desde el punto de vista farmacéutico al al menos un sitio hospedero en el sujeto. En algunas modalidades, la etapa de reemplazo inicial se realiza dentro de las 12 horas, 24 horas, 36 horas, 2 días, 3 días, 4 días,
20 5 días, 6 días, 7 días, 8 días, 9 días o 10 días, o entre 0.5

-10 días, 1-7 días o 2 a 5 días de la etapa de descolonización. En algunas modalidades, la etapa de reemplazo se repite a intervalos de no más de una vez cada dos semanas a seis meses después de la etapa de descolonización final. En algunas modalidades, la etapa de descolonización y la etapa de reemplazo se repiten a intervalos de no más de una vez cada dos semanas a seis meses, o tres semanas a tres meses. En algunas modalidades, el reemplazo comprende administrar el microorganismo sintético al al menos un sitio al menos una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve o diez veces. En algunas modalidades, el reemplazo comprende administrar el microorganismo sintético al al menos un sitio no más de una, no más de dos, no más de tres veces o no más de cuatro veces por mes.

En algunas modalidades, el método para descolonizar el microorganismo no deseado y reemplazarlo con un microorganismo sintético comprende además promover la colonización del microorganismo sintético en el sujeto. En algunas modalidades, la colonización promotora del microorganismo sintético en el sujeto comprende administrar al sujeto un agente promotor, opcionalmente donde el agente promotor es un nutriente, prebiótico, comensal, agente estabilizante, humectante y/o especie bacteriana probiótica. En algunas modalidades, el promotor comprende administrar una

especie probiótica en de 10^5 a 10^{10} cfu, 10^6 a 10^9 cfu o 10^7 a 10^8 cfu al sujeto después de la etapa de descolonización inicial.

En algunas modalidades, el nutriente se selecciona de
 5 cloruro de sodio, cloruro de litio, glicerofosfato de sodio, feniletanol, manitol, triptona, péptido y extracto de levadura. En algunas modalidades, el prebiótico se selecciona del grupo que consiste en ácidos grasos de cadena corta (ácido acético, ácido propiónico, ácido butírico, ácido
 10 isobutírico, ácido valérico, ácido isovalérico), glicerol, oligosacáridos derivados de pectina de subproductos agrícolas, fructooligosacáridos (por ejemplo, prebióticos similares a la inulina), galactooligosacáridos (por ejemplo, rafinosa), ácido succínico, ácido láctico y
 15 mananooligosacáridos.

En algunas modalidades, el probiótico se selecciona del grupo que consiste en *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium lactis*, *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium longum*, *Lactobacillus reuteri*,
 20 *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus salivarius*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactococcus lactis*, *Streptococcus thermophiles* y *Enterococcus faecalis*.

25 En algunas modalidades, el comensal se selecciona del

grupo que consiste en *Acinetobacter johnsonii*, *Acinetobacter baumannii*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus lugdunensis*, *Staphylococcus warneri*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Corynebacterium acnes*,
 5 *Corynebacterium striatum*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Corynebacterium minutissimum*, *Cutibacterium acnes*, *Propionibacterium acnes*, *Propionibacterium granulosum*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus viridans*,
 10 *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus anginosus*, *Streptococcus constellatus*, *Streptococcus intermedius*, *Streptococcus agalactiae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas oryzae*, *Pseudomonas stutzeri*, *Pseudomonas putida* y *Pseudomonas fluorescens*.

15 En algunas modalidades, el microorganismo no deseado es un microorganismo resistente a agentes antimicrobianos. En algunas modalidades, el microorganismo resistente a agentes antimicrobianos es una bacteria resistente a los antibióticos. En algunas modalidades, la bacteria resistente
 20 a los antibióticos es una especie bacteriana grampositiva seleccionada del grupo que consiste en un *Streptococcus* spp., *Cutibacterium* spp. y un *Staphylococcus* spp. En algunas modalidades, el *Streptococcus* spp. se selecciona del grupo que consiste en *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus pyogenes* y
 25

Streptococcus agalactiae. En algunas modalidades, el *Cutibacterium* spp. se selecciona del grupo que consiste en *Cutibacterium acnes* subsp. *acnes*, *Cutibacterium acnes* subsp. *defendens* y *Cutibacterium acnes* subsp. *elongatum*. En algunas

5 modalidades, el *Staphylococcus* spp. se selecciona del grupo que consiste en *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* y *Staphylococcus saprophyticus*. En algunas modalidades, el microorganismo no deseado es una cepa de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA) que

10 contiene un casete de cromosoma estafilocócico (SCCmec tipos I-III), que codifican uno (SCCmec tipo I) o múltiples genes de resistencia a antibióticos (SCCmec tipo II y III) y/o produce una toxina. En algunas modalidades, la toxina se selecciona del grupo que consiste en una toxina de

15 leucocidina de Panton-Valentine (PVL, por sus siglas en inglés), toxina del síndrome de shock tóxico 1 (TSST-1, por sus siglas en inglés), toxina de hemolisina alfa estafilocócica, toxina de hemolisina beta estafilocócica, toxina de hemolisina gamma estafilocócica, toxina de

20 hemolisina delta estafilocócica, enterotoxina A, enterotoxina B, enterotoxina C, enterotoxina D, enterotoxina E y una toxina coagulasa.

En algunas modalidades, el sujeto tratado con un método de acuerdo con la descripción no exhibe recurrencia o

25 colonización del microorganismo no deseado como se evidencia

al hisopar al sujeto en el al menos un sitio durante al menos dos semanas, al menos cuatro semanas, al menos seis semanas, al menos ocho semanas, al menos diez semanas, al menos 12 semanas, al menos 16 semanas, al menos 24 semanas, al menos 5 26 semanas, al menos 30 semanas, al menos 36 semanas, al menos 42 semanas, o al menos 52 semanas después de la etapa de administración.

La descripción proporciona un microorganismo sintético para reemplazar de manera duradera un microorganismo no 10 deseado en un sujeto. El microorganismo sintético comprende una modificación molecular diseñada para mejorar la seguridad al reducir el riesgo de infección sistémica. En una modalidad, la modificación molecular provoca una reducción significativa en el crecimiento o muerte celular del 15 microorganismo sintético en respuesta a sangre, suero o plasma. El microorganismo sintético puede usarse en métodos y composiciones para prevenir o reducir la recurrencia de la colonización dérmica o mucosa o la recolonización de un microorganismo no deseado en un sujeto.

20 La descripción proporciona un microorganismo sintético para usar en composiciones y métodos para tratar o prevenir, reducir el riesgo de, o reducir la probabilidad de colonización o recolonización, infección sistémica, bacteriemia o endocarditis causada por un microorganismo no 25 deseado en un sujeto.

La descripción proporciona un microorganismo sintético que comprende un nucleótido recombinante que comprende al menos una modificación molecular de interruptor de inactivación que comprende un primer gen de muerte celular asociado operativamente con una primera región reguladora que comprende un primer promotor inducible, en donde el primer promotor inducible exhibe una expresión génica condicionalmente de alto nivel del nucleótido recombinante en respuesta a la exposición a sangre, suero o plasma de al menos tres veces el aumento de la productividad basal. En algunas modalidades, el primer promotor inducible exhibe, comprende, se deriva de, o se selecciona de un gen que exhibe regulación ascendente de al menos 5 veces, al menos 10 veces, al menos 20 veces, al menos 50 veces, o al menos 100 veces dentro de al menos 30 min, 60 min, 90 min, 120 min, 180 min, 240 min, 300 min, o al menos 360 min después de la exposición a sangre, suero o plasma.

En algunas modalidades, el microorganismo sintético comprende una modificación molecular de interruptor de inactivación que comprende un primer gen de muerte celular ligado operativamente a una primera región reguladora que comprende un primer promotor inducible, en donde el primer promotor se activa (induce) por un cambio de estado en el entorno del microorganismo en comparación con las condiciones fisiológicas (nicho) normales en el al menos un sitio en el

sujeto.

En algunas modalidades, el microorganismo sintético comprende además una modificación molecular de abrazadera de expresión que comprende un gen de antitoxina específico para el primer gen de muerte celular o un producto de este, en donde el gen de antitoxina está asociado operativamente con una segunda región reguladora que comprende un segundo promotor que es constitutivo o activo tras la colonización dérmica o mucosa o en un medio completo, pero no se induce, se induce menos de 1.5 veces o se reprime después de la exposición a sangre, suero o plasma durante al menos 30 minutos. En algunas modalidades, el segundo promotor es activo tras la colonización dérmica o mucosa o en medio TSB, pero se reprime al menos 2 veces tras la exposición a sangre, suero o plasma después de un período de al menos 30 min, 60 min, 90 min, 120 min, 180 min, 240 min, 300 min o al menos 360 min.

En algunas modalidades, el microorganismo sintético exhibe una muerte celular promedio medible de al menos 50% de reducción de cfu dentro de al menos 1, 5, 15, 30, 60, 90, 120, 180, 240, 300 o 360 minutos después de la exposición a sangre, suero o plasma. En algunas modalidades, el microorganismo sintético exhibe una muerte celular promedio medible de al menos 70%, al menos 80%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 99%, al menos 99.5%, al menos 99.8% o al menos

99.9% de reducción de recuento de cfu dentro de al menos 1, 5, 15, 30, 60, 90, 120, 180, 240, 300 o 360 minutos después de la exposición a sangre, suero o plasma.

En algunas modalidades, el microorganismo sintético
5 comprende una modificación molecular de interruptor de inactivación que reduce o previene el crecimiento infeccioso del microorganismo sintético en condiciones sistémicas en un sujeto.

En algunas modalidades, el microorganismo sintético
10 comprende al menos una modificación molecular que está integrada a un cromosoma del microorganismo sintético.

En algunas modalidades, el microorganismo sintético se deriva de un microorganismo diana que tiene el mismo género y especie que un microorganismo no deseado. En algunas
15 modalidades, el microorganismo diana es susceptible a al menos un agente antimicrobiano. En algunas modalidades, el microorganismo diana se selecciona de un microorganismo diana bacteriano, fúngico o protozoario. En ciertas modalidades, el microorganismo diana puede colonizar un nicho dérmico y/o
20 mucoso.

En algunas modalidades, el microorganismo diana puede integrarse biómicamente con el microbioma del hospedero descolonizado. En algunas modalidades, el microorganismo sintético se deriva de un microorganismo diana aislado del
25 microbioma del hospedero. En algunas modalidades, el

microorganismo diana se selecciona de un microorganismo diana bacteriano, fúngico o protozoario.

En algunas modalidades, el microorganismo diana es miembro de un género seleccionado del grupo que consiste en

5 *Acinetobacter*, *Corynebacterium*, *Cutibacterium*,
Staphylococcus, *Streptococcus*, *Propionibacterium* y
Pseudomonas.

En algunas modalidades, el microorganismo diana es una especie bacteriana que puede colonizar un nicho dérmico y/o

10 mucoso y es miembro de un género seleccionado del grupo que consiste en *Acinetobacter*, *Corynebacterium*, *Cutibacterium*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Propionibacterium* y *Pseudomonas*. En algunas modalidades, el microorganismo diana se selecciona del grupo que consiste en *Acinetobacter*

15 *johnsonii*, *Acinetobacter baumannii*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus lugdunensis*, *Staphylococcus warneri*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Corynebacterium acnes*, *Corynebacterium striatum*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Corynebacterium minutissimum*,

20 *Cutibacterium acnes*, *Propionibacterium acnes*, *Propionibacterium granulosum*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus viridans*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus anginosus*, *Streptococcus constellatus*,

25 *Streptococcal intermedius*, *Streptococcus agalactiae*,

Pseudomonas aeruginosa, *Pseudomonas oryzihabitans*,
Pseudomonas stutzeri, *Pseudomonas putida* y *Pseudomonas fluorescens*. En una modalidad particular, se proporciona un
microorganismo sintético que se deriva de una cepa de
5 *Staphylococcus aureus*. En algunas modalidades, la cepa diana
es una cepa de *Staphylococcus aureus* 502a o cepa RN4220.

En algunas modalidades, el microorganismo sintético
comprende una modificación molecular de interruptor de
inactivación que comprende un gen de muerte celular
10 seleccionado del grupo que consiste en *sprA1*, *sprA2*, *kpn1*,
smal, *sprG*, *relF*, *rsaE*, *yoeB*, *mazF*, *yefM* o gen de toxina
lisostafina. En algunas modalidades, el gen de muerte celular
comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo
que consiste en SEC. ID NO.: 122, 124, 125, 126, 127, 128,
15 274, 275, 284, 286, 288, 290, 315 y 317, o una secuencia de
nucleótidos sustancialmente idéntica.

En algunas modalidades, el primer promotor inducible es
un promotor sensible a sangre, suero y/o plasma. En algunas
modalidades, el primer promotor está regulado de manera
20 ascendente en al menos 1.5 veces, al menos 3 veces, al menos
5 veces, al menos 10 veces, al menos 20 veces, al menos 50
veces o al menos 100 veces dentro de un período seleccionado
del grupo que consiste en al menos 30 min, 60 min, 90 min,
120 min, 180 min, 240 min, 300 min y al menos 360 min después
25 de la exposición a sangre, suero o plasma humanos. En algunas

modalidades, el primer promotor no se induce, se induce menos de 1.5 veces o se reprime en ausencia del cambio de estado. En algunas modalidades, el primer promotor se induce al menos 1.5, 2, 3, 4, 5 o al menos 6 veces en un período en presencia
 5 de suero, sangre o plasma. En algunas modalidades, el primer promotor no se induce, se induce menos de 1.5 veces o se reprime en las condiciones fisiológicas (nicho) normales en el al menos un sitio.

En algunas modalidades, el primer promotor inducible
 10 comprende o se deriva de un gen seleccionado del grupo que consiste en *isdA* (proteína determinante de superficie regulada por hierro A), *isdB* (proteína determinante de superficie regulada por hierro B), *isdG* (monooxigenasa degradante de hemo), *hlgA* (componente gamma-hemolisina A),
 15 *hlgA1* (gamma-hemolisina), *hlgA2* (gamma-hemolisina), *hlgB* (componente gamma-hemolisina B), *hrtAB* (transportador regulado por hemo), *sbnC* (proteína de biosíntesis del sideróforo de la familia luc C), *sbnD*, *sbnI*, *sbnE* (proteína de biosíntesis de sideróforos de la familia lucA/lucC), *isdI*,
 20 *lrgA* (regulador de mureína hidrolasa A), *lrgB* (regulador de mureína hidrolasa B), *ear* (proteína ear), *fhuA* (proteína de fijación a ATP de transporte de ferricromo *fhuA*), *fhuB* (permeasa de transporte de ferricromo), *hlyC* (fosfolipasa C), gen transportador hemo ABC 2, gen transportador ABC de hemo,
 25 *isd* ORF3, *sbnF*, gen alanina deshidrogenasa, gen de

diaminopimelato descarboxilasa, gen transportador ABC de hierro, gen treonina deshidratasa, gen transportador ABC sideróforo, gen SAM dep Metrans, *HarA*, *splF* (serina proteasa SplF), *splD* (serina proteasa SplD), *dps* (proteína de estrés general 20U), SAUSA300_2617 (proteína de fijación a ATP de transportador ABC de cobalto putativa), SAUSA300_2268 (proteína de la familia de simportador de sodio/ácido biliar), SAUSA300_2616 (proteína de transporte de la familia de cobalto), *srtB* (sortasa B), *sbnA* (proteína de biosíntesis de sideróforos probable *sbnA*), *sbnB*, *sbnG*, *leuA* (enzima biosintética de aminoácidos de 2-isopropilmalato sintasa), *sstA* (proteína de membrana de transporte de hierro), *sirA* (proteína de fijación a sustrato de transportador ABC de hierro), *isdA* (transportador de hemo) y *spa* (proteína estafilocócica A). En algunas modalidades, el primer promotor inducible comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en SEC. ID NO.: 114, 115, 119, 120, 121, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162 y 163, o una secuencia de nucleótidos sustancialmente idéntica de estos.

En algunas modalidades, el microorganismo sintético comprende una modificación molecular de abrazadera de expresión que comprende un segundo promotor asociado operativamente con un gen de antitoxina que codifica una

secuencia de ARN antisentido capaz de hibridarse con al menos una porción del primer gen de muerte celular. En algunas modalidades, el gen de antitoxina codifica una secuencia de ARN antisentido capaz de hibridarse con al menos una porción

5 del primer gen de muerte celular. En algunas modalidades, el gen de antitoxina se selecciona del grupo que consiste en un gen de antitoxina *sprA1*, gen de antitoxina *sprA2*, gen de antitoxina *sprG* o *sprF*, gen de antitoxina *holina*, gen de antitoxina *187-lysK*, gen de antitoxina *yefM*, gen de

10 antitoxina *lisostafina* o gen de antitoxina *mazE*, gen de antitoxina *kpn1*, gen de antitoxina *smal*, gen de antitoxina *relF*, gen de antitoxina *rsaE* o gen de antitoxina *yoeB*, respectivamente. En algunas modalidades, el gen de antitoxina comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo

15 que consiste en SEC. ID NO.: 273, 306, 307, 308, 309, 310, 311, 312, 314, 319 o 322, o una secuencia de nucleótidos sustancialmente idéntica.

En algunas modalidades, el segundo promotor comprende o se deriva de un gen seleccionado del grupo que consiste en

20 *clfB* (factor de aglutinación B), *sceD* (autolisina, exoproteína D), *walkR* (regulador de virulencia), *atlA* (autolisina principal), *oatA* (O-acetiltransferasa A); gen de fosforibosilglicinamida formiltransferasa, gen de fosforibosilglicinamida formiltransferasa, gen

25 amidofosforibosiltransferasa, gen de

fosforibosilformilglicinamidina sintasa, gen de
 fosforibosilformilglicinamidina sintasa, gen de
 fosforibosilaminoimidazol-succinocarboxamida, gen de
 trehalosa permeasa IIC, gen regulador de la transcripción de
 5 la familia de DeoR, gen de fosfofructocinasa, gen de la
 subunidad del transportador de fructosa PTS IIC, gen de
 galactosa-6-fosfata isomerasa, NarZ, NarH, NarT, gen de
 alquilhidroperoxidasa, gen de proteína hipotética, gen de
 factor trans DeoR, gen de lisofosfolipasa, gen de chaperona
 10 de desagregación de proteínas, gen de alquilhidroperoxidasa,
 gen de fosfofructocinasa, *gyrB*, *sigB* y *rho*. En algunas
 modalidades, el segundo promotor es un P_{c1fB} (factor de
 aglutinación B) que comprende una secuencia de nucleótidos de
 SEC. ID NO.: 117, 118, 129 o 130, o una secuencia de
 15 nucleótidos sustancialmente idéntica de estos.

En algunas modalidades, el microorganismo sintético
 comprende una modificación molecular de bloqueo de virulencia
 y/o una modificación molecular de nanofábrica. En algunas
 modalidades, la modificación molecular de bloqueo de
 20 virulencia impide la transferencia horizontal de genes del
 material genético desde el microorganismo no deseado.

En algunas modalidades, la modificación molecular de
 nanofábrica comprende una inserción de un gen que codifica,
 una inactivación de un gen que codifica, o una modificación
 25 genética de un gen que codifica un producto seleccionado del

grupo que consiste en una enzima, aminoácido, intermediario metabólico y una molécula pequeña.

La descripción proporciona una composición que comprende una cantidad eficaz de un microorganismo sintético de acuerdo con la descripción y un portador, diluyente, emoliente, aglutinante, excipiente, lubricante, agente endulzante, agente saborizante, agente humectante, conservador, amortiguador o absorbente aceptable desde el punto de vista farmacéutico, o una combinación de estos. En algunas modalidades, la composición comprende además un agente promotor. En algunas modalidades, el agente promotor se selecciona de un nutriente, prebiótico, comensal y/o especie bacteriana probiótica.

La descripción proporciona una unidad de dosis única que comprende una composición o microorganismo sintético de la descripción. En algunas modalidades, la unidad de dosis única comprende al menos alrededor de 10^5 , al menos 10^6 , al menos 10^7 , al menos 10^8 , al menos 10^9 , al menos 10^{10} CFU, o al menos 10^{11} de la cepa sintética y un portador aceptable desde el punto de vista farmacéutico. En algunas modalidades, la unidad de dosis única se formula para administración tópica. En algunas modalidades, la unidad de dosis única se formula para administración dérmica o mucosa.

La descripción proporciona una composición de microorganismos sintéticos de acuerdo con la descripción para

usarse en la elaboración de un medicamento para usarse en un método que elimina, previene o reduce el riesgo de la recurrencia de un microorganismo no deseado en un sujeto.

La descripción proporciona un kit para prevenir o
5 reducir la recurrencia de la colonización dérmica o mucosa o la recolonización de un microorganismo no deseado en un sujeto, en donde el kit comprende al menos un recipiente, que comprende un microorganismo sintético, composición o dosis
única de la descripción, y opcionalmente uno o más
10 componentes adicionales seleccionados de un segundo recipiente que comprende un agente descolonizante, una hoja de instrucciones, al menos un tercer recipiente que comprende un agente promotor y/o un aplicador.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

15 La Figura 1 muestra un diagrama de una modificación molecular representativa insertada en un *Staphylococcus aureus*, por ejemplo, BioPlx-01, para crear una cepa de microorganismo sintético BioPlx. Un casete que comprende la modificación molecular comprende un interruptor de
20 inactivación y una abrazadera de expresión, que incluye el promotor de abrazadera de expresión (por ejemplo, ClfB) clonado para impulsar la expresión del ARN antisentido (antitoxina) SprA1, en donde el casete se incorpora en el mismo módulo de expresión a partir de un interruptor de
25 inactivación que comprende un promotor sensible al suero (por

ejemplo, *PhlgA*) asociado operativamente con el gen de toxina SprA1. En esta cepa, la exposición al suero/sangre activa la toxina (por ejemplo, hasta 350 veces o más) pero no la antitoxina, y el crecimiento en TSB o en la piel activa la antitoxina pero no la toxina.

La Figura 2 muestra el vector transportador PCN51 usado para clonar genes en una cepa de transferencia de *E coli* - *Staphylococcus aureus* (IM08B) para la transfección del vector en BioPlx-01 para evaluación.

Las Figuras 3A-3C muestran la Tabla 4A con secuencias de cebadores para la construcción recombinante de *Staphylococcus aureus* sintético a partir de la cepa BioPlx-01.

Las Figuras 4A-4D muestran la Tabla 4B con secuencias de cebadores para la construcción CRISPR de *Staphylococcus aureus* sintético a partir de la cepa BioPlx-01.

La Figura 5A muestra un mapa genético de un plásmido integrativo pKOR1 que representa el *repF* (gen de replicación de pE194ts), *secY570* (570 nucleótidos de N-terminal de secY que incluyen el sitio de fijación al ribosoma), *cat* (cloranfenicol acetiltransferasa), *attP* (sitio de unión lambda de la página), *ori(-)* (origen de replicación del plásmido ColE1) y *bla* (b-lactamasa). (+) o (-) indica funciones en bacterias grampositivas (+) o gramnegativas (-). El promotor P_{xyl/tetO} y la dirección de transcripción del promotor se indican con una flecha.

La Figura 5B muestra un mapa genético de un plásmido integrativo pIMAY. (número de acceso JQ62198).

La Figura 6 muestra la inducción multiplicada del candidato promotor HlgA (hemolisina gamma) en una cepa de *Staphylococcus aureus* BioPlx-01 susceptible a meticilina por incubación con suero humano. La expresión se normalizó a un gen de mantenimiento (*gyrB*) y se comparó con la de las células que crecen logarítmicamente en medio TSB líquido.

La Figura 7 muestra la inducción multiplicada del candidato promotor SstA (transporte de hierro) en una cepa de *Staphyococcus aureus* BioPlx-01 susceptible a meticilina por incubación con suero humano. La expresión se normalizó a un gen de mantenimiento (*GyrB*) y se comparó con la de las células que crecen logarítmicamente en medio TSB líquido.

La Figura 8 muestra la región intergénica del sitio diana de gARN CRISPR identificado entre 1,102,100 y 1,102,700 bp en el genoma de *Staphylococcus aureus* 502a, GenBank: CP007454.1.

La Figura 9 muestra una captura de pantalla representativa de CRISPRScan usada para encontrar gARN putativos para usarse en métodos CRISPR.

La Figura 10 muestra el casete para la integración a través de CRISPR y el diseño del vector pCasSA. Cap1A es un promotor constitutivo que controla la transcripción de gARN. La secuencia diana es una secuencia de direccionamiento, por

ejemplo, con 10 posibles dianas de corte (1.1, 1.2, etc.). sgARN es un ARN guía monocatenario (proporciona un componente estructural). Xba1 y Xho1 son dos sitios de restricción usados para agregar los HA al vector pCasSA. Los HA son
5 brazos homólogos para usar como plantillas para la reparación dirigida por homología (típicamente 200 - 1000 bp). P_{rpsL} -mCherry es un promotor constitutivo que controla el mCherry "optimizado". P_{rpsL} -Cas9 es un promotor constitutivo que controla la expresión de la proteína Cas9.

10 Las Figuras 11A-11D muestran vectores para usar en la presente descripción. La fig. 11A es un vector usado para el cribado del promotor con fluorescencia mediante el uso de pCN51. La fig. 11B es un vector para el cribado del promotor con el gen de muerte celular. La fig. 11C es un vector para
15 la integración cromosómica mediante CRISPR. La fig. 11D es un vector para la integración cromosómica mediante el uso de recombinación homóloga. HA izquierdo y derecho (o dirección 5' y dirección 3'): brazos de homología al locus genómico diana, direccionamiento de CRISPR: ARN guía al locus
20 genómico, mCherry: proteína indicadora fluorescente, proteína Cas9: endonucleasa CRISPR, kanR: resistencia a kanamicina, oriT: origen de la transferencia (para integración) y *smal*: gen de muerte representativo (endonucleasa de restricción).

Las Figuras 12A-12C muestran la secuencia de nucleótidos
25 (SEC. ID NO.: 131) del plásmido integrativo pIMAY. (número de

acceso JQ62198).

La Figura 13A muestra la actividad de los candidatos de promotores *isdA*, *isdB*, *hlgA2*, *hrtAB*, *isdG*, *sbnE*, *lrgA*, *lrgB*, *fhuA*, *fhuB*, *ear*, *hly*, *splF*, *splD*, *dps* y SAUSA300_2617 a 1
5 min, 15 min y 45 min en suero y las relaciones de cambio en la expresión génica en comparación con los medios por qPCR.

La Figura 13B muestra la actividad de los candidatos de promotores *isdA*, *isdB*, *hlgA2*, *hrtAB*, *isdG*, *sbnE*, *lrgA*, *lrgB*, *fhuA*, *fhuB*, *ear*, *hly*, *splF*, *splD*, *dps* y SAUSA300_2617 a 1
10 min, 15 min y 45 min en sangre y las relaciones de cambio en la expresión génica en comparación con los medios por qPCR.

La Figura 13C es una gráfica que muestra la expresión génica en comparación con los medios por qPCR.

La Figura 14 muestra la inhibición inducible del
15 crecimiento celular de las células pTK1 de microorganismo sintético que comprenden un gen de toxina de muerte celular (*sprA1*) detrás de un promotor de cadmio en un plásmido pCN51 (pTK1) que se transformó en células *Staphylococcus aureus* RN4220. OD (630 nm) leída a las 2 h después de la inducción.
20 Las células 4220 de tipo silvestre mostraron un buen crecimiento celular tanto en ausencia de cadmio como en presencia de 500 nM y 1 μ M de cadmio. Las células pTK1-1 y pTK1-2 mostraron un buen crecimiento en ausencia de cadmio, pero el crecimiento celular se inhibió significativamente en
25 presencia de 500 nM y 1 μ M de cadmio 2 horas después de la

inducción.

La Figura 15A muestra una vista ampliada de un mapa plasmídico de p174 (pRAB11_Ptet-sprA1) de la región del plásmido que contiene el casete Ptet-sprA.

5 La Figura 15B muestra el plásmido p174 (pRAB11_Ptet-sprA1) completo en su forma circular nativa.

La Figura 15C muestra fotografías de diluciones de placa a las 6 horas de células *Staphylococcus aureus* 502a p174 de microorganismo sintético que comprenden un gen de toxina de muerte celular (sprA1) detrás de un promotor de anhidrotetraciclina en un plásmido pRAB11-2 (p174) que se transformó en células *Staphylococcus aureus* 502a. El plásmido p174 que contiene un antisentido sprA1 (Das) suprimido. Las diluciones de placa a $10e-5$ se muestran después de 6 horas de inducción para células 502a p174 (tet-sprA1Das) no inducidas (izquierda) e inducidas (derecha) en BHI chlor10. La placa de la izquierda (no inducida) era incontable a $10e-5$ pero a $10e-6$ se contaban ~ 720 colonias. La placa inducida a la derecha a $10e-5$ produjo 16 colonias. El porcentaje de supervivencia de las células inducidas 6 horas después de la inducción fue de 0.22%.

La Figura 16 muestra el crecimiento celular antes y después de la inducción de cuatro cepas sintéticas derivadas de *Staphylococcus aureus* 502a que tienen un sistema de expresión inducible a base de plásmido que comprende cuatro

candidatos diferentes de genes de muerte celular *sprA1*, *187-lysK*, *holina* y *sprG*. Los candidatos de genes de muerte celular fueron clonados detrás de un promotor inducible por tetraciclina en plásmidos *pRAB11* y se transformaron en

5 células *Staphylococcus aureus* 502a. Las lecturas calculadas de OD600 se tomaron a T=0, 30, 60, 120, y 240 min después de la inducción de cepas inducidas (+) por AtC ilustradas mediante líneas discontinuas (- - - - -) y cepas no inducidas (-) indicadas mediante líneas continuas (_____)

10 para BP_068 (502a *pRAB11*-Ptet-*sprA1*), BP_069 (502a *pRAB11*-Ptet-*187lysK*), BP_070 (502a *pRAB11*-Ptet-*holina*) y BP_071 (502a *pRAB11*-Ptet-*sprG1*) y en comparación con BP_001 (502a wt) en medios BHI. Cada una de las cepas inducidas (+) BP_068 (*sprA1*), BP_069 (*187lysK*) y BP_070 (*holina*) mostraron (i)

15 buen crecimiento celular antes de la inducción e (ii) inhibición significativa del crecimiento celular después de la inducción. BP_068 (+) exhibió la mejor inhibición del crecimiento celular en cada punto temporal T=30, T=60, T=60, T=120 y T=240 min después de la inducción, por lo que se

20 seleccionó el gen *sprA1* para el desarrollo inicial adicional de un interruptor de inactivación en *Staphylococcus aureus* 502a.

La Figura 17 muestra un gráfico de barras que muestra la diferencia en las unidades formadoras de colonias (cfu/mL)

25 entre T=0 (gris) y 240 min (negro) de cepas BP_068 (502a

pRAB11-Ptet -sprA1), BP_069 (502a pRAB11-Ptet-187lysK), BP_070 (502a pRAB11-Ptet-holina) y BP_071 (502a pRAB11-Ptet-sprG1) no inducidas (-) e inducidas (+) por anhidrotetraciclina en comparación con BP_001 (502a wt) en
5 medios BHI. Cada una de las cepas inducidas (+) BP_068 (sprA1), BP_069 (187lysK) y BP_070 (holina) mostraron (i) buen crecimiento celular antes de la inducción e (ii) inhibición significativa del crecimiento celular después de la inducción. BP_068 exhibió la mejor inhibición del
10 crecimiento celular 240 min después de la inducción, por lo que se seleccionó el gen sprA1 para el desarrollo inicial adicional de un interruptor de inactivación en *Staphylococcus aureus* 502a.

La Figura 18 muestra la relación de cambio de expresión
15 de GFP de subcultivos inducidos (+) y no inducidos (-) de cepas de *Staphylococcus aureus* BP_001, BP_055 y BP_076.

La Figura 19 muestra un mapa del genoma de la cepa BP_076 (SA 502a, ΔsprA1::Ptet-GFP).

La Figura 20 muestra un mapa de plásmido construido para
20 realizar la integración genómica en *Staphylococcus aureus*.

La Figura 21 muestra un mapa del interruptor de inactivación PsbnA-sprA1 en el genoma de *Staphylococcus aureus* 502a. El promotor PisdB sensible al suero y la sangre está operativamente ligado al gen de muerte celular de toxina
25 sprA1.

La Figura 22 muestra un mapa de la construcción de un interruptor de inactivación mediante el uso de un promotor PisdB sensible al suero y la sangre ligado operativamente al gen de muerte celular de toxina sprA1 y una abrazadera de expresión que comprende un segundo promotor clfB ligado operativamente a sprA AS para evitar la expresión permeable de la toxina en ausencia de sangre o suero. El interruptor de inactivación se incorpora al genoma de *Staphylococcus aureus* 502a.

La Figura 23 muestra una curva de crecimiento de tres cepas cuando se exponen al suero humano en comparación con TSB: 502a - *Staphylococcus aureus* tipo silvestre, *Staphylococcus aureus* BP_011 - 502a Δ sprA1-sprA1(AS), y *Staphylococcus aureus* BP_084 - 502a Δ PsprA::PsbN, en donde el interruptor de inactivación está integrado al genoma de *Staphylococcus aureus* 502a. Las líneas discontinuas representan las cepas cultivadas en suero, y las líneas continuas representan las cepas cultivadas en TSB. Después de 180 minutos, la cepa BP_084 con el interruptor de inactivación integrado muestra una curva de crecimiento que se reduce significativamente en comparación con el tipo silvestre en suero y el interruptor de inactivación en medios complejos. Después de 3 horas de exposición al suero humano, las células *Staphylococcus aureus* BP_084 (502a Δ PsprA::PsbN) exhibieron 98.84% de muerte celular promedio medible en

comparación con las mismas células BP_084 en TSB.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente descripción se basa en un principio denominado "reemplazo bacteriano" o "exclusión de nicho", en
5 donde un microorganismo reemplaza y excluye a otro. En el campo de la ecología, la exclusión competitiva, o Ley de Gause, establece que dos especies que compiten por exactamente los mismos recursos no pueden coexistir de manera estable. Esto se debe al hecho de que uno de los competidores
10 tendrá una ligera ventaja sobre el otro, lo que conducirá a la extinción del competidor menor a largo plazo. En los organismos de orden superior, esto a menudo conduce a la adaptación del competidor menor a un nicho ecológico ligeramente diferente.

15 Se proporcionan métodos y composiciones para gestionar de manera duradera el microbioma de un sujeto. En modalidades, el microbioma es un microbioma dérmico y/o mucoso (Exobiome). Si bien existen métodos para tratar la infección por un microorganismo patógeno, los métodos para
20 prevenir la recurrencia son efectivamente inexistentes.

Agente infeccioso - *Staphylococcus aureus* (MSSA y MRSA)

Clasificado desde principios del siglo XX como uno de los organismos más mortales que causan enfermedades, cada año alrededor de 500,000 pacientes en hospitales de los Estados
25 Unidos de América contraen una infección por estafilococos,

principalmente por *Staphylococcus aureus*. Hasta 50,000 muertes cada año en EE. UU. se relacionan con infecciones por *Staphylococcus aureus*. *Staphylococcus aureus* existe en la piel o dentro de las fosas nasales del 40-44% de las personas sanas. *Staphylococcus aureus* también se encuentra a veces en la boca, tracto gastrointestinal, genitourinario y vías respiratorias superiores. Algunos estudios indican una prevalencia de colonización aún mayor. Por ejemplo, Eriksen *et al* sostienen que hay un mayor porcentaje de portadores transitorios o intermitentes que aumentan la cantidad de prevalencia; a veces a más de 75%.

***Staphylococcus aureus* 502a WT BioPlx-01WT® y otras cepas de reemplazo y bloqueo**

Una cepa de *Staphylococcus aureus* 502a WT denominada BioPlx-01WT® se emplea en el Ejemplo 1 y es un organismo natural de "tipo silvestre" que se sabe que es relativamente no infeccioso y que no tiene efectos secundarios conocidos. Se demostró en los estudios clínicos de BioPlx que es altamente eficaz en esta aplicación prevista (ocupar y bloquear el nicho microbiómico requerido para prevenir la recurrencia de MRSA).

Los métodos actuales previenen la infección al reemplazar de manera duradera la cepa no deseada de *Staphylococcus aureus* colonizadora (típicamente virulenta y resistente a los antibióticos) con un organismo "bloqueador",

en este estudio, la cepa de *Staphylococcus aureus* 502a WT BioPlx01-WT. Se espera que este fenómeno se aplique de manera similar para cualquier otro organismo de reemplazo de patógenos desarrollado por BioPlx.

5 En la presente se proporcionan otras cepas de reemplazo, tales como cepas sintéticas, que pueden colonizar completamente la piel y las superficies mucosas preparadas adecuadamente, y ocupar el nicho ecológico usado por esta especie bacteriana, para bloquear otras variantes que
10 recolonicen ese nicho.

Hay una gran cantidad de variantes de *Staphylococcus aureus* (más de 10,000 genomas a partir de 9/2017), así como una amplia gama de casetes genéticos y factores de virulencia asociados con esta especie.

15 *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA) se refiere a una clase de variantes resistentes a los antibióticos de esta bacteria comensal humana común y, a veces, patógena. Varía de la cepa de tipo silvestre (MSSA - *Staphylococcus aureus* sensible a meticilina) por su
20 transporte de un casete *mecA* que permite que las cepas de MRSA produzcan una proteína de fijación a la penicilina (PBP2A) alternativa que las hace resistentes al tratamiento con la mayoría de los betalactámicos y muchos otros antibióticos de primera línea.

25 *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA) y

Staphylococcus aureus virulenta sensible a meticilina (vMSSA) son variantes invasivas y virulentas de *Staphylococcus aureus* que colonizan a muchos humanos, y que pueden causar además infecciones superficiales de tejidos blandos superficiales e infecciones sistémicas graves. La colonización con MRSA o vMSSA suele ser un precursor necesario para la infección activa por estafilococos. La infección es causada por la colonia de bacterias en la piel o las membranas mucosas, que penetra la barrera inmunológica externa e invade el tejido o el torrente sanguíneo a través de una herida, una incisión, una punción con aguja u otro corte en la piel. Esto puede conducir a bacteriemia y otras infecciones sistémicas que tienen altas tasas de mortalidad.

La presente descripción usa una cepa generalmente pasiva de *Staphylococcus aureus* para reemplazar y excluir MRSA o vMSSA de su lugar habitual en el microbioma dérmico/mucoso. Se sabe que el *Staphylococcus aureus* interferente de tipo silvestre usado por BioPlx es deficiente en causar enfermedad sistémica, sin embargo, independientemente del nivel de variación o invasividad, prácticamente cualquier microorganismo puede convertirse en un "patógeno accidental" a través de la inoculación natural o accidental. Esto es particularmente cierto en el caso de *Staphylococcus aureus*.

Los métodos de descolonización y aplicación de cepas BioPlx01 desarrollados por BioPlx permiten que las cepas

proporcionadas en la presente tengan una ventaja competitiva numérica y posicional enorme. Las consecuencias de este método proporcionan un efecto mucho más prolongado de descolonización de MRSA que una simple destrucción
5 antiséptica de la cepa virulenta de MRSA. Los primeros estudios muestran un efecto de exclusión total de más de 6 meses del proceso de descolonización/recolonización de MRSA BioPlx01 con el producto BioPlx en comparación con la literatura anterior que demuestra recurrencia de 45% de la
10 colonización nasal por *Staphylococcus aureus* a las 4 semanas y de 60% a las 12 semanas con el método de descolonización estándar solo.

Descripción general de indicación

Las infecciones por *Staphylococcus aureus* son un
15 problema grave tanto en hospitales como en entornos de salud comunitaria. El *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA) es genéticamente diferente de otras cepas de *Staphylococcus aureus*, con elementos genéticos que confieren resistencia al antibiótico meticilina y otros antibióticos
20 (generalmente betalactámicos) generalmente usados para tratar las infecciones por *Staphylococcus aureus*. Las cepas de MRSA llevan un casete de expresión *mecA* que permite que las cepas de MRSA produzcan una proteína de fijación a penicilina alternativa (PBP2A), y es esta mutación la que confiere

resistencia. Debido a esta resistencia, el MRSA es difícil de tratar, lo que lo convierte en un problema potencialmente mortal en muchos casos. El MRSA se contrae con frecuencia en hospitales u otros tipos de entornos de atención médica (asociados a hospital [HA]). Estas infecciones generalmente ocurren en el momento de un proceso invasivo, tal como cirugía, cateterismo intravenoso, intubación o colocación artificial de articulaciones. El MRSA asociado a la comunidad (CA) generalmente se transmite por contacto piel a piel, y los primeros síntomas tienden a ser forúnculos grandes en la piel.

El método BioPlx que usa cepas BioPlx no es un tratamiento para la enfermedad invasiva por MRSA y, por lo tanto, no se aplica intencionalmente a un paciente durante el estado de enfermedad invasiva. Los beneficios del método BioPlx se pueden demostrar en un grupo de pacientes que: 1) tiene un alto riesgo de enfermedad invasiva, 2) tiene una alta morbilidad y mortalidad debido a este mayor riesgo para mostrar un beneficio clínico significativo y no tiene otras opciones eficaces para la prevención de la enfermedad invasiva por *Staphylococcus aureus*. Estas características definen el grupo de pacientes que los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades han rastreado con respecto al subconjunto MRSA desde 2005 que ya ha experimentado la enfermedad invasiva por MRSA: 72,444 según datos de

vigilancia ABC en 2014.

La superficie de la piel humana y la capa mucosa donde reside el *Staphylococcus aureus* en el estado de colonización tiene un nivel muy diferente de nutrientes requeridos, así como diferentes cualidades ambientales que las del interior del cuerpo humano. Se ha reconocido ampliamente que, para que las bacterias sean exitosamente invasivas, deben ser capaces de ajustar sus necesidades y respuestas entre la colonización y los estados invasivos. Esto se logra cuando la bacteria detecta los cambios entre estos entornos y activa o desactiva determinados casetes de genes que permiten la producción de proteínas más adaptadas al nuevo estado invasivo.

El método BioPlx, y específicamente las cepas BioPlx01, aprovechan este requisito para reorganizar las instrucciones moleculares que conducen a la muerte del organismo en los operones de uno o más de estos casetes específicos. Esto crea una "cepa de retención" del *Staphylococcus aureus* colonizador que no puede causar enfermedad en el paciente al que se introduce, pero que tampoco permite que otras cepas de *Staphylococcus aureus* circulantes que normalmente pueden colonizar a la población humana colonicen a este paciente. Esto ocurre a través de la premisa ecológica de exclusión competitiva.

El "tratamiento de referencia" actual para pacientes colonizados con MRSA no es uniforme. No existen pautas para

el manejo de la colonización por estafilococos en pacientes con alto riesgo de enfermedad recurrente. Las Guías de prácticas clínicas de IDSA para el tratamiento de infecciones por MRSA en adultos y niños en 2011 solo brindan apoyo de nivel C-III (el más bajo, sin datos, opinión de expertos) para los procesos de descolonización en pacientes con infecciones recurrentes de piel y tejidos blandos adquiridos en la comunidad y no mencionan la función de la descolonización en la prevención de la enfermedad invasiva por MRSA. Algunos hospitales han seguido un amplio programa de detección y aislamiento para todos los pacientes ingresados en su institución, pero no se ha demostrado que sea eficaz debido a (que incluye) poca durabilidad del efecto y menor riesgo inicial del paciente hospitalizado promedio (es decir, brote de MRSA en UC Irvine). Por lo tanto, otros hospitales redujeron su atención a los pacientes ingresados en la ICU y los casos de cirugía cardiotorácica únicamente. Se demostró que esta estrategia reduce los aislados clínicos de MRSA, así como la infección del torrente sanguíneo de cualquier patógeno. Sin embargo, estas son estrategias situacionales a corto plazo diseñadas para reducir el riesgo de infección por MRSA en un período cercano.

La enfermedad y colonización por MRSA es un problema epidemiológico complicado tanto para los Estados Unidos de América como para el resto del mundo. Las manifestaciones de

MRSA son amplias, desde la colonización asintomática hasta estados de enfermedad invasiva que confieren alta mortalidad y costo al sistema. Está claro que los pacientes con MRSA que han experimentado una enfermedad invasiva son médicamente
5 distintos. Tienen una mortalidad más alta que cualquier otra subpoblación de MRSA. Tienen una mayor tasa de fracaso del tratamiento. Tienen un riesgo mucho mayor para otro caso de MRSA invasivo que cualquier otro grupo de pacientes. Esto convierte a este grupo en un grupo huérfano adecuado hacia el
10 cual debe dirigirse el método BioPlx y que se beneficiaría con su uso.

Se puede concluir que la descolonización es en gran medida ineficaz para eliminar de manera duradera la colonización por MRSA y conduce a una alta tasa de
15 recurrencia. Se descubrió que solo la descolonización junto con la recolonización activa proporciona la conversión a largo plazo de un organismo (variante) a otro.

MRSA invasivo recurrente como enfermedad clínicamente distinta

20 Otra indicación es "prevención de MRSA invasivo recurrente". Los pacientes que ya experimentaron un episodio de infección invasiva por MRSA tienen una mayor susceptibilidad a una infección invasiva por MRSA posterior. La tecnología BioPlx proporcionada en la presente funciona al
25 ocupar el nicho en el microbioma que normalmente tendría el

potencial de ser ocupado por una forma virulenta de MRSA.

Infección sistémica causada por MRSA invasivo:

SA, que incluye la variante MRSA, puede existir en una coexistencia inofensiva en la superficie de la piel y las
5 membranas mucosas de al menos 40% de toda la humanidad, por lo que la bacteria en sí no es descriptiva de la enfermedad; más bien, su presentación clínica es definitoria.

El conjunto de autoridades nacionales e internacionales que definen y controlan esta afección coinciden en que la
10 infección invasiva por MRSA es una enfermedad separada y distinta de otras afecciones causadas por esta bacteria.

La colonización simple con cualquier tipo de *Staphylococcus aureus* no debe considerarse un estado de enfermedad. De hecho, los seres humanos con características
15 nutricionales y ambientales de sus biomas de piel y mucosa que son hospitalarios para *Staphylococcus aureus* deben tener algún ocupante de nicho como parte de su flora microbiana para lograr un "estado de reposo" estable y equilibrado de su bioma. El objetivo de cualquier método sería reemplazar de
20 manera duradera una cepa MRSA en un paciente en riesgo con la cepa del producto, en este caso un *Staphylococcus aureus* sensible a antibióticos modificado para que no pueda sobrevivir dentro del cuerpo humano en estado invasivo.

Para crear una enfermedad infecciosa invasiva, el MRSA
25 debe abandonar su estado comensal pasivo y romper la barrera

dérmica/mucosa, entrar en las áreas intersticiales subdérmicas (fluido intersticial) o circulatorias (sangre, suero, plasma). Este "cambio de estado" inicia un nuevo estado de enfermedad, con nuevos comportamientos y relaciones
5 del organismo con el hospedero.

La bacteriemia por *Staphylococcus aureus* (SAB) es una instancia importante de este tipo de infección con una tasa de incidencia que varía de 20 a 50 casos/100,000 habitantes por año (que varía de 64,600 a 161,500 casos por año). Entre
10 10% y 30% de estos pacientes morirán a causa de SAB. La bacteriemia sistémica invasiva por MRSA tiene una tasa de mortalidad de alrededor de 20%. Comparativamente, esto representa una mayor cantidad de muertes que el SIDA, la tuberculosis y la hepatitis viral combinados.

15 El último informe para el cual hay una estimación de casos nacionales de los CDC-US para la enfermedad invasiva por MRSA (2014) es de 72,444 casos. La cantidad de pacientes con esta enfermedad es inferior a 200,000 por año, y puede permitir una designación de medicamento huérfano. El MRSA
20 puede afectar a los pacientes en tres niveles distintos: 1) colonización, 2) infección superficial: piel y tejidos blandos, y 3) infección invasiva sistémica.

1) Colonización. El *Staphylococcus aureus* es un organismo comensal normal que coloniza permanentemente
25 alrededor de un tercio de la población humana, con una

colonización transitoria en alrededor de un tercio adicional de la población. Las variantes MRSA de este organismo ocupan el organismo en el nicho del microbioma y han colonizado a aproximadamente 2% de la población en EE. UU. (con un alto

5 grado de variabilidad según la ubicación y la ocupación). La colonización por MRSA crea un reservorio permanente de organismos potencialmente infecciosos ubicados directamente en la capa externa de nuestro sistema inmunológico/de

defensa, y esto plantea un riesgo continuo para el paciente.

10 2) Infección superficial: infección de la piel y los tejidos blandos. El MRSA asociado a la piel o la infección de la piel y los tejidos blandos es la más común de las dos principales categorías de estados de enfermedad. Por lo general, comienza como un forúnculo hinchado, lleno de pus o

15 líquido que puede ser doloroso y cálido al tacto, y a veces está acompañado de fiebre. Si no se trata, estos forúnculos pueden convertirse en abscesos que requieren intervención quirúrgica para el drenaje. Para el MRSA que se limita a la piel, el drenaje quirúrgico de abscesos puede ser el único

20 tratamiento necesario, y los antibióticos no están indicados. Las infecciones de la piel y los tejidos blandos se tratan al drenar quirúrgicamente el forúnculo y solo mediante administración de antibióticos cuando se considera absolutamente necesario.

25 3) Infección invasiva sistémica. La bacteriemia por MRSA

(MRSA invasiva) es una infección sistémica por MRSA que se define como la presencia de MRSA en sitios típicamente estériles, que incluyen el torrente sanguíneo, el líquido cefalorraquídeo, el líquido articular, los huesos, el tracto respiratorio inferior y otros fluidos corporales. La bacteriemia por MRSA tiene un pronóstico mucho peor en comparación con las infecciones por MRSA limitadas a la piel, con 20% de casos que resultan en muerte. La diferencia en el pronóstico, la ubicación de la infección y los síntomas clínicos de la afección la hacen clínicamente distinta de las infecciones por MRSA en la piel y los tejidos blandos. La bacteriemia por MRSA causa múltiples complicaciones que no se ven en las infecciones de la piel y los tejidos blandos, que incluyen endocarditis infecciosa, artritis séptica y osteomielitis. Para el MRSA invasivo, la daptomicina y la vancomicina son los tratamientos recomendados en EE. UU. La vancomicina tiene un inicio relativamente lento y penetra poco en algunos tejidos. Se demostró que la daptomicina es eficaz, pero la no susceptibilidad emergente al tratamiento es un problema, además del problema de que la vancomicina fomenta la resistencia a la daptomicina en MRSA. La diferencia en los síntomas clínicos, así como en los métodos de tratamiento para el MRSA invasivo, proporciona una evidencia clara del MRSA invasivo como una condición clínicamente distinta de las infecciones de la piel y los

tejidos blandos por MRSA.

La tecnología BioPlx funciona al prevenir la recurrencia de una infección invasiva por MRSA en aquellos que han sido colonizados (que incluyen aquellos que ya experimentaron una
5 infección invasiva por MRSA) y que se han sometido a un proceso de descolonización. Como método microbiológico de descolonización/recolonización, la tecnología BioPlx no se administraría para "tratar" a un paciente mientras tiene una infección sistémica por MRSA. Se aplicaría después de la
10 eliminación de una infección sistémica por MRSA (y una descolonización de cuerpo completo).

Es un principio establecido de la nomenclatura médica que una enfermedad o afección no es simplemente sinónimo del agente causal. En el presente caso, la bacteriemia sistémica
15 mediada por MRSA (u otras designaciones de enfermedad sistémica invasiva) es inequívocamente distinta de otras afecciones superficiales de la piel y la mucosa que pueden ser causadas por, o estar asociadas con, MRSA u otras cepas de *Staphylococcus aureus*. La enfermedad sistémica invasiva
20 mediada por MRSA tiene un diagnóstico, una patología, un tratamiento y un perfil de pronóstico claramente distintos.

Es importante tener en cuenta que, en función del mecanismo de acción de las cepas BioPlx01, se previene en los pacientes una infección sistémica por MRSA posterior, a
25 diferencia del tratamiento de la infección invasiva por MRSA

per se. Por lo tanto, "la prevención de la infección sistémica recurrente por MRSA" sería la descripción más precisa de la indicación para las cepas BioPlx01.

La población diana son los pacientes que tuvieron
5 infección invasiva por MRSA, en los que se eliminó con éxito el organismo (típicamente a través de la intervención antibiótica estándar (por ejemplo, vancomicina), y aún tienen un alto riesgo (tasa) de recolonización por MRSA, recurrencia y riesgo elevado asociado de reinfección sistémica por MRSA.

10 **Reconocimiento internacional y estadounidense de la designación de la enfermedad:**

Los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC) establecieron una definición clara de esta enfermedad, ya que ha monitoreado activamente esta afección
15 en los Estados Unidos de América desde 2005. La agencia realiza este monitoreo mediante el uso del sistema de vigilancia del núcleo bacteriano activo a través del Programa de infecciones emergentes (EIP, por sus siglas en inglés). Un caso en este contexto se define por el aislamiento de MRSA de
20 un sitio del cuerpo normalmente estéril. Los sitios normalmente estériles incluyen sangre, líquido cefalorraquídeo, líquido pleural, líquido pericárdico, líquido peritoneal, líquido articular/sinovial, huesos, sitio interno del cuerpo (ganglios linfáticos, cerebro, corazón,
25 hígado, bazo, humor vítreo, riñón, páncreas u ovario), u

otros sitios normalmente estériles.

Los CDC también crearon la Red de Seguridad Nacional para el Cuidado de la Salud (NHSN, por sus siglas en inglés) como un sistema de seguimiento para más de 16,000 centros de salud de EE. UU. con el fin de proporcionar datos que guíen los esfuerzos de prevención. El Centro de Servicios de Medicare (CMS, por sus siglas en inglés) y otros prestadores usan estos datos para determinar incentivos financieros para el desempeño de los centros de salud. El sistema rastrea las infecciones por MRSA del torrente sanguíneo como un marcador de enfermedad invasiva con fines epidemiológicos.

El estado de enfermedad invasiva mediada por MRSA también se codifica en el sistema ICD9 e ICD10 mediante una agrupación de afecciones, cada una con su propio código numérico específico para el agente causal MRSA. Por ejemplo, la sepsis por MRSA está codificada como A41.02, la neumonía por MRSA está codificada como J15.212. Esto ejemplifica aún más la caracterización diferencial de que la enfermedad invasiva por MRSA se otorga en yuxtaposición con la enfermedad superficial de la piel y los tejidos blandos debido al mismo agente: código L03.114 (ejemplo de miembro superior izquierdo) con el siguiente código de MRSA B95.6 como causa de enfermedad clasificada en otra parte, que se adjunta a una variedad de otros códigos de infección para indicar el MRSA como la causa de la enfermedad.

El Centro Europeo para el Control de Enfermedades (ECDC, por sus siglas en inglés), una rama de la UE, también vigila aislamientos invasivos de *Staphylococcus aureus* por definición similar al NHSN y registra los porcentajes de resistencia a meticilina, pero los requisitos de informes no producen una estimación de la UE del total de casos anuales.

Diferencialmente, a diferencia de las condiciones sistémicas, la colonización simple por MRSA no se considera típicamente en sí misma una enfermedad. Sin embargo, la colonización se considera una condición previa para la mayoría de las enfermedades invasivas, como lo demuestran (por ejemplo) los estudios que muestran que los aislados nasales de *Staphylococcus aureus* suelen ser idénticos a las cepas que luego causan infección clínica. Este estado de colonización persistente refleja la estabilidad ecológica de esta bacteria en la piel y las superficies mucosas.

Este estado de colonización se registra en el sistema ICD10, Z22.322, bajo el subtítulo Z, que se reserva para los factores que influyen en el estado de salud y el contacto con los servicios de salud, pero que no son una enfermedad o lesión en sí mismos.

La población diana de enfermedad huérfana:

La población de enfermedades huérfanas a la que se dirige el método de no recurrencia BioPlx es el grupo de personas previamente infectadas de manera invasiva (infección

sistémica) con MRSA (una población que se sabe que es susceptible) y que continúan sufriendo recolonización continua con MRSA. Los CDC monitorean todos los casos estadounidenses de infección invasiva por MRSA. Varios
5 investigadores describieron esta población médicamente distinta: pacientes que ya sufrieron un episodio definido de infección invasiva por MRSA. Este grupo tiene un mayor riesgo de enfermedades invasivas potencialmente mortales como resultado de su susceptibilidad demostrada y su continua
10 colonización.

En algunas modalidades, se proporciona un método para prevenir la recolonización, o prevenir la recurrencia de bacteriemia invasiva sistémica causada por MRSA, que comprende la prevención de (o la prevención de la recurrencia
15 de) una condición previa de colonización por MRSA por

- 1) descolonización de MRSA de microbiomas dérmicos y mucosos, y
- 2) recolonización de estos microbiomas con un *Staphylococcus aureus* sintético (por ejemplo, una cepa
20 BioPlx01). El método es eficaz, a través del efecto de la interferencia bacteriana, y opera a través de dinámicas de nicho dentro del ecosistema de microbioma dérmico/mucoso
diana, debido a que el *Staphylococcus aureus* sintético (por ejemplo, una cepa BioPlx01) sirve para ocupar nichos
25 específicos y, por lo tanto, bloquea/previene la

recolonización por MRSA (bloquea la recurrencia). La eficacia de este método se demostró claramente a partir de los principales estudios proporcionados en la presente.

SA está presente como parte del microbioma normal de más de 40% de la población humana total. El estado de colonización de MSSA es común. La variante MRSA se encuentra en alrededor de 1-2% de la población de EE. UU., pero en ciertas áreas o sectores demográficos, este nivel puede ser considerablemente más alto. Se cree que el MRSA tiene la capacidad de colonizar a cualquiera dentro de la población susceptible a *Staphylococcus aureus*. El *Staphylococcus aureus* vive más comúnmente en la superficie de la piel y en los vestíbulos nasales anteriores, pero también puede encontrarse en pequeñas cantidades en la orofaringe profunda y el tracto gastrointestinal y en la flora vaginal normal en algunas personas.

En los individuos colonizados, el *Staphylococcus aureus* generalmente sigue siendo una bacteria comensal no invasiva que simplemente ocupa un nicho ecológico y no causa enfermedades. Sin embargo, en una parte de los colonizados, esta bacteria puede causar enfermedades de forma oportunista o como resultado de la mayor probabilidad de invasión debido a algunas características variantes particulares.

Aproximadamente 23% de los portadores persistentes de MRSA desarrollaron una infección discreta de MRSA dentro del

año posterior a la identificación como portador.

Muchas variantes de *Staphylococcus aureus* han adquirido casetes genéticos que codifican productos proteicos de virulencia que permiten que tales cepas invadan de manera más eficaz a través de las capas de tejido epidérmico o de la mucosa y, posteriormente, inician una infección profunda o sistémica. En la colonización o la infección, la presencia del casete mecA limita las opciones de tratamiento para estos pacientes, y una serie de estudios documentaron el aumento de la tasa de mortalidad asociada con MRSA en comparación con MSSA en bacteriemia, infección endovascular y neumonía.

No es posible predeterminar si una persona que está colonizada con MRSA eventualmente progresará o no a una enfermedad invasiva, por lo que es de particular importancia identificar y tratar a toda la población de pacientes que tienen un mayor riesgo bien documentado de enfermedad invasiva por MRSA.

Estadísticas de enfermedades invasivas mediadas por MRSA:

El MRSA fue identificado por científicos británicos en 1961 y el primer caso clínico estadounidense se documentó en 1968. Durante los siguientes 25 años, el MRSA se consideró en gran medida como un problema endémico hospitalario que aumentaba en incidencia, sin embargo, a partir de mediados y finales de la década de 1990, se observó un aumento de la incidencia de MRSA asociado a la comunidad que se manifestaba

principalmente en infecciones superficiales de la piel y los tejidos blandos. La mayor preocupación para la comunidad médica ha sido el aumento de las infecciones invasivas causadas por MRSA. La tendencia creciente en la incidencia de la enfermedad invasiva por MRSA se observó a lo largo de la década de 1990 y alcanzó su punto máximo en 2005.

Los CDC rastrean la incidencia de la enfermedad invasiva por MRSA a través del NHSN y el Programa de Infecciones Emergentes, sistema de vigilancia del núcleo bacteriano activo también a partir de 2005. En comparación con 2005, los datos de 2015 muestran que la incidencia general de la enfermedad invasiva por MRSA ha disminuido casi un 50% de una tasa de incidencia de 37.56 a 18.8. Las intervenciones de control de infecciones costosas y laboriosas implementadas en los hospitales en respuesta a esta crisis de salud pública han recibido gran parte del crédito por la disminución de la incidencia, ya que la mayor parte de la ganancia se observó en los casos relacionados con la atención médica en comparación con los relacionados con la comunidad. A pesar de los avances logrados en la última década, las infecciones invasivas por MRSA siguen siendo un problema prioritario de salud pública. Estas infecciones pueden ser muy difíciles de tratar y casi 25% de los pacientes que reciben el tratamiento adecuado mostraron fracaso del tratamiento. Predecir qué pacientes que experimentaron atención médica están en riesgo

de MRSA invasivo es un problema difícil. Se han dilucidado factores de riesgo tales como la colonización por MRSA, la presencia de heridas crónicas abiertas y la presencia de dispositivos invasivos.

5 La presencia de estas características por sí sola no predice qué paciente mostrará finalmente una enfermedad invasiva. Sin embargo, uno de los factores de riesgo más predictivos para un paciente que contrae una infección invasiva por MRSA es haber tenido una infección invasiva por
10 MRSA previa. En los datos de 2004-2005 de vigilancia del núcleo bacteriano activo (ABC, por sus siglas en inglés) se observó que casi 13% de sus casos invasivos desarrollaron una segunda infección invasiva por MRSA durante los 18 meses de evaluación retrospectiva de datos. Otra mirada a los datos de
15 EIP-ABC en el año calendario 2011 descubrió que 8% de estos pacientes tenían más de una infección invasiva por MRSA separada por al menos 30 días. El riesgo a largo plazo de infección invasiva por MRSA recurrente es seguramente aún mayor ya que estas estimaciones pasarán por alto las
20 infecciones anteriores en estos pacientes antes del período de estudio y las posteriores que se producen después de la fecha de finalización. Desde que Huang y Platt (2003) mostraron que 29% de los pacientes hospitalizados con colonización o infección por MRSA conocida desarrollaron una
25 segunda infección por MRSA (a menudo grave) dentro de un

seguimiento de 18 meses, dirigirse a este grupo para prevenir la recurrencia del estado de enfermedad invasiva podría prevenir aproximadamente 17,500 infecciones invasivas posteriores por MRSA (de acuerdo con los datos más recientes de los CDC).

El MRSA invasivo y la infección de la piel y los tejidos blandos por MRSA son causados por el mismo patógeno. Sin embargo, las designaciones huérfanas se otorgan en función de la diada de fármaco y enfermedad. MRSA es un patógeno, y no un estado de enfermedad. Sin embargo, puede causar infección, y son estos diferentes tipos de enfermedades infecciosas los que son tratados. El MRSA invasivo tiene un pronóstico mucho más grave, así como diferentes manifestaciones clínicas del MRSA confinado a la piel o simplemente colonizado por MRSA. Alrededor de 40% de la población de EE. UU. está colonizada con *Staphylococcus aureus*, que generalmente se encuentra en la nariz o en la piel. En general, no hay signos de infección que se considerarían "un estado de enfermedad". Sin embargo, la infección sistémica por MRSA se manifestará como fiebre alta, escalofríos, mareos, dolor en el pecho, hinchazón del área afectada, cefalea, erupción cutánea, tos y otros síntomas sistémicos. Estas dos afecciones se tratan de manera diferente, donde las infecciones de la piel los y tejidos blandos se tratan típicamente mediante incisión y drenaje de los forúnculos comúnmente asociados con infecciones de la

piel y los tejidos blandos. Los antibióticos y la descolonización solo se emplean si existen signos de enfermedad sistémica o grave que se ha extendido a múltiples sitios.

5 El MRSA invasivo tiene una tasa de incidencia de 20 a 50 casos/100,000 personas por año.^{6a} Con una población actual de 326,199,002 en EE. UU. (acceso el 2 de noviembre de 2017 a través de www.census.gov/popclock), esto significa que existen 163,100 casos de infección invasiva por MRSA en EE.
10 UU. por año de manera conservadora, por debajo del criterio de 200,000 pacientes para la designación huérfana de la FDA. Se buscaron otras fuentes de prevalencia informada para confirmar que se había calculado la estimación más conservadora de esta población de pacientes. Hassoun *et al.*
15 informó una incidencia de 72,444 casos de MRSA invasivo en EE. UU. en 2014, que había disminuido desde 111,261 en 2005.^{7a} Con base en esto, y con la suposición de que la población continuará disminuyendo, se puede suponer que una prevalencia de 163,029 pacientes con MRSA invasivo en EE. UU. en 2017 es
20 una estimación muy conservadora. Según los CDC, hubo más de 80,000 infecciones invasivas por MRSA y 11,285 muertes relacionadas en 2011.

Para abordar este problema, los inventores de la presente desarrollaron cepas BioPlx01, cepas de
25 *Staphylococcus aureus* alteradas molecularmente, que no pueden

causar enfermedades pero pueden residir en el nicho del microbioma en el que el MRSA podría establecerse. La falta de invasividad de las cepas BioPlx01 es posible gracias a operones que se activan al entrar en contacto con sangre o plasma, lo que desencadena la muerte del organismo. Un paciente que ha dado positivo para MRSA y experimenta síntomas sistémicos se someterá a una descolonización de cuerpo completo antes de administrarse la cepa BioPlx01, lo que le permitirá ocupar el nicho que el MRSA habría ocupado previamente en el microbioma de ese paciente. Al evitar que cepas virulentas de MRSA ocupen el nicho, estas cepas virulentas no pueden colonizar e invadir posteriormente sitios de tejido estéril. La cepa BioPlx01 puede prevenir infecciones sistémicas por MRSA recurrentes.

En una modalidad, se proporciona un método para tratar infecciones pulmonares por *Staphylococcus aureus* en pacientes con fibrosis quística.

En una modalidad, se proporciona un método para tratar bacteriemia invasiva. Mediante el uso de los criterios adoptados por los CDC (Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades), la bacteriemia invasiva está indicada por el aislamiento de bacterias de un sitio del cuerpo normalmente estéril. Estos pueden incluir sangre, CSF, líquido articular, muestras de hueso, muestras del tracto respiratorio inferior y otros fluidos corporales estériles.

Esta condición está relacionada con, pero se distingue claramente de, la colonización bacteriana simple y la infección de la piel y los tejidos blandos mediada por bacterias. Se acepta que el estado de colonización es un
5 requisito previo para la enfermedad invasiva en la gran mayoría de los casos.

Infección bacteriana invasiva (sistémica) mediada por MRSA y v-MSSA

Mediada por *Staphylococcus aureus*, la infección
10 bacteriana invasiva por MRSA también puede denominarse comúnmente o en la literatura como: bacteriemia o sepsis por MRSA, infección sistémica por MRSA, infecciones del torrente sanguíneo por MRSA, infección invasiva por MRSA. Las condiciones sistémicas inducidas por MRSA específicas varían
15 de osteomielitis, artritis séptica, neumonía, endocarditis, bacteriemia, síndrome de shock tóxico a shock séptico. El desarrollo de un método para prevenir o reducir la recurrencia de la enfermedad invasiva por MRSA en poblaciones de alto riesgo, a través del mecanismo de interferir de
20 manera duradera con la colonización de cepas no deseadas, sería un avance significativo en la prevención de condiciones típicamente requeridas para la infección invasiva por MRSA, y reduciría la probabilidad de que estos pacientes sufran una infección MRSA invasiva posterior.

25 Un objetivo de la presente descripción es evaluar la

capacidad del material BioPlx-01 WT para prevenir la
 recurrencia de MRSA en trabajadores médicos adultos sanos y
 activos. Esta población está particularmente en riesgo de
 infección por MRSA y tiene una de las tasas más altas de
 5 colonización por MRSA en cualquier grupo demográfico. La
 demostración exitosa de un efecto protector para este grupo
 validaría la eficacia de BioPlx-01 WT para prevenir la
 recurrencia de MRSA entre todos aquellos que están en riesgo.

“Recurrencia” significa simplemente que “la bacteria
 10 regresa”. La recurrencia es de importancia central tanto para
 la evolución como para el control de la enfermedad. Con la
 recurrencia, el patógeno regresa una y otra vez, y cada vez
 que pasa por un ciclo de supervivencia “aprende” a ser cada
 vez más resistente a los antibióticos que ha experimentado.
 15 Sin esta recurrencia, una vez que el patógeno se haya
 suprimido, se mantendría alejado, y eso sería el final. Si no
 hubiera recurrencia, no habría presión para evolucionar hacia
 la resistencia a los antibióticos.

En diversas modalidades, el sujeto puede ser colonizado
 20 con uno o más microorganismos patógenos. En ciertas
 modalidades, el microorganismo no deseado es un
 microorganismo patógeno resistente a fármacos. El
 microorganismo patógeno resistente a fármacos se puede
 seleccionar de *Neisseria gonorrhoeae*, *Candida* resistente a
 25 fluconazol, MRSA, *Streptococcus pneumoniae* resistente a

fármacos, tuberculosis resistente a fármacos, *Staphylococcus aureus* resistente a vancomicina, estreptococo de grupo A resistente a eritromicina y estreptococo de grupo B resistente a clindamicina.

5 https://www.cdc.gov/drugresistance/biggest_threats.html.

En una modalidad, el microorganismo no deseado puede ser un *Staphylococcus aureus* patógeno resistente a fármacos.

Los estafilococos son el género bacteriano colonizador de la piel más abundante y las causas más importantes de
10 infecciones nosocomiales e infecciones cutáneas asociadas a la comunidad. La especie *Staphylococcus aureus* puede causar infección fulminante, mientras que las infecciones por otras especies de estafilococos son mayoritariamente subagudas. La colonización suele ser un requisito previo para la infección.
15 Otto 2010, Expert Rev Dermatol, Abril 2010; 5(2):183-195. Sin embargo, no todas las infecciones invasivas por *Staphylococcus aureus* están precedidas por una colonización detectada con una cepa idéntica. La fracción no correlativa puede explicarse ya sea por la teoría de la "inoculación
20 directa" o de la "siembra directa de heridas", tal como un evento intraoperatorio de un segundo portador o la detección incompleta de todas las cepas de *Staphylococcus aureus* de estos pacientes en la colonización o colonización con la cepa invasiva en el tiempo que va desde la vigilancia inicial de
25 colonización.

El SA es un organismo comensal común en seres humanos que está presente (coloniza), típicamente sin síntomas, en 30 a 50% de la población (EE. UU.). El transporte asintomático de *Staphylococcus aureus* por seres humanos es el principal
5 reservorio natural, aunque los animales domésticos, el ganado y los fómites pueden servir como reservorios complementarios.

Hay muchas cepas diferentes de *Staphylococcus aureus*, muchas de las cuales también pueden actuar como patógenos graves. Los síntomas de las infecciones por *Staphylococcus*
10 *aureus* pueden ser diversos, y varían desde ninguno hasta infecciones menores de la piel y los tejidos blandos, hasta enfermedades sistémicas invasivas potencialmente mortales, tales como infecciones endovasculares, neumonía, artritis séptica, endocarditis, osteomielitis, infecciones de cuerpos
15 extraños, sepsis, shock tóxico y endocarditis. Tradicionalmente, se pensó que la mucosa nasal anterior es el sitio más frecuente para la detección de colonización de portadores sanos con *Staphylococcus aureus*. Varios sitios pueden colonizarse asintomáticamente, que incluyen las
20 narinas, la garganta, la axila, el perineo, la región inguinal y el recto.

Los aislados de MRSA alguna vez estuvieron confinados en gran medida en hospitales, otros entornos de atención médica y pacientes que frecuentaban estas instalaciones. Sin
25 embargo, desde mediados de la década de 1990, ha habido un

aumento en la cantidad de infecciones por MRSA notificadas en poblaciones que carecen de factores de riesgo por la exposición al sistema de atención médica. Este aumento en la incidencia de infección por MRSA se ha asociado con el

5 reconocimiento de nuevos clones de MRSA conocidos como MRSA asociado a la comunidad (CA-MRSA, por sus siglas en inglés). Las cepas de CA-MRSA difieren de las cepas de MRSA más antiguas relacionadas con el cuidado de la salud; infectan a un grupo diferente de pacientes, causan diferentes síndromes

10 clínicos, difieren en los patrones de susceptibilidad a los antimicrobianos, se propagan rápidamente entre personas sanas de la comunidad y con frecuencia causan infecciones en los entornos de atención médica. David, Michael et al., 2010, Clin Microbiol Rev 23(3): 616-687.

15 No se conoce por qué las infecciones recurrentes por CA-MRSA en la piel y los tejidos blandos son comunes. El mecanismo por el cual ocurre la recurrencia no está claro. Las posibilidades incluyen la reinfección por transporte persistente asintomático de CA-MRSA o después de la

20 adquisición de MRSA ambiental o después de la nueva adquisición de MRSA por contacto humano o animal cercano. Las infecciones de la piel y los tejidos blandos causadas por MSSA también son recurrentes, pero con menos frecuencia que las causadas por MRSA.

25 Bajo presión antibiótica constante, muchas variantes de

Staphylococcus aureus desarrollaron resistencia a los antibióticos. En la actualidad, la resistencia a la penicilina del *Staphylococcus aureus* es prácticamente universal, y la resistencia general a los betalactámicos y a múltiples antibióticos relacionados (metecilina) es generalizada, lo que creó una nueva clase significativa de "superbacterias" resistentes a los antibióticos.

El *Staphylococcus aureus* patógeno puede ser un *Staphylococcus aureus* resistente a fármacos, tal como MRSA, o una cepa resistente a vancomicina, tal como VISA o VRSA. De manera alternativa, el *Staphylococcus aureus* patógeno puede ser un *Staphylococcus aureus* virulento susceptible a metecilina (v-MSSA). v-MSSA es una causa de alta virulencia en infecciones invasivas potencialmente mortales. MRSA y v-MSSA son epidémicos y tienen un alto costo humano.

MRSA se ha convertido en un grave problema de salud pública en hospitales, clínicas, prisiones, cuarteles e incluso en gimnasios y clubes de salud de todo el mundo. El MRSA es una causa común de infecciones adquiridas en el hospital (500,000 pacientes estadounidenses/año) y, cada vez más, de infecciones adquiridas en la comunidad que pueden ser graves. Para la enfermedad invasiva sistémica, 20% de los casos dan como resultado la muerte. MRSA es uno de las nuevas "superbacterias" resistentes a antibióticos más importantes. Si bien existen métodos para tratar la infección por

Staphylococcus aureus, los métodos para prevenir la recurrencia son efectivamente inexistentes. La recurrencia de infecciones cutáneas por MRSA se encuentra en 31% a 45% de los sujetos.

- 5 Un esfuerzo para prevenir la recurrencia incluye la descolonización. La primera etapa (y actualmente la única) practicada ampliamente para prevenir la recurrencia es la descolonización. Desafortunadamente, la descolonización simple no es suficiente para prevenir la recurrencia. Los
- 10 médicos pueden tratar inicialmente la colonización o la infección microbiana, por ejemplo, colonización/infección por MRSA o v-MSSA, con productos químicos tópicos (por ejemplo, clorhexidina) o antibióticos. En muchos casos, el tratamiento con antibióticos puede eliminar "clínicamente" la enfermedad.
- 15 Se pueden usar antisépticos y astringentes para la descolonización (es decir, supresión), que incluyen aceite de árbol de té y clorhexidina. Los antibióticos usados para la supresión incluyen antibióticos tópicos para la descolonización nasal, tales como la mupirocina. Los
- 20 antibióticos sistémicos usados con mayor frecuencia para MRSA incluyen vancomicina, antibióticos de primera generación, tales como cefazolina, cepahalotina o cefalexina; y antibióticos de nueva generación, tales como linezolid o daptomicina. En casos de MRSA menos graves, se puede emplear
- 25 clindamicina o lincomicina. No obstante, solo con esta

descolonización, los MRSA y v-MSSA patógenos suelen reaparecer o volver a crecer casi la mitad de las veces. Este nivel de rendimiento naturalmente ha provocado escepticismo en cuanto a la eficacia de la descolonización simple para
5 prevenir la recurrencia.

Los médicos a menudo recetan agentes antimicrobianos tópicos, intranasales o sistémicos a pacientes con infecciones cutáneas recurrentes causadas por *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA) en un esfuerzo por
10 erradicar el estado del portador estafilocócico. Algunos agentes pueden interrumpir temporalmente el transporte estafilocócico, pero ninguno ha demostrado ser eficaz para la prevención de infecciones de la piel causadas por MRSA. Creech *et al.* *Infect Dis Clin North Am.* Septiembre de 2015;
15 29(3): 429-464.

En la literatura y por los inventores de la presente, se descubrió que la calidad de la descolonización se correlaciona con la tasa de recurrencia observada, pero la descolonización simple rara vez proporciona un resultado
20 duradero y exitoso.

La presente descripción proporciona métodos y composiciones enfocadas en prevenir la recurrencia a través de la modificación eficaz y duradera de las poblaciones de microbiomas.

25 Se desarrollaron métodos para prevenir o disminuir la

recurrencia de una infección microbiana patógena que comprende suprimir una infección o colonización microbiana.

Se proporciona un método para disminuir la recurrencia de una infección patógena o disminuir la colonización de un
5 microorganismo no deseado en un sujeto, que comprende descolonizar el microorganismo no deseado en al menos un sitio en el sujeto para reducir o eliminar significativamente la presencia del microorganismo no deseado del sitio; y reemplazar el microorganismo no deseado mediante la
10 administración al sujeto de un segundo microorganismo sintético que tiene el mismo género y especie que el microorganismo no deseado.

Los métodos y las composiciones para prevenir la recurrencia incluyen el reemplazo del microorganismo patógeno
15 al ocupar el nicho del bioma ocupado por el patógeno con un microorganismo sintético especialmente diseñado, o "bacteria buena". Al ocupar el mismo nicho de bioma, la "bacteria buena" desplaza al patógeno, lo que evita que recolonice o se mude (o regrese) a su vecindario ecológico preferido. Una
20 forma de garantizar que se ocupe el mismo nicho de bioma es mediante el diseño de un microorganismo sintético del mismo género y especie que el microorganismo patógeno.

Los métodos y las composiciones para prevenir la recurrencia incluyen promover o apoyar al microorganismo
25 sintético, la "bacteria buena", al restablecer los entornos

nutricionales, químicos o comensales clave que promueven adicionalmente al organismo de preferencia e inhiben la recolonización por el patógeno. Por ejemplo, un agrupamiento comensal puede proporcionar una mayor defensa en capas para
5 evitar que el patógeno vuelva a su antiguo nicho ecológico; puede ayudar a prevenir la recurrencia.

El método BioPlx es posible por métodos/tecnologías del estado de la técnica, que incluyen microbiología, sistemas y biología computacional; interacciones del entorno
10 (agrupamientos y señalización); organismos propietarios (seleccionados y modificados); y estrategias de sustitución de variantes y cepas.

En la presente se proporcionan microorganismos de reemplazo que incluyen (1) "variante BioPlx01-WT®": un
15 microorganismo de *Staphylococcus aureus* 502a de tipo silvestre con un historial establecido de no virulencia y colonización pasiva que se ha aislado, verificado y preparado para ensayos de campo mediante el uso de este agrupamiento de cepas como se describe en el Ejemplo 1; (2) "variante
20 diseñada por ingeniería genética BioPlx01-KO®", una cepa sintética de *Staphylococcus aureus* que mejora la seguridad al inactivar genes específicos de virulencia; y (3) "variante diseñada por ingeniería genética BioPlx01-KS®", una cepa sintética de *Staphylococcus aureus* que incorpora un activador
25 de muerte celular programado molecular para prevenir la

virulencia invasiva. En algunas modalidades, el microorganismo sintético actúa puramente como una sustitución de la cepa patógena, sin infección o colonización "nueva".

Se ha desarrollado una extensa colección patentada de
5 cultivos de *Staphylococcus aureus* completamente caracterizados (cepas y variantes) que se usa para el abastecimiento de organismos de reemplazo; usada para análisis de durabilidad y competencia; usada para análisis comparativo de genotipo/fenotipo; usada para el modelado de
10 agrupamiento de virulencia de genoma/transcriptoma; y usada para señalar el modelado de agrupamiento de genoma/transcriptoma.

Se está desarrollando una colección de organismos comensales controlados para la administración conjunta de
15 agrupamiento de variante potencial con la variante BioPlx01-KS®.

También se están desarrollando métodos de microbiología computacional, que incluyen aprendizaje automático; modelado de sistemas microbiómicos dinámicos complejos; relaciones
20 genoma/transcriptoma/proteoma (fenotípico); genética y promotores de factor de virulencia; resiliencia modelada y cambios en el tiempo/condición; relaciones n-dimensionales formadoras de nicho; y relaciones de agrupamiento de alta dimensión.

25 En el centro del método antirecurrencia del modelo

actual se encuentra el principio de "colonización no conjunta", lo que significa que solo una especie, y una variante de esa especie, puede ocupar el nicho ecológico de bioma de la piel o la mucosa relevante en cualquier momento.

- 5 Existe una serie de principios generativos más profundos subyacentes a este fenómeno simple y comprobable que se combinan para dar forma a la ciencia emergente de la microbiómica. Aunque se puede generalizar ampliamente, el análisis sobre la colonización no conjunta en esta sección se
10 refiere específicamente a las colonizaciones de *Staphylococcus aureus*.

Colonización no conjunta

- El principio de colonización no conjunta (también denominado "reemplazo bacteriano") establece que solo una
15 variante/cepa de una especie puede ocupar cualquier nicho dentro del bioma en un momento dado.

- El fenómeno empírico central de la colonización no conjunta representa un efecto agregado: la consecuencia de la interacción de una gran cantidad de fuerzas que pueden operar
20 en sistemas complejos, y que solo actualmente están siendo caracterizadas y matematizadas.

- Los nichos bacterianos dentro del bioma humano que son específicos del nivel de especie subyacen a la tecnología actual. Si no hubiera especificidad para la ocupación del
25 nicho biológico, entonces el intercambio intencional de cepas

no sería posible, como tampoco lo sería el fenómeno experimentalmente demostrado de reemplazo bacteriano.

Las expectativas de la colonización no conjunta son importantes para la durabilidad del presente método para
5 prevenir la recurrencia de la colonización o infección patógena. La colonización no conjunta de variante a variante se demostró experimentalmente en la literatura con sustitución de cepa/variante (por ejemplo, las conversiones de *Staphylococcus aureus* 80/81 a 502a de Shinefield et al.,
10 1963) y se confirmó en los estudios clínicos actuales, como se muestra en el Ejemplo 1.

La ocupación de nicho sostenida de especie a especie es sospechosa porque la lectura cuidadosa de la literatura indica que la durabilidad es baja, y la evidencia *in vivo* es
15 poco común. Puede ocurrir una ocupación transitoria, pero no se considera un resultado importante, ya que solo estamos interesados en resultados duraderos.

El fracaso de la durabilidad en la sustitución de especie a especie sirve como evidencia de que la ocupación de
20 nicho específico requiere una sustitución de "variante cercana". Esto es significativo ya que solo los biomas duraderos pueden mostrar las características funcionales (tales como resiliencia) requeridas para una tecnología/producto eficaz sin recurrencia.

25 En el caso de reemplazo de variante a variante, tal como

el que se observa en la presente descripción con respecto a los materiales antirecurrencia de MRSA, no se ha identificado evidencia directa de la literatura acerca de si el reemplazo requiere un "evento disruptivo del bioma" (tal como la descolonización accidental o intencional mediante antimicrobianos, antibióticos, etc.) o si puede ocurrir a través de un "reemplazo competitivo lento" (un organismo compite con otro por recursos, crecimiento, etc.). Sin embargo, abrumadoramente en los biomas dérmicos humanos, solo una cepa coloniza a una persona "in toto", lo que indica que se produce un reemplazo competitivo lento. Además, la tasa de éxito de 55% de los métodos de descolonización anti-MRSA muestra que los "eventos disruptivos del bioma" también pueden inducir cambios duraderos en el bioma. Ambos fenómenos son expresiones de colonización no conjunta.

La colonización no conjunta ocurre en la naturaleza, por ejemplo, en la gran mayoría de los casos solo se detecta una variante de *Staphylococcus aureus* dentro de un único bioma (más de 95% de los casos, con el equilibrio probablemente causado por "condiciones transitorias").

Al especificar y evaluar la durabilidad (eficacia) de la colonización no conjunta, es necesario reconocer tres escalas distintas de resultados: (1) a corto plazo: inmediatamente después de la recolonización, (2) etapa estable temprana: después de eliminar el exceso de organismos, y (3) a largo

plazo: después de que se establezca un "nuevo" bioma estable.

A corto plazo, inmediatamente después de la recolonización, el bioma descolonizado está dominado por organismos aplicados "en exceso" durante la recolonización, lo que genera un tipo de unión adventicia y transitoria (como cuando se esparce mantequilla de maní). Las pruebas dentro de este período solo pueden confirmar que se produjo la aplicación del bioma. Duración = unos pocos días, con eliminación posterior de exceso de organismos.

En la primera etapa estable, después de eliminar el exceso de organismos, el bioma *per se* restablece su estado de equilibrio, pero aparentemente con el organismo de reemplazo en lugar del patógeno preexistente. La confianza en este resultado se debe principalmente a la proporción abrumadoramente grande (probablemente millones a uno) de nuevos organismos para sobrevivir a los patógenos posteriores a la descolonización. Se espera que esto se convierta en una colonización estable con un alto nivel de durabilidad. Las pruebas en este período confirmarían que MRSA o vMSSA se han suprimido y que la cepa de reemplazo se ha vuelto a colonizar. Duración = semanas a meses.

A largo plazo, después de que se establezca un "nuevo" bioma estable, se demostrará no solo la capacidad del organismo para ocupar o "tomar" un nicho, sino también su capacidad para "mantener" ese nicho. En algunas modalidades,

esta etapa se usa para evaluar qué tan competitiva es la cepa de reemplazo o el microorganismo sintético contra la generación actual de nuevos invasores de bioma (tales como USA300). Esta pregunta se refiere a la capacidad del "nuevo" organismo de reemplazo para competir en el tiempo contra un reemplazo competitivo lento, así como por fuerzas externas que podrían ser perjudiciales para el bioma en el tiempo, tal como la exposición a antibióticos o antisépticos o la reexposición frecuente al patógeno, especialmente si las cepas son diferencialmente sensibles a este disruptor.

Es importante caracterizar el fenómeno de la colonización no conjunta de la variante del microorganismo, la ocupación del nicho de variante en comparación con variante, y la evidencia empírica ya desarrollada de que este fenómeno existe y que es una fuerza fuerte en el ecosistema del bioma dérmico.

La ley de "exclusión competitiva" se refiere a la situación en la que solo un organismo domina un nicho.

Un error histórico en la comprensión de este fenómeno es suponer que se trata de un sistema binario, conceptualmente impulsado por una o dos variantes. De hecho, una gran cantidad de microorganismos diferentes, por ejemplo, diversas cepas de *Staphylococcus aureus* pueden estar presentes en el medio ambiente en cualquier momento y en el tiempo.

Se puede concluir que sin el fenómeno de colonización no

conjunta, prácticamente todos los biomas "aptos para estafilococos" serían inherentemente "sopas" heterólogas mixtas altamente variables de múltiples variantes. Diversas posibilidades se muestran en la Tabla 1.

5 **Tabla 1. Compatibilidades de nicho de *Staphylococcus aureus* (SA) y resultados esperados**

10

Caso	Compatibilidad de nicho	Exclusión competitiva	Resultado esperado
1)	un nicho de <i>Staphylococcus aureus</i>	+	domina una variante (excepto transicional)
2)	un nicho de <i>Staphylococcus aureus</i>	-	siempre una gran cantidad de variantes (sopa)
3)	nichos de múltiples <i>Staphylococcus aureus</i>	+	cualquier cantidad menor de variantes = cantidad de nichos separados
4)	nichos de múltiples <i>Staphylococcus aureus</i>	-	siempre una gran cantidad de variantes (sopa)

15

En la Tabla 1, los casos 2 y 4 pueden eliminarse, porque la colonización conjunta ocurre en menos de 5% (en la literatura), e incluso en estos casos, la gran mayoría de las instancias de colonización conjunta observadas involucran solo otro organismo. El caso 3 se puede considerar como posible en una baja cantidad de casos (menos de 5%) potencialmente relacionados con huellas incompletas o no superpuestas del nicho en comparación con el organismo de reemplazo.

20

25

No existe evidencia directa de la literatura sobre si el reemplazo observado de una variante por otra (por ejemplo, la adquisición de MRSA) es causado por un evento disruptivo del bioma o por un reemplazo competitivo lento. Sin embargo, está empíricamente claro que solo una cepa a la vez tiende a

colonizar cualquier bioma individual (*in toto*). Los sitios biogeográficamente distintos y distantes dentro de un bioma dado tienden a tener la misma variante, y esto ocurre sin ningún proceso observable de descolonización y reemplazo total del cuerpo, lo que indica que ocurre un proceso de reemplazo competitivo basado en reglas. La observación del reemplazo competitivo es otra expresión del principio de colonización no conjunta.

En casos hipotéticos donde la variante de reemplazo no ocupa el nicho por completo, puede haber una tendencia débil a la colonización conjunta. En estos casos, se puede usar un grupo de variantes para "ocupar los espacios" con alternativas para que la colonización conjunta favorezca un microorganismo de reemplazo sintético en lugar del patógeno original. Si bien esto puede implicar el uso de un microorganismo de reemplazo diferente, esto no es recurrencia, sino que es un bloqueo adicional de la recurrencia.

Evidencia actual de la colonización no conjunta

Un gran estudio analizó la prevalencia de la colonización conjunta en 3,197 muestras positivas de *Staphylococcus aureus* tomadas de pacientes sanos en Oxfordshire, Inglaterra, seguidas longitudinalmente durante hasta dos años; la prevalencia puntual de posesión de múltiples cepas de *Staphylococcus aureus* en muestras de

narinas fue de 3.4 a 5.8%. Votintseva et al., 2014 J Clin Microbiol, 52 (4): 1192-1200. De los portadores de *Staphylococcus aureus* a los que se realizaron hisopados casi cada dos meses durante dos años, el 11% tenía un transporte compartido transitorio. El estudio usó un protocolo de tipificación de spa eficaz que permitió un proceso sensible para encontrar incluso cepas de colonización conjunta de baja proporción. La interpretación de este conjunto de datos muestra que la colonización por *Staphylococcus aureus* es un proceso dinámico con baja prevalencia de múltiples cepas de *Staphylococcus aureus* que compiten por su presencia en el mismo nicho a lo largo del tiempo. Un cálculo simple puede establecer que los resultados observados no son simplemente la ocupación independiente de un nicho no específico. En este caso, 1000 pacientes fueron examinados y 360 resultaron ser *Staphylococcus aureus* positivo. En un escenario de nicho no específico, se esperaría que 0.36×0.36 , o 13%, (130 personas) mostraran colonización conjunta; sin embargo, solo 3.9% de los 360 portadores (14 personas) en ese punto primario estaban de hecho colonizados conjuntamente, lo que demuestra la especificidad de la cepa del nicho del microbioma para *Staphylococcus aureus*.

Un pequeño porcentaje de los portadores de *Staphylococcus aureus* puede ser colonizado transitoriamente con dos cepas diferentes de *Staphylococcus aureus* en

cualquier momento del incidente. Como se discutió anteriormente, Votintseva *et al.*, analizaron todas las variantes dentro de MSSA y MRSA e informaron que las incidencias puntuales de este fenómeno están en el intervalo de 3.4 - 5.8%. El artículo que analiza solo las mezclas de MRSA y MSSA (solo encontraría especies que difieren en el sitio mecA) es previsiblemente más bajo en 2.3%. Si la colonización conjunta fuera un estado estable, se esperarían mezclas de especies de *Staphylococcus aureus* en prácticamente todas las muestras. Esto no se observa.

Otro estudio analizó a 680 pacientes que se presentaron para cualquier tipo de ingreso hospitalario. En ese momento, era práctica del Servicio Nacional de Salud evaluar a todos los pacientes admitidos para detectar MRSA. Dall'Antonia, M. *et al.*, 2005, J Hospital Infect 61, 62-67. Durante esta evaluación, el protocolo se perfeccionó para descubrir MSSA, MRSA y pacientes con MRSA y MSSA colonizados conjuntamente. MSSA solo se encontró en 115 pacientes (16.9%), MRSA solo se encontró en 56 pacientes (8.2%) y se descubrió colonización conjunta en 4 pacientes (0.58%), lo que nuevamente respalda la idea de un nicho exclusivo de cepa en el microbioma para *Staphylococcus aureus*. Esto apoya el concepto de que una cepa de *Staphylococcus aureus* puede prevenir el establecimiento de otra. Los resultados sugirieron un menor porcentaje de portadores colonizados conjuntamente como se predeciría por

la hipótesis nula que indica que existe un efecto protector significativo contra una colonización por cepa de *Staphylococcus aureus* por una cepa de *Staphylococcus aureus* residente que ocupa previamente. La significancia estadística
5 fue $p < 0.01$. El efecto protector de la colonización por MSSA contra la colonización por MRSA se calculó en 78% (CI: 29-99%).

Otro estudio examinó aislados de *Staphylococcus aureus* no concordantes en una población compuesta por consumidores
10 de fármacos IV infectados con VIH en una clínica de metadona. Hubo 121 muestras iniciales positivas de *Staphylococcus aureus* y 4 de ellas mostraron una clara discordancia entre 3 colonias evaluadas por PFGE. Sin embargo, la reevaluación de estas 4 muestras mostró que 2 de las 4 fueron concordantes en
15 la segunda evaluación. No se encontró discordancia después de evaluar nuevamente 18 muestras que primero fueron concordantes. Por lo tanto, se descubrió que 1.7 - 3.3% de esta población tenía colonización conjunta en un punto temporal singular. Cespedes C. et al., J Infect Dis 2005;
20 191: 444-52.

Las evidencias históricas de los estudios de descolonización/recolonización también muestran evidencia de colonización no conjunta. Este principio se demostró previamente de manera parcial durante las décadas de 1960 y
25 1970 en los conocidos estudios y las aplicaciones clínicas de

"interferencia bacteriana" 80/81 a 502a. La ausencia de colonización conjunta se muestra en los primeros documentos de interferencia bacteriana en las décadas de 1960 y 1970, estos documentos también demuestran claramente la "exclusión competitiva" en la regulación de la colonización conjunta. No se observaron cultivos mixtos tanto de 80/81 como cepa residente y 502A como cepa donante, lo que demuestra experimentalmente la colonización no conjunta como una situación estable para el microbioma. (Shinefield *et al.*, 1963; Shinefield *et al.*, 1966; Shinefield *et al.*, 1973; Aly *et al.*, 1974; Boris *et al.*, 1964; Light *et al.*, 1967; Fine *et al.*, 1967).

Sin "no equivalencia" y "exclusión competitiva", los nichos de microbioma se ocuparían consistentemente con múltiples cepas de la misma especie de bacteria. El aislamiento en la naturaleza de un cultivo de cepa pura de *Staphylococcus aureus* de las narinas sería un evento poco común si alguna vez se observa. La dinámica de la población en tal estado crearía una "sopa" heterogénea de muchas variedades de *Staphylococcus aureus*, según lo dictado por la exposición accidental o aleatoria del medio ambiente. Cualquier cepa con la que el hospedero haya entrado en contacto tendría la misma oportunidad de colonizar ese espacio sin competencia o interferencia de cualquier otra variante de cepa (colonización policlonal). La ausencia de

este resultado empírico demuestra "exclusión competitiva".

Sin embargo, el principio de exclusión no es tan rígido que una vez que un nicho está ocupado, ninguna otra variante puede usurpar su posición. Estas observaciones demuestran un principio de exclusión que es robusto, pero que permite a las especies externas desafiar a una especie ocupante al compartir brevemente ese nicho mientras se lleva a cabo la competencia final por el dominio en ese espacio. En algunas ocasiones, las cepas "nuevas" superan la cepa residente anterior y establecen una nueva cepa residente dominante. En otras ocasiones, el intruso es rechazado y la cepa residente repele el intento de reemplazo y restablece el dominio singular. En ambos escenarios, el estado de colonización conjunta es transitorio e inestable; presente a baja frecuencia.

Sistemas microbiómicos

Se proporcionan métodos y composiciones para prevenir de manera duradera y segura la recurrencia de una infección microbiana patógena en un sujeto, que comprenden la supresión de un microorganismo patógeno, el reemplazo por un microorganismo sintético capaz de ocupar el mismo nicho para excluir de manera duradera al microorganismo patógeno y la promoción del microorganismo sintético para una residencia duradera dentro del nicho. Este método se denomina método BioPlx®, como se analizó anteriormente. En algunas

modalidades, se descubrió que el sujeto está colonizado con el microorganismo patógeno antes de la etapa de supresión.

Para trabajar con éxito dentro del microbioma para promover la colonización de un organismo deseado de tal forma
5 que se produzca un resultado protector duradero, es necesario conocer las "reglas" de los microbiomas: como se analiza con mayor detalle en las secciones siguientes.

Se desarrolló un modelo de colonización no conjunta para proporcionar contexto y establecer las características del
10 producto diana. La justificación de la tecnología actual se basa en el paradigma microbiómico (bioma/ecosistema/nicho) y en que el microbioma tenga ciertas características persistentes y verificables. La métrica clave que se puede descubrir se basa en estadísticas de colonización conjunta en
15 la literatura modificada por detalles específicos sobre descolonización, pruebas y otras condiciones relevantes, seguidas de observaciones directas del estudio clínico del Ejemplo 1.

El microbioma de la piel en el sujeto es una entidad,
20 una cosa identificable persistente. Más de 10,000 especies diferentes de microorganismos forman el microbioma de la piel. El bioma de la piel es un ecosistema que puede definirse como un sistema, o grupo de elementos interconectados, formados por la interacción de una comunidad
25 de organismos con su entorno. El ecosistema del microbioma de

la piel tiene un estado base "saludable" o "normal". El bioma puede ser "sano" o "enfermo" (disbiosis), y puede ser invadido por organismos patógenos; en otras palabras, el microbioma puede ser invadido por una "bacteria mala", tal como MRSA, y también puede infectarse o contaminarse por organismos o variantes no deseados (disbiosis). Disbiosis es un término para un desequilibrio microbiano o una mala adaptación en o dentro del cuerpo, tal como una microbiota deteriorada.

El microbioma de la piel tiene una estructura creada por una vasta red combinatoria de relaciones entre el hospedero y todos los componentes del bioma. El microbioma, o bioma, es un sistema complejo estructurado dinámicamente y es un ecosistema "elásticamente resiliente".

El microbioma de la piel tiene una estructura dinámica pero persistente, es "resiliente", por ejemplo, incluso en condiciones de muerte celular masiva (por ejemplo, lavado, uso de etanol, desinfectante de manos, etc.), el bioma se regenera de forma similar.

20 Resiliencia

El microbioma humano tiene la cualidad de resiliencia, lo que significa que las perturbaciones leves tienden a corregirse nuevamente hacia una línea base establecida previamente de mezcla y concentración de especies. Sin embargo, los miembros de cada nicho pueden ser desafiados con

éxito por su lugar en esa mezcla estable, ya sea como resultado de un evento disruptivo externo agudo (es decir, un medicamento antimicrobiano o una aplicación antiséptica) o como un reemplazo competitivo lento.

5 En ecología, la resiliencia es la capacidad de un ecosistema para responder a una perturbación al resistir el daño y recuperarse rápidamente. La resiliencia se refiere a la estabilidad del ecosistema y la capacidad de tolerar perturbaciones y restaurarse a sí mismo.

10 En la literatura, las principales definiciones matemáticas de resiliencia se basan en la teoría de sistemas dinámicos y, más específicamente, en atractores y cuencas de atracción. El microbioma humano funciona de muchas maneras como un sistema complejo de múltiples cuencas. Cambia de
15 estados o cuencas, pero luego la resiliencia estabiliza ese estado. Martin, S. et al., 2011, en: Deffuant G., Gilbert N. (eds) Viability and Resilience of Complex Systems. Understanding Complex Systems. Springer, Berlín, Heidelberg, pp. 15-36.

20 El microbioma funciona de muchas maneras como un sistema complejo de múltiples atractores: puede cambiar sus estados o cuencas, pero luego la resiliencia asociada con ese atractor estabiliza ese estado.

 La resiliencia ecológica se define como la capacidad de
25 un sistema para absorber perturbaciones y reorganizarse

mientras experimenta cambios, de modo que aún conserve esencialmente la misma función, estructura, identidad y retroalimentación. Mitra, C., et al., 2015, An integrative quantifier of multistability in complex systems based on ecological resilience, Nature, Scient. Rep., 5, 1-12.

El "principio de exclusión competitiva" establece que no pueden existir competidores completos. El "axioma de desigualdad" establece que no existen dos cosas o procesos en un mundo real que sean exactamente iguales. Hardin, 1960, Science, vol. 131, 1292- 1297, p. 1292. Con base en el 'axioma de desigualdad' de Hardin y el principio de exclusión competitiva, la durabilidad a largo plazo solo debería lograrse mediante una sustitución de variante cercana, pero probablemente no estaría disponible con respecto a la sustitución de especies. Por ejemplo, MRSA y MSSA pueden colonizar conjuntamente de manera breve, al igual que cualquier otra variante de *Staphylococcus aureus* puede colonizar conjuntamente de manera transitoria. Ver Dall'Antonia, M. et al., 2005, J Hospital Infect 61, 62-67, que describe un estudio de 680 pacientes que se presentaron para cualquier tipo de ingreso hospitalario y donde se evaluó a todos los pacientes ingresados por MRSA. Durante esta evaluación, el protocolo se perfeccionó para descubrir MSSA, MRSA y pacientes con MRSA y MSSA colonizados conjuntamente. MSSA solo se encontró en 115 pacientes (16.9%), MRSA solo se

encontró en 56 pacientes (8.2%) y se descubrió colonización conjunta en 4 pacientes (0.58%), lo que nuevamente respalda la idea de un nicho exclusivo de cepa en el microbioma para *Staphylococcus aureus*. Esto apoya el concepto de que una cepa
5 de *Staphylococcus aureus* puede prevenir el establecimiento de otra.

La resiliencia puede crear recurrencia, un fenómeno natural observado, a medida que el bioma existente (contaminado con MRSA) intenta conservarse.

10 Sin embargo, la resiliencia también puede prevenir la recurrencia de MRSA, como lo demuestran los métodos y las composiciones proporcionados en la presente. Al suprimir un microorganismo patógeno, tal como el MRSA ("bacteria mala") que coloniza un sujeto, y reemplazarlo por un microorganismo
15 sintético seguro ("bacteria buena") de la misma especie, se estableció que la "bacteria buena" previene la recurrencia de manera duradera de la "bacteria mala" (evita la invasión nueva por MRSA).

Un ejemplo histórico de resiliencia que crea una
20 sustitución duradera y persistente se observa en portadores de *Staphylococcus aureus* y el reemplazo con la cepa 502a. Aly et al., 1974 J Infect Dis 129(6) pp. 720-724, estudió la interferencia bacteriana en portadores de *Staphylococcus aureus*. Los portadores fueron tratados con antibióticos y
25 jabones antibacterianos y expuestos a la cepa 502a de

Staphylococcus aureus. Se descubrió que era necesaria una descolonización completa para obtener una buena colonización de 502a. El día 7 mostró una toma de 100%, pero el día 23 la toma se redujo de 60 a 80%. Los datos de persistencia fueron de 73% a las 23 semanas para sujetos bien descolonizados. Por lo tanto, la durabilidad a largo plazo solo se logra mediante la sustitución de variantes cercanas. La microflora comensal (microflora normal, microbiota indígena) puede ayudar a la dinámica de recolonización, pero no cumple con los requisitos de durabilidad de las variantes cercanas. Los inventores diseñaron un método para obtener una versión "pasiva" de un organismo o patógeno (misma especie) que debe "reemplazarse" o "excluirse".

Se sugirió una relativa estabilidad en el ecosistema microbiano de adultos en ausencia de perturbación grave, y que la estabilidad a largo plazo de las comunidades humanas no se mantiene por inercia, sino por la acción de restaurar fuerzas dentro de un sistema dinámico. Relman, D.A., 2012, *Nutr Rev.*, 70 (Suppl 1): S2-S9.

La resiliencia funcional es una propiedad intrínseca de las comunidades microbianas y se sugirió que los cambios de estado en respuesta a la variación ambiental pueden ser un mecanismo clave que impulse la resiliencia funcional en las comunidades microbianas. Song et al., 2015, *Frontiers in Microbiology*, 6, 1298. Al buscar un concepto integrado

aplicable a todas las comunidades microbianas, Song et al. comparó la ingeniería y la resiliencia ecológica y las reconcilió al argumentar que la resiliencia es una propiedad intrínseca de los sistemas adaptativos complejos que, después
5 de la perturbación, recuperan sus funciones e interacciones a nivel del sistema con el medio ambiente, en lugar de su estado endógeno.

Por lo tanto, un ecosistema de bioma tiene un "equilibrio elastoplástico dinámico pero estable". Una vez
10 perturbado, el bioma "intenta" volver al equilibrio. En cualquier momento dado, el ecosistema del bioma tiene un "estado base" de equilibrio. Incluso en condiciones de estrés o muerte celular masiva (por ejemplo, lavado, uso de etanol, desinfectante de manos, etc.), se observa que el bioma se
15 regenera típicamente en una forma similar.

Los ecosistemas de microbioma tienen "nichos" definidos por la estructura y las interacciones internas y externas. Un "hecho" o "principio" de cualquier estructura de bioma es que diferentes organismos ocupan diferentes "nichos" en el bioma,
20 según lo definido/permitido por la estructura de las relaciones. Un "nicho" ecológico es la función y la posición que tiene una especie en su entorno; cómo satisface sus necesidades de alimento y refugio, cómo sobrevive y cómo se reproduce. El nicho de una especie incluye todas sus
25 interacciones con los factores bióticos y abióticos de su

entorno. Un "nicho" del bioma tiene factores y condiciones ambientales específicas que incluyen, por ejemplo, pH, temperatura, presión osmótica, osmolalidad, nivel de oxígeno, concentración de nutrientes, concentración de sangre, 5 concentración de plasma, concentración de suero y concentración de electrolitos.

Diferentes organismos ocupan diferentes "nichos" en el bioma, según lo definido/permitido por la estructura de las relaciones. Los nichos como características duraderas del 10 ecosistema del bioma. Cada nicho tiene condiciones límite; una forma virtual o "huella" que refleja la forma, que se analiza en el contexto de "nicho hutchinsoniano".

El nicho hutchinsoniano es un hipervolumen n-dimensional, donde las dimensiones son condiciones y recursos 15 ambientales, que definen los requisitos de un individuo o una especie para practicar "su" forma de vida, más particularmente, para que su población persista. El "hipervolumen" define el espacio multidimensional de recursos (por ejemplo, luz, nutrientes, estructura, etc.) disponibles 20 para (y usados específicamente por) los organismos, y "todas las especies que no sean las consideradas se consideran parte del sistema coordinado".

Un nicho es un segmento muy específico del ecosistema ocupado por una única especie. Bajo la presunción de que no 25 hay dos especies idénticas en todos los aspectos (es decir,

el "axioma de desigualdad" de Hardin) y el principio de exclusión competitiva, algún recurso o dimensión adaptativa proporcionará un nicho específico para cada especie.

Los nichos son exclusivos. Cada organismo compite con
5 organismos similares por ese nicho, y el organismo exitoso ocupa ese nicho. Dos organismos no ocupan/no pueden ocupar el mismo nicho porque uno superará al otro eventualmente. Por lo tanto, la coexistencia de dos organismos en el mismo bioma durante períodos prolongados significa que no ocupan el mismo
10 nicho.

Una vez que un nicho queda vacante, otros organismos pueden ocupar esa posición. Esto se debe a que una especie no tiene la misma huella que otra especie, por lo que una especie no puede ocupar el mismo nicho que otra especie. El
15 reemplazo exitoso requiere que se use el mismo organismo (por ejemplo, la misma especie o variante cercana) para ocupar o reemplazar de manera duradera dentro de un nicho. Se reconoce que existe una competencia parcial en forma de colonización/infección transitoria y es un fenómeno
20 observable.

La competencia parcial por un único nicho puede ocurrir. Un organismo puede "reducir" el "ancho de nicho" de otro mediante una competencia parcial. Este podría ser el caso con *Staphylococcus epidermidis* con respecto a *Staphylococcus*
25 *aureus*. *S. epidermidis* es una bacteria comensal que secreta

una serina proteasa capaz de desmontar las biopelículas preformadas de *Staphylococcus aureus* cuando se usa en concentraciones suficientemente altas. Sugimoto et al., *J Bacteriol*, 195(8) 1645-1655. Sin embargo, existe una
5 distinción importante entre un organismo como portador de una expresión fenotípica tóxica (que está temporalmente sobrecargada masivamente por la aplicación en un sitio) en comparación con ese organismo como un habitante duradero de un nicho que estrecha o supera al patógeno.

10 La colonización conjunta entre especies es un fenómeno diferente a la capacidad de ocupar y bloquear de manera duradera un nicho ecológico. Por ejemplo, Shu et al., 2013, demuestran que la fermentación de glicerol para formar ácidos grasos de cadena corta (SCFA, por sus siglas en inglés) con
15 *Cutibacterium acnes* (*C. acnes*), una bacteria cutánea comensal que puede inhibir el crecimiento de USA300, el *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina adquirido en la comunidad (CA-MRSA) más prevalente. Shu demuestra que los SCFA producidos por *C. acnes* en condiciones anaeróbicas inhiben el
20 crecimiento de *Staphylococcus aureus* en altas concentraciones. Shu et al., 2013 PLoS ONE 8(2): e55380. Sin embargo, estas bacterias y esta capacidad de fermentación de *C. acnes* ya están presentes en el bioma normal de la piel humana sin que haya una erradicación o disminución efectiva
25 de la patogenicidad de *Staphylococcus aureus*. No existe

ninguna razón para creer que una aplicación hiperfisiológica de estos sustratos lograría el objetivo de reducir la colonización de *Staphylococcus aureus* o la incidencia de enfermedades.

5 Descolonización/recolonización

Se proporciona un método para prevenir o disminuir la recurrencia de una infección patógena de un microorganismo no deseado en un sujeto, que comprende las etapas de (i) suprimir (descolonizar) el microorganismo no deseado en al menos un sitio en el sujeto para reducir o eliminar la presencia del microorganismo no deseado del sitio; y (ii) reemplazar el microorganismo no deseado mediante la administración al sujeto en el al menos un sitio de un segundo microorganismo sintético que tiene el mismo género y especie que el microorganismo no deseado. Opcionalmente, el método comprende además (iii) promover la colonización del microorganismo sintético, por ejemplo, en el sitio de administración.

En algunas modalidades, el microorganismo no deseado es un microorganismo patógeno y el término suprimir (S) se refiere a un proceso de supresión, reducción o eliminación del microorganismo patógeno en uno o más, dos o más, tres o más, cuatro o más sitios en un sujeto. Por ejemplo, el microorganismo no deseado puede estar sujeto a protocolos de descolonización nasal, mucosa y/o dérmica.

El término reemplazar (R) se refiere a reemplazar el microorganismo patógeno con un microorganismo sintético que es benigno, susceptible a fármacos y/o incapaz de causar una infección sistémica o patógena en el sujeto. El

5 microorganismo de reemplazo puede ser un microorganismo sintético modificado molecularmente de la misma especie que el microorganismo patógeno. El microorganismo sintético puede ser un microorganismo modificado molecularmente de la misma especie, diferente cepa, que el microorganismo patógeno, de

10 modo que el microorganismo sintético puede colonizar el sitio en el sujeto, pero no puede causar una infección sistémica en el sujeto. Al ocupar el nicho vacante del microorganismo patógeno, el microorganismo sintético puede eliminar la recolonización por el microorganismo patógeno en el sujeto y,

15 por lo tanto, disminuir o eliminar la recurrencia de la infección patógena.

El término promover (P) se refiere a métodos y composiciones para promover el reemplazo de microorganismos sintéticos en el sujeto, por ejemplo, mediante el empleo de

20 prebióticos y manejo de biomas, por ejemplo, mediante el empleo de un modulador de bioma para promover y apoyar el nuevo bioma que comprende el microorganismo sintético.

Estos métodos definen en términos generales una tecnología de plataforma (SRP, por sus siglas en inglés), con

25 protocolos diseñados específicamente desarrollados para

abordar afecciones médicas específicas (por ejemplo, MRSA). Si los procesos de S, R y P se seleccionan adecuadamente, al abrir y luego ocupar y mantener un nicho de bioma específico, se crea un bioma persistente "duradero" que es capaz de
5 repeler la colonización patógena.

Se proporciona un método para disminuir la recurrencia o la posibilidad de infección sistémica por un microorganismo patógeno en un sujeto, en donde el método comprende suprimir el microorganismo patógeno en el sujeto para reducir o
10 eliminar significativamente la presencia detectable del microorganismo patógeno; y reemplazar el microorganismo patógeno mediante la administración de un microorganismo sintético al sujeto, en donde el microorganismo sintético es capaz de ocupar el mismo nicho que el microorganismo patógeno
15 como se evidencia (1) al tener el mismo antecedente genético, o género y especie, que el microorganismo patógeno, y/o (2) al exhibir una presencia detectable duradera en el sujeto durante al menos 60 días después del reemplazo. El método puede incluir promover la colonización del microorganismo
20 sintético en al menos un sitio en el sujeto. En algunos casos, el sujeto puede haber sido colonizado por el microorganismo patógeno.

Con frecuencia, la infección sistémica de un sujeto con un microorganismo patógeno está precedida por la colonización
25 del microorganismo patógeno en el sujeto. Por ejemplo, una

proporción sustancial de casos de bacteriemia por *Staphylococcus aureus* parece ser de origen endógeno, ya que pueden originarse en colonias en la mucosa nasal. Por ejemplo, en un estudio multicéntrico de bacteriemia por *Staphylococcus aureus*, los aislados de sangre fueron idénticos a los de las narinas anteriores en 180 de 219 pacientes (82.2%). En un segundo estudio, 14 de 1278 pacientes que presentaban colonización nasal con *Staphylococcus aureus* tuvieron posteriormente bacteriemia por *Staphylococcus aureus*. En 12 de estos 14 pacientes (86%), los aislados obtenidos de las narinas eran clonalmente idénticos a los aislados obtenidos de la sangre de 1 día a 14 meses después. Ver von Eiff et al., 2001, NEJM, vol. 344, N.º 1, 11-16. Otro estudio mostró que el riesgo relativo de bacteriemia por *Staphylococcus aureus* aumentó varias veces en los portadores nasales en comparación con los no portadores, e informó una coincidencia de 80% entre el aislado invasivo y la cepa de colonización encontrada previamente. Wertheim et al., Lancet 2004; 364: 703-705.

En algunas modalidades, se descubrió que el sujeto está colonizado con la cepa patógena del microorganismo antes de la infección sistémica. En otras modalidades, el sujeto puede haber sido colonizado o infectado por una cepa nosocomial (adquirida en el hospital) o cepa adquirida en la comunidad de un microorganismo patógeno.

El microorganismo patógeno puede ser un microorganismo de tipo silvestre, y/o un microorganismo patógeno que puede estar colonizado o presente de manera detectable en al menos un sitio en el sujeto. El sitio puede ser un sitio dérmico o mucoso en el sujeto. El sitio o los sitios de colonización pueden incluir la piel y los tejidos blandos que incluyen, entre otros, narinas, garganta, perineo, región inguinal, vagina, nasal, ingle, área perirrectal, membranas de los dedos, frente, faringe, axilas, manos, pecho, abdomen, cabeza y/o membranas de los dedos del pie.

El microorganismo patógeno puede ser un microorganismo resistente a fármacos. Los Centros para el Control de Enfermedades (CDC) publicaron recientemente un informe que detalla las 18 principales amenazas resistentes a fármacos en los Estados Unidos de América, ver www.cdc.gov/drugresistance/biggest_threats. En algunas modalidades, el microorganismo no deseado se selecciona de *Neisseria gonorrhoeae*, *Candida* resistente a fluconazol, *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA), *Staphylococcus aureus* resistente a vancomicina, *Streptococcus pneumoniae* resistente a fármacos y tuberculosis resistente a fármacos, estreptococo de grupo A resistente a eritromicina y estreptococo de grupo B resistente a clindamicina.

En algunas modalidades, el microorganismo patógeno es un MRSA.

El microorganismo sintético (a) debe ser capaz de ocupar el nicho ecológico en el al menos un sitio en el sujeto para excluir de manera duradera al microorganismo no deseado después de la supresión; y (b) debe tener al menos una
5 modificación molecular que comprende un primer gen de muerte celular ligado operativamente a una primera región reguladora que comprende un primer promotor que se activa (induce) mediante un cambio en el estado del medio ambiente en comparación con las condiciones fisiológicas normales en a
10 menos un sitio en el sujeto.

El microorganismo sintético puede ser del mismo género y especie que el microorganismo no deseado, para mejorar la capacidad de ocupar el nicho y excluir de manera duradera el microorganismo no deseado en al menos un sitio en el sujeto.

15 En algunas modalidades, la descripción proporciona un microorganismo sintético que no es un patógeno y no puede convertirse en un patógeno accidental ya que no tiene la capacidad de infectar al sujeto tras un cambio de estado, por ejemplo, tras la exposición a sangre o suero. El
20 microorganismo sintético comprende al menos una modificación molecular que comprende un primer gen de muerte celular ligado operativamente a una primera región reguladora que comprende un primer promotor que se activa (induce) mediante un cambio en el estado del medio ambiente en comparación con
25 las condiciones fisiológicas normales en al menos un sitio en

el sujeto. Por ejemplo, si el sitio en el sujeto es un sitio dérmico o mucoso, entonces la exposición a sangre o suero es un cambio de estado que da como resultado la muerte celular del microorganismo sintético. Por ejemplo, la muerte celular promedio del microorganismo sintético puede ocurrir dentro de 5 6 horas, 5 horas, 4 horas, 2 horas, 90 minutos, 60 minutos, 45 minutos, 30 minutos, 20 minutos, 15 minutos, 10 minutos, 5 minutos, 2 minutos o 1 minuto después del cambio de estado. El cambio de estado puede ser un cambio en una o más de las 10 siguientes condiciones: pH, temperatura, presión osmótica, osmolalidad, nivel de oxígeno, concentración de nutrientes, concentración de sangre, concentración de plasma, concentración de suero y/o concentración de electrolitos a partir de la de al menos un sitio en un sujeto. En algunas 15 modalidades, el cambio de estado es una mayor concentración de sangre, suero o plasma en comparación con las condiciones fisiológicas normales en el al menos un sitio en el sujeto.

En una modalidad, el microorganismo patógeno es un MRSA. MRSA es un subgrupo variante de *Staphylococcus aureus*. Las 20 cepas de MRSA generalmente incluyen un casete *mecA* que permite la producción de una proteína alternativa de fijación a la penicilina que las hace resistentes al tratamiento con la mayoría de los betalactámicos y otros antibióticos de primera línea. *Staphylococcus aureus* en su conjunto (que 25 incluye MRSA) está presente como parte del microbioma normal

de aproximadamente 30% de la población humana total. Como parte del microbioma, el *Staphylococcus aureus* vive más comúnmente en la superficie de la piel y en los vestíbulos nasales anteriores, pero también puede encontrarse en
5 pequeñas cantidades en la orofaringe profunda y el tracto gastrointestinal y como parte de la flora vaginal normal en algunas personas.

En la gran mayoría de los individuos, el *Staphylococcus aureus* es una bacteria comensal no invasiva que simplemente
10 ocupa un nicho ecológico y no causa enfermedades. El estado de colonización es mucho más común que el de la enfermedad invasiva; algunos investigadores estiman que esta proporción es del orden de 1000 a uno. Laupland et al., J Infect Dis (2008) 198:336. Sin embargo, en una fracción de los
15 colonizados, esta bacteria puede causar enfermedades, ya sea de manera oportunista o como resultado de tendencias mayores a la invasión debido a la adquisición de casetes genéticos que codifican productos proteicos de virulencia que permiten que tales cepas invadan de manera más eficaz a través de las
20 capas de tejido epidérmico o de la mucosa que inician una infección profunda. En las dos circunstancias anteriores, la presencia del casete mecA limita las opciones de tratamiento para estos pacientes, y una serie de estudios documentaron el aumento de la tasa de mortalidad asociada con MRSA en
25 comparación con MSSA en bacteriemia, infección endovascular y

neumonía.

Definiciones

Las formas singulares "un", "una" y "el/la" pretenden incluir también las formas plurales, a menos que el contexto
5 indique claramente lo contrario.

El término "y/o" se refiere a y abarca todas y cada una de las posibles combinaciones de uno o más de los elementos asociados enumerados.

Los términos "comprende" y/o "que comprende", cuando se
10 usan en esta memoria descriptiva, especifican la presencia de características, números enteros, etapas, operaciones, elementos y/o componentes establecidos, pero no excluyen la presencia o la adición de uno o más de otras características, números enteros, etapas, operaciones, elementos, componentes
15 y/o grupos de estos. A menos que se defina lo contrario, todos los términos, que incluyen términos técnicos y científicos usados en la descripción tienen el mismo significado que entiende comúnmente una persona del oficio de nivel medio al que pertenece esta descripción. En el caso de
20 una terminología conflictiva, prevalecerá la presente memoria descriptiva.

La expresión "patógeno" o "microorganismo patógeno" se refiere a un microorganismo que es capaz de causar enfermedades. Un microorganismo patógeno puede colonizar un
25 sitio en un sujeto y posteriormente puede causar una

infección sistémica en un sujeto. El microorganismo patógeno puede haber desarrollado la capacidad genética para romper barreras celulares y anatómicas que normalmente restringen otros microorganismos. Los patógenos pueden causar daños inherentes a las células para obtener acceso forzoso a un nicho nuevo y único que les proporciona menos competencia de otros microorganismos, así como una nueva fuente de nutrientes. Falkow, Stanley, 1998 *Emerging Infectious Diseases*, Vol. 4, N.º 3, 495-497. El microorganismo patógeno puede ser un microorganismo resistente a fármacos.

El término "virulento" o "virulencia" se usa para describir la capacidad de un microorganismo para causar enfermedades.

El término "comensal" se refiere a una forma de simbiosis en la que un organismo obtiene alimentos u otros beneficios de otro organismo sin afectarlo. Las bacterias comensales suelen ser parte de la flora normal.

El término "suprimir" o "descolonizar" significa reducir o eliminar sustancialmente el microorganismo patógeno no deseado original mediante diversos medios (a menudo denominados "descolonización"). Reducir sustancialmente se refiere a la reducción del microorganismo no deseado en más de 90%, 95%, 98%, 99% o más de 99.9% de la colonización original mediante cualquier medio conocido en la técnica.

El término "reemplazar" se refiere a reemplazar el

microorganismo patógeno original mediante la introducción de un nuevo microorganismo (con frecuencia denominado "recolonización") que "desplaza" y ocupa los nichos que ocuparía típicamente el microorganismo original, para evitar así que el microorganismo no deseado original regrese al ecosistema del microbioma (a menudo denominado "interferencia" y "colonización no conjunta").

Las expresiones "reemplazar de manera duradera", "excluir de manera duradera", "exclusión duradera" o "reemplazo duradero" se refieren a la presencia detectable del nuevo microorganismo sintético durante un período de al menos 30 días, 60 días, 84 días, 120 días, 168 días o 180 días después de la introducción del nuevo microorganismo a un sujeto, por ejemplo, como se detecta mediante hisopado del sujeto. En algunas modalidades, "reemplazar de manera duradera", "excluir de manera duradera", "exclusión duradera" o "reemplazo duradero" se refiere a la ausencia del microorganismo patógeno original durante un período de al menos 30 días, 60 días, 84 días, 120 días, 168 días o 180 días después de la introducción del nuevo microorganismo sintético al sujeto, por ejemplo, ausencia tal como se detecta durante al menos dos períodos de muestra plural consecutivos, por ejemplo, mediante hisopado del sujeto.

El término "promover" o "que promueve" se refiere a actividades o métodos para mejorar la colonización y

supervivencia del nuevo organismo, por ejemplo, en el sujeto. Por ejemplo, promover la colonización de una bacteria sintética en un sujeto puede incluir administrar un nutriente, prebiótico y/o especie bacteriana probiótica.

5 Las expresiones "prevención", "prevenir", "que previene", "profilaxis", como se usan en la presente, se refieren a un curso de acción (tal como la administración de un compuesto o una composición farmacéutica de la presente descripción) iniciado antes del inicio de una manifestación
10 clínica de un estado de enfermedad o afección para prevenir o reducir tal manifestación clínica del estado de enfermedad o afección. Tal prevención y supresión no necesitan ser absolutas para ser útiles.

Las expresiones "tratamiento", "tratar" y "que trata",
15 como se usan en la presente, se refieren a un curso de acción (tal como la administración de un compuesto o una composición farmacéutica) iniciado después del inicio de una manifestación clínica de un estado de enfermedad o afección para eliminar o reducir tal manifestación clínica del estado
20 de enfermedad o afección. Tal tratamiento no necesita ser absoluto para ser útil.

La expresión "que necesita tratamiento", como se usa en la presente, se refiere a un criterio de un proveedor de atención médica por el que un paciente requiere o se
25 beneficiará del tratamiento. Este criterio se basa en una

variedad de factores que se encuentran en el ámbito de la experiencia de un proveedor de atención médica, pero esto incluye el conocimiento de que el paciente está enfermo o estará enfermo, como resultado de una afección que se puede
5 tratar con un método, un compuesto o una composición farmacéutica de la descripción.

La expresión "que necesita prevención", como se usa en la presente, se refiere a un criterio de un proveedor de atención médica por el que un paciente requiere o se
10 beneficiará de la prevención. Este criterio se basa en una variedad de factores que se encuentran en el ámbito de la experiencia de un proveedor de atención médica, pero esto incluye el conocimiento de que el paciente estará enfermo o podría estar enfermo, como resultado de una afección que se
15 puede prevenir con un método, un compuesto o una composición farmacéutica de la descripción.

El término "individuo", "sujeto" o "paciente", como se usa en la presente, se refiere a cualquier animal, que incluye aves o mamíferos, tal como ratones, ratas noruegas,
20 sigmodon, jerbos, cávidos, hámsters, otros roedores, conejos, perros, gatos, cerdos, ganado, ovejas, cabras, caballos o primates y seres humanos. El término puede especificar masculino o femenino o ambos, o excluir masculino o femenino. En un aspecto, el paciente es un humano adulto. En otro
25 aspecto, el paciente es un bebé humano no neonato. En otro

aspecto, el paciente es un bebé, un niño o un adolescente humano. En algunas modalidades, se descubrió que el sujeto está colonizado con una cepa patógena de un microorganismo antes de una infección sistémica, o el sujeto puede haber
5 sido colonizado o infectado por una cepa nosocomial (adquirida en el hospital) o cepa adquirida en la comunidad de un microorganismo patógeno.

El término "neonato", o recién nacido, se refiere a un bebé en los primeros 28 días después del nacimiento. El
10 término "no neonato" se refiere a un animal mayor de 28 días.

El término "cantidad eficaz", como se usa en la presente, se refiere a una cantidad de un agente, ya sea solo o como parte de una composición farmacéutica, que es capaz de tener cualquier efecto positivo detectable sobre cualquier
15 síntoma, aspecto o características de un estado de enfermedad o afección. Tal efecto no necesita ser absoluto para ser beneficioso.

El término "muerte celular promedio medible" se refiere a la inversa del porcentaje de supervivencia para un
20 microorganismo determinado en un período predefinido después de introducir un cambio de estado en comparación con el mismo microorganismo en ausencia de un cambio de estado en condiciones definidas. El porcentaje de supervivencia puede determinarse mediante cualquier método conocido para
25 cuantificar células microbianas vivas. Por ejemplo, el

porcentaje de supervivencia puede calcularse al realizar el recuento de cfu/mL para células de microorganismos sintéticos cultivados y al realizar el recuento de cfu/mL de células de microorganismos sintéticos no inducidas en el período predefinido, y luego dividir cfu inducidas/mL por cfu/mL no inducidas $\times 100 = x\%$ de supervivencia. La muerte celular promedio medible puede determinarse por $100\% - x\%$ de porcentaje de supervivencia = $y\%$ de muerte celular promedio medible. Por ejemplo, en donde el porcentaje de supervivencia es 5%, la muerte celular promedio medible es $100\% - 5\% = 95\%$. Se puede emplear cualquier método para realizar el recuento de células microbianas vivas cultivadas para el cálculo del porcentaje de supervivencia, que incluyen cfu, OD600, citometría de flujo u otras técnicas conocidas. Del mismo modo, una cepa sintética inducida se puede comparar con un microorganismo diana de tipo silvestre expuesto a las mismas condiciones durante el mismo período, mediante el uso de cálculos similares para determinar una "tasa de supervivencia" en donde $100\% - \text{tasa de supervivencia} = z\%$ de "reducción en células viables".

La expresión "que incluye", como se usa en la presente, no tiene un alcance limitante, de modo que se consideran elementos adicionales además de los enumerados; esta expresión puede leerse en cualquier caso como "que incluye, entre otros".

El término "animal" se refiere a la definición del reino animal.

Las expresiones "identidad sustancial" o "sustancialmente idéntico", cuando se refieren a un
5 nucleótido o fragmento de este, indican que, cuando se alinean óptimamente con las inserciones o eliminaciones de nucleótidos adecuadas con otro nucleótido (o su cadena complementaria), hay identidad de secuencia de nucleótidos en al menos alrededor de 95%, y con mayor preferencia, al menos
10 alrededor de 96%, 97%, 98% o 99% de las bases de nucleótidos, según se mide a través de cualquier algoritmo conocido de identidad de secuencia, tal como FASTA, BLAST o Gap, como se analiza más adelante. Una molécula de nucleótido que tiene una identidad sustancial con respecto a una molécula de
15 nucleótido de referencia puede, en ciertos casos, codificar un polipéptido que tenga una secuencia de aminoácidos igual o sustancialmente similar al polipéptido codificado por la molécula de nucleótido de referencia.

La expresión "derivado de", cuando se hace en referencia
20 a una secuencia de nucleótidos o aminoácidos, se refiere a una secuencia modificada que tiene al menos 50% de la secuencia de nucleótidos o aminoácidos de referencia contigua, respectivamente, en donde la secuencia modificada hace que el microorganismo sintético exhiba un atributo de
25 secuencia similar deseable como la secuencia de referencia de

un elemento genético, tal como promotor, gen de muerte celular, gen de antitoxina, bloqueo de virulencia o nanofábrica, que incluye la regulación ascendente o descendente en respuesta a un cambio de estado, o la
5 capacidad de expresar una toxina, antitoxina o producto de nanofábrica, o una secuencia sustancialmente similar, la capacidad de transcribir una antitoxina de ARN antisentido, o la capacidad de prevenir o disminuir la transferencia horizontal de genes del material genético del microorganismo
10 no deseado. La expresión "derivado de" en referencia a una secuencia de nucleótidos también incluye una secuencia modificada que fue optimizada con codones para que un microorganismo particular exprese una secuencia de aminoácidos sustancialmente similar a la codificada por la
15 secuencia de nucleótidos de referencia. La expresión "derivado de", cuando se usa en referencia a un microorganismo, se refiere a un microorganismo diana que se somete a una modificación molecular para obtener un microorganismo sintético.

20 La expresión "similitud sustancial" o "sustancialmente similar", según se aplica a polipéptidos, significa que dos secuencias de péptidos o proteínas, cuando se alinean óptimamente, tales como mediante los programas GAP o BESTFIT con ponderaciones de espacios predeterminados, comparten al
25 menos 95% de identidad de secuencia, aun con mayor

preferencia al menos 98% o 99% de identidad de secuencia. Preferentemente, las posiciones de residuos que no son idénticas difieren en sustituciones de aminoácidos conservadoras.

5 La expresión "sustitución de aminoácidos conservadora" se refiere a un residuo de aminoácido que está sustituido con otro residuo de aminoácido que tiene una cadena lateral (grupo R) con propiedades químicas similares, tal como carga o hidrofobicidad. En general, una sustitución de aminoácidos conservadora no modificará sustancialmente las propiedades
10 funcionales, por ejemplo, de una proteína de toxina o antitoxina. Los ejemplos de grupos de aminoácidos que tienen cadenas laterales con propiedades químicas similares incluyen (1) cadenas laterales alifáticas: glicina, alanina, valina, leucina e isoleucina; (2) cadenas laterales de hidroxilo alifáticas: serina y treonina; (3) cadenas laterales que contienen amida: asparagina y glutamina; (4) cadenas laterales aromáticas: fenilalanina, tirosina y triptófano; (5) cadenas laterales básicas: lisina, arginina e histidina;
15 (6) cadenas laterales ácidas: aspartato y glutamato; y (7) cadenas laterales que contienen azufre: cisteína y metionina. Los grupos de sustitución de aminoácidos conservadora preferidos son: valina-leucina-isoleucina, fenilalanina-tirosina, lisina-arginina, alanina-valina, glutamato-
20 aspartato y asparagina-glutamina.
25

Se pueden comparar secuencias de polipéptidos mediante FASTA con parámetros predeterminados o recomendados, un programa en GCG Versión 6.1. FASTA (por ejemplo, FASTA2 y FASTA3) proporciona alineaciones y porcentajes de identidad de secuencia de las regiones de la mejor superposición entre la secuencia de indagación y la secuencia de búsqueda (ver, por ejemplo, Pearson, W.R., *Methods Mol Biol* 132: 185-219 (2000), incorporado en la presente por referencia). Otro algoritmo preferido cuando se compara una secuencia de la descripción con una base de datos que contiene una gran cantidad de secuencias de diferentes organismos es el programa informático BLAST, en especial, BLASTP o TBLASTN, mediante parámetros predeterminados. Ver, por ejemplo, Altschul *et al.*, *J Mol Biol* 215:403-410 (1990) y Altschul *et al.*, *Nucleic Acids Res* 25:3389-402 (1997).

A menos que se indique lo contrario, las secuencias de nucleótidos proporcionadas en la presente se presentan en la dirección 5' - 3'.

Todos los pronombres están destinados a recibir su significado más amplio. A menos que se indique lo contrario, los pronombres femeninos abarcan el masculino, los pronombres masculinos abarcan el femenino, los pronombres singulares abarcan el plural y los pronombres plurales abarcan el singular.

La expresión "administración sistémica" se refiere a una

vía de administración en el sistema circulatorio de modo que el cuerpo entero esté afectado. La administración sistémica puede realizarse mediante administración enteral (absorción a través del tracto gastrointestinal, por ejemplo, administración oral) o administración parenteral (por ejemplo, inyección, infusión o implantación).

La expresión "administración tópica" se refiere a la aplicación en un área localizada del cuerpo o en la superficie de una parte del cuerpo, independientemente de la ubicación del efecto. Los sitios típicos para administración tópica incluyen sitios en la piel o las membranas mucosas. En algunas modalidades, la vía tópica de administración incluye la administración enteral de medicamentos o composiciones.

La expresión "microorganismo no deseado" se refiere a un microorganismo que puede ser un microorganismo patógeno, un microorganismo resistente a fármacos, un microorganismo resistente a antibióticos, un microorganismo que causa irritación, un microorganismo que causa olores y/o puede ser un microorganismo que comprende un factor de virulencia no deseado.

La expresión "microorganismo sintético" se refiere a un microorganismo aislado modificado por cualquier medio para comprender al menos un elemento que imparte un atributo no nativo. Por ejemplo, el microorganismo sintético puede diseñarse mediante ingeniería genética para incluir una

modificación molecular que comprende una adición, eliminación y/o modificación de material genético para incorporar un atributo no nativo. En algunas modalidades, el microorganismo sintético no es un auxótrofo.

5 La expresión "presencia detectable" de un microorganismo se refiere a una detección positiva confirmada en una muestra de un género, especie y/o cepa de microorganismos por cualquier método conocido en la técnica. La confirmación puede ser una interpretación positiva de la prueba por parte
10 de un profesional calificado y/o mediante la repetición del método.

El término "microbioma" o "microbiómico" o "microbiota", como se usa en la presente, se refiere a ecosistemas microbiológicos. Estos ecosistemas son una comunidad de
15 microorganismos comensales, simbióticos y patógenos que se encuentran en todos los animales y plantas.

El término "microorganismo", como se usa en la presente, se refiere a un organismo que se puede observar solo con la ayuda de un microscopio y que típicamente consiste en una
20 única célula. Los microorganismos incluyen bacterias, protozoos y hongos.

El término "nicho" y "condiciones de nicho", como se usa en la presente, se refieren al conjunto ecológico de requisitos ambientales y nutricionales que se requieren para
25 una especie particular de microorganismo. Las definiciones de

los valores para el nicho de una especie definen los lugares en los biomas particulares que pueden ser ocupados físicamente por esa especie y definen los posibles competidores microbianos.

5 El término "colonización", como se usa en la presente, se refiere a la presencia persistente detectable de un microorganismo en una superficie corporal, por ejemplo, una superficie dérmica o mucosa, sin causar enfermedad en el individuo.

10 La expresión "colonización conjunta", como se usa en la presente, se refiere a la colonización simultánea de un nicho en un sitio en un sujeto por dos o más cepas o variantes dentro de la misma especie de microorganismos. Por ejemplo, la expresión "colonización conjunta" puede referirse a dos o
15 más cepas o variantes que ocupan simultáneamente y no transitoriamente el mismo nicho. La expresión no transitoriamente se refiere a la identificación positiva de una cepa o variante en un sitio en un sujeto a lo largo del tiempo en dos o más puntos temporales posteriores en una
20 multiplicidad de muestras obtenidas del sujeto con al menos dos semanas de diferencia.

La expresión "reemplazo bacteriano" o "colonización no conjunta", como se usa en la presente, se refiere al principio de que solo una variante/cepa de una especie puede
25 ocupar cualquier nicho dado dentro del bioma en un momento

dado.

La expresión "interruptor de inactivación" o "KS", como se usa en la presente, se refiere a una modificación molecular intencional de un microorganismo sintético, en
5 donde la modificación molecular comprende un gen de muerte celular ligado operativamente a una región reguladora que comprende un promotor inducible, elemento genético o casete, en donde la expresión inducida del gen de muerte celular en el interruptor de inactivación provoca la muerte celular, la
10 detención del crecimiento o la incapacidad para replicarse del microorganismo en respuesta a un cambio de estado específico, tal como un cambio en la condición ambiental del microorganismo.

Por ejemplo, en el microorganismo sintético que
15 comprende un interruptor de inactivación, el primer promotor inducible puede activarse por la presencia de sangre, suero, plasma y/o hemo, en donde la regulación ascendente y la transcripción/expresión del gen de muerte celular asociado operativamente da como resultado la muerte celular del
20 microorganismo o la detención del crecimiento del microorganismo para mejorar la seguridad del microorganismo sintético.

La expresión "gen de muerte celular" se refiere a un gen que cuando se induce hace que una célula ingrese en un estado
25 en el que deja de reproducirse, altera los mecanismos

reguladores de la célula lo suficiente como para interrumpir de manera permanente la viabilidad celular, induce la senescencia o induce cambios fatales en los sistemas genéticos o proteómicos de la célula. Por ejemplo, el gen de muerte celular puede ser un gen de toxina que codifica una proteína de toxina o un péptido de toxina.

La expresión "gen de antitoxina" se refiere a un gen que codifica una molécula antisentido de ARN de antitoxina o una proteína de antitoxina u otra molécula de antitoxina específica para un gen de muerte celular o un producto codificado por este.

La expresión "bloqueo de virulencia" o "bloqueo en V" se refiere a una modificación molecular de un microorganismo que da como resultado que el organismo tenga una capacidad disminuida para aceptar ADN extraño de otras cepas o especies, lo que eficazmente hace que el organismo tenga una capacidad disminuida para adquirir genes de virulencia exógena o resistencia a antibióticos.

El término "nanofábrica", como se usa en la presente, se refiere a la modificación molecular de un microorganismo que da como resultado la producción de un producto, ya sea proteína primaria, polipéptido, aminoácido o ácido nucleico o productos secundarios de estas modificaciones para un efecto beneficioso.

Las expresiones "proteína de toxina" o "péptido de

toxina", como se usan en la presente, se refieren a una sustancia producida internamente dentro de un microorganismo sintético en una cantidad eficaz para causar efectos nocivos al microorganismo sin causar efectos nocivos al sujeto que
5 coloniza.

La expresión "modificación molecular" o "diseñado molecularmente por ingeniería genética", como se usa en la presente, se refiere a una modificación intencional de los genes de un microorganismo mediante el uso de cualquier
10 método de edición de genes conocido en la técnica, que incluye, entre otros, técnicas de ADN recombinante como se describe en la presente a continuación, NgAgo, mini-Cas9, CRISPR-Cpf1, CRISPR-C2c2, Target-AID, Lambda Red, integrasas, recombinasas o el uso de técnicas de fagos conocidas en la
15 técnica. El ADN puede secuenciarse y manipularse químicamente o mediante técnicas de biología molecular, por ejemplo, para organizar uno o más elementos, por ejemplo, regiones reguladoras, promotores, genes de toxinas, genes de antitoxinas u otros dominios en una configuración adecuada, o
20 para introducir codones, eliminar codones, optimizar codones, crear residuos de cisteína, modificar, agregar o eliminar aminoácidos, etc. La modificación molecular puede incluir, por ejemplo, uso de plásmidos, inserción de genes, inactivación de genes para extirpar o eliminar un gen no
25 deseado, cambio de marco al sumar o restar pares de bases

para romper el marco de codificación, silenciamiento exógeno, por ejemplo, mediante el uso de un promotor inducible o un promotor constitutivo que puede estar incorporado en la codificación de ADN, por ejemplo, antitoxina antisentido de
5 ARN, producción de CRISPR-cas9 u otras proteínas de edición para digerir, por ejemplo, genes de virulencia entrantes mediante ARN guía, por ejemplo, ligado a un promotor inducible o un promotor constitutivo, o un sistema de modificación/metilación de restricción, por ejemplo, para
10 reconocer y destruir genes de virulencia entrantes para aumentar la resistencia a la transferencia horizontal de genes. La modificación molecular (por ejemplo, interruptor de inactivación, abrazadera de expresión y/o bloqueo en V) se puede incorporar de manera duradera al microorganismo
15 sintético mediante la inserción de la modificación en el genoma del microorganismo sintético.

El microorganismo sintético puede comprender además modificaciones moleculares adicionales (por ejemplo, una nanofábrica), que se pueden incorporar directamente en el
20 genoma bacteriano o en plásmidos, para adaptar la duración del efecto de, por ejemplo, la producción de nanofábrica, y que podrían variar desde corto plazo (con plásmidos no replicantes para la especie bacteriana) a mediano plazo (con plásmidos replicantes sin dependencia de adicción) a largo
25 plazo (con manipulación genómica bacteriana directa).

Las modificaciones moleculares pueden conferir un atributo no nativo que se desea incorporar de manera duradera en el microbioma del hospedero, pueden proporcionar mayor seguridad o funcionalidad a los organismos en el microbioma o al microbioma del hospedero en general, pueden proporcionar características de seguridad mejoradas, que incluyen interruptores de inactivación u otras funciones de control. En algunas modalidades, los atributos de seguridad integrados de esta forma pueden responder a cambios en el estado o la condición del microorganismo o del microbioma del hospedero en general.

La modificación molecular puede incorporarse al microorganismo sintético en una o más, dos o más, cinco o más, 10 o más, 30 o más, o 100 o más copias, o no más de una, no más de tres, no más de cinco, no más de 10, no más de 30, o en no más de 100 copias.

El término "recurrencia", como se usa en la presente, se refiere a la recolonización del mismo nicho por un microorganismo descolonizado.

La expresión "aceptable desde el punto de vista farmacéutico" se refiere a compuestos, portadores, excipientes, composiciones y/o formas de dosis que, dentro del alcance de un criterio médico sensato, son adecuados para usar en contacto con tejidos de seres humanos y animales sin provocar una excesiva toxicidad, irritación, reacción

alérgica u otros problemas o complicaciones proporcionales con una relación riesgo/beneficio razonable.

La expresión "portador aceptable desde el punto de vista farmacéutico" se refiere a un portador que es fisiológicamente aceptable para el sujeto tratado y que conserva la integridad y las propiedades deseadas del microorganismo sintético con el que se administra. Los portadores aceptables desde el punto de vista farmacéutico de ejemplo incluyen solución salina fisiológica o solución salina amortiguada con fosfato. Otros portadores fisiológicamente aceptables y sus formulaciones se proporcionan en la presente o son conocidos por una persona del oficio de nivel medio y se describen, por ejemplo, en Remington's Pharmaceutical Sciences, (20.^a edición), ed. A. Gennaro, 2000, Lippincott, Williams & Wilkins, Philadelphia, Pa.

Los intervalos numéricos como se usan en la presente tienen la intención de incluir cada número y subconjunto de números contenidos dentro de ese intervalo, ya sea específicamente descrito o no. Además, se debe interpretar que estos intervalos numéricos proporcionan un respaldo para una reivindicación que se refiere a cualquier número o subconjunto de números en ese intervalo. Por ejemplo, se debe interpretar que una descripción de 1 a 10 respaldan un intervalo de 2 a 8, de

3 a 7, de 5 a 6, de 1 a 9, de 3.6 a 4.6, de 3.5 a 9.9, etc.

Todas las patentes, publicaciones de patentes y publicaciones revisadas por colegas (es decir, "referencias")
5 citadas en la presente se incorporan expresamente por referencia en la misma medida como si se indicara que cada referencia individual se incorpora específica e individualmente por referencia. En caso de conflicto entre la presente descripción y las referencias incorporadas,
10 prevalecerá la presente descripción.

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente tienen el mismo significado que entiende comúnmente una persona del oficio de nivel medio a quien se dirige la presente invención. Como se
15 usa en la presente, la expresión "alrededor de", cuando se usa en referencia a un valor numérico descrito en particular, significa que el valor puede variar del valor descrito en no más de 1%. Por ejemplo, como se usa en la presente, la expresión "alrededor de 100" incluye 99 y 101 y todos los
20 valores intermedios (por ejemplo, 99.1, 99.2, 99.3, 99.4, etc.).

Aunque los métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en la presente pueden usarse en la práctica o en pruebas de la presente invención, a continuación se
25 describen los métodos y materiales preferidos.

Vectores y microorganismos diana

También se describen en la presente vectores que comprenden moléculas de polinucleótidos, así como células diana transformadas con tales vectores. Las moléculas de polinucleótidos descritas en la presente pueden estar unidas a un vector, que incluye un marcador seleccionable y origen de replicación, para el hospedero de propagación de interés. Las células diana están diseñadas mediante ingeniería genética para incluir estos vectores y, por lo tanto, transcribir ARN y expresar polipéptidos. Los vectores en la presente incluyen moléculas de polinucleótidos ligadas operativamente a secuencias reguladoras de la transcripción o traducción adecuadas, tales como las de células diana microbianas. Los ejemplos de secuencias reguladoras incluyen promotores transcripcionales, operadores o potenciadores, sitios de fijación a mRNA ribosómico y secuencias adecuadas que controlan la transcripción y la traducción. Las secuencias de nucleótidos como se describen en la presente están ligadas operativamente cuando las secuencias reguladoras en la presente se relacionan funcionalmente, por ejemplo, con un gen de muerte celular que codifica el polinucleótido.

Los vehículos típicos incluyen plásmidos, vectores transportadores, baculovirus, adenovirus inactivado y similares. En ciertos ejemplos descritos en la presente, el

vehículo puede ser un plásmido integrador pIMAY, pIMAYz o pKOR modificado, como se analiza en la presente.

Se puede seleccionar un microorganismo diana de cualquier microorganismo que tenga la capacidad de reemplazar de manera duradera un microorganismo no deseado específico después de la descolonización. El microorganismo diana puede ser un microorganismo de tipo silvestre que posteriormente se modifica mediante ingeniería genética para mejorar la seguridad a través de los métodos descritos en la presente.

El microorganismo diana puede seleccionarse de un microorganismo diana bacteriano, fúngico o protozoario. El microorganismo diana puede ser una cepa capaz de colonizar un nicho dérmico y/o mucoso en un sujeto. El microorganismo diana puede ser un microorganismo de tipo silvestre, o un microorganismo sintético que puede estar sujeto a modificaciones moleculares adicionales. El microorganismo diana se puede seleccionar de un género seleccionado del grupo que consiste en *Acinetobacter*, *Corynebacterium*, *Cutibacterium*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Propionibacterium* y *Pseudomonas*. El microorganismo diana se puede seleccionar del grupo que consiste en *Acinetobacter baumannii*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus lugdunensis*, *Staphylococcus warneri*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Corynebacterium acnes*, *Corynebacterium striatum*, *Corynebacterium diphtheriae*,

Corynebacterium minutissimum, *Cutibacterium acnes*,
Propionibacterium acnes, *Propionibacterium granulosum*,
Escherichia coli, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus*
aureus, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus mitis*,
5 *Streptococcus viridans*, *Streptococcus pneumoniae*,
Streptococcus anginosus, *Streptococcus constellatus*,
Streptococcus intermedius, *Streptococcus agalactiae*,
Streptococcus mutans, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas*
oryzihabitans, *Pseudomonas stutzeri*, *Pseudomonas putida* y
10 *Pseudomonas fluorescens*.

El microorganismo diana puede ser del mismo género y
especie que el microorganismo no deseado, pero de una cepa
diferente. Por ejemplo, el microorganismo no deseado puede
ser una cepa de *Staphylococcus aureus* resistente a
15 antibióticos, tal como una cepa de MRSA. La tinción de
Staphylococcus aureus resistente a antibióticos puede ser una
cepa patógena, que se sabe que está involucrada en infección
dérmica, infección de la mucosa, bacteriemia y/o
endocarditis. Cuando el microorganismo no deseado es una cepa
20 de *Staphylococcus aureus*, por ejemplo, un MRSA, el
microorganismo diana puede ser, por ejemplo, una cepa menos
patógena que puede ser una cepa aislada, tal como una célula
diana de *Staphylococcus aureus*, tal como una cepa RN4220 o
502a, y similares. De manera alternativa, la célula diana
25 puede ser de la misma cepa que el microorganismo no deseado.

En otro ejemplo, el microorganismo no deseado es una cepa de *Escherichi coli*, por ejemplo, una cepa de *E. coli* tipo 1 uropatógena o cepa p-fimbriada, por ejemplo, una cepa implicada en infección del tracto urinario, bacteriemia y/o
5 endocarditis. En otro ejemplo, la cepa no deseada es una cepa de *Cutibacterium acnes*, por ejemplo, una cepa implicada en *acnes vulgaris*, bacteriemia y/o endocarditis. En otro ejemplo, el microorganismo no deseado es una cepa de *Streptococcus mutans*, por ejemplo, una cepa implicada en la
10 endocarditis de *S. mutans*, caries dental.

Modelo de microorganismo diana susceptible a antibióticos

El microorganismo diana puede ser un microorganismo susceptible a antibióticos de la misma especie que el microorganismo no deseado. En una modalidad, el
15 microorganismo no deseado es una cepa MRSA y el microorganismo diana de reemplazo es una cepa de *Staphylococcus aureus* susceptible a antibióticos. El microorganismo susceptible a antibióticos puede ser una cepa de *Staphylococcus aureus* 502a ("502a"). 502a es un
20 estafilococo coagulasa positivo, sensible a la penicilina y productor de no penicilinasa, generalmente lisado por los fagos 7, 47, 53, 54 y 77. Tipo serológico (b)ci. 502a exhibe un patrón inusual de sensibilidad a los antibióticos del disco porque esta cepa es susceptible a bajas concentraciones
25 de la mayoría de los antibióticos, excepto la tetraciclina;

resistente a 5 µg, pero sensible a 10 µg de tetraciclina. En algunas modalidades, la cepa 502a se puede adquirir en el comercio como *Staphylococcus aureus* subsp. *Aureus* Rosenbach ATCC®27217™.

5 Desafortunadamente, incluso un microorganismo diana susceptible a agentes antimicrobianos puede causar infección sistémica. Por lo tanto, como se proporciona en la presente, el microorganismo diana se somete a modificación molecular para incorporar secuencias reguladoras que incluyen, por
10 ejemplo, un primer promotor inducible para la expresión del gen de muerte celular, bloqueo en V o nanofábrica, para mejorar la seguridad y reducir la probabilidad de infección patógena como se describe en la presente.

El microorganismo diana y/o el microorganismo sintético
15 comprende (i) la capacidad de colonizar de manera duradera un nicho en un sujeto después de la descolonización del microorganismo no deseado y administrar el microorganismo diana o sintético a un sujeto, y (ii) la capacidad de prevenir la recurrencia del microorganismo no deseado en el
20 sujeto por un período de al menos dos semanas, al menos cuatro semanas, al menos seis semanas, al menos ocho semanas, al menos diez semanas, al menos 12 semanas, al menos 16 semanas, al menos 24 semanas, al menos 26 semanas, al menos 30 semanas, al menos 36 semanas, al menos 42 semanas o al
25 menos 52 semanas después de la etapa de administración.

Selección de un microorganismo diana para MRSA

La selección del microorganismo diana puede realizarse al descolonizar el microorganismo diana y reemplazarlo por un microorganismo diana putativo, como se describe en la presente. Por ejemplo, el microorganismo no deseado *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (MRSA) es la causa de una cantidad desproporcionada de infecciones bacterianas invasivas en todo el mundo. El estado de colonización para *Staphylococcus aureus* se considera una condición previa necesaria para la mayoría de las infecciones invasivas. Sin embargo, la descolonización con regímenes antisépticos estándar se ha estudiado como un método para reducir la colonización y las infecciones por MRSA con resultados mixtos. En un ejemplo proporcionado en la presente, la viabilidad y durabilidad de un enfoque de descolonización novedoso para microorganismos no deseados MRSA mediante el uso de recolonización intencional con una cepa de *Staphylococcus aureus* diferente como un microorganismo diana candidato se realizó con la esperanza de mejorar la duración del efecto en comparación con la descolonización estándar. El Ejemplo 1 describe el estudio en el que un total de 765 voluntarios sanos fueron examinados para la colonización por *Staphylococcus aureus*. La tasa de MRSA total para la población examinada fue de 8.5%. Una cohorte de 53 individuos colonizados por MRSA participó en un

estudio controlado de un tratamiento de descolonización/recolonización mediante *Staphylococcus aureus* 502a WT cepa BioPlx-01 en comparación con un grupo de control de descolonización estándar solamente. La duración de la

5 ausencia de MRSA desde el estado de colonización, así como la persistencia de la recolonización de MSSA intencional se monitoreó durante 6 meses. El grupo de control (n=15) para la porción de eficacia del protocolo de descolonización de MRSA

10 mostró una recurrencia de MRSA de 60% en el punto temporal de 4 semanas. El grupo de prueba que empleó el protocolo BioPlx-01WT (n=34) mostró 0% de recurrencia de MRSA en el criterio de valoración primario de 8 semanas y continuó sin mostrar evidencia de recurrencia de MRSA hasta las 26 semanas. En

15 cambio, estos participantes mostraron una persistencia sorprendente de colonización con MSSA, lo que probablemente indica una colonización en curso con el producto de la cepa *Staphylococcus aureus* 502a BioPlx-01WT hasta las 26 semanas. Además, los componentes de BioPlx-01WT en una composición salina amortiguada con fosfato usados en el tratamiento de

20 descolonización/recolonización no mostraron evidencia de irritación dérmica en una cohorte separada de 55 participantes. Por lo tanto, el protocolo de descolonización/recolonización de la cepa diana *Staphylococcus aureus* 502a BioPlx-01WT proporciona una mayor

25 durabilidad de la descolonización de las cepas MRSA que la

descolonización estándar y no muestra efectos cutáneos negativos observados.

Métodos para determinar la presencia detectable de un microorganismo

5 Se puede emplear cualquier método conocido en la técnica para la determinación de la presencia detectable de un género, una especie y una cepa de microorganismos. Se puede encontrar una descripción general de los métodos en Aguilera-Arreola MG. Identification and Typing Methods for the Study
10 of Bacterial Infections: a Brief Review and Mycobacterial as Case of Study. Arch Clin Microbiol. 2015, 7:1, que se incorpora en la presente por referencia.

La presencia detectable de un género, una especie y/o una cepa de una bacteria puede determinarse mediante métodos
15 fenotípicos y/o métodos genotípicos. Los métodos fenotípicos pueden incluir reacciones bioquímicas, reacciones serológicas, susceptibilidad a agentes antimicrobianos, susceptibilidad a fagos, susceptibilidad a bacteriocinas y/o perfil de proteínas celulares. Un ejemplo de una reacción
20 bioquímica es la detección de enzimas extracelulares. Por ejemplo, los estafilococos producen muchas enzimas extracelulares diferentes que incluyen ADNasa, proteínasa y lipasas. Gould, Simon *et al.*, 2009, The evaluation of novel chromogenic substrates for detection of lipolytic activity in
25 clinical isolates of *Staphylococcus aureus* and MRSA from two

European study groups. FEMS Microbiol Let 297; 10-16. Se pueden emplear sustratos cromogénicos para la detección de enzimas extracelulares. Por ejemplo, los medios cromogénicos CHROMager™ MRSA (CHROMagar, París, Francia) pueden emplearse

5 para aislar y diferenciar *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (MRSA), incluido MRSA de bajo nivel. Las muestras se obtienen de, por ejemplo, muestras nasales, perineales, de garganta, rectales, con una posible etapa de enriquecimiento. Si la placa de agar se refrigeró, se

10 calienta hasta temperatura ambiente antes de la inoculación. La muestra se siembra por estría en placas seguido de incubación en condiciones aeróbicas a 37°C durante 18-24 horas. Se lee la apariencia de las colonias, en donde las colonias de MRSA aparecen de color rosa a malva, las colonias

15 de *Staphylococcus aureus* susceptible a la meticilina (MSSA) están inhibidas y otras bacterias aparecen como colonias azules, incoloras o inhibidas. La identificación definitiva como MRSA requiere, además, una identificación final como *Staphylococcus aureus*. Por ejemplo, los medios cromogénicos

20 CHROMagar™ *Staph aureus* pueden emplearse donde *S. aureus* aparece como malva, *S. saprophyticus* aparece como azul turquesa, *E. coli*, *C. albicans* y *E. faecalis* están inhibidos. Para la detección de *Streptococcus* del Grupo B (GBS) (*S. agalactiae*), se pueden emplear placas CHROMagar™ StrepB, en

25 donde *Streptococcus agalactiae* (grupo B) aparece como malva,

Enterococcus spp. y *E. faecalis* aparecen como azul acero, *Lactobacilli*, *leuconostoc* y *lactococci* aparecen como rosa claro, y otros microorganismos son azules, incoloros o inhibidos. Para la detección de diversas *Candida* spp., se
5 pueden emplear medios cromogénicos CHROMager™ *Candida*. Las especies de *Candida* están involucradas en infecciones orofaríngeas y urogenitales superficiales. Aunque *C. albicans* sigue siendo una especie importante involucrada, otros tipos tales como *C. tropicalis*, *C. krusai* o *C. glabrata* han
10 aumentado a medida que los nuevos agentes antifúngicos han funcionado eficazmente contra *C. albicans*. El muestreo y la siembra por estriás directa de las muestras de piel, esputo, orina, vaginales y la siembra por estriás directa o esparcimiento en placas, seguido de incubación en condiciones
15 aeróbicas a 30-37°C durante 48 horas, y la lectura de placas para determinar la apariencia de colonias donde *C. albicans* es verde, *C. tropicalis* es azul metálico, *C. krusei* es rosa y difuso, *C. kefyr* y *C. glabrata* son de color marrón malva, y otras especies son de color blanco a malva.

20 Los métodos genotípicos para la identificación de géneros y especies pueden incluir hibridación, perfil de plásmidos, análisis de polimorfismo de plásmidos, digestión de enzimas de restricción, reacción y separación por electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE, por sus siglas
25 en inglés), ribotipado, reacción en cadena de la polimerasa

(PCR, por sus siglas en inglés) y sus variantes, reacción en cadena de la ligasa (LCR, por sus siglas en inglés), sistema de amplificación basado en la transcripción (TAS, por sus siglas en inglés), o cualquiera de los métodos descritos en la presente.

La identificación de un microbio se puede realizar, por ejemplo, al emplear el software de detección de resistencia a los antimicrobianos (AMR, por sus siglas en inglés) Galileo™ (Arc Bio LLC, Menlo Park, CA y Cambridge, MA) que proporciona anotaciones para secuencias de ADN bacteriano gramnegativo.

El método de tipificación microbiana puede seleccionarse de los métodos genotípicos que incluyen tipificación por secuencia multilocus (MLST, por sus siglas en inglés) que se basa en la amplificación por PCR de varios genes de mantenimiento para crear perfiles de alelos; elementos palindrómicos extragénicos repetitivos por PCR (rep-PCR) que implica la amplificación por PCR de secuencias repetidas en el genoma y la comparación de patrones de bandas; AP-PCR que es reacción en cadena de la polimerasa con cebadores arbitrarios; polimorfismo en la longitud de fragmento amplificado (AFLP, por sus siglas en inglés) que implica la digestión de enzimas de restricción del ADN genómico, la fijación de fragmentos de restricción y la amplificación selectiva; polimorfismo de fragmentos de restricción de ADN (RFLP, por sus siglas en inglés) que implica la digestión del

ADN genómico o de un amplicón con enzimas de restricción que producen fragmentos de restricción cortos; amplificación aleatoria de ADN polimórfico (RAPD, por sus siglas en inglés) que emplea fragmentos de ADN marcador de la amplificación por

5 PCR de segmentos aleatorios de ADN genómico con un cebador único de secuencia de nucleótidos arbitraria; análisis de secuencia de repetición en tándem multilocus (MLVA, por sus siglas en inglés) que implica la amplificación por PCR de locus VTR, lo que visualiza el polimorfismo para crear un

10 perfil de alelo; o electroforesis en gel de campos pulsados (PFGE, por sus siglas en inglés) que implica la comparación de fragmentos de macrorestricción. El método de electroforesis PFGE es capaz de separar fragmentos de una longitud mayor de 50 kb hasta 10 Mb, lo que no es posible con

15 la electroforesis convencional, que puede separar solo fragmentos de 100 bp a 50 kb. Esta capacidad de PFGE se debe a su característica multidireccional, que cambia continuamente la dirección del campo eléctrico, lo que permite la reorientación de la dirección de las moléculas de

20 ADN, para que estas puedan migrar a través del gel de agarosa, además de este evento, los pulsos eléctricos aplicados son de diferente duración, lo que fomenta la reorientación de las moléculas y la separación de los fragmentos de diferente tamaño. Un aparato de PFGE puede ser

25 los campos eléctricos homogéneos con abrazadera de contorno

(CHEF, BioRad). La electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE, por sus siglas en inglés) se considera una técnica estándar de oro para la tipificación de MRSA, debido a su alto poder discriminatorio, pero su proceso es complicado y requiere mucho tiempo. El gen *spa* codifica un componente de la pared celular de la proteína A de *Staphylococcus aureus* y exhibe polimorfismo. La tipificación basada en la secuencia de *spa* se puede usar como una prueba de cribado rápida. Narukawa et al 2009 Tohoku J Exp Med 2009, 218, 207-213.

En la presente se proporcionan métodos y composiciones para suprimir (descolonizar) y reemplazar un microorganismo no deseado con un nuevo microorganismo sintético para desplazar y reemplazar de manera duradera el microorganismo no deseado del ecosistema microbiológico con un nuevo microorganismo para prevenir la recurrencia del organismo no deseado original (denominado en la presente nicho o interferencia ecológica).

En algunas modalidades, se proporcionan métodos para prevenir la colonización, prevenir la infección, disminuir la recurrencia de la colonización o disminuir la recurrencia de una infección patógena de un microorganismo no deseado en un sujeto, que comprende descolonizar y administrar una cepa sintética que comprende una modificación molecular que disminuye la capacidad del microorganismo sintético para causar una enfermedad al sujeto con respecto a la cepa diana

de tipo silvestre, donde el microorganismo se selecciona del grupo que consiste en *Acinetobacter johnsonii*, *Acinetobacter baumannii*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus lugdunensis*, *Staphylococcus warneri*,
5 *Staphylococcus saprophyticus*, *Corynebacterium acnes*, *Corynebacterium striatum*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Corynebacterium minutissimum*, *Cutibacterium acnes*, *Propionibacterium acnes*, *Propionibacterium granulosum*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus aureus*, *Streptococcus*
10 *agalactiae*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus viridans*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus anginosus*, *Streptococcus constellatus*, *Streptococcus intermedius*, *Streptococcus agalactiae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas oryzae*, *Pseudomonas stutzeri*, *Pseudomonas putida* y
15 *Pseudomonas fluorescens*.

En algunas modalidades, se proporciona un método para prevenir la transmisión por parte de un sujeto, o la recurrencia de la colonización o infección, de un microorganismo patógeno en un sujeto, que comprende suprimir
20 el microorganismo patógeno en el sujeto y reemplazar el microorganismo patógeno mediante la administración tópica al sujeto de una composición que comprende un microorganismo benigno de la misma especie, pero de una cepa diferente. El método puede comprender además promover la colonización del
25 microorganismo benigno. En algunas modalidades, el

microorganismo benigno es un microorganismo sintético que tiene al menos una modificación molecular que comprende un primer gen de muerte celular ligado operativamente a una primera región reguladora que comprende un primer promotor, 5 en donde el primer promotor se activa en presencia de suero o sangre humanos. En algunas modalidades, el primer promotor no se activa durante la colonización de membranas dérmicas o mucosas en un sujeto humano.

En algunas modalidades, se proporciona un método para 10 prevenir la transmisión por parte de un sujeto, o la recurrencia de la colonización o infección, de un *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (MRSA) en un sujeto, que comprende suprimir el MRSA en el sujeto y reemplazar el MRSA mediante la administración tópica al 15 sujeto de un *Staphylococcus aureus* susceptible a la meticilina (MSSA, por sus siglas en inglés) de la misma especie, pero de una cepa diferente. El método puede comprender además promover la colonización del MSSA en el sujeto.

20 Se proporciona un método para prevenir la transmisión por parte de un sujeto, o la recurrencia de la colonización o infección, de un microorganismo no deseado en un sujeto, que comprende suprimir el microorganismo no deseado en el sujeto y reemplazar el microorganismo no deseado mediante la 25 administración al sujeto de un segundo microorganismo de la

misma especie, pero de una cepa diferente. El método puede comprender además promover la colonización del segundo microorganismo. En algunas modalidades, el microorganismo no deseado es un microorganismo patógeno resistente a los fármacos. En algunas modalidades, el segundo microorganismo es un microorganismo susceptible a los fármacos. En algunas modalidades, el segundo microorganismo es un microorganismo sintético.

Supresión/descolonización

Un microorganismo no deseado puede suprimirse o descolonizarse, mediante la aplicación tópica de una composición desinfectante, antiséptica o biocida directamente sobre la piel o la mucosa del sujeto, por ejemplo, al pulverizar, sumergir o recubrir el área afectada, opcionalmente el área afectada y áreas adyacentes, o más de 25%, 50%, 75% o más de 90% del área de superficie externa o mucosa del sujeto con la composición desinfectante, antiséptica o biocida. En algunas modalidades, el área afectada, o áreas de superficie adicionales, se secan al aire o se secan con un secador de aire con calor suave, o se exponen a radiación ultravioleta o luz solar antes de vendar al sujeto. En una modalidad, la supresión comprende exponer el área afectada, y opcionalmente una o más áreas adyacentes o distales del sujeto, a radiación ultravioleta. En diversas modalidades, se puede emplear cualquier composición

desinfectante, antiséptica o biocida comúnmente usada. En una modalidad, se emplea un desinfectante que comprende clorhexidina o una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico de esta.

5 En algunas modalidades, el agente bacteriocida, antiséptico, astringente y/o antibacteriano se selecciona del grupo que consiste en alcoholes (alcohol etílico, alcohol isopropílico), aldehídos (glutaraldehído, formaldehído, agentes liberadores de formaldehído (noxytiolin =
 10 oximetilentiourea, taurolina, hexamina, dantoína), o-ftalaldehído), anilidas (triclocarbán = TCC = 3,4,4'-triclorocarbanilida), biguanidas (clorhexidina, alexidina, biguanidas poliméricas (polihexametilen biguanidas con MW> 3,000 g/mol, vantocil), diamidinas (propamidina, isetionato
 15 de propamidina, diclorhidrato de propamidina, dibromopropamidina, isetionato de dibromopropamidina), fenoles (fenticlor, *p*-cloro-*m*-xilenol, cloroxilenol, hexaclorofeno), bisfenoles (triclosán, hexaclorofeno) compuestos de amonio cuaternario (cetrimida, cloruro de
 20 benzalconio, cloruro de cetilpiridinio), compuestos de plata (sulfadiazina de plata, nitrato de plata), compuestos de peroxi (peróxido de hidrógeno, ácido peracético), compuestos de yodo (povidona-yodo, poloxámero-yodo, yodo), agentes liberadores de cloro (hipoclorito de sodio, ácido
 25 hipocloroso, dióxido de cloro, dicloroisocianurato de sodio,

cloramina-T), compuestos de cobre (óxido de cobre), extractos botánicos (*Malaleuca* spp. (aceite de árbol de té), *Cassia fistula* Linn, *Baekea frutesdens* L., *Melia azedarach* L., *Muntingia calabura*, *Vitis vinifera* L, *Terminalia* 5 *avicennnioides* Guill & Perr., *Phyllanthus discoideus* Muel. Muel-Arg., *Ocimum gratissimum* Linn., *Acalypha wilkesiana* Muell-Arg., *Hypericum pruinatum* Boiss. & Bal., *Hypericum olympicum* L. y *Hypericum sabrum* L., *Hamamelis virginiana* (hamamelis), *Eucalyptus* spp., *Rosemarinus officinalis* spp. (romero), 10 *Thymus* spp. (tomillo), *Lippia* spp. (orégano), *Cymbopogon* spp. (citronela), *Cinnamomum* spp., *Geranium* spp., *Lavendula* spp.) y compuestos antibióticos tópicos (bacteriocinas; mupirocina, bacitracina, neomicina, polimixina B, gentamicina).

La supresión del microorganismo no deseado también se 15 puede realizar mediante el uso de fotosensibilizadores en lugar de, o además de, por ejemplo, antibióticos tópicos. Por ejemplo, Peng Zhang et al., Using Photosensitizers Instead of Antibiotics to Kill MRSA, GEN News Highlights, 20 de agosto de 2018; 48373, desarrolló una técnica que usa la luz para 20 activar el oxígeno, que suprime el crecimiento microbiano. Los fotosensibilizadores, tales como las moléculas de colorante, se excitan cuando se iluminan con luz. Los fotosensibilizadores convierten el oxígeno en especies reactivas con oxígeno que matan a los microbios, tales como 25 el MRSA. Con el fin de concentrar los fotosensibilizadores

para mejorar la eficacia, Zhang et al. desarrolló fotosensibilizadores híbridos dispersables en agua, que comprenden nanopartículas de metales nobles decoradas con polímeros anfifílicos para atrapar fotosensibilizadores
5 moleculares. Los fotosensibilizadores híbridos pueden aplicarse a un sujeto, por ejemplo, en una superficie o herida dérmica, en forma de aerosol, loción o crema, y luego iluminarse con luz roja o azul para reducir el crecimiento microbiano.

10 Una composición descolonizante puede estar en forma de una solución tópica, loción o ungüento que comprende un desinfectante, un fotosensibilizador biocida o un compuesto antiséptico y uno o más portadores o excipientes aceptables desde el punto de vista farmacéutico. En un ejemplo
15 específico, se emplea un aerosol desinfectante que comprende gluconato de clorhexidina (0.4%), glicerina (10%), en un portador aceptable desde el punto de vista farmacéutico, que contiene opcionalmente un colorante para marcar la cobertura del aerosol. En una modalidad, la etapa de supresión
20 comprende la administración a una o más áreas afectadas, y opcionalmente una o más áreas circundantes, de un aerosol desinfectante como se describe en la patente estadounidense N.º 4,548,807 y/o 4,716,032, cada una de las cuales se incorpora en la presente por referencia en su totalidad. El
25 aerosol desinfectante puede estar disponible en el comercio,

por ejemplo, Fight Bac®, Deep Valley Farm, Inc., Brooklyn, CT. Otros materiales desinfectantes pueden incluir clorhexidina o sales de esta, tales como gluconato de clorhexidina, acetato de clorhexidina y otras diguanidas, 5 etanol, alcohol SD, alcohol isopropílico, *p*-cloro-*o*-bencilfenol, *o*-fenilfenol, compuestos de amonio cuaternario, tales como cloruro de *n*-alquil/dimetil etil bencil amonio/cloruro de *n*-alquil dimetil bencil amonio, cloruro de benzalconio, cetrimida, cloruro de metilbencetonio, cloruro 10 de bencetonio, cloruro de cetalconio, cloruro de cetilpiridinio, cloruro de dofanio, bromuro de domifeno, peróxidos y permanganatos, tales como solución de peróxido de hidrógeno, solución de permanganato de potasio, peróxido de benzoílo, colorantes antibacterianos tales como hemisulfato 15 de proflavina, trifenilmetano, verde brillante, violeta cristal, violeta de genciana, derivados de quinolona tales como sulfato de hidroxiquinolona, sulfato de hidroxiquinolona de potasio, clorquinaldol, cloruro de decualinio, diyodohidroxiquinolona, solución de Burow (solución acuosa de 20 acetato de aluminio), solución de lejía, solución de yodo, solución de bromuro. Se pueden emplear diversos materiales generalmente reconocidos como seguros (GRAS) en la composición desinfectante o biocida, que incluyen glicerina y glicéridos, por ejemplo, entre otros, mono y diglicéridos de 25 ácidos grasos formadores de grasa comestibles, ésteres de

ácido diacetil tartárico de mono y diglicéridos, triacetina, acetooleínas, acetoestearinas, lactopalmitato de glicerilo, lactooleato de glicerilo y oxiestearinas.

La etapa de supresión, o descolonización, puede
5 realizarse al administrar 1-3 veces al día, durante un
período de 1 a 10 días; por ejemplo, en uno, dos, tres,
cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce,
trece o catorce días. En otras modalidades, la etapa de
supresión se puede administrar de dos, tres, cuatro, cinco o
10 seis veces, cada administración con una separación de 6 a 48
horas, de 8 a 40 horas, de 18 a 36 horas, o de alrededor de
20 a 28 horas. En modalidades específicas, la etapa de
supresión se administra una vez al día de uno a cinco, o de
tres a cuatro días consecutivos. En algunas modalidades, la
15 etapa de supresión no incluye la administración sistémica de
agentes antimicrobianos. En algunas modalidades, la etapa de
supresión no incluye la administración sistémica de agentes
antibióticos, antivirales o antifúngicos. En otras
modalidades, la etapa de supresión incluye la administración
20 sistémica de agentes antimicrobianos. En algunas modalidades,
la etapa de supresión puede incluir la administración
sistémica de uno o más agentes antibióticos, antivirales o
antifúngicos.

Reemplazo

25 Se proporcionan métodos en donde un microorganismo no

deseado se reemplaza de manera duradera con un microorganismo sintético. El microorganismo sintético tiene la capacidad de ocupar el mismo nicho ecológico y/o puede ser de la misma especie, pero de una cepa diferente, que el microorganismo patógeno. Mediante el uso de la misma especie, pero de una cepa diferente (o incluso la misma cepa), el nicho ambiental del microorganismo patógeno puede ocuparse o reemplazarse de manera duradera con el microorganismo sintético benigno.

Microorganismo sintético

En algunas modalidades, el microorganismo patógeno no deseado se reemplaza con un microorganismo sintético. Por ejemplo, la cepa de reemplazo puede ser un microorganismo sintético que es una cepa modificada molecularmente de la misma especie que el microorganismo patógeno o no deseado o la misma cepa que el microorganismo patógeno o no deseado.

En algunas modalidades, se proporciona un microorganismo sintético que comprende un "interruptor de inactivación" que exhibe muerte celular rápida y completa tras la exposición a sangre o suero, pero exhibe un metabolismo y una función de colonización normal en otros entornos. En algunas modalidades, el microorganismo sintético comprende genes de interruptor de inactivación estables e inmóviles. Los componentes del interruptor de inactivación (KS, por sus siglas en inglés) mínimos incluyen una región reguladora (RR, por sus siglas en inglés) que contiene señales de operador,

promotor y traducción, que se activa fuertemente en respuesta a la exposición a sangre o suero, un gen de interruptor de inactivación que expresa una proteína o ARN tóxico, y un medio de terminación de la transcripción. Se prefiere la
5 integración cromosómica del KS. El locus cromosómico puede estar en una región transcripcionalmente inactiva, por ejemplo, una región intergénica (IR, por sus siglas en inglés) entre una seril-tARN sintetasa y un transportador de aminoácidos. Las inserciones aquí no afectan la transcripción
10 de genes flanqueantes (Lei et al., 2012). Preferentemente, no hay sARN conocidos presentes en la IR. Se puede seleccionar cualquier otro locus inerte.

Microorganismo sintético que comprende un interruptor de inactivación

15 En una modalidad particular, el microorganismo patógeno es un microorganismo resistente a los antimicrobianos, y el microorganismo de reemplazo es un microorganismo sintético de la misma especie que el microorganismo patógeno. El microorganismo sintético puede ser un microorganismo
20 modificado molecularmente y susceptible a los antibióticos.

El microorganismo sintético puede comprender una o más, dos o más, o tres o más modificaciones moleculares que comprenden un primer gen de muerte celular ligado operativamente a una primera región reguladora que comprende
25 un primer promotor inducible. Opcionalmente, el

microorganismo sintético comprende además un segundo gen de muerte celular ligado operativamente a la primera región reguladora que comprende el primer promotor o una segunda región reguladora que comprende un segundo promotor
5 inducible. El primer promotor, y opcionalmente el segundo promotor, se activa (induce) por un cambio de estado en el entorno del microorganismo en comparación con las condiciones fisiológicas normales en el al menos un sitio en el sujeto. Por ejemplo, el cambio de estado puede seleccionarse de uno o
10 más cambios en pH, temperatura, presión osmótica, osmolalidad, nivel de oxígeno, concentración de nutrientes, concentración de sangre, concentración de plasma, concentración de suero y concentración de electrolitos. En algunas modalidades, el cambio de estado es una mayor
15 concentración de sangre, suero o plasma en comparación con las condiciones fisiológicas normales en el al menos un sitio en el sujeto.

En una modalidad específica, el microorganismo patógeno es un MRSA y el microorganismo de reemplazo es un
20 microorganismo sintético que es una cepa de *Staphylococcus aureus* coagulasa positiva modificada molecularmente. El microorganismo sintético puede ser un *Staphylococcus aureus* 502a modificado molecularmente, como se describe en la presente.

25 El uso de *Staphylococcus aureus* vivo como plataforma

terapéutica plantea problemas de seguridad porque este patógeno puede causar enfermedades graves si obtiene acceso al sistema circulatorio. En una modalidad, el microorganismo sintético está diseñado molecularmente por ingeniería genética para comprender un "interruptor de inactivación" (KS) y un promotor inducible que induce la muerte bacteriana rápida tras la exposición a sangre o suero. El interruptor de inactivación puede estar compuesto por ADN que codifica 3 componentes principales: i) "región de control", que contiene un promotor y otras secuencias reguladoras, que se activa fuertemente por la sangre o el suero; ii) un ARN o polipéptido tóxico, cuya expresión es impulsada por la región de control, y; iii) un terminador de la transcripción. Un casete compuesto por estos elementos puede integrarse en el cromosoma de *Staphylococcus aureus* en sitios susceptibles de alteración sin afectar negativamente la función bacteriana.

Se desea que la expresión basal o "permeable" de la región de control se minimice o se evite. Por ejemplo, si se produce una producción significativa de ARNm antes de la exposición a sangre o suero, la cepa podría debilitarse durante la elaboración o la colonización de la piel y puede acumular mutaciones que eluden o escapan del KS. Para abordar esto, los candidatos se criban para encontrar aquellos que son fuertemente inducidos en el suero, pero que también tienen una expresión de mRNA muy baja o indetectable en los

medios de crecimiento estándar *in vitro*. A pesar de este esfuerzo, puede observarse alguna expresión permeable, que puede controlarse al comprender además una iv) "abrazadera de expresión" para prevenir la producción de toxinas prematura.

5 Enfoque recombinante para el microorganismo sintético

Se proporciona un microorganismo sintético que comprende un nucleótido recombinante que comprende al menos una modificación molecular (por ejemplo, un interruptor de inactivación) que comprende (i) un gen de muerte celular asociado operativamente con (ii) una primera región reguladora que comprende un primer promotor inducible que es inducido por un cambio de estado en el entorno del microorganismo sintético. El microorganismo sintético puede comprender además al menos una segunda modificación molecular (abrazadera de expresión) que comprende (iii) un gen de antitoxina específico para el primer gen de muerte celular, en donde el gen de antitoxina está asociado operativamente con (iv) una segunda región reguladora que comprende un segundo promotor que está activo (por ejemplo, constitutivo) tras la colonización dérmica o mucosa o en un medio, y preferentemente está regulado de manera descendente por un cambio de estado del entorno del microorganismo sintético.

En algunas modalidades, se proporciona un microorganismo sintético que comprende al menos una modificación molecular (por ejemplo, un interruptor de inactivación) que comprende

un primer gen de muerte celular ligado operativamente a una primera región reguladora que comprende un primer promotor, en donde el primer promotor es activado (inducido) por un cambio de estado en el entorno del microorganismo en comparación con las condiciones fisiológicas normales en el al menos un sitio en el sujeto, opcionalmente en donde la muerte celular del microorganismo sintético ocurre dentro de los 30, 60, 90, 120, 180, 360 o 240 minutos después del cambio de estado. El cambio de estado puede seleccionarse de una o más condiciones de pH, temperatura, presión osmótica, osmolalidad, nivel de oxígeno, concentración de nutrientes, concentración de sangre, concentración de plasma, concentración de suero, concentración de hemo, concentración de sudor, concentración de sebo, concentración de metal, concentración de metal quelado, cambio en la composición o concentración de uno o más factores inmunitarios, concentración de minerales y concentración de electrolitos. En algunas modalidades, el cambio de estado es una mayor concentración de sangre, suero o plasma en comparación con las condiciones fisiológicas normales en el al menos un sitio en el sujeto.

Promotores inducibles

Se proporciona un microorganismo sintético que puede comprender un nucleótido recombinante que comprende al menos una modificación molecular (por ejemplo, un interruptor de

inactivación) que comprende (i) un gen de muerte celular asociado operativamente con (ii) una primera región reguladora que comprende un primer promotor inducible que exhibe condicionalmente una expresión génica de alto nivel del nucleótido recombinante en respuesta a la exposición a sangre, suero o plasma, de al menos dos veces, al menos tres veces, al menos 10 veces, al menos 20 veces, al menos 50 veces, al menos 100 veces de aumento de la productividad basal.

El primer promotor inducible puede activarse (inducirse) tras la exposición a una mayor concentración de sangre, suero, plasma o hemo después de un período de tiempo, por ejemplo, después de 15 minutos, 30 minutos, 45 minutos, 90 minutos, 120 minutos, 180 minutos, 240 minutos, 360 minutos, o cualquier punto temporal intermedio, para aumentar la transcripción y/o expresión al menos 5 veces, al menos 10 veces, al menos 20 veces, al menos 50 veces, al menos 100 veces, al menos 300 veces, o al menos 600 veces en comparación con la transcripción y/o expresión en ausencia de sangre, suero, plasma o hemo (no inducida).

El primer promotor inducible por sangre o suero puede seleccionarse mediante un proceso que comprende seleccionar un microorganismo diana, seleccionar uno o más genes candidatos del primer promotor en el microorganismo diana, cultivar el microorganismo en un medio, obtener muestras del

microorganismo en $t = 0$ min, agregar suero o sangre al medio, obtener muestras en $t = n$ minutos, donde $n = 1-240$ min o más, 15-180 min o 30-120 min, realizar la secuenciación de ARN de las muestras y comparar los números de lectura de secuenciación de ARN para el primer promotor candidato en las muestras obtenidas en $t = 0$ min, y $t = n$ minutos después de la exposición a sangre o suero para el gen del primer promotor candidato. Alternativamente, las muestras obtenidas después de $t = n$ minutos después de la exposición a sangre o suero pueden compararse con $t = n$ minutos en medios sin sangre o suero para el primer promotor candidato. Los primeros promotores candidatos pueden seleccionarse de aquellos que exhiben regulación ascendente mediante secuenciación de ARN después del cultivo de células diana en $t = n$ min en sangre o suero de más de alrededor de 10 veces, más de alrededor de 20 veces, más de alrededor de 50 veces, más de alrededor de 100 veces, o más de alrededor de 500 veces, en comparación con el promotor candidato en la célula diana en $t = 0$, o en comparación con el promotor candidato en la célula diana en $t = n$ en medios sin suero o sangre.

Varios genes candidatos del promotor sensible al suero en *Staphylococcus aureus* 502a se regularon de manera ascendente en más de 20 veces después de la exposición al suero durante 30 minutos, según lo determinado mediante secuenciación de ARN en comparación con $t = 0$, que incluyen el gen *isdB* CH52_00245 (479

veces), el gen *sbnB* CH52_05135 (158 veces), el gen *isdC* CH52_00235 (93 veces), el gen *sbnA* CH52_05140 (88 veces), el gen *srtB* CH52_00215 (73 veces), el gen *sbnE* CH52_05120 (70 veces), el gen *sbnD* CH52_05125 (66 veces), el gen *isdI* CH52_00210 (65 veces), el gen 2 de transportador ABC de hemo CH52_00225 (65 veces), el gen *sbnC* CH52_05130 (63 veces), el gen de transportador ABC de hemo CH52_00230 (60 veces), el gen *isd* ORF3 CH52_00220 (51 veces), el gen *sbnF* CH52_05115 (43 veces), el gen de alanina deshidrogenasa CH52_11875 (43 veces), el gen *HarA* CH52_10455 (43 veces), el gen *sbnG* CH52_05110 (42 veces), el gen de diaminopimelato descarboxilasa CH52_05105 (32 veces), el gen de transportador ABC de hierro CH52_05145 (31 veces), el gen de treonina deshidratasa CH52_11880 (24 veces) y el gen *isdA* CH52_00240 (21 veces).

Se descubrió que varios genes candidatos del promotor sensible al suero en el microorganismo diana *Staphylococcus aureus* 502a se regularon de manera ascendente en más de 20 veces después de la exposición al suero durante 30 minutos, según lo determinado mediante secuenciación de ARN en comparación con TSB en 30 minutos, que incluyen el gen *isdB* CH52_00245 (471 veces), el gen *isdC* CH52_00235 (56 veces), el gen *isdI* CH52_00210 (53 veces), el gen *sbnD* CH52_05125 (52 veces), el gen *sbnC* CH52_05130 (51 veces), el gen *sbnE* CH52_05120 (50 veces), el gen *srtB* CH52_00215 (47 veces), el gen *sbnB* CH52_05135 (44 veces), el gen *sbnF* CH52_05115 (44

veces) el gen 2 de transportador ABC de hemo CH52_00225 (43 veces), el gen *isdA* CH52_00240 (40 veces), el gen de transportador ABC de hemo CH52_00230 (40 veces), el gen *sbnA* CH52_05140 (37 veces), el gen *isd* ORF3 CH52_00220 (35 veces),
 5 el gen *sbnG* CH52_05110 (34 veces), el gen *HarA* CH52_10455 (28 veces), el gen de diaminopimelato descarboxilasa CH52_05105 (25 veces), el gen *sbnI* CH52_05100 (22 veces) y el gen de alanina deshidrogenasa CH52_11875 (20 veces). El gen de transportador ABC de hierro CH52_05145 se reguló de manera ascendente (19
 10 veces) después de 30 min de exposición al suero en comparación con 30 min en TSB. El gen de treonina deshidratasa CH52_11880 se reguló de manera ascendente (14 veces) después de 30 min de exposición al suero en comparación con 30 min en TSB.

Varios genes candidatos del promotor sensible al suero en
 15 el microorganismo diana *Stapylocooccus aureus* 502a se regularon de manera ascendente en más de 50 veces después de la exposición al suero después de 90 minutos, según lo determinado mediante secuenciación de ARN en comparación con $t=0$, que incluyen el gen *isdB* CH52_00245 (2052 veces), el gen *sbnB*
 20 CH52_05135 (310 veces), el gen de alanina deshidrogenasa CH52_11875 (304 veces), el gen *sbnE* CH52_05120 (190 veces), el gen *sbnD* CH52_05125 (187 veces), el gen *isdC* CH52_00235 (173 veces), el gen *sbnC* CH52_05130 (162 veces), el gen *sbnA* CH52_05140 (143 veces), el gen *srtB* CH52_00215 (143 veces), el
 25 gen *sbnG* CH52_05110 (133 veces), el gen *sbnF* CH52_05115 (129

veces), el gen de transportador ABC de hemo CH52_00230 (125 veces), el gen 2 de transportador ABC de hemo CH52_00225 (117 veces), el gen *isdI* CH52_00210 (115 veces), el gen *HarA* CH52_10455 (114 veces), el gen de diaminopimelato
 5 descarboxilasa CH52_05105 (102 veces), el gen *sbnI* CH52_05100 (101 veces), el gen *isd* ORF3 CH52_00220 (97 veces), el gen SAM dep Metrans CH52_04385 (75 veces). El gen de transportador ABC de hierro CH52_05145 (44 veces), el gen *isdA* CH52_00240 (44 veces) y el gen de transportador ABC de sideróforo CH52_05150
 10 (33 veces) también se regularon de manera ascendente después de 90 min de exposición al suero en comparación con $t=0$.

Se descubrió que varios genes candidatos del promotor sensible al suero en el microorganismo diana *Stapylocooccus aureus* 502a se regularon de manera ascendente en más de 50
 15 veces después de la exposición al suero después de 90 minutos, según lo determinado mediante secuenciación de ARN en comparación con el cultivo en TSB en 90 minutos, que incluyen el gen *isdB* CH52_00245 (1240 veces), el gen *sbnD* CH52_05125 (224 veces), el gen de transportador ABC de hemo
 20 CH52_00230 (196 veces), el gen *sbnE* CH52_05120 (171 veces), el gen *srtB* CH52_00215 (170 veces), el gen *isdC* CH52_00235 (149 veces), el gen *sbnC* CH52_05130 (147 veces), el gen de diaminopimelato descarboxilasa CH52_05105 (141 veces), el gen 2 de transportador ABC de hemo CH52_00225 (135 veces), el gen
 25 *sbnB* CH52_05135 (130 veces), el gen *sbnF* CH52_05115 (127

veces), el gen bnG CH52_05110 (120 veces), el gen isd ORF3 CH52_00220 (119 veces), el gen isdI CH52_00210 (118 veces), el gen HarA CH52_10455 (117 veces), el gen isdA CH52_00240 (115 veces), el gen sbnA CH52_05140 (93 veces) y el gen sbnI CH52_05100 (89 veces). El gen de transportador ABC de hierro CH52_05145 (47 veces), el gen de transportador ABC de sideróforo CH52_05150 (37 veces) y el gen SAM dep Metrans CH52_04385 (25 veces) también se regularon de manera ascendente después de 90 min de exposición al suero en comparación con TSB en t=90 min.

Los genes del primer promotor inducible por sangre o suero para usarse en un microorganismo sintético *Staphylococcus aureus* se pueden seleccionar o derivar de un gen seleccionado de isdA (proteína determinante de superficie regulada por hierro A), isdB (proteína determinante de superficie regulada por hierro B), isdG (monooxigenasa degradante de hemo), hlgA (componente gamma-hemolisina A), hlgA1 (gamma-hemolisina), hlgA2 (gamma-hemolisina), hlgB (componente gamma-hemolisina B), hrtAB (transportador regulado por hemo), sbnC (proteína de biosíntesis de sideróforos de la familia luc C), sbnE (proteína de biosíntesis de sideróforos de la familia lucA/lucC), lrgA (regulador de mureína hidrolasa A), lrgB (regulador de mureína hidrolasa B), ear (proteína ear), fhuA (proteína de fijación a ATP de transporte de ferricromo fhuA), fhuB

(permeasa de transporte de ferricromo), hlb (fosfolipasa C), splF (serina proteasa SplF), splD (serina proteasa SplD), dps (proteína de estrés general 20U), SAUSA300_2617 (proteína de fijación a ATP de transportador ABC de cobalto putativa),

5 SAUSA300_2268 (proteína de la familia de simportador de sodio/ácido biliar), SAUSA300_2616 (proteína de transporte de la familia de cobalto), srtB (sortasa B), sbnA (proteína de biosíntesis de sideróforos probable sbnA), leuA (enzima biosintética de aminoácidos de 2-isopropilmalato sintasa),

10 sstA (proteína de membrana de transporte de hierro), sirA (proteína de fijación a sustrato de transportador ABC de hierro), IsdA (transportador de hemo) y Spa (proteína estafilocócica A), HlgA (hemolisina gamma), leuA (enzima biosintética de aminoácidos), sstA (transportador de hierro),

15 sirA (transporte de hierro), spa (proteína A), o IsdA (transportador de hemo), o un gen sustancialmente idéntico. Los genes del primer promotor también pueden seleccionarse del grupo que consiste en SAUSA300_0119 (proteína de la familia de la ornitina ciclodeaminasa), lrgA (transportador

20 de mureína hidrolasa) y bioA (adenosilmetionin-8-amino-7-oxononanoato aminotransferasa), o un gen sustancialmente idéntico.

Los genes del primer promotor inducible por sangre o suero para usarse en un microorganismo sintético

25 *Staphylococcus aureus* pueden seleccionarse o derivarse de un

gen seleccionado del gen *isdB* CH52_00245, el gen *sbnD* CH52_05125, el gen de transportador ABC de hemo CH52_00230, el gen *sbnE* CH52_05120, el gen *srtB* CH52_00215, el gen *isdC* CH52_00235, el gen *sbnC* CH52_05130, el gen de diaminopimelato
5 descarboxilasa CH52_05105, el gen 2 de transportador ABC de hemo CH52_00225, el gen *sbnB* CH52_05135, el gen *sbnF* CH52_05115, el gen *bnG* CH52_05110, el gen *isd* ORF3 CH52_00220, el gen *isdI* CH52_00210, el gen *HarA* CH52_10455, el gen *isdA* CH52_00240, el gen *sbnA* CH52_05140, y el gen *sbnI*
10 CH52_05100, el gen de transportador ABC de hierro CH52_05145, el gen de transportador ABC de sideróforo CH52_05150 y el gen SAM dep Metrans CH52_04385.

El gen del primer promotor inducible por sangre o suero para usarse en un microorganismo sintético *Staphylococcus aureus*
15 puede derivarse de o comprender una secuencia de nucleótidos seleccionada de 114, 115, 119, 120, 121, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162 y 163, o una secuencia sustancialmente idéntica.

20 En una modalidad, el microorganismo sintético es un *Staphylococcus aureus* 502a modificado molecularmente. Las secuencias sin procesar del primer ORF en el operón que sigue a cada región reguladora, desde el codón de inicio hasta el codón de detención, usadas para el diseño de sondas de PCR en
25 tiempo real se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. *Staphylococcus aureus* cepa 502a, secuencias sin procesar del primer ORF en el operón que sigue a cada región reguladora usadas para el diseño de sondas de PCR en tiempo real.

5

10

15

20

25

<i>Staphylococcus aureus</i> cepa 502a, <i>spa</i> ORF de 502a	ATGACTTTACAAATACATACAGGGGTATTAATTT GAAAAAGAAAAACATTTATTCAATTCTGTAACTAGGTGTAGGTATTGCAT CTGTAACTTTAGGTACATTACTTATATCTGGTGGCGTAACACCTGCTGCA AATGCTGCGCAACACGATGAAGCTCAACAAAATGCTTTTATCAAGTGTT AAATATGCCTAATTAACGCTGATCAACGTAATGGTTTATCCAAAGCC TTAAAGATGATCCAAGCCAAAGTGCTAACGTTTTAGGTGAAGCTCAAAAA CTTAATGACTCTCAAGCTCCAAAGCTGATGCGCAACAAAATAACTTCAA CAAAGATCAACAAAGCGCCTTCTATGAAATCTTGAACATGCCTAACTTAA ACGAAGCGCAACGTAACGGCTTCATTCAAAGTCTTAAGACGACCCAAAGC CAAAGCACTAATGTTTTAGGTGAAGCTAAAAAATTAAACGAATCTCAAGC ACCGAAAGCTGATAACAATTTCAACAAAGAACAACAAATGCTTTCTATG AAATCTTGAATATGCCTAACTTAAACGAAGAACAACGCAATGGTTTCATC CAAAGCTTAAAGATGACCAAGCCAAAGTGCTAACCTATTGTGCAAGC TAAAAAGTTAAATGAATCTCAAGCACCGAAAGCGGATAACAAATTCACA AAGAACAACAAATGCTTTCTATGAAATCTTACATTTACCTAACTTAAAC GAAGAACAACGCAATGGTTTCATCCAAAGCTTAAAGATGACCCAAAGCCA AAGCGCTAACCTTTTAGCAGAAGCTAAAAAGCTAAATGATGCACAAAGCAC CAAAGCTGACAACAAATTCACAAAGAACAACAAATGCTTTCTATGAA ATTTTACATTTACCTAACTTAACTGAAGAACAACGTAACGGCTTCATCCA AAGCCTTAAAGACGATCCTTCAGTGAGCAAAGAAATTTAGCAGAAGCTA AAAAGCTAAACGATGCTCAAGCACCAAAAGAGGAAGACAACAAAAACCT GGTAAAGAAGACGGCAACAAAGCCTGGTAAAGAAGACAACAAAAACCTGG TAAAGAAGACGGCAACAAAGCCTGGTAAAGAAGACAACAAACCTGGCA AAGAAGACGGCAACAAAGCCTGGTAAAGAAGACAACAAACCTGGTAAA GAAGACGGCAACAAAGCCTGGTAAAGAAGACGGCAACAAACCTGGTAAAGA AGACGGCAACGGAGTACATGTCGTTAAACCTGGTGATACAGTAAATGACA TTGCAAAAGCAAACGGCACTACTGCTGACAAAATTGCTGCAGATAACAAA TTAGCTGATAAAAACATGATCAACCTGGTCAAGAACTTGTGTTGATAA GAAGCAACCAAGCAACCATGCGATGCTAACAAAGCTCAAGCATTAACAG AAACTGGTGAAGAAAATCCATTATCGGTACAACGTGATTTGGTGGATTA TCATTAGCCTTAGGTGCAGCGTTATTAGCTGGACGTCGTCGCGAACATATA A SEC. ID NO.: 1
<i>Staphylococcus aureus</i> cepa 502a, <i>sirA</i> ORF de 502a	ATGAATAAAGTAATTAATGC TTGTTGTTACGCTTGCTTTCTACTTGTGTTAGCAGGATGTAGTGGGAAT TCAAAATAACAATCATCTGATAACAAAGATAAGGAAACAACCTCAATTAA ACATGCAATGGGTACAACGAAATTAAGGGAAACCAAGCGTGTGTTA CGCTATATCAAGGTGCCACTGACGTCGCTGTATCTTTAGGTGTTAAACCT GTAGGTGCTGTAGAATCATGGACACAAAAACCGAAATTCGAATACATAAA AAATGATTTAAAGATACTAAGATTGTAGGTCAAGAACCTGCACCTAACT TAGAGGAAATCTCTAAATTAACCGGACTTAATTGTGCGCTCAAAAGTT AGAAATGAAAAAGTTTACGATCAATTTCTAAAATCGCACCAACAGTTTC TACTGATACAGTTTTCAAATCAAAGATACAACCTAAGTTAATGGGAAAG CTTTAGGGAAAGAAAAAGAGCTGAAGATTACTTAAAAAGTACGATGAT AAAGTAGCTGCATTCAAAAAGATGCAAAAGCAAAAGTATAAGATGCATG GCCATTGAAAGCTTCAGTTGTTAACTTCGCTGCTGATCATACAAGATTT ATGCTGGTGGATATGCTGGTGAATCTTAATGATTTAGGATTCAAACGT AATAAAGACTTACAAAAACAAGTTGATAATGGTAAGATATTATCCAAC TACATCTAAAGAAAGCATTCCATTAAATGAACGCTGATCATATTTTGTAG TAAATCAGATCCAAATGCGAAAGATGCTGCATTAGTTAAAAAGACTGAA AGCGAATGCACTTCAAGTAAAGAGTGAAAAAATTAGACGCACTTAAAAA CAACCAAGTATCTGATGATTTAGATGAAATCACTTGGAACTTAGCTGGCG GATATAAATCTTCATTAACCTTATTGACGATTTATGAAAAAGTTAAAT ATTGAAAAACAATCAAAATAA SEC. ID NO.: 2

5

Staphylococcus aureus cepa
502a, sstA de 502a

ATGATAATGATTATCATTAATTTAA
AGGGAGAAAAATTTGAATGAAGTATTTATTAAGGGAAATATTTTGCTT
CTATTACTAATATTGTTGACAATTATTTGCTTGTTCATAGGTGTGAGTGA
ACTATCAATTAAGATTTACTACATTTAACTGAATCACAGCGGAATATTT
TATTCACAGCCGAATACCAAGGACGATGAGTATTTAATTGCTGGAAGT
TCGTTGGCTTTAGCAGGCTTGATAATGCAACAAATGATGCAAAATAAGTT
TGTTAGTCCGACTACAGCTGGAACGATGGAATGGGCTAAACTAGGTATTT
TAATTGCTTTATTGTTCTTTCCAACCGGTCATATTTTATTAACACTAGTA
TTTGCTGTTATTTGCAGTATTTGCGGTACGTTTTATTGTTAAAAATCAT
TGATTTTATAAAAGTGAAAGATGTCATTTTGTACCGCTTTTAGGAATTA
TGATGGGTGGGATTGTTGCAAGTTTCACAACCTTCATCTCATTGCGCACG
AATGCTGTTCAAAGCATTGGTAACCTGGCTTAACGGGAACCTTGCCATTAT
CACAAGTGGACGCTATGAAATTTTATATTTAAGTATTCCTCTTTTAGCAT
TGACATATCTTTTTGCTAATCATTTACGATTGTAGGAATGGTAAAGAC
TTTACTAATAATTTAGGTTTGAGTTACGAAAAATTAATTAACATCGCATT
GTTTATTACTGCAACTATTACAGCATTGGTAGTGGTGACTGTTGGAACAT
TACCGTCTTAGGACTAGTAATACCAAAATATTATTTCAATTTATCGAGGT
GATCATTTGAAAAATGCTATCCCTCATACGATGATGTTAGGTGCCATCTT
TGATTATTTCTGATATAGTTGCCAGAATTGTTGTTTATCCATATGAAA
TAAATATTGGTTTAAACAATAGGTGATTTTGAACAATCATTTTCTTATC
TTGCTTATGAAAGGTAGGAAAAATTATGCGCAACAATAA
SEC. ID NO.: 3

10

Staphylococcus aureus cepa
502a, hlgA ORF de 502a

ATGAACT
TAAATTAAGTAGAAAGAAAGTGATTCTATGATTAAAAATAAAATATTA
ACAGCAACTTTAGCAGTTGGTTTAATAGCCCTTTAGCCAATCCATTTAT
AGAAATTTCTAAAGCAGAAAAATAAGATAGAAGATATCGGTCAAGGTGACG
AAATCATCAAAAGAACACAGACATTACTAGCAAACGATTAGCTATAACT
CAAAACATTCAATTTGATTTTGTAAAGATAAAAAATATAACAAGATGC
CCTAGTTGTTAAGATGCAAGGCTTCATCAGCTCTAGAACACATATTCAG
ACTTAAAAAATATCCATATATTAAGAAGATGATATGGCCATTTCAATAT
AATATCAGTTTGAAGACGAAAGACTCTAATGTTGATTAAATCAATTTATCT
TCCTAAAAATAAAATTGATTCAGCAGATGTTAGTCAGAAATTAGGCTATA
ATATCGGCGGAACTTCCAATCAGCGCCATCAATCGGAGGCACTGGCTCA
TTCAACTACTCTAAACCAATTAGTTATAATCAAAAAAACTATGTTACTGA
AGTAGAAAGTCAGAACTCTAAAGGTGTTAAATGGGGAGTGAAAGCAAAAT
CATTGTACACCGAATGGTCAAGTATCTGCATATGATCAATACTTATTT
GCACAAGACCCAACTGGTCCAGCAGCAAGAGACTATTTGCTCCAGATAA
TCAATTACCTCCTTTAATTCAAAGTGGCTTTAATCCATCATTTTATTACAA
CATTGTCACACGAAAGAGGTAAAGGTGATAAAAGCGAGTTTGAATCACT
TACGGCAGAAACATGGATGCTACATATGCTTACGTGACAAGACATCGTTT
AGCCGTTGATAGAAAACATGATGCTTTTAAACCGAAACGTTACAGTTA
AATATGAAGTGAAGTGGAAACACATGAAGTAAAAATTAAGCATCACA
CCTAAGTAA
SEC. ID NO.: 4

15

Staphylococcus aureus cepa
502a, isdA ORF de 502a

ATGACAAACATTATTTAAACAGTAAGTATCAATC
AGAACAACGTTTCATCAGCTATGAAAAAGATTACAATGGGTACAGCATCTA
TCATTTTAGGTTCCCTTGATACATAGGCGCAGACAGCCAAACAGTCAAT
GCGGCAACAGAAGCTACGAACGCACTAATAATCAAACACACAAGTTTC
TCAAGCAACATCACAACCAATTAATTTCCAAGTGCAAAAAGATGGCTCTT
CAGAGAAGTCACACATGGATGACTATATGCAACACCTCGTAAAGTAATT
AAACAAAAATAAATAATATTATTTCCAACCGTGTAAACAATGCATCAT
CTCGAAAGATACAAATTTTACAATGCAACAATCAAGAATTAGCAACAA
CTGTTGTTAACGATAATAAAAAAGCGGATACTAGAACAAATCAATGTTGCA
GTTGAACCTGGATATAAGAGCTTAACCTAAAGTACATATTGTCGTGCC
ACAAATTAATTACAATCATAGATATACGCAATTTGGAATTTGAAAAAG
CAATTCCTACATTAGCTGACGCAAGCAAAACCAACAAATGTTAAACCGGTT
CAACCAAAACCGCTCAACCTAAACACCTACTGAGCAAACTAAACAGT
TCAACCTAAAGTTGAAAAAGTTAAACCTACTGTAACCTACAACAAGCAAG
TTGAAGACAATCACTCTACTAAAGTTGTAAGTACTGACACAACAAGAT
CAAACTAAACACAACTGCTCATACAGTTAAACAGCACAACTGCTCA
AGAACAAATAAAGTTCAAACACCTGTTAAAGATGTTGCAACAGCGAAAT
CTGAAAGCAACAATCAAGCTGTAAGTGATAATAATCACAACAACTAAC
AAAGTTACAAAAACATAACGAAACGCCATAACAAGCATCTAAAGCTAAAGA
ATTACCAAAACTGGTTTAACTTCAGTTGATAACTTTATTAGCACAGTTG
CCTTCGCAACACTTGCCCTTTTAGGTTCAATTATCTTTATTACTTTTCAAA
AGAAAGAATCTAAATAA
SEC. ID NO.: 5

20

25

5 10	<i>Staphylococcus aureus</i> cepa 502a, <i>leuA</i> de 502a ATGAGTAGTCATATTCAAATTTTGGATACGACACTAAGAGACGGTGAACA AACACCAGGAGTGAATTTTACTTTTATGTAACGCTTGCGTATTGCATTGC AATTAGAAAAATGGGGTGTAGATGTTATTGAAGCTGGATTTCTGCTTCA AGTACAGGTAGCTTTAAATCTGTTCAAGCAATTGCACAAACATTAACAAC AACGGCTGTATGTGGTTTAGCTAGATGTAAAAATCTGACATCGATGCTG TATATGAAGCAACAAAAGATGCAGCGAAGCCGGTTCGTGCATGTTTTAT A GCAACATCACCTATTTCATCTTGAACATAAACTTAAAAATGTCTCAAGAAGA CGTTTTAGCATCTATTAAGAACATGTCACATACGCGAAACAATTATTTG ACGTTGTTCAATTTTACCTGAAGATGCAACGCGTACTGAATTACCATTC TTAGTGAAATGTGTACAACTGCCGTTGACGCTGGAGCTACAGTTATTAA TATTCCTGATACAGTGGCTACAGTTACCATGATGAATATGCACATATTT TCAAAACCTTAACAGAATCTGTAACATCTTCAAATGAAATTATTTATAGT GCTCATTGCCATGACGATTTAGGAATGGCTGTTTCAAATAGTTTAGCTGC AATTGAAGGCGGTGCGAGACGAATTGAAGGCACTGTAATGGTATTGGT G AACGAGCAGGTAATGCAGCACTTGAAGAAGTCGCGCTTGCATATACGT T CGAAATGATCATTATGGTGCTCAAACCTGCCCTTAATCTCGAAGAACTAA AAAAACATCGGATTTAATTTCAAGATATGCAGGTATTTCGAGTGCCTAGAA ATAAAGCAATTGTTGGCCAAAATGCATTTAGTCATGAATCAGGTATTCAC CAAGATGGCGTATTAACACATCGTGAAACATATGAAATTATGACACCTCA ACTTGTGGTGTAAAGCAGCACTGAACTCCATTAGGAAAATTATCTGGTA AACACGCCTTCTCAGAGAAGTTAAAGCATTAGGTTATAACATTGATAAA GAAGCGCAAATAGATTTATTTAAACAATTCAAGACCATTGCGGACAAAAA GAAATCTGTTTCAGATAGAGATATTCATGCGATTATTCAAGGTTCTGAGC ATGAGCATCAAGCACTTTATAAATTGGAACACTACAACACTACAATATGTC TCTAGCGGCCTTCAAAGTGCTGTTGTTGTTGTTAAAGATAAAGAGGGTC A TATTTACCAGGATTCAAGTATTGGTACTGGTTCAATCGTAGCAATTTACA ATGCAGTTGATCGTATTTTCCAGAAAGAAACAGAATTAATTGATTATCGT ATTAATTCTGCTCACTGAAGGTACTGATGCCCAAGCAGAAGTACATGTAAA TTTATTGATTGAAGGTAAGACTGTCAATGGCTTTGGTATTGATCATGATA TTTACAAGCCTCTTGTAAGCATACGTAGAAGCACATGCTAAATTTGCA GCTGAAAATGTTGAGAAGGTAGGTAAT SEC. ID NO.: 6
--------------------	--

15 Como se analiza más adelante en la presente, el microorganismo sintético puede incluir una modificación molecular de abrazadera de expresión que impide la expresión del gen de muerte celular, en donde la abrazadera de expresión comprende un gen de antitoxina específico para el

20 gen de muerte celular asociado operativamente con un segundo promotor que está activo sobre la colonización dérmica o mucosa o en medio TSB, y preferentemente se regula de manera descendente en sangre, suero o plasma, por ejemplo, el segundo promotor puede comprender un gen *clfB* (factor de

25 aglutinación B), por ejemplo, como se muestra en la Tabla 3.

Tabla 3. Otras secuencias usadas para el diseño de sondas de PCR en tiempo real

5	<i>clfB</i> ORF de 502a (para impulsar la antitoxina para "abrazadera de expresión")	ATGAAAAAAAAGAATTGATTATTTGTCTGAATAAGCAGAATAAGTATTCGAT TAGACGTTTTACAGTAGGTACACATCAGTAATAGTAGGGGCAACTATAC TATTTGGGATAGGCAATCATCAAGCACAAGCTTCAGAACAAATCGAACGAT ACAACGCAATCTTCGAAAAAATAATGCAAGTGCAGATTCCGAAAAAAACAA TATGATAGAAACACCTCAATTAAATACAACGGCTAATGATACATCTGATA TTAGTGCAAACACAAACAGTGCGAATGTAGATAGCACAAACAAACCAATG TCTACACAAACGAGCAATACCACTACAACAGAGCCAGCTTCAACAAATGA AACACCTCAACCGACGGCAATTAATAATCAAGCAACTGCTGCAAAAAATGC AAGATCAAACGTCTCCTCAAGAAGCAAATTCTCAAGTAGATAATAAAACA ACGAATGATGCTAATAGCATAGCAACAAACAGTGAGCTTAAAAATTCTCA AACATTAGATTTACCACAATCATCACCACAAACGATTTCCAATGCGCAAG GAACTAGTAAACCAAGTGTAGAACGAGAGCTGTACGTAGTTAGCTGTT GCTGAACCGGTAGTAAATGCTGCTGATGCTAAAGGTACAAATGTAAATGA TAAAGTTACGGCAAGTAATTTCAAGTTAGAAAAGACTACATTTGACCCTA ATCAAAGTGGTAACACATTTATGGCGGCAAATTTACAGTGACAGATAAA GTGAAATCAAGGGGATTATTTTACAGCGAAGTTACCAGATGTTTAACTGG TAATGGAGACGTGGATTATTCTAATTCAAATAATACGATGCCAATTGCAG ACATTAAAAGTACGAATGGCGATGTTGTAGCTAAAGCAACATATTGATATC TTGACTAAGACGTATACATTTGTCTTTACAGATTATGTAAATAATAAAGA AAATATTAACGGACAATTTTCATTACCTTTATTTACAGACCCGAGCAAGG CACCTAAATCAGGAACATATGATGCGAATATTAATATTGCGGATGAAATG TTTAATAATAAAATTACTTATAACTATAGTTCCGCCAATTGCAGGAATTGA TAAACCAAATGGCGCGAACATTTCTTCTCAAATTTGGTGTAGATACAG CTTCAGGTCAAAACACATACAAGCAAAACAGTATTTGTTAACCCTAAGCAA CGAGTTTTAGGTAATACGTGGGTGTATATTAAGGCTACCAAGATAAAAT CGAAGAAAGTAGCGGTAAAGTAAGTGCTACAGATACAAAACCTGAGAATTT TTGAAGTGAATGATACATCTAAATTATCAGATAGCTACTATGCAGATCCA AATGACTCTAACCTTAAAGAAAGTAACAGACCAATTTAAAAATAGAATCTA TTATGAGCATCCAAATGTAGCTAGTATTAATTTGGTGATATTACTAAAA CATATGTAGTATTAGTAGAAGGGCATTACGACAATACAGGTAAGAACTTA AAAACCTCAGGTTATTCAAGAAAATGTTGATCCTGTAAACAATAGAGACTA CAGTATTTTTCGGTTGGAATAATGAGAATGTTGTACGTTATGGTGGTGGA GTGCTGATGGTGATTCAGCAGTAAATCCGAAAGACCCAACTCCAGGGCCG CCGTTTGACCCAGAACCAAGTCCAGACCCAGAACCAGAACCAACGCCAGA TCCAGAACCAAGTCCAGACCCAGAACCGGAACCAAGCCAGACCCGGATC CGGATTCGGATTCAGACAGTGACTCAGGCTCAGACAGCGACTCAGGTTCA GATAGCGACTCAGAATCAGATAGCGATTCCGGATTCAGACAGTGATTTCAGA TTCAGACAGCGACTCAGAATCAGATAGCGATTTCAGAATCAGATAGCGACT CAGATTCAGATAGCGATTTCAGATTCAGATAGCGATTTCAGAATCAGATAGC GATTCGGATTCAGACAGTGATTTCAGATTTCAGACAGCGACTCAGAATCAGA TAGCGACTCAGAATCAGATAGTGAGTCAGATTTCAGACAGTGACTCGGACT CAGACAGTGATTTCAGACTCAGATAGCGATTTCAGACTCAGATAGCGATTCA GACTCAGACAGCGATTTCAGATTTCAGACAGCGACTCAGAATCAGACAGCGA CTCAGACTCAGATAGCGACTCAGACTCAGACAGCGACTCAGATTTCAGATA GCGATTTCAGACTCAGACAGCGACTCAGACTCAGACAGCGACTCAGACTCA GATAGCGATTTCAGACTCAGACAGCGACTCAGATTTCAGATAGCGATTTCGGA CTCAGACAGCGATTTCAGATTTCAGACAGCGACTCAGACTCGGATAGCGATT CAGATTTCAGACAGCGACTCAGACTCGGATAGCGACTCGGATTTCAGATAGT GACTCCGATTCAAGAGTTACACCACCAAATAATGAACAGAAAGCACCATC AAATCCTAAAGGTGAAGTAAACCATTTCTAATAAGGTATCAAAACAACACA AAACTGATGCTTTACCAGAAACAGGAGATAAGAGCGAAAACACAAATGCA ACTTTATTTGGTGCAATGATGGCATTATTAGGATCATTACTATTGTTTAG AAAACGCAAGCAAGATCATAAAGAAAAAGCGTAAATACTTTTTTAGGCCG AATACATTTGTATTCCGTTTTTTTGTGAAAATGATTTTAAAGTGAATTG SEC. ID NO.: 7
10		
15		
20		

5

10

15

20

<i>gyrA</i> ORF de 502a (gen de mantenimiento interno)	ATGGCTGAATTACCTCAATCAAGAATAAATGAACGAAATATTACCAGTGA AATGCGTGAATCATTTTTAGATTATGCGATGAGTGTTATCGTTGCTCGTG CATTGCCAGATGTTTCGTGACGGTTTAAACCAGTACATCGTCGTATACTA TATGGATTAAATGAACAAGGTATGACACCGGATAAATCATATAAAAAATC AGCACGTATCGTTGGTGACGTAATGGGTAAATATCACCCATCGGTGACT CATCTATTTATGAAGCAATGGTACGTATGGCTCAAGATTTTCAGTTATCGT TATCCGCTTGTTGATGGCCAAGGTAACCTTTGGTTCAATGGATGGAGATGG CGCAGCAGCAATGCGTTATACTGAAGCGCGTATGACTAAAATCACACTTG AACTGTTACGTGATATTAATAAAGATACAATAGATTTTATCGATAACTAT GATGGTAATGAAAGAGAGCCGTCAGTCTTACCTGCTCGATTCCCTAACTT GTTAGCCAATGGAGCATCAGGTATAGCGGTAGGTATGGCAACGAATATTC CACCACATAACTTAACAGAATTAATCAATGGTGTACTTAGCTTAAGTAAG AACCCTGATATTTCAATTGCTGAGTTAATGGAGGATATTGATGAGTAACTGA TTTCCCAACTGCTGGACTTATTTTAGGTAAGAGTGGTATTAGACGTGCAT ATGAAACAGGTGCTGGTTCAATTCAAATGCGTTCTCGTGCAAGTTATTGAA GAACGTGGAGGCGGACGTCAACGTATTGTTGTCACTGAAATTCCTTTCCA AGTGAATAAGGCTCGTATGATTGAAAAAATTGCAGAGCTCGTTTCGAGACA AGAAAAATTGACGGTATCACTGATTTACGTGATGAAACAAGTTTACGTACT GGTGTGCGTGTGCTTATTGATGTGCGTAAGGATGCAAATGCTAGTGTCTAT TTTAAATAACTTATACAAACAAACACCTCTTCAAACATCATTTGGTGTGA ATATGATTGCACTGTAAATGGTAGACCGAAGCTTATTATTTAAACGAA GCGTTGGTACATTATTTAGAGCATCAAAGACAGTTGTTAGAAGACGTAC GCAATACAACTTACGTAAAGCTAAAGATCGTGCCACATTTTAGAAGGAT TACGTATCGCACTTGACCATATCGATGAAATTATTTCAACGATTGCTGAG TCAGATACAGATAAAGTTGCAATGGAAAGCTTGCAACAACGCTTCAAAC TTCTGAAAAACAAGCTCAAGCTATTTAGACATGCGTTTAAAGACGTCTAA CAGGTTTAGAGAGAGACAAAAATTGAAGCTGAATATAATGAGTTATTAAT TATATTAGTGAATTAGAAACAATCTTAGCTGATGAAGAAGTATTACTACA ATTAGTTAGAGATGAATTAACAGAAATTCGAGATCGTTTCGGTGATGATC GTCGTAAGTGAATCCAATTAGGTGGATTTGAAGATTTAGAAGATGAAGAT CTCATTCCAGAAGAACAATTTGTAATTACACTAAGCCATAAATACTACAT TAAACGTTTGCCGGTATCTACATATCGTGCTCAAAACCGTGGTGGTCTGTG GTGTTCAAGGTATGAATACATTGGAAGAAGATTTTGTCAAGTCAATTGGTA ACTTTAAGTACACATGACCATGTATTGTTCTTTACTAACAAAGGTGCTGT ATACAACTTAAAGGTTATGAAGTGCCTGAGTTATCAAGACAGTCTAAAG GTATTCCTGTAGTGAATGCTATTGAACTTGAAAAATGATGAAGTCAATAGT ACAATGATTGCTGTTAAAGACCTTGAAAGTGAAGACAACCTTCTTAGTGTT TGCAACTAAACGTGGTGTGCTTAAACGTTGAGCATTAAAGTAACTTCTCAA GAATAAATAGAAATGGTAAGATTGCGATTTGTTTCAGAGAAGATGATGAG TTAATTGCAAGTTCGCTTAAACAAGTGGTCAAGAAGATATCTTGATTGGTAC ATCACATGCATCATTAAATCGATTCCCTGAATCAACATTACGTCCTTTAG GCCGTACAGCAACGGGTGTGAAAGGTATTACACTTCGTGAAGGTGACGAA GTTGTAGGGCTTGATGTAGCTCATGCAAACAGTGTGATGAAGTATTAGT AGTTACTGAAAATGGTTATGGTAAACGTACGCCAGTTAATGACTATCGTT TATCAAATCGTGGTGGTAAAGGTATTTAAACAGCTACGATTACTGAGCGT AATGGTAATGTTGTATGTATCACTACAGTAACTGGTGAAGAAGATTTAAT GATTGTTACTAATGCAGGTGTCATTATTCGACTAGATGTTGCAGATTTT CTCAAAATGGTTCGTGCAGCACAAGGTGTTTCGCTTAATTCGCTTAGGTGAT GATCAATTTGTTTCAACGGTTGCTAAAGTAAAGAAGATGCAGAAGATGA AACGAATGAAGATGAGCAATCTACTTCACTGTATCTGAAGATGGTACTG AACACAACGTGAAGCGGTTGTAATGATGAAACACCAGGAAATGCAATT CATACTGAAGTGATTGATTGAGAAGAAAATGATGAAGATGGACGTATTGA AGTAAGACAAGATTTTCATGGATCGTGTGAAAGAAGATATACAACAATCAT CAGATGAAGATGAAGAATAATAA SEC. ID NO.: 8
---	--

25

Los oligonucleótidos adicionales usados en el enfoque recombinante para preparar el microorganismo sintético *Staphylococcus aureus* 502a modificado molecularmente se muestran en la Tabla 4A mostrada en la Figura 3A-3C, y las
5 secuencias promotoras se muestran más adelante.

Genes de muerte celular

El microorganismo sintético puede contener una modificación molecular de interruptor de inactivación que comprende un gen de muerte celular asociado operativamente
10 con un primer promotor inducible, como se describe en la presente. El gen de muerte celular puede seleccionarse de cualquier gen, que tras la sobreexpresión da como resultado la muerte celular o una reducción significativa en el crecimiento del microorganismo sintético dentro de un período
15 de tiempo predefinido, preferentemente dentro de 15 minutos, 30 minutos, 60 minutos, 90 minutos, 120 minutos, 240 minutos o 360 minutos de inducción.

Se han desarrollado genes de muerte celular, genes de toxinas o genes de interruptor de inactivación en otros
20 contextos.

WO 2016/210373, Jonathan Kotula et al., otorgada a Synlogic, Inc., describe una célula bacteriana recombinante que es un auxótrofo diseñado por ingeniería genética para bioseguridad, por ejemplo, que comprende un gen interruptor
25 de inactivación basado en la represión que comprende una

toxina, una antitoxina y un promotor inducible por arabinosa y depende de la presencia de un inductor (por ejemplo, arabinosa) para mantener vivas las células.

US 8,975,061, Bielinski, describe la regulación de genes
5 de toxinas y antitoxinas para la contención biológica para prevenir la propagación no intencional y/o no controlada de los microorganismos en el entorno.

WO 1999/058652, Gerdes, describe sistemas de contención y destrucción biológicos basados en citotoxinas, que incluyen
10 locus de *E. coli* relBE y sistemas similares encontrados en bacterias y arqueas gramnegativas y grampositivas.

US 20150050253, Gabant, describe el crecimiento controlado de microorganismos y el control del crecimiento/la propagación de otros exógenos recombinantes u otros
15 microbios.

WO 2017/023818 y WO 2016/210384, Falb, describen bacterias diseñadas por ingeniería genética para tratar trastornos que involucran el metabolismo del propionato.

US 20160333326, Falb, describe bacterias diseñadas por
20 ingeniería genética para tratar enfermedades asociadas con la hiperamonemia.

US 9101597, Garry, describe células madre mesenquimatosas primarias inmunoprotectoras y métodos, y se describe un interruptor de inactivación proapoptótica para
25 usarse en células madre mesenquimatosas.

US 20160206666, Falb, describe bacterias diseñadas por ingeniería genética para tratar enfermedades que se benefician de la reducción de la inflamación intestinal y/o refuerzan la barrera de la mucosa intestinal.

5 En algunas modalidades, se proporcionan microorganismos sintéticos que comprenden uno o más de los genes de toxina SprA1 (*Staphylococcus aureus*), Sma1 (*Serratia marcescens*), RelF (*E. coli*), KpnI (*K. pneumoniae*) y/o RsaE (*Staphylococcus aureus*).

10 En la presente descripción, se evaluaron diversos genes de toxina de muerte celular en combinaciones con regiones de control óptimas previamente identificadas: i) un péptido de 30 aminoácidos (PepA1) que forma poros en la membrana celular, lo que altera su función; ii) una enzima de
15 restricción (Kpn1 u otra) que digiere rápidamente el cromosoma bacteriano; iii) un ARN pequeño (RsaE) que altera el metabolismo bioquímico central al inhibir la traducción de 2 genes esenciales; iv) una endonucleasa de restricción (Sma1) derivada de *Serratia marcescens*; y v) un gen de toxina
20 derivado de *E. coli* (RelF). Algunas toxinas son más potentes que otras y la combinación ideal de la fuerza de inducción de la región de control y la potencia de la toxina puede dar como resultado una cepa que es saludable al inicio y que muere rápidamente en el sistema circulatorio.

25 El gen de toxina sprA1 (*Staphylococcus aureus*) (que

codifica el péptido PepA1) se describe en WO 2013/050590, Felden, B y Sayed, N, que describe el uso de PepA1 como antimicrobiano, pero el fucos es usar el péptido como agente terapéutico exógeno purificado para administrarse en el
5 cuerpo.

El gen de toxina *relF* (*E. coli*) se describe en EP 20090168998, Gerdes, que describe interruptores de inactivación con el propósito de biocontención y se centra en girar en torno a la inactivación de bacterias gramnegativas.

10 El gen de toxina *relF* se describe en US 8852916, Hyde y Roderick, que describe mecanismos para desencadenar la muerte celular de microorganismos (muerte celular programada). La aplicación principal es usar RelF en biocontención del entorno.

15 *relF* se describe en US 8682619, Amodei, que describe proféticamente RelF para regular el crecimiento de la población bacteriana.

El microorganismo sintético puede derivarse de un microorganismo diana *Staphylococcus aureus* mediante la
20 inserción de una modificación molecular de interruptor de inactivación que comprende una región reguladora que comprende un promotor inducible ligado operativamente a un gen de muerte celular que puede ser un gen de toxina.

El gen de muerte celular puede seleccionarse o derivarse
25 de un gen *sprA1* (que codifica una toxina de péptido que forma

poros en la membrana celular), un gen *sprA2*, un gen *sprG*, un gen *sma1* (una endonucleasa de restricción), un gen *kpn1* (enzima de restricción que rápidamente digiere cromosoma bacteriano), un gen *rsaE* (un ARN pequeño que altera el metabolismo central al inhibir la traducción de 2 genes esenciales), un gen *relF* (*E. coli*), un gen *yoeB*, un gen *mazF*, un gen *yefM*, o un gen de toxina lisostafina. El *Staphylococcus aureus* sintético puede incluir una modificación molecular de interruptor de inactivación que comprende un gen de muerte celular que tiene una secuencia de nucleótidos seleccionada de SEC. ID NO.: 122, 124, 125, 126, 127, 128, 274, 275, 284, 286, 288, 290, 315 o 317, o una secuencia de nucleótidos sustancialmente idéntica.

En una modalidad específica, se proporciona un *Staphylococcus aureus* sintético que tiene una modificación molecular que comprende un primer promotor inducible por sangre o suero asociado operativamente con un gen de muerte celular que comprende o se deriva de un gen *SprA1*.

Interruptores de inactivación múltiples

Un KS puede ser suficiente para equipar al microorganismo sintético con las características deseadas, pero más de un KS puede mejorar adicionalmente la cepa al: i) reducir drásticamente la tasa de mutaciones inactivadoras de KS, y; ii) inactivar la célula por más de una vía, lo que podría causar una muerte celular más rápida (una

característica que mejora el producto). El gen de muerte celular puede comprender una o más de las secuencias de ADN (7) dirección 3' de los promotores que se muestran más adelante. Los números de pares de bases corresponden a la
5 ubicación del vector pCN51.

1. La secuencia del gen *sprA1* entre los sitios de restricción PstI y EcoRI se muestra a continuación. La secuencia se sintetizó mediante DNA 2.0(Atum) y se ligó a un vector, que puede transformarse en células de *E. coli* para su
10 replicación. El gen *sprA1* se cortó por restricción en los sitios PstI y EcoRI y se aisló mediante electroforesis en gel. Secuencia completa entre sitios de restricción con posibles sitios de inicio y detención en cursiva.

PstI

15 CTGCAGGG TACCGCAGAG AGGAGGTGTA

6101 TAAGGTG**ATG** CTTATTTTCG TTCACATCAT AGCACCAGTC ATCAGTGGCT

6151 GTGCCATTGC GTTTTTTTCT TATTGGCTAA GTAGACGCAA TACAAAA**TAG**

6201 GTGACATATA GCCGCACCAA TAAAAATCCC CTCACTACCG CAAATAGTGA

6251 GGGGATTGGT GTATAAGTAA ATACTTATTT TCGTTGTGGA TCCTTGACTG

20 6301 AATTC SEC. ID NO.: 122

EcoRI

2. La secuencia de ADN para el ARN regulador *sprA1sprA1_{AS}* (antisentido *sprA1sprA1*) bajo el promotor ClfB (que se clona de manera inversa detrás del gen *sprA1*, incluido el ARN
25 regulador antisentido). Esta secuencia de ADN produce un ARN

regulador antisentido no codificante, que actúa como una antitoxina al regular la traducción de *sprA1* fuera de los factores del entorno del suero y/o la sangre. A continuación se muestra la secuencia de ADN *sprA1sprA1_{AS}*.

5 EcoRI

GAATTCAGTCAAGGATCCACAACGAAAATAAGTATTTACTTATACACCAATCCCCTCACTA
TTTGCGGTAGTGAGGGGATTTTTATTGGTGCGGCTATATGTCACCTATTTTGTATTGCGTC
TACTTAGCCAATAAGAAAAAACGCAATGGCACAGCCACTGATGACTGGTGCTATGATGTG
AACGAAAATAAGCATCACCTTATACACCTCCTCTCTGCGGTACCCTGCAG SEC. ID

10 NO.: 123

PstI

3. La secuencia de ADN de *SmaI* entre los sitios de restricción PstI y EcoRI. La secuencia se sintetizó mediante DNA 2.0(Atum) y se ligó a un vector que puede transformarse en células de *E. coli* para su replicación. El gen *SmaI* se cortó por restricción en los sitios PstI y EcoRI y se aisló mediante electroforesis en gel. Secuencia completa entre sitios de restricción con sitios de inicio y detención en cursiva.

20

C TGCAG**ATGAG**

5751 CAGGGATGAC CAACTCTTTA CACTTTGGGG AAAGCTTAAC GATCGTCAGA
5801 AGGATAATTT TCTAAAATGG ATGAAAGCTT TTGATGTAGA GAAAACTTAC
5851 CAAAAACAA GTGGGGATAT TTTCAATGAT GATTTTTTCG ATATATTTGG
5901 TGATAGATTA ATTACTCATC ATTTAGTAG CACGCAAGCT TTAACAAAAA
25 5951 CTTTATTCTGA ACATGCTTTT AATGACTCCT TAAATGAATC TGGAGTTATA

6001 TCCTCTCTTG CGGAAAGTAG AACAAACCCT GGGCATGACA TAACAATCGA
 6051 TAGCATAAAG GTTGCTTTAA AAACAGAAGC AGCTAAAAAT ATTAGCAAAT
 6101 CATATATTCA TGTAAGTAAG TGGATGGAGT TAGGCAAGGG GGAGTGGATT
 6151 CTAGAATTAT TATTAGAACG GTTTTTAGAG CATCTAGAGA ATTATGAACG
 5 6201 TATTTTCACA CTCAGATATT TTAAATATC CGAGTATAAA TTTAGCTACC
 6251 AGCTTGTAGA AATACCCAAG AGTCTTTTGT TGGAAGCAAA AAATGCGAAA
 6301 TTAGAAATAA TGTCGGGAAG CAAACAAAGC CCTAAGCCCG GCTATGGATA
 6351 TGTGTTAGAT GAAAATGAAA ATAAGAAGTT TTCTCTATAC TTTGATGGTG
 6401 GTGCCGAGAG AAAACTTCAA ATAAACATT TAAATTTAGA ACATTGCATT
 10 6451 GTTCATGGAG TTTGGGATTT TATTCTACCG CCGCCT**TAAG** AATTC SEC.
 ID NO.: 124

4. La secuencia de ADN de *rsaE* entre los sitios de
 restricción PstI y EcoRI. La secuencia se sintetizó mediante
 DNA 2.0(Atum) y se ligó a un vector que puede transformarse
 15 en células de *E. coli* para su replicación. El ARN regulador
 pequeño RsaE (sARN) se cortó por restricción en los sitios
 PstI y EcoRI y se aisló mediante electroforesis en gel. Esto
 contiene un avance de 5' y el ARN maduro se procesa en el
 inicio de GAAATTAA en negrita y termina en el tramo de Ts
 20 después de ACG.

CTGCAGAT GGTAGAGATA GCATGTTATA

6101 TTATGAACAT **GAAATTAA**TC ACATAACAAA CATACCCCTT TGTTTGAAGT
 6151 GAAAAATTTT TCCCATCCCC TTTGTTTAGC GTCGTGTATT CAGACACGAC
 6201 GTTTTTTTGA ATTC SEC. ID NO.: 125

25 5. Se puede usar una variante para el sARN de RsaE que

puede expresar el sARN más altamente y que puede funcionar de manera más eficaz. Esta variante comenzaría con GAAATTAA en el extremo 5'.

6110 **GAAATTAATC** ACATAACAAA CATACCCCTT TGTTTGAAGT

5 6151 GAAAAATTTT TCCCATCCCC TTTGTTTAGC GTCGTGTATT CAGACACGAC

6201 GTTTTTTTGA ATTC SEC. ID NO.: 126

6. La secuencia de ADN de *relF* (*E. coli*). Este potencial gen de muerte será evaluado y clonado.

ATGAAGCAGC AAAAGGCGAT GTTAATCGCC CTGATCGTCA TCTGTTTAAC

10 CGTCATAGTG

ACGGCACTGG TAACGAGGAA AGACCTCTGC GAGGTACGAA TCCGAACCGG
CCAGACGGAG

GTCGCTGTCT TCACAGCTTA CGAACCTGAG GAGTAA SEC. ID NO.: 127

7. La secuencia de ADN de *KpnI* (enzima de restricción de
15 *K. pneumoniae*) será evaluada y clonada.

atggatgtctttgataaagtttatagtgatgataataatagttatgaccaaaaaactgtaa
gtcagcgtattgaagccct

atcttctaataaccttggaaggttgtaactcgtcagcaaatcattagggcggcaactgat
ccaaaaacagggaaacaac

20 cagaaaattggcatcagagacttttcagaactacgaactgataaaggatatactatctttatc
ctggcgggatatgaagggtt

ttagctccgcaagagtatataatgccacacgcaacaagacgccccaaaggcagcaaagcgtg
tattaccgacaaaagaac

ctgggaacaggttttggatagagctaattactcttgcgagtggcaggaagatgggtcaacac

25 tgtgggttagttgaagggtg

atattgatacctatagggggaggcacggtcaaactaacaccagaccatatgacacctcattc
aatagatcccgcaactgat
gtaaatgatacctaaaaatgtggcaagcattgtgtggacgtcatcaagttatgaaaaaaaaatt
attgggattcaaataatgg
5 gaaaataaatgtcattggtatatattgcagtcagtaaatagagaaacaaaagaatgatgcttta
gagtttcttttgaattatt
atggattgaaaagataa SEC. ID NO.: 128

En la presente se proporciona un *Staphylococcus aureus* 502a sintético que comprende al menos una modificación
10 molecular (interruptor de inactivación) que comprende un primer gen de muerte celular ligado operativamente a una primera región reguladora que comprende un primer promotor, opcionalmente en donde el primer gen de muerte celular comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada de SEC.
15 ID NO.: 122, 124, 125, 126, 127, 128, 274, 275, 284, 286, 288, 290, 315 y 317, o una secuencia de nucleótidos sustancialmente idéntica.

Aunque los interruptores de muerte (KS) se han descrito para otros fines, el presente KS tiene las siguientes
20 características únicas: i) responde a la exposición a sangre o suero; ii) está regulado de manera endógena, lo que significa que no es necesaria la adición o eliminación de moléculas pequeñas para activar o ajustar el KS (no un auxótrofo); y iii) se pueden usar combinaciones útiles de
25 región de control/toxina, y de múltiples casetes para lograr

un rendimiento superior.

Abrazadera de expresión

Se proporciona un microorganismo sintético que comprende una modificación molecular de interruptor de inactivación que comprende (i) un gen de muerte celular asociado operativamente con (ii) una primera región reguladora que comprende un primer promotor inducible que es inducido por la exposición a sangre o suero. Para que el microorganismo sintético ocupe de manera duradera un nicho dérmico o mucoso en el sujeto, el interruptor de inactivación preferentemente debe ser silencioso (no expresado) en ausencia de sangre o suero.

Para evitar la "expresión permeable" del gen de muerte celular, el microorganismo sintético puede comprender además al menos una segunda modificación molecular (abrazadera de expresión) que comprende (iii) un gen de antitoxina específico para el primer gen de muerte celular, en donde el gen de antitoxina está asociado operativamente con (iv) una segunda región reguladora que comprende un segundo promotor que está activo (por ejemplo, constitutivo) tras la colonización dérmica o mucosa o en un medio (por ejemplo, TSB), y preferentemente está regulado de manera descendente por la exposición a sangre, suero o plasma.

El nivel basal de expresión génica (la expresión observada cuando las células no están expuestas a sangre o

suero, por ejemplo, en TSB (caldo de soja triptico)) en la cepa KS debería ser idealmente muy baja ya que la producción de la toxina antes del contacto con el suero mataría o debilitaría la cepa de manera prematura. Incluso el

5 deterioro moderado de la salud celular es inaceptable porque: 1) se acumularían mutaciones de escape en el KS (inestabilidad del KS), un fenómeno conocido que debe evitarse, y/o; 2) la eficacia natural observada con nuestra cepa en ensayos preliminares podría reducirse o perderse.

10 Para comprender si la expresión permeable es un problema, tanto el nivel absoluto de expresión inicial como la relación de cambio en el suero se miden y se consideran de cerca en la selección de la región de control óptima para impulsar el KS.

15 El conocimiento de la expresión permeable no soluciona el problema y la realidad es que incluso los promotores reostáticos "estrechamente controlados" ampliamente usados tales como las variantes *P_{CUP1}* y *P_{Gal17}*, y *P_{Tet}* -encendido/apagado producen transcripción de mRNA medible en ausencia de

20 inducción específica. En algunas modalidades, se emplea una "abrazadera de expresión" en donde el casete KS contiene no solo la región de control sensible al suero que impulsa la expresión de toxina, sino que también codifica un ARN de "bloqueo de traducción" bajo el control de un promotor de

25 *Staphylococcus aureus* (*P_{clfB}*, etc.) que normalmente es

fuertemente activo en *Staphylococcus aureus* durante la colonización de la piel, y se regula de manera descendente en sangre.

El promotor del gen *clfB* (P_{clfB}) se clonará para impulsar la expresión de *sprAIsprA_{AS}*. El ARN y el casete se incorporarán en el mismo módulo de expresión que se usa para la expresión de la toxina *sprA1* de un promotor sensible al suero (por ejemplo, P_{isdB} , P_{hlgA} , etc.). En esta cepa, la exposición a suero/sangre activa la toxina (por ejemplo, hasta 350 veces o más) pero no la antitoxina, y el crecimiento en TSB o en la piel activa la antitoxina pero no la toxina. Un diagrama representativo de una modificación molecular de ejemplo de una cepa sintética se muestra en la Figura 1.

15 Un enfoque alternativo para un microorganismo sintético: método KO

Una forma alternativa de crear un fenotipo similar al interruptor de inactivación en el microorganismo sintético es alterar ("inactivar") uno o más genes necesarios para la supervivencia en sangre y/o para la infección de órganos, pero que no son necesarios (o importantes) para el crecimiento en medios o en la piel. En algunas modalidades, uno o más, o dos o más, de los 6 genes mostrados en la Tabla 5 pueden emplearse en el método KO.

Tabla 5: Candidatos para la inactivación de genes para crear una cepa atenuada:

5	Referencia	Tipo de mutagénesis	Genes necesarios para la supervivencia en sangre o infección de órganos	Función genética informada
10	Benton <i>et al</i> (2004) Large-Scale Identification of Genes Required for Full Virulence of <i>Staphylococcus aureus</i> . J. bact. 186(24): 8478–8489. DOI 10.1128/JB.186.24.8478–8489.2004	Inserción de transposón	PycA; AspB; GabP. La mutación de estos causa una reducción de hasta 1000 veces en la tasa de infección de órganos <i>in vivo</i>	PycA: piruvato carboxilasa
				AspB: aspartato aminotransferasa
				GabP: gamma-aminobutirato permeasa
15	Valentino <i>et al</i> (2014). Genes Contributing to <i>Staphylococcus aureus</i> Fitness in Abscess- and Infection-Related Ecologies. mBio5(5):e01729-14.doi:10.1128/mBio.01729-14.	Inserción de transposón	Genes esenciales para la supervivencia <i>in vitro</i> en sangre pero no necesarios para el crecimiento en líquido BHI o agar: - SAOUHSC_01216 - SAOUHSC_00686 - SAOUHSC_00378	SAOUHSC_01216: subunidad b de succinil CoA-sintetasa.
20				SAOUHSC_00686: proteína hipotética desconocida
				SAOUHSC_00378: proteína hipotética desconocida

En una modalidad, se proporciona un microorganismo sintético que comprende el reemplazo de uno o más de los

genes en la Tabla 5 con KS no modificado o con abrazadera de expresión, mediante intercambio alélico. Esto puede mejorar aún más la tasa de mortalidad del microorganismo sintético en sangre. Alternativamente, la necesidad de
5 integrar dos KS se reduce al tener un KO y un KS. En una modalidad adicional, un microorganismo sintético puede comprender una combinación de más de un KO que puede tener efectos sinérgicos.

Región reguladora del interruptor de inactivación

10 Se proporciona un microorganismo sintético que comprende un interruptor de inactivación. El interruptor de inactivación comprende un gen de muerte celular ligado operativamente a una región reguladora (RR) que comprende un promotor inducible, como se describe en la presente.

15 El desarrollo de un microorganismo sintético implica la identificación y caracterización de regiones reguladoras (RR) óptimas para impulsar los genes de interruptor de inactivación; se elige una lista de locus sensibles al suero; se identifican las RR; y se verifica
20 la respuesta de activación del suero, y se investiga la expresión basal.

Identificación y caracterización de regiones reguladoras óptimas para impulsar candidatos de interruptores de inactivación.

25 Esta fase importante de la construcción de la cepa KS

implica la identificación de genes que están fuertemente regulados de manera ascendente en respuesta al suero humano y/o la sangre heparinizada. Una vez que se identifican los genes, se identifican y anotan sus RR, que
5 contienen el promotor y otros elementos dirección 5'. En un enfoque, se puede emplear cualquier gen sensible al suero y a la sangre en *Staphylococcus aureus* que se conoce en la bibliografía.

Una RR incluye las secuencias reguladoras dirección
10 5' necesarias para la activación (o represión) de la transcripción de mRNA en respuesta a estímulos. Los motivos incluyen elementos "arriba", elementos de consenso -35 y -10, sitios de fijación a ribosomas ("secuencia Shine-Dalgarno") y secuencias "operadoras" que se fijan a
15 factores proteicos que influyen fuertemente en la transcripción. En la práctica para las eubacterias, el aprovechamiento de una región de 200 bp de secuencia de ADN dirección 5' del codón de inicio suele ser adecuado para capturar todos estos elementos. Sin embargo, se
20 prefiere identificar deliberadamente estas secuencias para asegurar su inclusión.

En la Tabla 6 se muestran seis genes de *Staphylococcus aureus* que están fuertemente regulados de manera ascendente por la exposición a sangre o suero
25 humanos.

Tabla 6: Identificación de RR y promotores inducibles por suero o sangre candidatos para impulsar los componentes del interruptor de inactivación para impulsar la toxina.

5

10

15

20

25

Gen	Función	Primer autor, año	Relación de cambio en suero o sangre	Tiempo de exposición a sangre o suero	Cepa SA usada en el estudio	Comentarios
<i>spa</i>	Proteína estafilocócica A; fijación a Ig; gen monocistónico	Malachowa 2011	~ 45 veces	90 min	USA300 y mu50	Wang 2004 predice la estructura del gen monocistónico. Existen evidencias experimentales y computacionales de esta estructura.
<i>sir</i>	Sir ABC; transporte de hierro	Malachowa 2011 y Wang 2004	81 veces en suero; 68 veces en sangre (sirA; primer ORF en operón)	30 a 120 minutos	USA300 y mu50	Alta inducción en el primer punto temporal. Coincidencia experimental y prevista de estructura de operón
<i>sst</i>	Operón sstABCD; transporte de hierro	Malachowa 2011 y Wang 2004	25 veces en suero; 15 veces en sangre;	30 a 120 minutos	USA300 y mu50	Alta inducción en el primer punto temporal. Coincidencia experimental y prevista de estructura de operón
Gamma hemolisina <i>hlgA</i>	lisis de rbc	Malachowa 2011;	~ 350 veces (Figura 4b).	90 min	USA300	Estructura de operón caracterizada por Cooney 1993
<i>sai-1</i> (proteína de superficie de superficie seg 7). También denominada <i>isdA</i>	Proteína de superficie celular de 29 kd; transportador de hemo;	Wiltshire 2001	50 veces en suero; 24 veces en sangre. IsdB del mismo operón está regulado de manera ascendente 240 veces en suero y 140 veces en sangre	16 h (ensayo de placas O/N)	8325-4	Agar sérico y ensayos en fase de solución, pub. separadas. El suero fue suficiente para la inducción en Wiltshire 2001 y Malachowa 2011.

5	<i>leuA</i>	2-isopropilmalato sintasa	Malachowa 2011	regulado de manera descendente 6 veces en TSB; regulado de manera ascendente 15 veces en suero; regulado de manera ascendente 12 veces en sangre	30 a 120 min	USA300	Atractivo porque está regulado de manera descendente en TSB, pero las veces que está regulado de manera ascendente en suero pueden ser insuficientes
10	SAUSA300_0119	Proteína de la familia de la ornitina ciclodaminasa	Malachowa 2011	regulado de manera ascendente 50 veces en suero, 27 veces en sangre; sin regulación de manera ascendente en TSB comparado con el tiempo 0 en TSB	30 a 120 min	USA300	Categoría de gen diferente a la anterior y también aparentemente estrictamente regulada en TSB
15	<i>lrgA</i>	Transportador de mureína hidrolasa	Malachowa 2011	regulado de manera descendente -3.3 veces en TSB; regulado de manera ascendente 12 veces en suero; regulado de manera ascendente 17 veces en sangre	30 a 120 min	USA300	Atractivo porque está regulado de manera descendente en TSB
20	<i>bioA</i>	Adenosilmetiloin-8-amino-7-oxononanoato aminotransferasa	Malachowa 2011	regulado de manera ascendente 107 veces en suero; regulado de manera ascendente 56 veces en sangre; no regulado en TSB	30 a 120 min	USA300	Atractivo porque está fuertemente regulado de manera ascendente y un gen metabólico menos conocido

Los genes completos en cada operón y las secuencias
 flanqueantes de la cepa BioPlx-01 se obtienen de Genbank y se
 25 anotan en función de la bibliografía más algoritmos de

identificación de motivos conocidos. Los terminadores de la transcripción se han identificado mediante una combinación de experimentos publicados y herramientas predictivas.

Se investigó evidencia bibliográfica adicional de la
 5 expresión de promotores sensibles al suero en TSB (o medios similares). Por ejemplo, el gen *spa* y el gen *isdA* se describen en Ythier *et al* 2012, Molecular & Cellular Proteomics, 11:1123-1139, 2012. El gen *sirA* se describe en Dale *et al.*, 2004 J Bacteriol 186(24) 8356-8362. El gen *sst*
 10 se describe en Morrissey *et al.* 2000. El gen *hlgA* se describe en Flack *et al* 2014, PNAS E2037-E2045. www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1322125111. El gen *leuA* se describe en Lei *et al* 2015, Virulence 6:1, 75-84.

Dado que estos datos provienen de muchas cepas y
 15 sistemas experimentales diferentes, se puede evaluar la expresión de toda la colección en un único sistema de ensayo estandarizado con mediciones cuantitativas de expresión génica realizadas mediante PCR en tiempo real. Es importante destacar que el nivel "permeable" basal de expresión génica
 20 (la expresión observada cuando las células no están expuestas a sangre o suero, por ejemplo, en TSB) debería ser muy baja porque la producción de la toxina antes del contacto con el suero mataría/debilitaría la cepa BioPlx-XX (microorganismo sintético que comprende un interruptor de inactivación) de
 25 manera prematura. Incluso el deterioro moderado de la salud

celular es inaceptable porque: 1) se acumularían mutaciones de escape en el KS (inestabilidad del KS), un fenómeno conocido que debe evitarse, y/o 2) la eficacia natural observada con BioPlx-01 podría reducirse o perderse. Por lo tanto, tanto el nivel absoluto de expresión inicial como la relación de cambio en el suero se pueden medir y considerar de cerca en la selección de las RR óptimas para impulsar el KS. Se observa que *leuA* está regulado de manera descendente en TSB (6 veces) y regulado de manera ascendente en suero (15 veces), lo que hace que su RR sea un candidato particularmente interesante para controlar la expresión de KS.

En algunas modalidades, el microorganismo sintético que tiene un interruptor de inactivación puede comprender además una "abrazadera de expresión" en la que el casete KS contiene no solo la RR sensible al suero que impulsa la expresión de toxina, sino que también codifica una antitoxina de ARN de "bloqueo de traducción" bajo el control de un promotor que normalmente está activo en la piel o la mucosa nasal durante la colonización. El interruptor de inactivación puede codificar una antitoxina que es capaz de suprimir los efectos negativos del gen de toxina de muerte celular.

En algunas modalidades, el microorganismo sintético es un *Staphylococcus aureus* que tiene una modificación molecular que comprende un interruptor de inactivación que comprende

además una "abrazadera de expresión" en la que el casete KS contiene no solo la RR sensible al suero que impulsa la expresión de toxina, sino que también codifica una antitoxina de ARN de "bloqueo de traducción" bajo el control de un
5 promotor de *Staphylococcus aureus* (P_{clfB} etc.) que normalmente está activo en la piel o la mucosa nasal durante la colonización, por ejemplo, como se muestra en la Tabla 7.

De los promotores enumerados en la Tabla 6 más datos de PCR en tiempo real, se pueden seleccionar dos o más RR con la
10 mejor combinación de baja expresión basal y alta respuesta al suero/sangre para impulsar la expresión de KS. Estas RR pueden aparearse con 3 genes KS diferentes como se describe en la presente, lo que genera un panel de cepas candidatas KS para las pruebas. El panel incluirá un candidato de
15 "abrazadera de expresión" como se describe a continuación.

Abrazadera de expresión para bloquear la expresión de toxina cuando la cepa KS está en la piel o en los epitelios nasales

El microorganismo sintético puede comprender una abrazadera de expresión. Los genes involucrados en la
20 colonización por *Staphylococcus aureus* de las narinas humanas se muestran en la Tabla 7 y pueden emplearse como un segundo promotor para usarse en una abrazadera de expresión que además comprende un gen de antitoxina para bloquear la expresión de toxina permeable cuando la cepa sintética se
25 coloniza en la piel o los entornos de la mucosa. El segundo

promotor puede ser un promotor constitutivo, tal como un gen de mantenimiento. El segundo promotor puede estar preferentemente regulado de manera descendente en presencia de sangre o suero.

5 **Tabla 7. Genes involucrados en la colonización por *Staphylococcus aureus* de las narinas humanas**

10

15

20

Gen	Función conocida o putativa	Referencia	Comentarios
<i>clfB</i> (factor de aglutinación B) (ClfB)	Adhesión	Wertheim HF, Walsh 2008; también Burian 2010	10 veces mayor que <i>Gyr in vivo</i> ; misma alta expresión que <i>gyr in vitro</i> . Además, la expresión en modelos de roedores y en seres humanos es importante para la colonización nasal. Está expresado en fase exponencial <i>in vitro</i> . El gen está regulado de manera descendente 3 veces en suero humano (Malachowa 2011)
autolisina (<i>sceD</i>) (exoproteína D)	Transglicosilasa lítica	Stapleton MR, Horsburgh MJ 2007	expresado en fase exponencial <i>in vitro</i>
<i>walkR</i> (regulador de virulencia)	regulador maestro esencial de virulencia	Burian 2010	La expresión <i>in vivo</i> en el tiempo cero y en el año 1 está a la par con <i>gyrA</i>
<i>atlA</i> (Autolisina principal)	autolisina principal; peptidoglicano hidrolasa bifuncional	Burian 2010	Características similares a <i>walkR</i> pero la expresión es mayor (5 veces por encima de <i>gyr</i>)
<i>oatA</i> (O-acetiltransferasa A)	O-acetilación de peptidoglicano; hace que las células de <i>Staphylococcus aureus</i> sean resistentes a la lisozima	Burian 2010	Similar a <i>WalkR</i>

En algunas modalidades, se proporciona un microorganismo sintético que tiene una modificación molecular que comprende un interruptor de inactivación y que comprende además una abrazadera de expresión que comprende un gen de antitoxina

impulsado por un segundo promotor que normalmente está activo en la piel o la mucosa nasal durante la colonización, opcionalmente en donde el segundo promotor se selecciona de un gen seleccionado o derivado de factor de aglutinación B (*clfB*), autolisina (*sceD*; exoproteína D), *walkR* (regulador de virulencia), *atlA* (autolisina principal) y *oatA* (O-acetiltransferasa A), como se muestra en la Tabla 7. De manera alternativa, el segundo promotor constitutivo puede seleccionarse o derivarse de un gen de mantenimiento, por ejemplo, *gyrB*, *sigB* o *rho*, opcionalmente en donde el segundo promotor comprende una secuencia de nucleótidos de SEC. ID NO.: 324, 325 o 326, respectivamente, o una secuencia sustancialmente idéntica.

El segundo promotor para usarse en la abrazadera de expresión se puede seleccionar de un gen identificado en el microorganismo diana que se ha reconocido como que se regula de manera descendente tras la exposición a sangre o suero.

El segundo promotor para usarse en una modificación molecular de abrazadera de expresión debe ser un promotor constitutivo que preferentemente está regulado de manera descendente tras la exposición a sangre o suero después de un período de tiempo, por ejemplo, después de 15 minutos, 30 minutos, 45 minutos, 90 minutos, 120 minutos, 180 minutos, 240 minutos, 360 minutos, o cualquier punto temporal intermedio, para disminuir la transcripción y/o expresión del

gen de muerte celular, al menos 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, o al menos 10 veces, en comparación con la transcripción y/o expresión en ausencia de sangre o suero.

El segundo promotor puede seleccionarse mediante un
5 proceso que comprende seleccionar un microorganismo diana, seleccionar uno o más genes candidatos del segundo promotor en el microorganismo diana, cultivar el microorganismo en un medio, obtener muestras del microorganismo en $t = 0$ min, agregar suero o sangre al medio, obtener muestras en $t = n$
10 minutos, donde $n = 1-240$ min o más, 15-180 min o 30-120 min, realizar la secuenciación de ARN de las muestras y comparar los números de lectura de secuenciación de ARN para el primer promotor candidato en las muestras obtenidas en $t = 0$ min, y $t = n$ minutos después de la exposición a sangre o suero para el
15 gen del primer promotor candidato. Alternativamente, las muestras obtenidas después de $t = n$ minutos después de la exposición a sangre o suero pueden compararse con $t = n$ minutos en medios sin sangre o suero para el segundo promotor candidato. Los segundos promotores candidatos pueden
20 seleccionarse de aquellos que exhiben regulación descendente mediante secuenciación de ARN después del cultivo de células diana en $t = n$ min en sangre o suero, en comparación con el promotor candidato en la célula diana en $t = 0$, o en comparación con el promotor candidato en la célula diana en
25 $t = n$ en medios sin suero o sangre.

El segundo promotor puede seleccionarse o derivarse de un gen candidato de promotor identificado en la presente para usarse potencial en una abrazadera de expresión en *Stapylocooccus aureus* 502a que se encontró que se regula de manera descendente al menos 2 veces después de la exposición al suero durante 30 minutos, según lo determinado mediante secuenciación de ARN en comparación con $t = 0$, que incluyen el gen de fosforibosilglicinamida formiltransferasa CH52_00525 (-4.30 veces), el gen de fosforibosilaminoimidazol sintetasa CH52_00530 (-4.27 veces), el gen de amidofosforibosiltransferasa CH52_00535 (-4.13 veces), el gen de fosforibosil-formilglicinamidina sintasa CH52_00540 (-4.04 veces), el gen de fosforibosilformilglicinamidina sintasa CH52_00545 (-3.49 veces), el gen de fosforibosilaminoimidazol-succinocarboxamida CH52_00555 (-3.34 veces), el gen de trehalosa permeasa IIC CH52_03480 (-3.33 veces), el gen regulador de la transcripción de la familia DeoR CH52_02275 (-2.55 veces), el gen de fosfofructocinasa CH52_02270 (-2.46 veces) y el gen de la subunidad del transportador de fructosa PTS IIC CH52_02265 (-2.04 veces).

El segundo promotor puede seleccionarse o derivarse del gen de fosforibosilglicinamida formiltransferasa CH52_00525, el gen de trehalosa permeasa IIC CH52_03480, el gen regulador de la transcripción de la familia de DeoR CH52_02275, el gen

de fosfofructocinasa CH52_02270, o el gen de la subunidad del transportador de fructosa PTS IIC CH52_02265.

El segundo promotor puede ser un gen *P_{clfB}* (factor de aglutinación B); opcionalmente en donde el segundo promotor
5 comprende una secuencia de nucleótidos de SEC. ID NO.: 7, 117, 118, 129 o 130, o una secuencia sustancialmente idéntica.

En un ejemplo específico, uno de los constructos de KS (*sprA1*) está equipado con una abrazadera de expresión que
10 comprende una antitoxina (*sprA1_{AS}*) impulsada por el promotor del factor de aglutinación B (*clfB*). Este promotor es una opción para impulsar la abrazadera porque se expresa fuertemente en TSB y durante la colonización nasal/de la piel (10 veces mayor que el abundante gen de mantenimiento *gyrA*)
15 (Burian 2010). Esto es directamente relevante para la elaboración y el uso del producto, respectivamente. El promotor del factor de aglutinación B (*clfB*) también se regula de manera descendente 3 veces en sangre (Malachowa 2011), lo que favorece la inactividad de la abrazadera. Es
20 posible que no se necesite la inactividad completa en sangre porque el direccionamiento de los promotores sensibles al suero se activa muy fuertemente en la sangre.

El promotor del factor de aglutinación B (*clfB*) también se expresa de manera estable durante al menos 12 meses
25 durante la colonización nasal en seres humanos y también se

identificó en modelos de colonización de roedores e *in vitro* (Burian 2010).

En un ejemplo de una abrazadera de expresión, *clfB* se selecciona como un promotor constitutivo para usarse en una
5 abrazadera de expresión después de la confirmación de una expresión fuerte en TSB, y niveles más bajos de expresión en sangre o suero (PCR en tiempo real), para determinar sus características en la cepa diana *Staphylococcus aureus* 502a. La región reguladora de *clfB* se clona para impulsar la
10 expresión del ARN antisentido (antitoxina) *sprA1* (ver la Tabla 3, primera entrada), y el casete se incorpora en el mismo vector transportador de expresión que se usa para la expresión del gen de toxina *sprA1* a partir de un promotor sensible al suero. Se desea que la exposición a suero/sangre
15 pueda activar fuertemente la toxina pero no la antitoxina, y la exposición a TSB o piel/epitelial nasal active la antitoxina pero no la toxina. Este concepto puede aplicarse a los otros genes KS en la Tabla 3 más adelante. Una posibilidad alternativa para usar la abrazadera es el enfoque
20 de la enzima de restricción KpnI (toxina) para el cual la antitoxina puede ser un aptámero de ARN que se desarrolló recientemente como un potente inhibidor de esta enzima (Mondragon, 2015) como un medio para impartir estabilidad metabólica al aptámero.

25 El conocimiento de la expresión permeable no soluciona

el problema y la realidad es que incluso los promotores reostáticos "estrechamente controlados" ampliamente usados tales como las variantes P_{CUP1} y P_{Gal1} , y P_{Tet} -encendido/apagado producen transcripción de mRNA medible en ausencia de inducción específica.

La abrazadera de expresión comprende un segundo promotor ligado operativamente a un gen de antitoxina. Por ejemplo, el gen de antitoxina es específico para el gen de toxina de muerte celular en el interruptor de inactivación para ser eficaz. En condiciones fisiológicas normales, la abrazadera de expresión actúa para evitar la expresión permeable del gen de muerte celular. Cuando se expone a sangre o suero, el segundo promotor ligado operativamente a la antitoxina se regula de manera descendente, lo que permite la expresión del gen de muerte celular.

El microorganismo sintético puede contener una abrazadera de expresión que comprende un gen de antitoxina que es específico para silenciar el gen de muerte celular. La antitoxina puede seleccionarse o derivarse de cualquier antitoxina específica para el gen de muerte celular en la modificación molecular de interruptor de inactivación que se conoce en la técnica. El gen antitoxina puede codificar un ARN antisentido específico para el gen de muerte celular o una proteína antitoxina específica para el gen de muerte celular.

El gen de antitoxina puede ser un gen de antitoxina sprA1 o sprA1(AS). El gen de antitoxina sprA1 puede comprender una secuencia de nucleótidos de TATAATTGAGATAA CGAAAATAAGTATTTACTTATACACCAATCCCCTCACTATTTGCGGTAGTGAGGGGATTT
 5 (SEC. ID NO.: 311), o una secuencia sustancialmente idéntica,
 o CCCCTCACTA CCGCAAATAGTGAGGGGATTGGTGTATAAGTAAATACTTATTTTCGTTGT (SEC. ID NO.: 273), o una secuencia sustancialmente idéntica.

El gen de antitoxina puede ser una antitoxina sprA2 o
 10 sprA2(AS), y puede comprender una secuencia de nucleótidos de TATAATTAATTACATAATAAATTGAACATCTAAATACA CCAAATCCCCTCACTACTGCCATAGTGAGGGGATTTATT (SEC. ID NO.: 306), o una secuencia sustancialmente idéntica; o TATAATTAATTACATAATAAATTGAACATCTAAAT
 15 ACACCAAATCCCCTCACTACTGCCATAGTGAGGGGATTTATTTAGGTGTTGGTTA (SEC. ID NO.: 312), o una secuencia sustancialmente idéntica.

El gen de antitoxina puede ser un gen de antitoxina sprG, también conocido como sprF, y puede comprender una secuencia de nucleótidos de (5'-3') ATATATAGAAAAAGGG
 20 CAACATGCGCAAACATGTTACCCTAATGAG CCCGTTAAAAAGACGGTGGCTATTTTAGATTAAAGATTAAATTAATAACCATTTAACCATC GAAACCAGCCAAAGTTAGCGATGGTTATTTTTT (SEC. ID NO.: 307), o una secuencia sustancialmente idéntica. Pinel-Marie, Marie-Laure, Régine Brielle y Brice Felden. "Dual toxic-peptide-coding
 25 Staphylococcus aureus RNA under antisense regulation targets

host cells and bacterial rivals unequally." *Cell reports* 7.2 (2014): 424-435.

El gen de antitoxina puede ser un gen de antitoxina yefM que es específico para silenciar el gen de toxina yoeB. El
 5 gen de antitoxina yefM puede comprender una secuencia de nucleótidos de
 MIITSPTTEARKDFYQLLKNNNNHEPIYISGNNAENNAVIIGLEDWKSIIQETIYLESTGTM
 DKVREREKDNSGTTNIDDIDWDNL (SEC. ID NO.: 314), o un nucleótido sustancialmente idéntico.

10 El gen de antitoxina puede ser un gen de antitoxina lisostafina específico para un gen de toxina lisostafina. La antitoxina lisostafina puede comprender una secuencia de nucleótidos de
 TATAATTGAGATATGTTTCATGTGTTATTTACTTATACACCAATCCCCTCACTATTTGCGGT
 15 AGTGAGGGGATTTTT (SEC. ID NO.: 319), o una secuencia de nucleótidos sustancialmente idéntica.

El gen de antitoxina puede ser un gen de antitoxina mazE dirigido a mazF. El gen de toxina mazE puede comprender una secuencia de nucleótidos de ATGTTATCTTTTAGTCAAAAT
 20 AGAAGTCATAGCTTAGAACAATCTTTAAAAGAAGGATATTCACAAATGGCTGATTTAAATC
 TCTCCCTAGCGAACGAAGCTTTTCCGATAGAGTGTGAAGCATGCGATTGCAACGAAACATA
 TTTATCTTCTAATTC (SEC. ID NO.: 322), o una secuencia sustancialmente idéntica.

El gen de antitoxina puede diseñarse alternativamente de
 25 la siguiente manera. En *Staphylococcus aureus*, existen dos

métodos principales usados para silenciar genes. En un estilo de silenciamiento génico, que se ejemplifica mediante sprA1, el ARN antisentido se fija a la UTR 5' del gen diana, lo que bloquea la traducción del gen y provoca una degradación prematura del mRNA. Otro estilo de silenciamiento génico se usa para genes que no tienen un terminador de la transcripción ubicado cerca del codón de detención. La traducción puede controlarse para estos genes mediante un ARN antisentido que es complementario (~3-10 bases) al extremo 3' del gen diana. El ARN antisentido se fijará al transcrito de mRNA que cubre la secuencia que codifica los últimos dos codones y crea ARN bicatenario al que luego se dirige la degradación mediante RNasaIII.

Dado que hay muchos ejemplos de silenciamiento de ARN en *Staphylococcus aureus* que se han identificado con capacidad demostrada para controlar sus genes diana, estas regiones y secuencias se pueden usar como base para diseñar los casetes de toxina/antitoxina. Este enfoque requiere solo pequeños cambios en las secuencias de ADN.

En la presente descripción, la antitoxina para un gen de muerte celular puede estar diseñada para implicar la fijación antisentido a UTR 5' del gen diana. El gen de toxina puede insertarse en el marco de lectura de PepA1, y los 12 bp en el antisentido sprA1 endógeno se cambian por una secuencia homóloga a 12 bp hacia el comienzo del gen de toxina

heteróloga.

En un ejemplo, holina insertada en la ubicación de sprA1 puede controlarse mediante el fragmento de ARN antisentido codificado por (secuencia de direccionamiento holina de 12 bp

5 en **NEGRITA**)= TATA ATTGAGAT
AGTTTCATTAGCTATTTACTTATACACCAATCCCCTCA CTATTT GCGGTAGTGA
 GGGGATTTTT (SEC. ID NO.: 308).

En otro ejemplo 187-lysK insertado en la ubicación de sprA1 puede controlarse mediante el fragmento de ARN
 10 antisentido codificado por (secuencia de direccionamiento 187-lysK de 12 bp en **NEGRITA**) TATAATTGAGAT **TTTAGGCAGTGC**
 TATTTACTTATACACCAA TCCCCTCA CTATTTGCGGT AGTGAGGGGATTTTT (SEC. ID NO.: 309).

La antitoxina específica para el gen de muerte celular
 15 puede implicar la fijación antisentido a la UTR 3' del gen de toxina. Este método consiste en insertar la toxina heteróloga en lugar de sprG en el genoma de *Staphylococcus aureus* y agregar un codón de lisina adicional (AAA) antes del codón de detención final. Las últimas 6 bases de la región codificante
 20 (AAAAAA) más el codón de detención (TAA) se superponen con la región 3' de la antitoxina sprF endógena. Cuando el ARN de sprF se transcribe a una velocidad 2.5 veces mayor que el gen de toxina heteróloga, formará un dúplex con la región UTR 3' del transcrito de toxina, lo que inicia la degradación
 25 mediante ARNasaIII y bloquea la formación de un péptido

funcional. Como el extremo 3' de ambas toxinas heterólogas se manipuló de la misma manera para superponerse con la secuencia de sprF (al agregar el codón AAA delante del codón de detención TAA), que también es el mismo que el extremo 3' de sprG endógeno, la secuencia de la antitoxina seguirá siendo la misma para estos tres genes de toxina. Por ejemplo, el gen de antitoxina sprG (sprF) puede comprender la secuencia de nucleótidos ATATATAGAAAAA GGGCAACATGCGCAAACATGTTACCCTAATGAGCCC

5

10 GTTAAAAAGACGGTGGCTATTTTAGATTAAAGATTAAATTAATAACCATTTAACCATCGAA ACCAGCCAAAGTTAGCGATGGTTATTTTTT (SEC. ID NO.: 310).

El gen de antitoxina puede comprender una secuencia de nucleótidos seleccionada de cualquiera de SEC. ID NO.: 273, 306, 307, 308, 309, 310, 311, 312, 314, 319 o 322, o una

15 secuencia sustancialmente idéntica de estas.

El gen de antitoxina puede o no codificar un péptido de antitoxina. En donde el microorganismo sintético se deriva de una cepa de *Staphylococcus aureus*, el péptido de antitoxina puede ser específico para el péptido de toxina codificado por el gen de muerte celular. Por ejemplo, cuando el gen de toxina es un gen de toxina yoeB, por ejemplo, que codifica un péptido de toxina que comprende una secuencia de aminoácidos de SEC. ID NO.: 316, el gen de antitoxina puede codificar una proteína antitoxina yefM que comprende la secuencia de

20

25 aminoácidos de MIITSPTEARKDFYQLLKNVNNNHEPI YISGNNAENNA

VIIGLEDWKSIIQETIYLESTGTMDKVREREKDNSGTTNIDDIDWDNL (SEC. ID NO.: 314), o una secuencia sustancialmente similar. Como otro ejemplo, en donde el gen de antitoxina es un gen de toxina mazF, por ejemplo, que codifica un péptido de toxina que
5 comprende una secuencia de aminoácidos de SEC. ID NO.: 321, el gen de antitoxina puede ser un gen de antitoxina mazE, por ejemplo, que codifica una proteína antitoxina que comprende una secuencia de aminoácidos de MLSFSQNRSHSLEQSLKEGYSQ
MADLNLSLANEAFPIECEACDCNETYLSSNSTNE (SEC. ID NO.: 323), o una
10 secuencia sustancialmente similar.

Se seleccionaron tres genes candidatos KS como de particular interés porque provocan la muerte celular de 3 maneras diferentes. En algunas modalidades, el microorganismo sintético comprende uno o más, dos o más o cada uno de *sprA1*,
15 *kpnI* o *rsaE* para lograr tasas de mortalidad máximas como indican los datos iniciales. El mecanismo de acción de *sprA1* es una pérdida de la integridad/función de la membrana plasmática mediante la expresión de un péptido formador de poros. El mecanismo de acción de *kpnI* implica la destrucción
20 del genoma de *Staphylococcus aureus* con una enzima de restricción. El mecanismo de acción de *rsaE* implica la alteración del metabolismo central, que incluye el ciclo de TCA y la biosíntesis de tetrahidrofolato.

En algunas modalidades, el microorganismo sintético
25 comprende una región reguladora que comprende un primer

promotor ligado operativamente a un gen de muerte celular, en donde el gen de muerte celular codifica un péptido o proteína de toxina, y en donde el primer promotor se regula de manera ascendente tras la exposición a sangre o suero. El gen de

5 muerte celular puede ser un gen *sprA1*. *SprA1* codifica el péptido de toxina PepA1 como se describe en Sayed et al., 2012 JBC VOL. 287, N.º 52, páginas 43454-43463, 21 de diciembre de 2012. PepA1 induce la muerte celular por permeabilización de la membrana. PepA1 tiene la secuencia de

10 aminoácidos: MLIFVHIIAPVISGCAIAFFSYWLSRRNTK SEC. ID NO.: 104. Los péptidos antimicrobianos relacionados incluyen MMLIFVHIIAPVISGCAIAFFSYWLSRRNTK (SEC. ID NO.: 105), AIAFFSYWLSRRNTK (SEC. ID NO.: 106), IAFFSYWLSRRNTK (SEC. ID NO.: 107), AFFSYWLSRRNTK (SEC. ID NO.: 108), FFSYWLSRRNTK

15 (SEC. ID NO.: 109), FSYWLSRRNTK (SEC. ID NO.: 110), SYWLSRRNTK (SEC. ID NO.: 111) o YWLSRRNTK (SEC. ID NO.: 112), como se describe en WO 2013/050590, que se incorpora en la presente por referencia. El gen de muerte celular puede ser un gen *sprA2*. El gen *sprA2* puede codificar una toxina

20 MFNLLINIMTSALSGCLVAFFAHWLRTNNKKGDK (SEC. ID NO.: 305). El gen de muerte celular puede ser un gen *yoeB* de *Staphylococcus aureus* que puede codificar una toxina *yoeB* que tiene la secuencia de aminoácidos de

MSNYTVKIKNSAKSDLRKIKHSYLKKSFLIEIVETLKN

25 PYKITQSFEKLEPKYLERYSRINHQHRVVYTVDDRNKEVLILSAWSHYD (SEC. ID

NO.: 316), o una secuencia sustancialmente similar. El gen de muerte celular puede ser un gen de *Staphylococcus simulans* que puede codificar un gen de toxina metalopeptidasa que tiene una secuencia de aminoácidos de

5 MTHEHSAQWLNNYKKGYGYGPYPLGINGGMHYGVDFFMNIGTPVKAISSGKIVEAGWSNYG
GGNQIGLIENDGVHRQWYMHLSKYNVKVGDYVKAGQIIGWSGSTGYSTAPHLHFQRMVNSF
SNSTAQDPMPFLKSAGYGKAGGTVTPTNTGWKTNKYGTLYKSESASFTPNTDIITRTTGP
FRSMPQSGVLKAGQTIHYDEVKQDGHVWVGTYGNSGQRIYLPVRTWNKSTNTLGVLWGTI
K (SEC. ID NO.: 318), o una secuencia sustancialmente

10 similar. El gen de muerte celular puede ser un gen de toxina *mazF* que codifica una toxina *mazF* que comprende una secuencia de aminoácidos de

MIRRGDVYLADLSPVQGSEQGGVRPVI IQNDTG NKYSPTVIVAAITGRINKAKIPTHVEI
EKKKYKLDKDSVILLEQIRTLDDKKRLKEKLTYSDDKMKEVDNALMISLGLNAVAHQKN

15 (SEC. ID NO.: 321), o una secuencia sustancialmente similar.

El gen de muerte celular puede codificar un péptido o proteína de toxina que comprende una secuencia de aminoácidos de SEC. ID NO.: 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 285, 287, 289, 291, 305, 316, 318 o 321, o una secuencia de

20 aminoácidos sustancialmente similar. Preferentemente, el primer promotor es silencioso, no está activo, o está mínimamente activo, en ausencia de sangre o suero.

PepA1 es un péptido formador de poros tóxico que causa la muerte de *Staphylococcus aureus* al alterar las funciones

25 esenciales de la membrana celular. Se desconoce su función

natural, pero se especula que es una asistencia altruista a la población/el cultivo de *Staphylococcus aureus* al inactivar células que se ven afectadas negativamente por las condiciones del entorno. Al sobreexpresar este gen, se produce una muerte celular rápida y completa en presencia de suero. Cabe destacar que la traducción del mRNA de *sprA1* está reprimida por un ARN antisentido denominado *sprA11* (antisentido *SprA1*). El ARN de *SprA1_{AS}* codificado en *cis* opera en *trans* para regular de manera descendente la expresión del péptido codificado por *sprA1* *in vivo*, como se describe en WO 2013/050590, que se incorpora en la presente por referencia. El ARN antisentido puede, de hecho, ser una protección conveniente para minimizar la toxicidad "permeable". Será impulsado a partir de un promotor que se expresa en *Staphylococcus aureus* en la piel y los epitelios nasales humanos durante la colonización. Las ventajas de *sprA1* incluyen la expresión de un péptido pequeño, que tiene una estructura y una actividad conocidas.

En una modalidad particular, se proporciona un microorganismo sintético que comprende un primer gen de muerte celular *sprA1* ligado operativamente a una primera región reguladora que comprende un primer promotor inducible por sangre y/o suero que comprende una secuencia de nucleótidos de cualquiera de SEC. ID NO.: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 114, 115, 119, 120, 121, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138,

139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162 o 163. El primer promotor puede estar regulado de manera ascendente más de 5 veces, más de 10 veces, más de 50 veces, 5 más de 100 veces, más de 300 veces o más de 600 veces después de 15, 30, 45, 60, 90, 120, 180 o 240 minutos de incubación en sangre o suero. El primer promotor puede estar regulado de manera ascendente más de 5 veces después de 90 minutos de incubación en suero y puede seleccionarse de fhuA, fhuB, 10 isdI, isdA, srtB, isdG, sbnE, sbnA, sbnC e isdB. El primer promotor puede estar regulado de manera ascendente más de 100 veces después de 90 minutos de incubación en suero y puede seleccionarse de isdA, srtB, isdG, sbnE, sbnA, sbnC e isdB.

El gen de muerte celular puede codificar un péptido 15 antimicrobiano que comprende una secuencia de aminoácidos de SEC. ID NO.: 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 285, 287, 289, 291, 305, 316, 318 o 321, o una secuencia de aminoácidos sustancialmente similar de estas.

El gen de muerte celular puede seleccionarse de 20 cualquier gen de toxina de *Staphylococcus* spp. El gen de muerte celular puede seleccionarse de un gen de toxina *sprA1*, gen de toxina *sprA2*, gen de toxina *187-lysK*, gen de toxina holina, gen de toxina *Sprg*, gen de toxina *yoeB*, gen de toxina lisostafina, gen de toxina metalopeptidasa, o 25 gen de toxina *mazF*, o un gen de toxina sustancialmente

idéntico. El gen de toxina puede comprender una secuencia de nucleótidos de SEC. ID NO.: 274, 275, 284, 286, 288, 290, 304, 315, 317 o 320, o una secuencia de nucleótidos sustancialmente idéntica de estas.

5 El gen de muerte celular puede ser *sprA1* que codifica el péptido antimicrobiano PepA1. En algunas modalidades, el microorganismo sintético comprende además un gen de antitoxina SprA1-AS ligado operativamente a una segunda región reguladora que comprende un segundo promotor que
10 comprende una secuencia de nucleótidos de *clfB* que comprende una secuencia de nucleótidos de SEC. ID NO.: 7, 117, 118, 129 o 130, o una secuencia sustancialmente idéntica.

En algunas modalidades, el microorganismo sintético
15 comprende un gen de enzima de restricción KpnI (*Klebsiella pneumoniae*). KpnI protege los genomas bacterianos contra la invasión de ADN extraño. La expresión de alto nivel de (por ejemplo) la enzima de restricción de reconocimiento de 6 bp KpnI escindirá eficazmente el genoma de
20 *Staphylococcus aureus*. En algunas modalidades, el vector de expresión (más adelante) se diseñará por ingeniería genética para que carezca de sitios de reconocimiento de escisión mediante (por ejemplo) el ajuste del uso de codones. La secuencia de reconocimiento de 6 bases ocurre
25 una vez cada 4096 bp, al cortar el genoma de 2.8 MB de

Staphylococcus aureus en ~684 fragmentos. KpnI tiene la ventaja de una actividad rápida. En algunas modalidades, el problema de expresión "permeable" puede manejarse al expresar un aptámero de ARN como la abrazadera como se describió anteriormente para *sprA1*.

En algunas modalidades, el microorganismo sintético comprende un gen *rsaE*. El gen *rsaE* es un ARN pequeño (93 nt) que inhibe de manera coordinada 2 vías metabólicas diferentes al dirigirse al inicio de la traducción de ciertos mRNA de mantenimiento que codifican enzimas de la vía de biosíntesis de THF y el ciclo del ácido cítrico; la expresión de alto nivel es tóxica. Al sobreexpresar *RseE*, la alteración del crecimiento se produce debido a la inhibición de las enzimas de mantenimiento esenciales. Esto ocurre mediante la fijación a los mRNA Opp3A y OppB en el sitio de fijación al ribosoma y la región del codón de inicio, lo que evita la traducción. Ambos genes codifican componentes del sistema transportador de péptidos ABC y afectan el suministro de nitrógeno/aminoácidos esenciales en la célula, lo que altera el metabolismo bioquímico central directa e indirectamente. Las ventajas incluyen inhibición severa del crecimiento (10,000 veces sobre controles de vectores vacíos) y multifuncionalidad eficiente porque un solo sARN altera la expresión de múltiples vías bioquímicas

esenciales. Geissman et al. 2009 y Bohn et al. 2010 informan sobre la función natural de RsaE.

Se realiza la creación de un panel de candidatos de plásmidos con interruptor de inactivación (KS) activado
5 por suero para la expresión en *Staphylococcus aureus*, en donde las RR sensibles al suero se subclonan en vectores transportadores de *Staphylococcus aureus*; los genes de muerte celular se insertan dirección 3' de las RR y se secuencian; se evalúa la viabilidad del represor de
10 expresión permeable "abrazadera de expresión"; y las cepas candidatas se completan y se evalúan para seleccionar los candidatos principales que exhiben una muerte rápida y completa, y una buena viabilidad inicial.

La integración cromosómica de los candidatos de
15 interruptor de inactivación óptimos es importante para la expresión estable a largo plazo. Además, se realiza la comparación de la extensión de la tasa de mortalidad y la estabilidad de las cepas *in vitro*. Se realiza la inserción de hasta 3 casetes de interruptor de inactivación óptimos
20 solamente y en 3 combinaciones de dos, para un total de hasta 6 cepas. Este logro puede requerir una clonación de múltiples etapas en *E. coli* para construir los constructos. Por ejemplo, se puede emplear la cepa de *E. coli* DC10B. DC10B es una cepa de *E. coli* que es solo DCM
25 menos (número de producto BEI NR-49804). Esta es una forma

de generar ADN que puede transfectarse fácilmente en la mayoría de las cepas de *Staphylococcus aureus*. Para este fin, se obtienen integrantes estables, y el vector de plásmido se extirpa durante la contraselección. Se
5 confirma y se caracteriza la tasa y extensión de la muerte celular inducida por suero, y se determina la estabilidad genética para las 6 cepas. Se realiza una prueba funcional no humana de candidatos de cepa KS preferidos que incluye una prueba funcional de muerte de cepa *in vivo*; y una
10 prueba funcional de discos de colonización de piel.

En algunas modalidades, se proporciona un método para preparar una cepa sintética de *Staphylococcus aureus* a partir de BioPlx-01 que comprende (1) producir un vector transportador pCN51 a mediana escala en *E. coli*, (2)
15 clonar genes de muerte celular en pCN51 en *E. coli* bajo el promotor inducible por Cd *P_{cad}*, (3) reemplazar *P_{cad}* con promotores sensibles al suero y opcionalmente insertar una abrazadera de expresión, (4) verificar constructos al secuenciar casetes KS, (5) electroporar en *Staphylococcus*
20 *aureus* RN4220 y seleccionar transformantes en placas de eritromicina (esta cepa es sin restricción y genera el patrón de metilación correcto para sobrevivir en BioPlx-01), (6) preparar el plásmido a partir de RN4220 y la digestión de restricción para confirmar la identificación,
25 (7) electroporar los plásmidos en BioPlx-01 y seleccionar

en placas de eritromicina, y (8) aislar las cepas. Las cepas producidas de esta manera están listas para pruebas de rendimiento y experimentación con suero. El método se describe adicionalmente en detalle en la presente.

5 En algunas modalidades, se proporciona un método para evaluar el rendimiento de una cepa sintética de *Staphylococcus aureus* a partir de BioPlx-01 que comprende (1) cultivar en TSB más antibiótico como presión selectiva para el plásmido, (2) comparar el crecimiento con WT
10 BioPlx-01 al generar opcionalmente una curva de crecimiento, (3a) para variantes de promotor Cd, lavar y desplazar células a un medio Cd (el control es BioPlx-01 que contiene un vector vacío sin gen de muerte celular) o (3b) para variantes de KS, lavar y desplazar células al
15 suero (el control es WT BioPlx-01 que contiene un vector vacío sin gen de muerte celular) y (4) monitorear el crecimiento mediante OD_{630 nm} con lector de placas, opcionalmente durante un período prolongado con monitoreo de mutantes de escape. Para la prueba de sangre, el método
20 solo se realiza en candidatos preferidos y mediante el uso de unidades formadoras de colonias (CFU) en TSA como lectura de muerte. Si se forman colonias en el interruptor de inactivación que transportan cepas después de haber sido expuestas a la sangre, el plásmido debe secuenciarse
25 para verificar mutaciones. Si hay mutantes de escape, se

transporta el plásmido a *E. coli* y se secuencia el plásmido completo.

Método para la creación de candidatos de plásmidos de interruptor de inactivación (KS) activados por suero para la expresión en *Staphylococcus aureus* (SA)

Se proporcionan métodos para la evaluación de la inducción de muerte celular que comprende la construcción recombinante del microorganismo sintético que comprende clonar los genes en un vector transportador de *E. coli*-SA y transfectar este vector en BioPlx-01 para su evaluación.

Etapas 1: Solicitar el vector transportador PCN51

Se obtiene un vector transportador disponible en el comercio tal como PCN51 (disponible a través de BEI); es una excelente opción ya que contiene: i) un promotor inducible por cadmio que puede usarse en cepas de control positivo para demostrar que las toxinas se expresan y son funcionales; ii) un terminador de la transcripción (TT) universal que se aplicará a todos nuestros constructos; y iii) replicones bien establecidos para *E. coli* y *Staphylococcus aureus*. En la Figura 2 se muestra un esquema del vector transportador disponible en el comercio pCN51 (N.º de categoría BEI NR-46149). Los elementos genéticos mostrados del plásmido transportador pCN51 se muestran en la Tabla 8.

Tabla 8. Elementos del vector transportador pCN51

5

Plásmido transportador pCN51 (N.º de categoría BEI NR-46149)	
Elemento	Propósito
pT181cop-WT repC	Maquinaria de replicación de SA
ermC	resistencia a eritromicina
Amp	beta-lactamasa; confiere resistencia a la ampicilina en <i>E. coli</i>
ColE1 Ori	Origen de replicación para <i>E. coli</i>
Pcad-cadC	Promotor inducible por cadmio
MCS (caja negra)	Sitio de clonación múltiple; sitios únicos para clonar nuestro KS.
TT	terminador de la transcripción blaZ

10

Las secuencias promotoras (7) usadas en el desarrollo se muestran a continuación, los números de pares de bases en los promotores *leuA*, *hlgA* y cadmio corresponden a la ubicación del vector pCN51.

15

1. secuencia del promotor *leuA* (P_{leuA}) entre los sitios de restricción SphI y PstI (subrayado) amplificada a partir del ADN genómico de BioPlx-01 (502a).

20

SphI

GCATGCGAAA CAGATTATCT

5501 ATTCAAAGTT AATTGTAAGA AAATTTAAAA TATTTGTTGA CATACTAAAG

5551 CAGATATAGT AAATTAAATT TATCAAATTT TTAGACAATT CTAAC TATTA

5601 AAGTGATATA TACCATTAC GGAAGGAGTA TAATAAAATG CTTAATCAAT

5651 ATACTGAACA TCAACCGACA ACTTCAAATA TTATTATTTT ATTATACTCT

5701 TTAGGACTCG AACGTTAGTA AATATTTACT AAACGCTTTA AGTCCTATTT

5751 CTGTTTGAAT GGGACTTGTA AACGTCCCAA TAATATTGGG ACGTTTTTTT

5801 ATGTTTTATC TTTCAATTAC TTATTTTAT TACTATAAAA CATGATTAAT

5851 CATTAAATTT TACGGGGGAA TTTACTCTGC AG SEC. ID NO.:114

25

PstI

2. secuencia del promotor *hlgA* (P_{hlgA}) entre los sitios de restricción SphI y PstI amplificada a partir del ADN genómico de BioPlx-01 (502a).

SphI

5 GCATGC AAACCTATTGC

5501 GAAATCCATT CCTCTTCCAC TACAAGCACC ATAATTAAAC AACAAATTC

5551 TAGAATAAGA CTTGCAAAAC ATAGTTATGT CGCTATATAA ACGCCTGCGA

5601 CCAATAAATC TTTTAAACAT AACATAATGC AAAAACATCA TTTAACAATG

5651 CTAAAAATGT CTCTTCAATA CATGTTGATA GTAATTAAC TTTAACGAAC

10 5701 AGTTAATTCG AAAACGCTTA CAAATGGATT ATTATATATA TGAACCTAAA

5751 ATTAAATAGA AAGAAAGTGA TTTCTCTGCA G SEC. ID NO.: 115

PstI

3. Secuencia del promotor de cadmio (P_{cad}) entre los sitios de restricción SphI y PstI. Este promotor se usa para
15 controles y es parte del vector original pCN51 de BEI Resources (<https://www.beiresources.org/>).

SphI

GCATGCGCAC TTATTCAAGT

5501 GTATTTTTTA ATAAATTATT TTAATTATTG AAATGTATTA TTTTCTAATG

20 5551 TCATACCCTG GTCAAAACCG TTCGTTTTTG AGACTAGAAT TTTATGCCCT

5601 ACTTACTTCT TTTATTTTCA TTCAAATATT TGCTTGCATG ATGAGTCGAA

5651 AATGGTTATA ATACACTCAA ATAAATATTT GAATGAAGAT GGGATGATAA

5701 TATGAAAAAG AAAGATACTT GTGAAATTTT TTGTTATGAC GAAGAAAAGG

5751 TTAATCGAAT ACAAGGGGAT TTACAAACAG TTGATATTTT TGGTGTAGC

25 5801 CAAATTTTAA AGGCTATTGC CGATGAAAAT AGAGCAAAAA TTAATTACGC

5851 TCTGTGTCAG GATGAAGAGT TGTGTGTTTG TGATATAGCA AATATCTTAG
 5901 GTGTTACGAT AGCAAATGCA TCTCATCATT TACGTACGCT TTATAAGCAA
 5951 GGGGTGGTCA ACTTTAGAAA AGAAGGAAAA CTAGCTTTAT ATTCTTTAGG
 6001 TGATGAACAT ATCAGGCAGA TAATGATGAT CGCCCTAGCA CATAAGAAAG
 5 6051 AAGTGAAGGT CAATGTCTGA ACCTGCAG SEC. ID NO.: 116

PstI

4. promotor *clfB* (*P_{clfB}*) para impulsar el ARN regulador antisentido *sprAl_{AS}*. Esta es la secuencia directa con los sitios EcoRI y BamHI. Esta secuencia se invierte para que el
 10 *sprAl_{AS}* actúe potencialmente como una abrazadera para mantener el gen *sprAI* regulado en ausencia de sangre. Lo subrayado representa los sitios EcoRI y BamHI, respectivamente.

EcoRI

GAATTCAGGTGATGAAAAATTTAGAACTTCTAAGTTTTTGAAAAGTAAAAATTTGTAATA
 15 GTGTAAAAATAGTATATTGATTTTTGCTAGTTAACAGAAAATTTTAAGTTATATAAATAGG
 AAGAAAACAAATTTTACGTAATTTTTTTTCGAAAAGCAATTGATATAATTCTTATTTTCATTA
 TACAATTTAGACTAATCTAGAAATTGAAATGGAGTAATATTTGGATCC SEC. ID NO.:
 117

P_{clfB} como se clona en el vector pCN51 con EcoRI y BamHI
 20 invertidos.

BamHI

GGATCCAAATATTACTCCATTTCAATTTCTAGATTAGTCTAAATTGTATAATGAAATAAGA
 ATTATATCAATTGCTTTTCGAAAAAATTACGTAAAATTTGTTTTCTTCCTATTTATATAA
 CTTAAAATTTTCTGTAACTAGCAAAAATCAATATACTATTTTTTACACTATTACAAATTTT
 25 TTACTTTTCAAAAACCTTAGAAGTTCTAAATTTTTTCATCACCTGAATTC

SEC. ID NO.: 118

5. El promotor *sirA* (P_{sirA}) como se encuentra en el
genoma completo NCBI 502a. Esta secuencia se tomó 300 pares
de bases dirección 5' del codón de inicio *sirA* como se
5 muestra subrayado a continuación.

ttagaaagatttactttttatatatgaagagactggattaaatactttttattgacgtaaaaa
ttcactttttgaaccgttca

atatcttgccgattttttatataacagctacaaataaaatataacagtttgattttacagcc
tcggtaaatcgtcttgaca

10 aacaaaaattttgtgctatcacaacatttgcaacgtcttaacaagtcattctataaacattt
ctaaatatattaacattact

tatgcgtcattttattgctaaaattattgtattaaaatatacatagaattgatgggatatcA

TG SEC. ID NO.: 119

6. El promotor *sstA* (P_{sstA}) como se encuentra en el
15 genoma completo NCBI 502a. Esta secuencia se tomó 300 pares
de bases dirección 5' del codón de inicio *sstA* como se
muestra subrayado a continuación.

acgaaaaattaattaacatcgcatgttttattactgcaactattacagcattggtagtggt
gactgttggaacattaccg

20 ttcttaggactagtaatacacaatattattttcaatttatcgaggtgatcatttgaaaaatg
ctatccctcatcacgatgat

gttaggtgccatctttgtattattttctgatatagttggcagaattgttggtttatccatat
gaaataaatattgggttaa

caataggtgtatttggaacaatcattttccttatcttgcttatgaaaggtaggaaaaattA

25 TG SEC. ID NO.: 120

7. El promotor *isdA* (P_{isdA}). Esta secuencia se tomó 300 pares de bases dirección 5' del codón de inicio SstA como se muestra subrayado a continuación a partir del genoma completo NCBI 502a.

5 CTATCTGCGGCATTTGCAGAATTACTGAATGTCGCGATGATGATAATTAACGCTAAAATCG
TTGTATTAAAACTTTTAAAATATTTTTCAAACATAATCCTCCTTTTTATGATTGCTTTT
AAGTCTTTAGTAAAATCATAAATAATAATGATTATCATTGTCAATATTTATTTTATAATCA
ATTTATTATTGTTATACGGAAATAGATGTGCTAGTATAATTGATAACCATTATCAATTGCA
ATGGTTAATCATCTCATATAACAACACATAATTTGTATCCTTAGGAGGAAAACAACATG
10 SEC. ID NO.: 121.

En algunas modalidades, se proporciona un plásmido, vector o microorganismo sintético que comprende una modificación molecular que comprende un gen de muerte celular ligado operativamente a un primer promotor inducible sensible
15 a la sangre o al suero que comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en SEC. ID NO.: 114, 115, 119, 120, 121, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161,
20 162 y 163, o una secuencia de nucleótidos sustancialmente idéntica. En algunas modalidades, la modificación molecular comprende además una abrazadera de expresión que comprende un gen de antitoxina ligado operativamente a un segundo promotor que comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada de
25 SEC. ID NO.: 7, 117, 118, 129 o 130.

Etapa 2: Clonar las dos mejores RR sensibles al suero en el vector transportador (hospedero de *E. coli*)

Clonar las RR sensibles al suero candidatas en el vector transportador (hospedero de *E. coli*) comprende: (a) 5
amplificar por PCR las dos mejores RR sensibles al suero preferidas a partir del ADN genómico de BioPlx-01 (gADN); y (b) reemplazar el promotor inducible por cadmio con estos fragmentos de RR en pCN51 para crear dos nuevos plásmidos (RR1 y RR2), y (3) seleccionar clones en *E. coli* DH10B (o DH5 10
alfa) y secuenciar las inserciones.

Los siguientes genes KS se obtienen del gADN de *Staphylococcus aureus* o mediante síntesis de novo: (i) *sprA1/sprA1_{AS}*: sintético; (ii) *RsaE*: ADN genómico de *Staphylococcus aureus*. Y (iii) *KpnI*: sintético. Para los 15
genes amplificados a partir de gADN, los cebadores de PCR se usan con enzimas de restricción relevantes para la clonación. Para los genes sintéticos, los sitios de clonación se incluirán en la síntesis y cualquier sitio no deseado se eliminará durante la construcción. Por ejemplo, los sitios 20
KpnI se eliminarán del casete *kpn1* para evitar la digestión automática. Los genes KS se insertan dirección 3' de las RR sensibles al suero en los plásmidos RR1 y RR2, lo que genera todos los constructos enumerados más adelante. Insertar los genes KS dirección 3' del promotor inducible por Cd en pCN51 25
para crear constructos de control positivo. Ver las

secuencias relevantes adicionales y las secuencias de cebadores proporcionadas en la presente útiles para estas etapas, por ejemplo, las Tablas 2, 3 y 4. La secuenciación de promotores e insertos de todos los constructos se realiza para garantizar que no se hayan acumulado mutaciones en el proceso de construcción.

A continuación, se muestra una lista de constructos de plásmidos a producir. Todos menos 2, 4, 8 y 11 serán transfectados en *Staphylococcus aureus*.

1. Promotor inducible por Cd-*sprA1*
2. Promotor inducible por Cd-orientación inversa *sprA1*
3. RR1 sensible al suero- *sprA1*
4. RR1 sensible al suero-orientación inversa *sprA1*
5. RR1 sensible al suero- *sprA1* + P_{c1fB} - *sprA1*_{AS}
6. RR2 sensible al suero- *sprA1*
7. RR1 sensible al suero-*rsaE*
8. RR1 sensible al suero- *rsaE* -orientación inversa
9. RR2 sensible al suero- *rsaE*
10. RR1 sensible al suero-*kpnI*
11. RR1 sensible al suero- *kpnI* orientación inversa
12. RR2 sensible al suero- *kpnI*

Los constructos de orientación inversa se crean en el proceso, porque si un gen de muerte celular tiene cierta toxicidad basal incluso en el medio de crecimiento, puede que no sea posible obtener el constructo de orientación directa.

Tal resultado negativo no es concluyente a menos que el constructo de orientación inversa se obtenga fácilmente de manera paralela.

Etapas 3: Transfectar los plásmidos en *Staphylococcus aureus*

5 RN4220 intermediario (para obtener el patrón de metilación de ADN correcto). No hay necesidad de transfectar constructos de orientación inversa; pero la transfección del vector vacío pCN51 se realiza de la siguiente manera:

A. Electroporar en RN4220;

10 B. Seleccionar transformantes en placas que contienen eritromicina; y

C. Aislar y confirmar la ID del plásmido con digestiones de restricción.

Etapas 4: Transfectar en BioPlx-01

15 A. Electroporar plásmidos de la etapa 3C en BioPlx-01 competente;

B. Seleccionar transformantes por resistencia a la eritromicina; y

20 C. Aislar y confirmar la ID del plásmido con digestiones de restricción; guardar reservas de 9 cepas.

Etapas 5: Evaluar la expresión de KS y el grado y la tasa de muerte en respuesta a la exposición a suero y sangre

25 A. Prueba cualitativa de expresión de genes de inactivación con PCR en tiempo real antes y después de la exposición a sangre/suero. Esto: i) confirmará la

construcción de la cepa; ii) correlacionará el inicio de la producción de toxinas con el inicio de la muerte, y iii) determinará la "pérdida" del promotor en el contexto del KS;

5 B. Curvas de inducción de muerte celular en suero/sangre en comparación con TSB (grado de inactivación y cinética mediante CFU); y

C. Comparación de la tasa de crecimiento simple de BioPlx-01 que contiene un vector vacío en comparación con BioPlx-01 con los plásmidos KS.

10 Etapla 6: Medir la tasa de mutación de KS

Contar las colonias que crecen en placas de agar en suero o sangre y/o en suero que contiene medios líquidos durante varios cientos de generaciones mediante el pasaje en serie. Determinar si la tasa de mutación es aceptable. Se ha informado que la tasa de pérdida funcional de KS es 10^{-6} para una copia de un gen KS, pero tan baja como 10^{-10} para dos copias de los mismos o diferentes genes KS de dos promotores diferentes (Knudsen 1995; que informa sobre mediciones de ensayo de tasa de mutación real).

20 Etapla 7: Análisis e interpretación

Las mejores cepas de KS son aquellas con tasas de crecimiento no afectadas (y potencial de colonización); y que muestran una muerte rápida y completa en respuesta a sangre y/o suero; y que tienen modificaciones moleculares estables.

Etapa 8: Determinar la necesidad de insertar múltiples casetes KS

Si la estabilidad molecular de un KS se considera inadecuada, se agregará al plásmido un segundo KS funcional
5 diferente de la lista de 9 candidatos (si existe otro funcional) y se realizará una nueva prueba de inactivación y estabilidad. Se anticipa una mejora dramática en la estabilidad de KS en función de Knudsen 1995 y los cálculos teóricos.

10 **Método para la integración cromosómica de interruptores de inactivación óptimos, para la expresión estable a largo plazo**

Los constructos de KS óptimos sensibles a suero/sangre se integrarán en el cromosoma precisamente en una ubicación preseleccionada que se sabe que tolera las inserciones sin
15 alterar notablemente la biología de la célula.

Etapa 1: Obtener un vector integrativo para usarse en *Staphylococcus aureus*.

Después de considerar cuidadosamente el vector integrativo óptimo, se pueden emplear los plásmidos pKOR1 o
20 pIMAY porque brindan la capacidad de elegir el sitio de integración, lo que permite evitar perturbar regiones biológicamente críticas del genoma que pueden ocurrir con otros métodos. Ambos vectores poseen un medio conveniente para la contraselección (*secY*) de modo que la cadena
25 principal del plásmido y sus marcadores pueden extirparse del

genoma después de que se haya integrado el KS. Un mapa genético de pKOR1 se muestra en la Figura 5A y las características se describen en Bae et al. 2006 Plasmid 55, páginas 58-63, y se describe brevemente en la Tabla 9. Una
5 ventaja de pKOR es la capacidad de clonar insertos sin los límites de enzimas de restricción específicas.

Tabla 9. Propósito de los elementos en el plásmido integrativo Pkor

10	Plásmido integrativo pKOR	
	Elemento	Propósito
	AmpR	beta-lactamasa; confiere resistencia a la ampicilina en <i>E. coli</i> (peor no en <i>Staphylococcus aureus</i>)
	Ori (-)	Origen de replicación de <i>E. coli</i>
	AttP1 y 2	Recombinar con elementos AttB de insertos de ADN
	CcdB	Proteína inhibidora de <i>E. coli</i> girasa; esta proteína inhibe el crecimiento de células que contienen plásmido no recombinante
	Cat- y Cat +	Genes de resistencia al cloranfenicol para usarse en bacterias gram - y gram + respectivamente
	SecY570	570 nt que codifica el terminal N esencial de secY; su antisentido se expresa a partir del promotor pxyl/tetO inducible por ATc; el crecimiento en presencia de Atc significa que la cadena principal del plásmido se ha perdido
	RepF	Gen de replicación para <i>Staphylococcus aureus</i>
15		

Un mapa genético de pIMAY se muestra en la Figura 5B de Monk, IR et al., MBio 2012; doi: 10.1128/mBio.00277-11. Las Figuras 12A-12C muestran la secuencia de nucleótidos
20 (SEC. ID NO.: 131) del plásmido integrativo pIMAY. (número de acceso JQ62198). El plásmido sensible a la temperatura de *E. coli*/estafilococo pIMAYz comprende el origen de replicación de *E. coli* de bajo número de copias (p15A), un origen de transferencia para la conjugación (*oriT*), el
25 sitio de clonación múltiple pBluescript (MCS) y el gen *cat*

altamente expresado (*Phelp-cat*) derivado de pIMC. El replicón sensible a la temperatura para las bacterias grampositivas (*repBCAD*) y la región *secY* antisentido inducible por anhidrotetraciclina (*anti-secY*) pueden
5 amplificarse a partir de pVE6007 y pKOR1, respectivamente. Los sitios de restricción enumerados son únicos. Los cebadores (IM151/152) se fijan externamente al MCS de pIMAY y se usan para cribar clones en *E. coli* (amplificar 283 bp sin un inserto clonado) y para determinar la
10 presencia de un plásmido replicante en estafilococos. Las ventajas de pIMAYz son un tamaño más pequeño, un cribado azul blanco y una temperatura no permisiva más baja, que se ha informado que evita las mutaciones que pueden ocurrir en el proceso de integración. Por lo tanto, el
15 plásmido puede elaborarse mediante síntesis génica *de novo* en una empresa proveedora contratada.

Etapas 2. Revisar los marcadores seleccionables en BioPlx-01.

BioPlx-01 es sensible a la ampicilina (50 µg/mL y 100 µg/mL), cloranfenicol (10 µg/mL) y eritromicina (Drury 1965).
20 En una modalidad, el gen de cloranfenicol (*cat+*) se usa para seleccionar transformantes en placas de cloranfenicol durante el proceso de integración.

Etapas 3: Generar el fragmento de ADN a integrar.

Preparar un plásmido en el vector transportador pTK1 que
25 contenga los siguientes elementos en tándem: [aTTB2]-[1 Kb de

secuencia dirección 5' de la región diana a reemplazar]-
 [casete KS-AmpR]-[1 Kb de secuencia dirección 3' de la región
 diana] ATTB1 de acuerdo con una modificación de Bae et al.,
 2006. Dejar caer el fragmento de este plásmido con enzimas de
 5 restricción y aislarlo. El "casete KS" en realidad puede ser
 una o dos copias de un KS, en espera del resultado de las
 pruebas de estabilidad genética.

Etapas 4: Insertar casetes KS en el plásmido pKOR.

Realizar la recombinación *in vitro* del fragmento de la
 10 etapa 3 con el plásmido PKOR1 y luego transfectar la mezcla
 de recombinación en DH5 alfa y obtener el constructo del
 plásmido deseado mediante métodos de cribado estándar en *E.*
coli, mediante mapeo de restricción para verificar la
 construcción.

15 Etapas 5: Obtener el plásmido de integración que contiene la cepa KS, en BioPlx-01

Electroporar el plásmido en RN4220; aislar el ADN de
 plásmido del RN4220 así transfectado, y electroporar este ADN
 en BioPlx-01 y seleccionar transformantes en placas TSA que
 20 contengan cloranfenicol (10 µg/mL).

Etapas 6: Integración del plásmido al cromosoma.

Cambiar las cepas a la temperatura no permisiva (43°C)
 para promover la integración del plásmido en el sitio diana y
 seleccionar una colonia en una placa de cloranfenicol (10
 25 µg/mL).

Etapa 7: Contraselección para expulsar la cadena principal del plásmido

Cultivar el aislado de colonia de la etapa 6 a la temperatura permisiva (30°C) para favorecer la escisión del plásmido y colocar en una placa en 2 µg/mL y 3 µg/mL de anhidrotetraciclina (aTc) de agar para obtener colonias en las que el gen diana se ha integrado y el plásmido se ha extirpado y perdido (la etapa de contraselección). Cualquier colonia que se cultive en placas que contengan ≥ 2 µg/mL de aTc no contiene el plásmido porque la cadena principal del plásmido contiene el gen antisentido SecY desreprimible por aTc letal.

Etapa 8: Confirmar la secuencia de alelo integrada

Aislar el ADN genómico de la cepa KS y confirmar el casete de activación y la estructura flanqueante por PCR (y secuenciación del amplicón de PCR).

Etapa 9: Verificar la muerte celular inducida por suero

Una vez confirmado, realizar ensayos de tasa de muerte celular al cultivar las células primero en TSB, luego cambiar a sangre o suero humanos y determinar la tasa de muerte mediante ensayos en placas de CFU en TSA (10 días).

Etapa 10: Verificar la expresión del mRNA de KS

Confirmar los cambios de expresión del gen diana en sangre, suero y TSB.

Etapas 11: Preparar bancos congelados

Los estudios en animales se pueden realizar con microorganismos sintéticos BioPlx-XX creados por estos métodos. Se pueden realizar estudios funcionales *in vivo* para evaluar la función de la cepa de interruptor de inactivación. Los posibles estudios incluyen un estudio en ratones para mostrar la diferencia en la patogenicidad de la inyección intravenosa o intraperitoneal de BioPlx-01 wt en comparación con la cepa KS. También se puede realizar una prueba de colonización de piel *in vitro*. Las pruebas adicionales pueden incluir, en ratón: se realiza la prueba LD₅₀, BioPlx-01 en comparación con BioPlx-XX. Como otro ejemplo, en rata u otro: se realiza la prueba de colonización, BioPlx-01 en comparación con BioPlx-XX.

15 Reparación dirigida por homología inducida por CRISPR-Cas para la inserción directa de candidatos de interruptor de inactivación óptimos para la expresión estable a largo plazo

En algunas modalidades, se proporciona un método para preparar una cepa sintética de *Staphylococcus aureus* a partir de BioPlx-01 que comprende el uso de reparación dirigida por homología inducida por CRISPR-Cas para la inserción directa de candidatos de KS óptimos para la expresión estable a largo plazo. En algunas modalidades, se proporciona un método para preparar una cepa sintética de *Staphylococcus aureus* a partir de BioPlx-01 que comprende (1) obtener células competentes,

(2) diseñar y evaluar las secuencias de ARN guía (gARN) CRISPR y evaluar simultáneamente pCasSA, (3) diseñar y evaluar plantillas de reparación dependientes de homología mediante un indicador fluorescente controlado por un
5 indicador constitutivo, (4) comprobar los promotores KS con el indicador fluorescente, (5) insertar KS en BioPlx-01 y verificar la incorporación, y (6) evaluar la eficacia y la longevidad. Opcionalmente, se realiza la inserción de casetes KS adicionales en ubicaciones alternativas dentro del genoma
10 BioPlx-01.

La Figura 10 muestra el casete para la integración a través de CRISPR y el diseño del vector pCasSA. *Pcap1A* es un promotor constitutivo que controla la transcripción de gARN. La secuencia diana es la secuencia de direccionamiento, por
15 ejemplo, con 10 posibles dianas de corte (1.1, 1.2, etc.). gRN_g es un ARN guía monocatenario (proporciona un componente estructural). *Xba*I y *Xho*I son dos sitios de restricción usados para agregar los brazos de homología al vector pCasSA. Los HA son brazos de homología para usar como plantillas para
20 la reparación dirigida por homología (200 - 1000 bp). *P_{xpsL}-mCherry* es un promotor constitutivo que controla el mCherry "optimizado". *P_{xpsL}-Cas9* es un promotor constitutivo que controla la expresión de la proteína Cas9.

Las Figuras 11A-11D muestran vectores para diversos usos
25 en la presente descripción. La fig. 11A es un vector usado

para el cribado del promotor con fluorescencia mediante el uso de pCN51. La fig. 11B es un vector para el cribado del promotor con el gen de muerte celular. La fig. 11C es un vector para la integración cromosómica mediante CRISPR. La
5 fig. 11D es un vector para la integración cromosómica mediante recombinación homóloga. HA L y R: brazos de homología al locus genómico diana, direccionamiento de CRISPR: ARN guía al locus genómico, mCherry: proteína indicadora fluorescente, proteína Cas9: endonucleasa CRISPR,
10 kanR: resistencia a kanamicina, oriT: origen de la transferencia (para integración) y SmaI: gen de muerte representativo (endonucleasa de restricción).

Administración y composiciones

En algunas modalidades, se proporcionan composiciones
15 que comprenden un microorganismo sintético y un excipiente o portador. Las composiciones pueden administrarse en cualquier método adecuado para sus características inmunógenas o biológicamente o inmunológicamente reactivas particulares, que incluyen métodos orales, intravenosos, bucales, nasales,
20 mucosos, dérmicos u otros, dentro de una matriz de portador apropiada. En una modalidad, se proporcionan composiciones para la administración tópica a un sitio dérmico, y/o un sitio mucoso en un sujeto. Otra modalidad específica implica la administración oral de la composición de la descripción.

25 En algunas modalidades, la etapa de reemplazo comprende

la administración tópica de la cepa sintética a el menos un sitio de sujeto hospedero dérmico o mucoso y opcionalmente áreas adyacentes en el sujeto no más de una, no más de dos, o no más de tres veces. La administración puede incluir la
5 aplicación tópica inicial de una composición que comprende al menos 10^6 , al menos 10^7 , al menos 10^8 , al menos 10^9 o al menos 10^{10} CFU de la cepa sintética y un portador aceptable desde el punto de vista farmacéutico al al menos un sitio hospedero en el sujeto. La etapa de reemplazo inicial puede realizarse
10 dentro de las 12 horas, 24 horas, 36 horas, 48 horas, 72 horas, 4 días, 5 días, 6 días, 7 días, 8 días o 9 días de la etapa de supresión final.

La composición que comprende un microorganismo sintético puede administrarse al al menos un sitio dérmico y/o mucoso
15 en el sujeto, y opcionalmente a sitios adyacentes al menos una vez, por ejemplo, de una a 30 veces, de una a 20 veces, de una a diez veces, de una a seis veces, de una a cinco veces, de una a cuatro veces, de una a tres veces, o de una a dos veces, o no más de una, dos, tres veces, 4 veces, 5
20 veces, 6 veces, 8 veces por mes, 10 veces, o no más de 12 veces por mes. La administración posterior de la composición puede ocurrir después de un período de, por ejemplo, uno a 30 días, dos a 20 días, tres a 15 días, o cuatro a 10 días después de la primera administración.

25 La colonización del microorganismo sintético puede

promoverse en el sujeto al administrar una composición que comprende un agente promotor seleccionado de un nutriente, prebiótico, agente estabilizante, humectante y/o especie bacteriana probiótica. El agente promotor puede administrarse a un sujeto en una composición de agente promotor separada o puede agregarse a la composición microbiana.

En algunas modalidades, el agente promotor puede ser un nutriente, por ejemplo, seleccionado de cloruro de sodio, cloruro de litio, glicerofosfato de sodio, feniletanol, manitol, triptona y extracto de levadura. En algunas modalidades, el prebiótico se selecciona del grupo que consiste en ácidos grasos de cadena corta (ácido acético, ácido propiónico, ácido butírico, ácido isobutírico, ácido valérico, ácido isovalérico), glicerol, oligosacáridos derivados de pectina de subproductos agrícolas, fructooligosacáridos (por ejemplo, prebióticos similares a la inulina), galactooligosacáridos (por ejemplo, rafinosa), ácido succínico, ácido láctico y mananoligosacáridos.

En algunas modalidades, el agente promotor puede ser un probiótico. El probiótico puede ser cualquier probiótico conocido en la técnica. Los probióticos son microorganismos vivos que proporcionan un beneficio para la salud del hospedero. En los métodos proporcionados en la presente, los probióticos se pueden aplicar tópicamente a los microbiomas dérmicos y mucosos, y/o los probióticos se pueden administrar

por vía oral para proporcionar beneficios para la salud de la piel y las mucosas del sujeto. Se ha demostrado que varias cepas de *Lactobacillus* tienen efectos antiinflamatorios sistémicos. Los estudios han demostrado que ciertas cepas de

5 *Lactobacillus reuteri* inducen citocinas antiinflamatorias sistémicas, tales como interleucina (IL)-10. Los factores solubles de *Lactobacillus reuteri* inhiben la producción de citocinas proinflamatorias. Se ha demostrado que las cepas de *Lactobacillus paracasei* inhiben la inflamación neutrógena en

10 un modelo de piel Kober et al., 2015, Int J Women's Dermatol 1(2015) 85-89. En modelos de fibroblastos dérmicos humanos y ratones sin pelo, se ha demostrado que *Lactobacillus Plantarum* inhibe la expresión de la metaloproteinasa de matriz 1 inducida por UVB (MMP-1) para preservar la expresión

15 de procolágeno en fibroblastos humanos. La administración oral de *L. plantarum* en ratones sin pelo en muestras histológicas demostró que *L. plantarum* inhibió la expresión de MMP-13, MMP-2 y MMP-9 en el tejido dérmico.

Clínicamente, también se ha demostrado que la aplicación

20 tópica de probióticos modifica la función de barrera de la piel con un aumento secundario de las propiedades antimicrobianas de la piel. Se ha demostrado que cuando *Streptococcus thermophiles* se aplica tópicamente, modifica la función de barrera de la piel con un aumento secundario de

25 las propiedades antimicrobianas de la piel. Se ha demostrado

que cuando *Streptococcus thermophiles* se aplica tópicamente, aumenta la producción de ceramida tanto *in vitro* como *in vivo*. Las ceramidas atrapan la humedad en la piel y ciertos esfingolípidos de ceramida, tales como la fitosfingosina (PS), exhiben actividad antimicrobiana directa contra *P. acnes*. Kober et al., 2015, Int J Women's Dermatol 1(2015) 85-89.

Dos ensayos clínicos de preparaciones tópicas de probióticos han evaluado su efecto en el acné. La loción de *Enterococcus fecalis* aplicada en la cara durante 8 semanas dio como resultado una reducción de 50% de las lesiones inflamatorias en comparación con el placebo. Se observó una reducción en el recuento de acné, el tamaño y el eritema asociado durante un estudio clínico del extracto tópico de *Lactobacillus plantarum*. Kober et al., 2015, Int J Women's Dermatol 1(2015) 85-89.

Los ensayos clínicos de probióticos tópicos han evaluado su efecto en los sistemas mucosos. En un estudio, *Streptococcus salivarius* se administró mediante pulverización nasal para la prevención de la otitis media aguda (AOM). Si la nasofaringe fue colonizada con éxito, hubo un efecto significativo en la reducción de la AOM. Marchisio et al. (2015). Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 34, 2377-2383. En otro ensayo, la aplicación por pulverización de *S. sanguinis* y *L. Rhamnosus* disminuyó el líquido del oído medio

en niños con otitis media secretora. Skovbjerg et al. (2008). Arch. Dis. Child. 94, 92-98.

El probiótico puede ser un probiótico tópico o un probiótico oral. El probiótico puede ser, por ejemplo, de un
 5 género y una especie diferente que el microorganismo no deseado, o del mismo género pero de una especie diferente, que el microorganismo no deseado. La especie probiótica puede ser un género y una especie diferente que el microorganismo
 10 una modificación molecular de interruptor de inactivación. El probiótico puede seleccionarse de *Lactobacillus* spp, *Bifidobacterium* spp. *Streptococcus* spp. o *Enterococcus* spp. El probiótico puede seleccionarse de *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium lactis*,
 15 *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium longum*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus salivarius*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus*
 20 *plantarum*, *Lactococcus lactis*, *Streptococcus thermophiles*, *Streptococcus salivarius* o *Enterococcus fecalis*.

El agente promotor puede incluir un agente estabilizador de proteínas tal como los descritos en un documento incorporado por referencia de la patente estadounidense N.º
 25 5,525,336, que está incluido en la composición. Los ejemplos

no limitativos incluyen glicerol, trehalosa, ácido etilendiamintetraacético, cisteína, una ciclodextrina tal como una alfa, beta o gamma-ciclodextrina, o un derivado de estas, tal como una 2-hidroxipropil beta-ciclodextrina e
5 inhibidores de proteinasas tales como leupeptina, pepstatina, antipaína y cistatina.

El agente promotor puede incluir un humectante. Los ejemplos no limitativos de humectantes incluyen glicerina, sorbitol, 2-pirrolidon-5-carboxilato de sodio, colágeno
10 soluble y dibutilftalato.

Composiciones

Se proporcionan composiciones que comprenden un microorganismo sintético y un portador, diluyente, emoliente, aglutinante, excipiente, lubricante, agente edulcorante,
15 agente saborizante, amortiguador, espesante, agente humectante o absorbente aceptable desde el punto de vista farmacéutico.

Los diluyentes o portadores aceptables desde el punto de vista farmacéutico para formular la composición se
20 seleccionan del grupo que consiste en agua, solución salina, solución salina amortiguada con fosfato o un solvente. El solvente se puede seleccionar, por ejemplo, de alcohol etílico, tolueno, isopropanol, alcohol n-butílico, aceite de ricino, etilenglicol monoetiléter, dietilenglicol
25 monobutiléter, dietilenglicol monoetiléter, dimetilsulfóxido,

dimetilformamida y tetrahidrofurano. El portador o diluyente puede comprender además uno o más tensioactivos tales como i) tensioactivos aniónicos, tales como sales de metal o alcanolamina de ácidos grasos, por ejemplo, laurato de sodio y oleato de trietanolamina; alquilbencenosulfonas, por ejemplo, dodecilbencensulfonato de trietanolamina; sulfatos de alquilo, por ejemplo, laurilsulfato de sodio; alquil éter sulfatos, por ejemplo, lauril éter sulfato de sodio (2 a 8 EO); sulfosuccinatos, por ejemplo, dioctil sulfosuccinato de sodio; sulfatos de monoglicéridos, por ejemplo, monosulfato de monoestearato de glicerilo de sodio; isotionatos, por ejemplo, isotionato de sodio; metiltauridas, por ejemplo, Igepon T; acilsarcosinatos, por ejemplo, miristil sarcosinato de sodio; péptidos de acilo, por ejemplo, Maypons y Lamepons; acil lactilatos, éter glicolatos polialcoxilados, por ejemplo, ácido tridecet-7 carboxílico; fosfatos, por ejemplo, dilaurilfosfato de sodio; tensioactivos catiónicos, tales como sales de amina, por ejemplo, clorhidrato de sapamina; sales de amonio cuaternario, por ejemplo, Quaternium 5, Quaternium 31 y Quaternium 18; tensioactivos anfóteros, tales como compuestos de imidazol, por ejemplo, Miranol; N-alquil aminoácidos, tales como cocaminopropionato de sodio y derivados de asparagina; betáinas, por ejemplo, cocamidopropilbetaína; tensioactivos no iónicos, tales como alcanolamidas de ácidos grasos, por ejemplo, etanolamida

oleica; ésteres o polialcoholes, por ejemplo, Span; ésteres de poliglicerol, por ejemplo, los esterificados con ácidos grasos y uno o varios grupos OH; derivados polialcoxilados, por ejemplo, polioxi:estearato de polioxietileno; éteres, por ejemplo, polioxiet lauril éter; éteres de éster, por ejemplo, Tween; óxidos de amina, por ejemplo, óxidos de coco y dodecildimetilamina. En algunas modalidades, se incluye más de un tensioactivo o solvente.

La composición puede incluir un componente amortiguador para ayudar a estabilizar el pH. En algunas modalidades, el pH está entre 4.5-8.5. Por ejemplo, el pH puede ser aproximadamente 4.5, 4.6, 4.7, 4.8, 4.9, 5.0, 5.1, 5.2, 5.3, 5.4, 5.5, 5.6, 5.7, 5.8, 5.9, 6.0, 6.1, 6.2, 6.3, 6.4, 6.5, 6.6, 6.7, 6.8, 6.9, 7.0, 7.1, 7.2, 7.3, 7.4, 7.5, 7.6, 7.7, 7.8, 7.9 u 8.0, incluido cualquier valor intermedio. En algunas modalidades, el pH es de 5.0 a 8.0, 6.0 a 7.5, 6.8 a 7.4, o alrededor de 7.0. Los ejemplos no limitativos de amortiguadores pueden incluir ACES, acetato, ADA, hidróxido de amonio, AMP (2-amino-2-metil-1-propanol), AMPD (2-amino-2-metil-1,3-propandiol), AMPSO, BES, BICINA, bis-tris, BIS-TRIS propano, borato, CABS, cacodilato, CAPS, CAPSO, carbonato (pK1), carbonato (pK2), CHES, citrato (pK1), citrato (pK2), citrato (pK3), DIPSO, EPPS, HEPPS, etanolamina, formiato, glicina (pK1), glicina (pK2), glicilglicina (pK1), glicilglicina (pK2), HEPBS, HEPES, HEPPSO, histidina,

hidrazina, imidazol, malato (pK1), malato pK2), maleato (pK1), maleato (pK2), MES, metilamina, MOBS, MOPS, MOPSO, fosfato (pK1), fosfato (pK2), fosfato (pK3), piperazina (pK1), piperazina (pK2), piperidina, PIPES, POPSO, 5 propionato, piridina, pirofosfato, succinato (pK1), succinato (pK2), TABS, TAPS, TAPSO, taurina (AES), TES, tricina, trietanolamina (TEA) y Trizma (tris). Los excipientes pueden incluir una lactosa, manitol, sorbitol, celulosa microcristalina, sacarosa, citrato de sodio, fosfato 10 dicálcico, amortiguador de fosfato o cualquier otro ingrediente de naturaleza similar solo o en una combinación adecuada de estos.

La composición microbiana puede incluir un aglutinante, por ejemplo, una goma tragacanto, goma arábica, 15 metilcelulosa, gelatina, polivinilpirrolidona, almidón o cualquier otro ingrediente de naturaleza similar solo o en una combinación adecuada de estos; excipientes seleccionados del grupo que consiste en agar-agar, carbonato de calcio, carbonato de sodio, silicatos, ácido algínico, almidón de 20 maíz, almidón de tapioca de patata, primogel o cualquier otro ingrediente de naturaleza similar solo o en una combinación adecuada de estos; lubricantes seleccionados del grupo que consiste en estearato de magnesio, estearato de calcio, talco, polietilenglicoles sólidos, laurilsulfato de sodio o 25 cualquier otro ingrediente de naturaleza similar solo;

agentes deslizantes seleccionados del grupo que consiste en dióxido de silicio coloidal o cualquier otro ingrediente de naturaleza similar solo o en una combinación adecuada de estos; un estabilizante seleccionado del grupo que consiste
5 en manitol, sacarosa, trehalosa, glicina, arginina, dextrano o combinaciones de estos; un agente odorizante o saborizante seleccionado del grupo que consiste en menta, salicilato de metilo, aroma de naranja, aroma de vainilla o cualquier otro aroma o sabor aceptable desde el punto de vista farmacéutico
10 solo o en una combinación adecuada de estos; agentes humectantes seleccionados del grupo que consiste en alcohol de acetilo, monoestearato de glicerilo o cualquier otro agente humectante aceptable desde el punto de vista farmacéutico solo o en una combinación adecuada de estos;
15 absorbentes seleccionados del grupo que consiste en caolín, arcilla de bentonita o cualquier otro absorbente aceptable desde el punto de vista farmacéutico solo o en una combinación adecuada de estos; agentes retardadores seleccionados del grupo que consiste en cera, parafina o
20 cualquier otro agente retardador aceptable desde el punto de vista farmacéutico solo o en una combinación adecuada de estos.

La composición microbiana puede comprender uno o más emolientes. Los ejemplos no limitativos de emolientes
25 incluyen alcohol estearílico, monoricinoleato de glicerilo,

monoestearato de glicerilo, propan-1,2-diol, butan-1,3-diol, aceite de visón, alcohol cetílico, isoestearato de isopropilo, ácido esteárico, palmitato de isobutilo, estearato de isocetilo, alcohol oleílico, laurato de isopropilo, laurato de hexilo, oleato de decilo, octadecan-2-ol, alcohol isocetílico, palmitato de cetilo, dimetilpolisiloxano, sebacato de di-n-butilo, miristato de isopropilo, palmitato de isopropilo, estearato de isopropilo, estearato de butilo, polietilenglicol, trietilenglicol, lanolina, aceite de sésamo, aceite de coco, aceite de cacahuete, aceite de ricino, alcoholes de lanolina acetilados, petróleo, aceite mineral, miristato de butilo, ácido isoesteárico, ácido palmítico, linoleato de isopropilo, lactato de laurilo, lactato de miristilo, oleato de decilo, miristato de miristilo.

La composición microbiana puede incluir un espesante, por ejemplo, donde el espesante puede seleccionarse de hidroxietilcelulosas (por ejemplo, Natrosol), almidón, gomas tales como goma arábiga, caolín u otras arcillas, silicato de aluminio hidratado, sílice ahumada, polímero de carboxivinilo, carboximetilcelulosa de sodio u otros derivados de celulosa, monoestearato de etilenglicol y alginatos de sodio. La composición microbiana puede incluir conservadores, antisépticos, pigmentos o colorantes, fragancias, agentes enmascarantes y portadores, tales como

agua y alquilo inferior, alcoholes, tales como los descritos en un documento incorporado por referencia de la patente estadounidense N.º 5,525,336, que se incluyen en las composiciones.

5 Las composiciones microbianas para administración tópica se pueden proporcionar en líquido, solución, suspensión, crema, loción, pomada, gel o en forma sólida, tal como un polvo, comprimido o tableta para suspensión inmediatamente antes de la administración. Las composiciones para uso tópico
10 también se pueden proporcionar como cápsulas duras o cápsulas de gelatina blanda, en donde el microorganismo benigno y/o sintético se mezcla con agua o un medio oleoso, por ejemplo, aceite de maní, parafina líquida o aceite de oliva. Los polvos y granulados pueden prepararse con los ingredientes
15 mencionados anteriormente en comprimidos y cápsulas para la disolución de una manera convencional mediante, por ejemplo, un mezclador, un aparato de lecho fluido, liofilización o un equipo de secado por pulverización. Una composición microbiana seca puede administrarse directamente o puede ser
20 para suspensión en un portador. Cuando la composición está en forma de polvo, los polvos pueden incluir tiza, talco, tierra de batán, dióxido de silicio coloidal, poliacrilato de sodio, esmectitas de tetraalquil y/o trialquil arilamonio y silicato de aluminio y magnesio modificado químicamente en un
25 portador. Cuando la composición está en forma de polvo, los

polvos pueden incluir tiza, talco, tierra de batán, dióxido de silicio coloidal, poliacrilato de sodio, esmectitas de tetraalquil y/o trialquil arilamonio y silicato de aluminio y magnesio modificado químicamente.

- 5 La composición microbiana puede exhibir una CFU estable que pierde menos de 30%, 20%, 10% o 5% cfu durante al menos uno, dos, tres meses, seis meses, 12 meses, 18 meses o 24 meses cuando se almacena congelada, refrigerada o preferentemente a temperatura ambiente.

10 **Kits**

- Cualquiera de las composiciones o los microorganismos sintéticos mencionados anteriormente se puede proporcionar en forma de un kit. En algunas modalidades, un kit comprende un recipiente que contiene bacterias vivas o un recipiente que
15 contiene bacterias vivas liofilizadas. Los kits pueden incluir un segundo recipiente que incluye medios. Los kits también pueden incluir uno o más agentes descolonizantes. Los kits también pueden incluir instrucciones para administrar la composición. En ciertas modalidades, se proporcionan
20 instrucciones para mezclar las cepas bacterianas con otros componentes de la composición. En algunas modalidades, un kit incluye además un aplicador para aplicar la composición microbiana a un sujeto.

Dosis

- 25 En ciertas modalidades, se proporciona una composición

para la administración tópica que es una composición de solución, o para la reconstitución en una composición de solución. En una modalidad, la composición puede incluir de alrededor de 1×10^5 a 1×10^{12} cfu/mL, 1×10^6 a 1×10^{10} 5 cfu/mL, o 1.2×10^7 a 1.2×10^9 CFU/mL del microorganismo sintético en una solución acuosa, tal como solución salina amortiguada con fosfato (PBS). Se pueden emplear dosis más bajas para estudios de irritación preliminares en un sujeto.

Preferentemente, el sujeto no exhibe recurrencia del 10 microorganismo no deseado como se evidencia al hisopar el sujeto en al menos un sitio después de al menos 2, 3, 4, 6, 10, 15, 22, 26, 30 o 52 semanas después de realizar la etapa de administración inicial.

Nanofábrica

15 En algunas modalidades, se proporcionan métodos para crear la producción de una sustancia deseada en el sitio del microbioma (nanofábrica). Se proporcionan microorganismos sintéticos que pueden comprender una modificación molecular de nanofábrica. El término "nanofábrica" se refiere a una 20 modificación molecular de un microorganismo diana que da como resultado la producción de un producto, ya sea un producto primario tal como una proteína, una enzima, un polipéptido, un aminoácido o un ácido nucleico, o un producto secundario tal como una molécula pequeña para producir un efecto 25 beneficioso. El producto puede secretarse del microorganismo

sintético o puede estar en forma de un cuerpo de inclusión. Tales cepas bacterianas de nanofábrica tienen el potencial de proporcionar al sujeto hospedero una amplia gama de beneficios duraderos que incluyen: (i) la adquisición de productos celulares y enzimas para los cuales el hospedero era previamente deficiente y; (ii) la adquisición de un sistema de administración de productos farmacéuticos de moléculas pequeñas, polipéptidos o proteínas elaborados microbianamente para diversos beneficios terapéuticos y profilácticos. Tales cepas bacterianas de nanofábrica cuando se integran de manera duradera en el bioma como se describe en la presente proporcionarían una producción de producto en estado estacionario alternativa duradera útil a la aplicación directa del producto.

En la presente se proporcionan métodos y microorganismos sintéticos para reemplazar la colonización existente por un microorganismo no deseado con una cepa bacteriana sintética que comprende una modificación molecular de nanofábrica para la producción o el consumo de un producto primario o secundario, donde el microorganismo diana puede ser una cepa de *Acinetobacter johnsonii*, *Acinetobacter baumannii*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus lugdunensis*, *Staphylococcus warneri*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Corynebacterium acnes*, *Corynebacterium striatum*, *Corynebacterium diphtheriae*,

Corynebacterium minutissimum, *Cutibacterium acnes*,
Propionibacterium acnes, *Propionibacterium granulosum*,
Streptococcus pyogenes, *Streptococcus aureus*, *Streptococcus*
agalactiae, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus viridans*,
5 *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus anginosus*,
Streptococcus constellatus, *Streptococcus intermedius*,
Streptococcus agalactiae, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas*
oryzihabitans, *Pseudomonas stutzeri*, *Pseudomonas putida*, y
Pseudomonas fluorescens, *Lactobacillus crispatus*,
10 *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus jensenii* y *Lactobacillus*
iners.

La modificación molecular de nanofábrica en un
microorganismo sintético puede usarse para ayudar a su sujeto
hospedero, es decir, un paciente con un déficit de alguna vía
15 metabólica primaria (anabólica o catabólica) o secundaria o
cualquier otra dolencia derivada de la abundancia excesiva o
insuficiente de alguna molécula pequeña o macromolécula tal
como una enzima. La modificación molecular de nanofábrica
puede codificar una enzima, un aminoácido, un intermediario
20 metabólico o una molécula pequeña. La modificación molecular
de nanofábrica puede conferir una nueva producción (síntesis)
o función metabólica en el microbioma del hospedero, tal como
la capacidad de sintetizar o metabolizar endógenamente
compuestos específicos, o sintetizar enzimas u otras
25 moléculas activas para operar dentro del microbioma exógeno.

El microorganismo transportará una nanofábrica seleccionada de un gen biosintético, un agrupamiento de genes biosintéticos o genes que codifican una o múltiples enzimas bajo el control de un promotor regulado diferencialmente, 5 inducible o regulado constitutivamente. El microorganismo sintético que comprende una nanofábrica debe administrarse en el al menos un sitio del cuerpo, ya sea dérmico, mucoso u otro sitio, como agente singular o junto con un segundo, tercer o cuarto microorganismo sintético que ayuda al primer 10 microorganismo sintético a restaurar la pérdida de función en el sujeto hospedero.

En un ejemplo, un microorganismo sintético que comprende una nanofábrica puede usarse para restaurar la función mediante la producción de factores intercelularmente activos, 15 por ejemplo, la complementación microbiana de enzimas digestivas en pacientes con insuficiencia pancreática exocrina mediante enzimas recombinantes secretadas en el intestino delgado. El páncreas es un órgano vital y tiene una función clave en la digestión. La insuficiencia pancreática 20 exocrina (EPI, por sus siglas en inglés) es causada por un daño prolongado al páncreas, lo que genera la reducción o ausencia de enzimas digestivas esenciales en el intestino delgado que descomponen principalmente las grasas y los carbohidratos. La pérdida de estas enzimas puede conducir a 25 una amplia amplitud o síntomas y depende de la gravedad de la

EPI. El nivel de pH del intestino delgado en el intestino delgado proximal (duodeno) es más bajo que el de la región distal. Este cambio en el entorno conduce a una ocupación de nicho microbiano que depende del pH. Esta dependencia del pH ha seleccionado naturalmente bacterias comensales del duodeno que podrían modificarse molecularmente para convertirse en microorganismos sintéticos, que se localizarían intrínsecamente en esa región del tracto gastrointestinal. El estómago y las dos terceras partes superiores del intestino delgado contienen lactobacilos y estreptococos tolerantes a los ácidos (Hao, Wl, Lee YK. Microflora of the gastrointestinal tract: a review. *Methods Mol. Biol.* 2004, 268, 491-502) y podrían aislarse de donantes sanos. Al activar lipasas, amilasas y/o proteasas recombinantes con secuencias de señalización secretoras, la colonización del duodeno por parte de los microorganismos sintéticos podría restaurar la función digestiva en pacientes que padecen EPI.

En otro ejemplo de una nanofábrica, un microorganismo sintético que comprende una nanofábrica puede usarse para restaurar la función mediante la producción de factores intercelularmente activos. Por ejemplo, proteger a un sujeto que padece fenilcetonuria (PKU, por sus siglas en inglés) mediante la eliminación de fenilalanina en el tracto gastrointestinal. La fenilalanina es un aminoácido esencial, lo que significa que el cuerpo humano no puede producirla y

debe adquirirla a través de la nutrición. Una vez en el cuerpo, la descomposición de la fenilalanina se lleva a cabo mediante una proteína, la fenilalanina hidroxilasa (PAH, por sus siglas en inglés). El trastorno genético hereditario conocido como fenilcetonuria (PKU, por sus siglas en inglés) es causado por mutaciones en el gen que codifica la PAH, lo que causa la acumulación de fenilalanina en el cuerpo. Uno de los enfoques más comunes para evitar esta acumulación es evitar los alimentos ricos en fenilalanina. Alternativamente, un microorganismo sintético que se ha modificado molecularmente para descomponer la fenilalanina por vía intracelular puede introducirse en el tracto gastrointestinal. Este microorganismo sintético constituye una nanofábrica de PAH, que descompone la fenilalanina antes de que tenga la oportunidad de ingresar al cuerpo del hospedero con PKU.

En otro ejemplo de una nanofábrica, una bacteria sintética puede derivarse de una bacteria comensal diana de la microbiota de la piel que puede comprender una modificación molecular de nanofábrica. La bacteria comensal de la piel o mucosa diana puede ser, por ejemplo, un *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp. o un *Cutibacterium* spp. Por ejemplo, *Staphylococcus epidermidis* puede ser el microorganismo diana porque se encuentra en múltiples tipos de entornos dérmicos o mucosos. El diseño por ingeniería

genética de un *S. epidermidis* sintético, dada su capacidad de persistir en diferentes entornos, permitiría el desarrollo y la optimización de múltiples tipos de técnicas y ubicaciones de administración.

- 5 En un ejemplo, una cepa sintética de *S. epidermidis* puede comprender una modificación molecular de nanofábrica para producir testosterona para hombres que padecen hipogonadismo masculino. La producción de testosterona podría lograrse mediante: (i) la introducción de la vía biosintética
- 10 de esteroides completa con las enzimas adicionales necesarias para generar testosterona, o (ii) la introducción de la vía biosintética de esteroides parcial y tener las moléculas precursoras necesarias en el medio portador, es decir, farnesil, escualeno, colesterol, etc., de modo que la
- 15 testosterona pueda ensamblarse en la bacteria sintética. En otro ejemplo, una cepa sintética de *S. epidermidis* podría comprender una modificación molecular de nanofábrica para la producción de nicotina; esta cepa sintética podría aplicarse como tratamiento transdérmico para ayudar a dejar de fumar.
- 20 Esta cepa sintética puede incluir una modificación molecular para incluir una o más vías biosintéticas que se encuentran en la familia de plantas Solanaceae, y opcionalmente incluir además una modificación molecular para mejorar las vías intrínsecas de las moléculas precursoras, es decir, ácido
- 25 aspártico, ornitina, etc.

En un ejemplo adicional de una nanofábrica, una cepa sintética de *S. epidermidis* puede comprender una modificación molecular de nanofábrica para la producción de escopolamina. La escopolamina se administra actualmente a través de un
5 parche transdérmico de liberación prolongada para el tratamiento de la cinetosis y la profilaxis postoperatoria. Esta cepa necesitaría transportar las vías biosintéticas que se encuentran en la familia de plantas Solanaceae y posiblemente mejorar las vías intrínsecas de las moléculas
10 precursoras.

Como otro ejemplo, una cepa sintética de *S. epidermidis* puede comprender una modificación molecular de nanofábrica para la producción de capsaicina para aliviar el dolor derivado de la neuralgia posherpética, la psoriasis u otros
15 trastornos relacionados con la piel.

En otro ejemplo, el microorganismo diana es una cepa de *Streptococcus mutans*, que puede tener uno o más de un interruptor de inactivación, bloqueo en V o modificación molecular de nanofábrica. La caries dental y la placa dental
20 se encuentran entre las enfermedades más comunes en todo el mundo, y son causadas por una mezcla de microorganismos y restos de alimentos. Los tipos específicos de bacterias productoras de ácido, especialmente *Streptococcus mutans*, colonizan la superficie dental y causan daño a la estructura
25 del diente duro en presencia de carbohidratos fermentables,

por ejemplo, sacarosa y fructosa. La caries dental y la placa dental se encuentran entre las enfermedades más comunes en todo el mundo, y son causadas por una mezcla de microorganismos y restos de alimentos. Los tipos específicos de bacterias productoras de ácido, especialmente *Streptococcus mutans*, colonizan la superficie dental y causan daño a la estructura del diente duro en presencia de carbohidratos fermentables, por ejemplo, sacarosa y fructosa. Forrsten et al., Nutrients, marzo de 2010; 2(3):290-298. En algunas modalidades, el microorganismo diana es *S. mutans* que tiene un KS y/o una inactivación de nanofábrica para reducir la producción de ácido en presencia de sacarosa, fructosa u otros carbohidratos fermentables.

Otros ejemplos de modificaciones moleculares de nanofábrica en un microorganismo sintético para abordar usos dermatológicos y cosméticos incluyen: (i) la producción de ácido hialurónico en *Staphylococcus epidermidis* para la dermatitis atópica o piel seca, (ii) la producción de ácido alfa-hidroxi en *Staphylococcus epidermidis* para reducir las líneas finas y arrugas, así como disminuir la pigmentación irregular, (iii) la producción de ácido salicílico en *Cutibacterium acnes* para reducir el acné, (iv) la producción de arbutina en *Staphylococcus epidermidis* (la arbutina y su metabolito hidroquinona funcionan como agentes para aclarar la piel mediante la supresión de melanina), (v) ácido kójico

(producido por varios hongos, incluido *Aspergillus oryzae*) en *Staphylococcus epidermidis* para aclarar la pigmentación de la piel, (vi) la producción de retinoides por *Staphylococcus epidermidis* para la reducción de líneas finas y arrugas, 5 (vii) la producción de ácido L-ascórbico (vitamina C) en *Staphylococcus epidermidis* para la estimulación de colágeno y efectos antioxidantes en la piel, (viii) la producción de péptido de cobre (GHK-Cu) en *Staphylococcus epidermidis* para la estimulación de la producción de colágeno y elastina y 10 reducción de la formación de cicatrices, (ix) la producción de ácido alfa lipoico en *Staphylococcus epidermidis* para efectos antioxidantes beneficiosos en la piel, y (x) la producción de dimetilaminoetanol en *Staphylococcus epidermis* para reducir líneas finas y arrugas.

15 *Cutibacterium acnes* es una bacteria dominante que vive en la piel y se ha asociado tanto con una piel sana como con diversas enfermedades. Este es otro organismo y nicho disponible para mejorar y fortalecer con técnicas de biología molecular modernas. Los estudios han demostrado que los 20 niveles de *C. acnes* son similares entre la piel sana y la piel cargada de acné. Dréno, B., et al. "Cutibacterium acnes (Propionibacterium acnes) and acne vulgaris: a brief look at the latest updates." *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology* 32 (2018): 5-14. Esto indica que 25 solo reducir el número de *C. acnes* viables en la piel de una

persona no ayudará a aliviar la enfermedad o los síntomas. En
 cambio, otras cepas de *C. acnes* u otros miembros del
 microbioma dérmico y subcutáneo pueden alterarse para mitigar
 los mecanismos que ciertas cepas de *C. acnes* usan para causar
 5 la enfermedad. También se ha demostrado que los aislados que
 mostraron tener la mayor asociación con una mayor gravedad
 del acné producen mayores cantidades de ácido propiónico y
 butírico. Beylot, C., et al. "Propionibacterium acnes: an
 update on its role in the pathogenesis of acne." *Journal of*
 10 *the European Academy of Dermatology and Venereology* 28.3
 (2014): 271-278.

Otro ejemplo de una modificación molecular de
 nanofábrica incluye otra cepa de *C. acnes* que se modifica
 para aumentar el apetito por los ácidos grasos de cadena
 15 corta, tales como el ácido propiónico y el ácido butírico, lo
 que elimina las secreciones químicas inflamatorias de la cepa
 virulenta que la hace menos tóxica. Los ácidos grasos ricos
 en carbono podrían usarse para inducir una vía heteróloga y
 usarse como precursores para la síntesis de vitaminas u otros
 20 compuestos orgánicos beneficiosos para la piel o el
 microbioma que habita en esa ubicación.

En otro ejemplo, el ácido lipoteicoico de *S. epidermidis*
 ha demostrado que ayuda a mitigar la respuesta inflamatoria
 de *Propionibacterium acnes* (es decir, *Cutibacterium acnes*) al
 25 inducir miR-143. Xia, Xiaoli, et al. "Staphylococcal LTA-

induced miR-143 inhibits *Propionibacterium acnes*-mediated inflammatory response in skin." *Journal of Investigative Dermatology* 136.3 (2016): 621-630. Se puede emplear un microorganismo sintético que comprende una modificación

5 molecular de nanofábrica que produce ácido lipoteicoico que inhibe la inflamación inducida por *C. acnes* mediante la inducción de miR-143. La nanofábrica puede usarse para modular las respuestas inflamatorias por parte de *S. epidermidis* en el sitio del acné vulgar para el manejo de la

10 inflamación inducida por *C. acnes*. Esta vía es solo un ejemplo de un producto útil que podría elaborarse a partir de ácidos grasos de cadena corta que, si se dejan solos, causan inflamación e irritación de la piel.

En otro ejemplo, la inflamación y el aumento de

15 temperatura son factores involucrados en la enfermedad causada por *C. acnes*, podrían usarse como señales para inducir vías heterólogas previamente silenciosas en una cepa diseñada por ingeniería genética. Un aumento de temperatura (que indica un poro sellado y un estado progresivo de la

20 enfermedad localizada) podría inducir en la cepa virulenta u otro microbio comensal, la transcripción y traducción de una lipasa estimulante no inmunitaria (u otra enzima) que sea capaz de degradar el sebo al punto de reabrir un poro obstruido lo que permite que la ubicación reanude sus

25 condiciones normales de crecimiento.

En otro ejemplo, un *Lactobacillus* spp. sintético tal como *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus jensenii* o *Lactobacillus iners*, que son especies dominantes comunes presentes en la cúpula vaginal
5 femenina, pueden ser diseñadas por ingeniería genética para comprender una modificación molecular de nanofábrica que produce estradiol en la cúpula vaginal de las mujeres posmenopáusicas.

En la presente se proporcionan métodos y microorganismos
10 sintéticos para reemplazar la colonización existente por un microorganismo no deseado con una cepa bacteriana sintética que comprende una modificación molecular de nanofábrica para la producción o el consumo de un producto primario o secundario, por ejemplo, seleccionado de una enzima,
15 nicotina, ácido aspártico, ornitina, ácido propiónico, ácido butírico, ácido hialurónico, un ácido alfa-hidroxi, ácido L-ascórbico, un péptido de cobre, ácido alfa-lipoico, ácido salicílico, arbutina, ácido kójico, escopolamina, capsaicina, un retinoide, dimetilaminoetanol, ácido lipoteicoico,
20 testosterona, estradiol y progesterona.

La integración duradera de una cepa bacteriana sintética que es capaz de producir, por medio de una modificación molecular de nanofábrica o adición sintética a su genoma, una sustancia, un material o un producto o productos que son
25 beneficiosos para el hospedero en el sitio de la integración

del microbioma o en sitios distantes en el hospedero después de la absorción puede adaptarse a la indicación deseada. Según si el cambio de nucleótido sintético se incorpora directamente en el genoma bacteriano o si se introdujo en los
5 plásmidos, la duración del efecto de la producción de nanofábrica podría variar de corto plazo (con plásmidos no replicantes para la especie bacteriana) a medio plazo (con plásmidos replicantes sin dependencia de adicción) a largo plazo (con manipulación genómica bacteriana directa).

10 **Bloqueo de virulencia**

En algunas modalidades, se proporcionan métodos para reemplazar la colonización existente con una cepa bacteriana sintética que no puede aceptar la transferencia genética de genes de virulencia no deseada o resistencia a antibióticos.
15 Se proporcionan microorganismos sintéticos que pueden comprender un "bloqueo de virulencia" o "bloqueo en V". El término "bloqueo de virulencia" o "bloqueo en V" se refiere a una modificación molecular de un microorganismo que hace que el organismo tenga una capacidad disminuida para aceptar ADN
20 extraño de otras cepas o especies, lo que eficazmente da como resultado que el organismo tenga una capacidad disminuida para adquirir genes de virulencia exógena o resistencia a antibióticos.

En la presente se proporcionan métodos para reemplazar
25 la colonización existente por un microorganismo no deseado

con una cepa bacteriana sintética que comprende una modificación molecular de bloqueo en V que no puede aceptar la transferencia genética de genes de virulencia no deseada o resistencia a antibióticos, donde el microorganismo diana

5 puede ser una cepa de *Acinetobacter johnsonii*, *Acinetobacter baumannii*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus lugdunensis*, *Staphylococcus warneri*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Corynebacterium acnes*, *Corynebacterium striatum*, *Corynebacterium diphtheriae*,

10 *Corynebacterium minutissimum*, *Cutibacterium acnes*, *Propionibacterium acnes*, *Propionibacterium granulosum*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus viridans*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus anginosus*,

15 *Streptococcus constellatus*, *Streptococcus intermedius*, *Streptococcus agalactiae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas oryzae*, *Pseudomonas stutzeri*, *Pseudomonas putida*, y *Pseudomonas fluorescens*.

Una de las principales preocupaciones con respecto a las

20 enfermedades infecciosas se denomina comúnmente "transferencia horizontal de genes" con posibles patógenos bacterianos que adquieren genes de proteínas de virulencia exógena o genes de resistencia a los antimicrobianos. La adquisición puede ser el resultado de la transferencia de

25 estos genes de otras cepas o especies de bacterias en el

entorno del microbioma local. Como es común que los patógenos bacterianos invasivos sean inicialmente parte del microbioma bacteriano colonizador en la piel o las superficies mucosas antes de causar la enfermedad, sería de gran beneficio práctico poder imbuir a estas cepas colonizadoras de la incapacidad de aceptar ADN bacteriano extraño en el genoma bacteriano. El proceso para lograr esto en una cepa bacteriana sintética integrada de manera duradera se ha denominado "bloqueo de virulencia".

5 Tal cepa manipulada de "bloqueo de virulencia" podría integrarse en el microbioma después de un evento de descolonización y luego, a través del proceso de exclusión competitiva, permanecer por un tiempo como la cepa dominante dentro de ese nicho en particular sin adquirir

15 características de virulencia no deseada o resistencia a antibióticos. Tal concepto llevado a cabo en patógenos potenciales dentro del microbioma daría como resultado un microbioma estable que no podría adquirir ni virulencia ni genes de resistencia a los antimicrobianos en la forma de

20 transferencia horizontal, lo que hace que la totalidad del microbioma sea más robusta y con un potencial de conversión reducido.

El bloqueo en V es una modificación molecular que puede emplearse en un microorganismo sintético para suprimir la

25 virulencia o la transferencia horizontal de genes de un

microorganismo no deseado. La modificación molecular de bloqueo en V puede crearse en un microorganismo diana mediante: (i) la inactivación de genes (extirpación o eliminación) de uno o más genes de virulencia conocidos, (ii) 5 el desplazamiento de marco de una región de virulencia (sumar o restar pares de bases para "romper" 'el marco de codificación), (iii) el silenciamiento exógeno de regiones de virulencia mediante un promotor inducible o un promotor constitutivo (incrustado en el genoma del ADN, pero que 10 funciona en el ARN), como la estrategia antitoxina, la producción de CRISPR-CAS9 u otras proteínas de edición para digerir los genes de virulencia entrantes que usan ARN guía que puede estar ligado a un promotor inducible o promotor constitutivo, o (iv) mediante una modificación de restricción 15 (RM) tal como un sistema de metilación para activar el 'sistema inmunitario innato' del organismo para reconocer y destruir los genes de virulencia entrantes por clase de molécula. Se puede emplear cualquiera de estos métodos para aumentar la resistencia a la transferencia horizontal de 20 genes. Los métodos de edición de genes para construir un bloqueo en V pueden incluir NgAgo, mini-Cas9, CRISPR-Cpf1, CRISPR-C2c2, Target-AID, Lambda Red, integrasas, recombinasas o el uso de fagos. El bloqueo de virulencia puede estar ligado operativamente a un promotor constitutivo en el 25 microorganismo sintético. La modificación molecular de

bloqueo de virulencia puede impedir la transferencia horizontal de genes del material genético desde un microorganismo virulento.

El casete génico que confiere resistencia a los
 5 antibióticos a las cepas de *Staphylococcus aureus* (SA) puede integrarse en el genoma de la célula receptora en un sitio particular. Este sitio podría eliminarse o cambiarse en un genoma de células, lo que hace que el sitio de aterrizaje ya no esté disponible para la secuencia de ADN entrante. Se ha
 10 demostrado que esto no interfiere con la capacidad de crecimiento de SA y haría que la adquisición del casete de resistencia por parte del organismo sea mucho menos probable.

Las modificaciones moleculares de bloqueo en V pueden causar la eliminación o neutralización de factores de
 15 virulencia, locus o casetes de resistencia, toxinas o funciones toxigénicas u otros atributos no deseados del microorganismo biómicamente integrado.

Se puede usar un bloqueo de virulencia en forma de sistema de reconocimiento Cas9 para secuencias consistentes
 20 con factores de virulencia conocidos o genes de resistencia a antibióticos en *Staphylococcus aureus* para proteger a las cepas de *Staphylococcus aureus* Live Biotherapeutic Products de adquirir factores de virulencia adicionales y resistencias a las clases de antibióticos, lo que las hace tan seguras
 25 como inicialmente aprobadas y elaboradas.

CRISPR es un sistema inmunitario adaptativo nativo para células procariotas que ha evolucionado con el tiempo para ayudar a defenderse de los ataques de fagos. El sistema usa secuencias cortas de ADN complementarias de las secuencias de ADN de fago (o cualquier ADN diana) para dirigirse al ADN entrante y digerir la cadena antes de que pueda incorporarse al genoma de la célula viva. Esta misma tecnología puede ser diseñada por ingeniería genética para dirigirse a secuencias de ADN que no son amenazantes para la célula bacteriana, pero una vez adquiridas permiten que el organismo cause enfermedades y persista en entornos que antes eran menos habitables. Al integrar la enzima Cas-9 en el genoma, o al aprovechar la Cas-9 endógena si está disponible, es posible introducir en el genoma ARN guía expresados constitutivamente que se dirigen a los genes de resistencia a antibióticos. Si las secuencias diana alguna vez se introducen en la célula a través de la transferencia horizontal de genes o de otro modo, el ADN entrante se cortará y no podrá integrarse en el genoma o producir un péptido funcional. Si los genes se integran en el genoma antes de que el sistema CRISPR-Cas pueda dirigirse a estos, el sistema CRISPR-Cas diseñado por ingeniería genética lo encontrará en el genoma y cortará las secuencias en la ubicación diana, lo que produce una célula no viable y detiene la propagación de casetes de resistencia

a antibióticos.

El sistema CRISPR también se puede usar para dirigir secuencias de ARN con el resultado de silenciar la expresión génica. En lugar de secuencias de reconocimiento dirigidas a la secuencia de ADN de genes de resistencia a antibióticos o virulencia, las secuencias de reconocimiento pueden diseñarse para dirigirse al mRNA. Si Cas9 y los ARN guía dirigidos se expresan de manera constitutiva en una célula que recibe los genes *abxR* o de virulencia, la traducción será interrumpida por el sistema CRISPR diseñado por ingeniería genética que impide la formación de proteínas y la capacidad de la célula para usar los genes diana.

Aun otro método de silenciamiento génico en procariotas que puede usarse para dirigir la expresión de genes de virulencia o resistencia a antibióticos es diseñar y expresar de manera constitutiva los ARN reguladores que se dirigen al transcrito de mRNA, generalmente en el RBS. Estos se integrarían y se expresarían de manera constitutiva desde el genoma para crear un organismo sintético. El ARN regulador es una secuencia corta (>100 bp) y es complementaria a la región no traducida (UTR) 5' del transcrito de mRNA del gen *abxR* o de virulencia. La expresión constitutiva de las secuencias cortas no debería ser metabólicamente exigente para el organismo, y tendrá el resultado de bloquear la traducción del mRNA diana a una proteína. El ARN diseñado por ingeniería

genética bloqueará suficientemente la capacidad de las células para usar el gen de resistencia a antibióticos diana si se recibe a través de transferencia horizontal de genes.

La metilación de ADN tiene muchas funciones importantes en procariotas y eucariotas. Una característica de la metilación de ADN permite que una célula distinga su propio ADN del ADN extraño. Esto hace que editar y estudiar muchas cepas de tipo silvestre sea muy difícil, porque los sistemas de metilasa del organismo reconocen el ADN de plásmido transformado como extraño y lo mastican antes de que pueda transcribirse o integrarse. La transferencia horizontal de genes puede ocurrir entre organismos que tienen patrones de metilación muy similares porque el ADN entrante se ve muy similar al propio ADN del receptor y no se digiere. Dado que el mecanismo y los genes responsables de agregar grupos metilo a secuencias específicas, y aquellos que buscan y cortan ADN metilado incorrectamente se conocen en una variedad de cepas bacterianas, es posible crear un organismo sintético que sea capaz de tener un patrón de metilación único. Esto serviría para hacer que todo el ADN entrante parezca extraño al organismo sintético y se digiera antes de que el organismo pueda adquirir los nuevos rasgos. Esto serviría para que la transferencia horizontal de genes de virulencia o genes de resistencia a antibióticos en nuestro organismo sintético no sea un problema.

Un bloqueo en V en forma de alteración molecular de uno o más sitios de inserción de casetes genómicos bacterianos en el microorganismo sintético puede hacer que el microorganismo sintético sea incapaz de adquirir genes de resistencia a

5 clases de antibióticos de especies de bacterias residentes que conviven en el bioma. Tal manipulación también impedirá la adquisición de genes de virulencia que podrían aumentar la posibilidad de eventos invasivos a través de la pared intestinal. El casete génico que confiere resistencia a los

10 antibióticos a las cepas de *Staph aureus* (SA) puede integrarse en el genoma de la célula receptora en un sitio particular. Este sitio podría eliminarse o cambiarse en un genoma de células, lo que hace que el sitio de aterrizaje ya no esté disponible para la secuencia de ADN entrante.

15 Mientras se demuestre que el bloqueo en V no interfiere con la capacidad de crecimiento del microorganismo sintético y haría que la adquisición del casete de resistencia por parte del organismo sea mucho menos probable.

EJEMPLOS

20 **Ejemplo 1. Estudios de campo, nicho de exclusión con microorganismos benignos:**

Estudios clínicos: supresión y reemplazo

Se diseñó un estudio clínico para identificar sujetos MRSA positivos, suprimir la cepa de MRSA, reemplazar el MRSA

25 mediante la administración de Bioplax-01 (es decir, MSSA 502a)

y volver a evaluar periódicamente la recurrencia de MRSA en los sujetos. La población de estudio provenía en gran medida del personal médico y estudiantes de medicina del área de Meerut. No se inscribieron sujetos sintomáticos en el
5 estudio.

Este es un estudio de "prueba del principio", que se realiza con materiales y métodos en gran parte no mejorados; cualquier resultado superior a 55% de no recurrencia se considerará una indicación de la eficacia potencial de estos
10 métodos. Cualquier resultado de 80% o más de no recurrencia se consideraría una fuerte indicación de la fortaleza técnica actual de este enfoque.

Propósito del estudio y criterios de valoración primarios:

1) Determinar la tasa de ocurrencia asintomática de
15 *Staphylococcus aureus* y MRSA en la población general, Meerut, UP (norte de la India), y calificar a los participantes para fases adicionales de este estudio;

2) Determinar la tasa de recurrencia de MRSA en participantes descolonizados de BioPlx;

20 3) Determinar la tasa de recurrencia de MRSA en participantes recolonizados con BioPlx01-WT;

4) Determinar la durabilidad de BioPlx01-WT para prevenir la recurrencia de MRSA (a 8 y 12 semanas);

5) Nivel de recurrencia del estudio aceptable = 40%,
25 nivel de recurrencia diana = 20%.

Los resultados del estudio se evalúan contra las tasas de recurrencia publicadas de fuentes revisadas por pares, con un promedio de 45% de recurrencia, 55% de no recurrencia.

La identificación y solicitud de posibles participantes se realizó con el total de participantes inscritos y evaluados: n=765. Los pacientes se extrajeron del personal médico y estudiantes de medicina de: Meerut University Medical College - LLRM Medical College (MUMC Hospital), Harish Chandra Hospital, Murti Hospital, Silver Cross Hospital, JP Hospital y Lokpriya Hospital, Dhanvantri Hospital, Jaswantrai Hospital. Todos los participantes firmaron una descripción en papel, un consentimiento informado y un documento de registro.

El personal de laboratorio realizó un hisopado (nasal) a los 765 participantes potenciales. El personal de laboratorio colocó todos los hisopos una placa de *Staphylococcus aureus* y una placa Cromagar de MRSA. Todas las placas se incubaron durante 24 horas a 37°C, el supervisor del estudio las leyó y calificó personalmente. Se tomaron fotografías de todas las placas en la lectura y se etiquetaron los resultados.

El total de participantes con hisopado nasal de *Staphylococcus aureus* positivo (MSSA y MRSA) fue 162 o 21.18%, en el extremo inferior de la tasa esperada para hisopado nasal solamente. La cantidad de participantes de MSSA solamente (no MRSA) fue 97 o 12.68%.

La cantidad de participantes MRSA positivos fue 65 u 8.50% de la población total evaluada.

El supervisor del estudio seleccionó a los participantes MRSA positivos (n=65) para el estudio de eficacia. El supervisor del estudio seleccionó a los participantes *Staphylococcus aureus* positivos para el estudio de irritación.

El estudio de eficacia se realizó con BioPlx01-WT (10^8) en PBS.

A los participantes MRSA positivos confirmados (n=65) se les informó sobre la duración de 12 semanas y el compromiso con el proceso. La duración del estudio se extendió a 6 meses. Los sujetos para el estudio de eficacia se dividieron como se muestra en la Tabla 10.

Tabla 10. Estudio de eficacia

MRSA positivos identificados	n = 65
MRSA positivos usados en grupos de tratamiento - descolonización/recolonización	n = 34
MRSA positivos usados en controles negativos - descolonización solamente	n = 15
MRSA perdidos por estudio (uso de antibióticos/abandono)	n = 04
MRSA positivos no usados	n = 12

Proceso de descolonización/recolonización

Descolonización.

Primero se realiza una descolonización completa en los participantes. A continuación, se muestra la confirmación de la erradicación de MRSA en sitios clave. La descolonización total del cuerpo se realiza con clorhexidina, la

descolonización nasal se realiza con mupirocina y se realizan
gárgaras con el antiséptico original de Listerine según la
sección "protocolo de descolonización". Después del curso
completo del proceso de descolonización (cinco días), se
5 administrará una prueba de MRSA de confirmación para
verificar que no haya MRSA presente en áreas clave, y una
prueba de *Staphylococcus aureus* para recopilar información
sobre los niveles de *Staphylococcus aureus* posteriores a la
colonización. Los participantes se sometieron a un proceso de
10 descolonización de cinco días, que se administró y observó
por el personal del estudio. La descolonización dérmica fue
realizada por el personal del estudio e incluyó (1)
aplicación de clorhexadina en aerosol en todo el cuerpo (4%),
(2) descolonización nasal (mucosa) con mupriocina (2%) y (3)
15 descolonización de la garganta (mucosa) mediante la
aplicación de Listerine, cada uno una vez al día durante 5
días. Los participantes se someten a un proceso de
descolonización de cinco días, administrado y observado por
el personal de BioPlx Pvt Ltd.

- 20 Dérmica - clorhexadina
- Nasal (mucosa) - mupriocina
- Garganta (mucosa) - Listerine

Los participantes se someten a un baño de
clorhexidina de cuerpo completo que descoloniza
25 completamente la piel y el cabello. También es cierto que

la clorhexidina tiene una actividad antibiótica residual que dura tanto como la capa externa de la piel está presente. Un período de espera de cinco días asegura que la capa externa de la piel se haya desprendido y que
5 cuando el sujeto se recolonice, BioPlx-01 no se inactive en el proceso.

Descolonización nasal. Para descolonizar la nariz y la garganta, los participantes deben usar un tratamiento de cinco días con antibióticos de mupiricina. Esto
10 descoloniza completamente las narinas (nariz).

Descolonización de la garganta. Para descolonizar la garganta, los participantes deben realizar gárgaras durante 30 segundos todos los días con Original Listerine. Esto descoloniza completamente la garganta.

15 La descolonización exitosa se caracteriza por un resultado de MRSA negativo para la nariz, la garganta y la axila. Con una descolonización exitosa, solo se requieren pruebas de seguimiento nasal en los puntos temporales posteriores. MRSA positivo en nariz o garganta
20 requiere una segunda ronda completa de proceso de descolonización. Los pacientes en esta categoría no pasan a la siguiente fase de estudio hasta que se descolonizan. MRSA positivo en axila no requiere una segunda ronda completa de descolonización y puede pasar a la siguiente
25 fase de estudio. El sitio de axila ahora debe incluirse

en todas las pruebas de MRSA posteriores.

Prueba de calificación posterior a la descolonización N-T-H-A - *Staphylococcus aureus* y MRSA para cada grupo de estudio (1, 2, 3). Hisopados tomados por el personal del laboratorio Garg. El personal del laboratorio Gard colocó todos los hisopos en placas de un *Staphylococcus aureus* y una placa Cromagar de MRSA. Todas las placas se incubaron en el laboratorio del Dr. Garg durante 24 horas. El Dr. Garg leyó y calificó personalmente todas las placas. Se tomaron fotografías de todas las placas en la lectura y se etiquetaron con los resultados del Dr. Garg. BioPlx Pvt Ltd registró todos los datos en papel y en formato digital. Todos los datos digitales se transmiten a BioPlx, Inc. para su archivo e ingreso en el sistema de registros. Este proceso se usó para todas las etapas del estudio de eficacia.

La recolonización se realizó con la aplicación de 1.2×10^8 cfu/mL de Bioplax-01 en solución salina amortiguada con fosfato (PBS), como se describe a continuación, alrededor de 15 mL una vez al día durante dos días consecutivos según el siguiente programa:

1.2×10^8 PRUEBAS DE RECOLONIZACIÓN Y CONTROL DE CALIDAD se realizaron dos días consecutivos;

1.2×10^8 PRUEBAS DE RECOLONIZACIÓN POSTERIORES - un día;

1.2×10^8 PRUEBAS DE RECOLONIZACIÓN POSTERIORES - una

semana; y

Observación semanal - semana 2 y posteriores.

Prueba de calificación posterior a la descolonización N-T-H-A - *Staphylococcus aureus* y MRSA se realizó para cada
5 grupo de estudio (1, 2, 3).

Las observaciones semanales incluyeron hisopados de los sujetos que fueron tomados por el personal de laboratorio. Los sitios anatómicos muestreados incluyeron narinas, garganta, axila, mano.

10 El personal de laboratorio colocó todos los hisopos una placa de *Staphylococcus aureus* y una placa Cromagar de MRSA. Todas las placas se incubaron durante 24 horas a 37°C. El director del estudio leyó y calificó personalmente todas las placas. Se tomaron fotografías de
15 todas las placas en la lectura y se etiquetaron con los resultados.

Controles negativos. Controles negativos posteriores a la descolonización n = 15; N.º de ID: 0021, 0022, 0060, 0512, 0704, 0724, 0731, 0218, 0234, 0239, 0249, 0302,
20 0327, 0037, 0221. Recurrencia de MRSA posterior a la descolonización n = 15: Ejecución de control negativo inicial (hoja semana 4 - semana promedio posterior a la descolonización 6) incluyó MRSA positivos n = 08; MRSA negativos n = 07, lo que da como resultado una recurrencia
25 = 53%. Una ejecución de control negativo final (hoja

semana 12 - semana promedio posterior a la descolonización
16) dio como resultado MRSA positivos $n = 09$; y MRSA
negativos $n = 06$, con una recurrencia = 60%.

Grupos de tratamiento 1, 2, 3. Descolonizado /
5 recolonizado (concentración de 8^{10} células): 34. El
descolonizado/recolonizado se dividió en tres grupos para
el estudio: GRUPO 1 BioPlx01-WT (10^8) en PBS $n = 10$; N.º
de ID: 0015, 0086, 0146, 0147, 0149, 0155, 0178, 0625,
0657, 0667. GRUPO 2 BioPlx01-WT (10^8) en PBS $n = 10$; N.º
10 de ID: 0063, 0075, 0124, 0138, 0172, 0325, 0444, 0478,
0483, 0538; y GRUPO 3 BioPlx01-WT (10^8) en PBS $n = 14$;
N.º de ID: 0064, 0112, 0158, 0232, 0336, 0488, 0497, 0498,
0499, 0552, 0574, 0692, 0725, 0735.

Recurrencia de MRSA posterior a la
15 descolonización/recolonización: 0; GRUPO 1 = 0; GRUPO 2 =
0; GRUPO 3 = 0. Duración del MRSA negativo posterior a la
descolonización: 18 semanas = 16 casos: 0 recurrencia; y
17 semanas = 18 casos: 0 recurrencia.

Rendimiento de recolonización detectable

20 Los sujetos en el estudio de eficacia se evaluaron
para detectar resultados positivos de *Staphylococcus*
aureus para detectar la presencia de BioPlx 01 WT de
reemplazo mediante discos de penicilinas. Los resultados
se muestran en la Tabla 11.

Tabla 11. *Staphylococcus aureus* positivos (NvTvHvA)

5

SA positivos	Día/semana posterior a la colonización; +/-total
97.1% (Grupo 1 y 2 y 3)	día 01; 33/34
91.2% (Grupo 1 y 2 y 3)	semana 01; 31/34
100% (Grupo 1 y 2 y 3)	semana 02; 34/34
97.1% (Grupo 1 y 2 y 3)	semana 03; 33/34
91.2% (Grupo 1 y 2 y 3)	semana 04; 31/34
100% (Grupo 1 y 2 y 3)	semana 05; 34/34
88.2% (Grupo 1 y 2 y 3)	semana 06; 30/34
79.5% (Grupo 1 y 2 y 3)	semana 08; 27/34
67.7% (Grupo 1 y 2 y 3)	semana 10; 23/34
85.3% (Grupo 1 y 2 y 3)	semana 12; 29/34
100% (Grupo 1 y 2 y 3)	semana 14; 20/20

La duración del estudio se extendió a seis meses. Al finalizar el estudio, los *Staphylococcus aureus* positivos mostraron 100% de un efecto de exclusión total de más de 26 semanas del proceso de descolonización/recolonización de MRSA BioPlx-01 con el producto BioPlx en comparación con la bibliografía anterior que demuestra la recurrencia de 45% de la colonización nasal por *Staphylococcus aureus* a las 4 semanas y 60% a las 12 semanas con el método de descolonización estándar solo.

Estudios de irritación

Como se describió anteriormente, el supervisor del estudio (Dr. Garg) seleccionó a los participantes MRSA positivos para el estudio de eficacia. El supervisor del estudio seleccionó a los participantes *Staphylococcus aureus* positivos para el estudio de irritación. Los pacientes con MRSA requieren mucho esfuerzo para el cribado, por lo que se intentó preservarlos para la evaluación de eficacia principal

del estudio. Las tasas de colonización de MRSA no positivos son de alrededor de 33% a 66% de todos los participantes cribados, por lo que hubo un suministro más abundante de ellos. Debido a que MRSA es una cepa de *Staphylococcus aureus* resistente a los antibióticos, las pruebas de irritación en los participantes *Staphylococcus aureus* positivos son equivalentes a las pruebas de irritación en los participantes MRSA positivos.

Se realizaron estudios de irritación en 55 sujetos *Staphylococcus aureus* positivos mediante la administración tópica de alrededor de 5 mL de BioPlx-01 (502a), a 1.2×10^7 CFU/mL en PBS, en el antebrazo derecho. El brazo izquierdo sirvió como control negativo. Los antebrazos fueron observados y fotografiados por el personal del estudio en el día 1, el día 4 y el día 7 posteriores la aplicación para observar enrojecimiento o desarrollo de pústulas. No se realizó ninguna etapa de supresión durante el estudio de irritación. No se observaron irritación ni eventos adversos.

Condiciones de cultivo

Los estudios de eficacia usaron BioPlx-01 (1.2×10^8 CFU/mL) en comprimidos de solución salina amortiguada con fosfato BP2944100 PBS (Fisher) disueltos en agua para proporcionar 100 mM de amortiguador de fosfato, 2.7 mM de KCl y 137 mM de NaCl, pH 7.4 a 25°C.

Las reservas maestras se prepararon de la siguiente

manera. La cepa BioPlx-01 se sembró por estría en placas de agar de soja triptico (TSA) en forma de cuatro rayas. Después de 20 h a 37°C, se usó un nuevo bolo de células para inocular asépticamente un matraz de caldo de soja triptico estéril (TSB). Este cultivo se incubó a 37°C con agitación a 250 rpm durante 18 h. Se agregó 50% de glicerol estéril al cultivo hasta 5% (v/v) final y el lote se dividió en alícuotas en tubos de tapón de rosca de polipropileno de 50 mL estériles. Las alícuotas se congelaron a -20°C. Para el control de calidad, se descongeló una alícuota, se volvió a suspender por completo mediante una agitación vigorosa y se diluyó para la determinación de unidades formadoras de colonias (CFU) por mL mediante incubación en placas de agar con infusión de cerebro y corazón (BHI) durante 18 h a 37°C. Los valores de CFU se calcularon a partir de los recuentos de colonias corregidas por dilución. Un lote de la reserva maestra de BioPlx-01 concentrada producido de esta manera contenía 8×10^9 CFU/mL de BioPlx-01. La identidad fenotípica de la cepa se confirmó mediante incubación en medio indicador cromogénico estafilocócico HiChrom durante 18 h a 37°C, que produjo solo las colonias verdes esperadas. El material no produjo colonias cuando se incubó en placas indicadoras cromogénicas de MRSA.

Preparación de la reserva de trabajo para el estudio de eficacia 1.2×10^8 CFU/mL

Una alícuota de 10 mL de reserva concentrada BioPlx-01 que está a 8×10^9 CFU/mL se descongeló completamente y luego
 5 se agitó durante 1 minuto completo para mezclar. Se agregaron 8.5 mL de esta solución a 275 mL de PBS estéril (temperatura ambiente), lo que generó una reserva de 2.4×10^8 CFU/mL. Esto se mezcló bien mediante inversión y se almacenó a 4°C hasta su uso. Como se usa en los estudios de eficacia, para
 10 proporcionar una solución de trabajo 1.2×10^8 matriz de PBS-BioPlx-01, se mezcló un vial de la solución " 2.4×10^8 CFU/mL" mediante inversión vigorosa y se agregaron 200 mL de esta a 200 mL de PBS para crear una "solución de trabajo 1.2×10^8 CFU/mL BioPlx-01". Esta última solución fue el material
 15 aplicado a los sujetos en los estudios de eficacia. La botella se cerró herméticamente, se mezcló mediante agitación y se almacenó a 4°C hasta su uso.

Ejemplo 2. Selección de uno o más promotores inducibles

En este ejemplo, se evaluaron los candidatos promotores.
 20 El factor de inducción y la expresión basal de 6 candidatos promotores en una cepa de MSSA BioPlx-01 se evaluaron mediante incubación con sangre y suero humanos. La expresión se normalizó a un gen de mantenimiento (*gyrB*) y se comparó con la de las células que crecen logarítmicamente en medios
 25 líquidos de caldo de soja triptico (TSB).

El BioPlx-01 se cultivó hasta la mitad de la fase logarítmica (2 OD/mL) y luego se lavó en un gran volumen y se cambió a suero recién recolectado y sangre heparinizada del donante TK.

5 Las muestras se incubaron en un matraz ventilado con agitación lenta a 125 rpm; y las muestras se retiraron para el aislamiento de ARN a los 15, 45 o 75 minutos a 37°C. Las bacterias recolectadas se lavaron y el ARN se extrajo con el kit Qiagen Allprep, se eluyó y se congeló el ARN. El ADN
10 codificante (cADN) se preparó a partir del ARN y la expresión génica diana se evaluó mediante PCR en tiempo real (Taqman) en un instrumento ABI 7500 Fast.

Los niveles de ARN relativos se determinaron mediante interpolación contra una curva estándar ejecutada en una
15 muestra de cADN común que se diluyó en serie y se evaluó con cebadores/sondas específicos para ORF impulsados por cada uno de los 5 promotores sensibles al suero putativos (*P_{hlgA}*, *P_{leuA}*, *P_{sstA}*, *P_{sirA}*, *P_{isdA}*) y una sonda para un gen candidato que se regula de manera ascendente en *Staphylococcus aureus* en la
20 piel durante la colonización, pero no se informa que se regula de manera ascendente en la sangre, para usarse en una estrategia de abrazadera de expresión (*P_{clfB}*).

La expresión de todos los genes se normalizó al gen de mantenimiento *gyrB* (una subunidad de la girasa) ampliamente
25 usado para este propósito en *Staphylococcus aureus*. Ct se

determinó mediante rt PCR. Ct, ciclo umbral de PCR, es la cantidad de ciclos en una fluorescencia dada; cuanto mayor es la cantidad del gen (mARN), menor es el Ct.

Los resultados preliminares con suero de un solo donante se muestran en la Tabla 12.

Tabla 12. Efecto de la exposición al suero en la activación de los candidatos promotores KS en BioPlx-01 y los niveles de expresión basal en TSB

Gen	Aumento del factor de inducción en la expresión en muestras tratadas con suero mediante PCR en tiempo real	Expresión basal Relación LeuA/GyrB en TSB
<i>hlgA</i> (hemolisina gamma)	30	0.19
<i>leuA</i> (enzima biosintética de AA)	7.7	0.75
<i>sstA</i> (transporte de hierro)	12.8	0.33
<i>sirA</i> (transporte de hierro)	1.2	0.95
<i>isdA</i> (transportador de hemo)	1.7	0.59
<i>clfB</i> (factor de aglutinación B)	1.3	0.78

El transcurso del tiempo de inducción del promotor candidato *P_{hlgA}* en suero humano se muestra en la Figura 6 que muestra una relación *hlgA/gyrB* en TSB de 0.19, favorable para usarse en el constructo de interruptor de inactivación. "Sin RT": el cADN hecho a partir de ARN de punto temporal de 75 min se diluyó en una reacción a la misma dilución que todas las otras muestras; si la preparación de ARN carece de gADN, no debe verse ninguna señal. El transcurso del tiempo de *sstA* en suero humano se muestra en la Figura 7 que muestra la relación *sst/gyrB* en TSB que fue de 0.33. *P_{hlgA}* y *P_{sstA}* se seleccionaron como candidatos preferidos preliminares para una evaluación adicional. Los niveles de *hlgA* en TSB fueron

sólo 1/5 de gen de mantenimiento *gyrB*, o menor, en TSB por lo que este promotor se convirtió en un candidato líder.

El experimento se repitió con suero y sangre de dos donantes con análisis de ARN total, excepto que los cADN se trataron con ADNasaI para eliminar el ADN genómico contaminante. Específicamente, las muestras de ARN se trataron con el kit de ADNasa turbo siguiendo el protocolo del kit para el tratamiento y la inactivación de ADNasa. El control "sin transcripción inversa" (control sin RT) con ADNasa estaba en el nivel de bkg/valor inicial, por lo tanto aceptable.

El ARN tratado luego se usó para producir cADN (y se ejecutó nuevamente un control sin RT). El cADN se analizó (al comenzar con *hlga* y *sstA*) mediante Taqman con triplicados técnicos. Los resultados se muestran en la Tabla 13.

Tabla 13. Selección del promotor: Efecto de la exposición a suero y sangre en la activación de los candidatos promotores KS en BioPlx-01 y los niveles de expresión basal en TSB

Promotor	Factor de inducción a los 15 min			Expresión "permeable"	¿Inducción sérica >3 veces durante 75 min?
	Suero (donante 1)	Suero (donante 2)	Sangre (donante 2)	Diana/GyrB (TSB)	
ISDA	83	15	4.1	0.002, 0.022	sí
SSTA	9	6.7	0.3	0.16, 0.333	sí
LEUA	1393	1601	990	0.0013, 0.000017	sí
HLGA	27	6	35	0.23, 0.26	sí
SIRA	5.5	2.6	0.08	0.25, 1.1	no

P_{isdA}, *P_{sstA}*, *P_{sirA}* se eliminaron en función de los datos que se muestran en la Tabla 13. *P_{sstA}* se eliminó debido a la expresión basal significativa, y no se indujo en sangre. *P_{sirA}* también se eliminó debido a la
5 expresión basal significativa, y la inducción de baja magnitud en suero, y no se indujo en sangre, además de exhibir una inducción que no fue sostenida.

En función de este experimento, se seleccionó *P_{leuA}* como un promotor preferido porque exhibía una
10 regulación ascendente muy alta en suero, una expresión basal muy baja en TSB, y no se regulaba de manera ascendente durante la colonización. Se puede emplear una abrazadera de expresión, pero puede ser opcional cuando se usa *P_{leuA}* como promotor. *P_{leuA}* también exhibió
15 una fuerte activación por exposición a sangre o suero en Malachawa 2011 (micromatrices) y en el presente ejemplo. *leuA* es parte de un operón de nueve genes: *ilvDBHC*, *leuABCD*, *ilvA*. Un factor denominado Cody se fija a la RR para reprimir la transcripción cuando está
20 fijado a aminoácidos de cadena ramificada (leucina, isoleucina y valina), por lo que cuando los niveles de aminoácidos libres están por encima de un umbral, el promotor es silencioso. En los ensayos de colonización nasal ex vivo porcinos con MRSA, los operones
25 biosintéticos de aminoácidos, incluido *leu*, no estaban

regulados de manera ascendente, y los autores proponen que los aminoácidos estén presentes en una cantidad suficiente durante la colonización para evitar la regulación ascendente de estas vías (Tulinski et al., 5 2014).

El gen *leuA* se activa muy fuertemente en sangre y suero y tiene una expresión basal baja, por lo que es importante comprenderlo mejor. *leuA* está dentro del segundo de dos casetes en un operón de nueve genes; la 10 región reguladora que lo impulsa puede estar inmediatamente dirección 5' de *ilvD* o dirección 5' de *leuA*. Una forma de comprender es evaluar y comparar ambas variantes.

ilvDBHC-leuABCD-ilvA

15 *PhlgA* se seleccionó como otro promotor preferido porque exhibía una alta regulación ascendente en suero y sangre, y una regulación descendente durante la colonización nasal. Un inconveniente de *Phlg* es la expresión basal en TSB; que puede abordarse al incluir 20 una abrazadera de expresión para *hlgA*. El péptido HlgA es una subunidad de una toxina formadora de poros y secretada que lisa los glóbulos rojos y los leucocitos del hospedero. HlgA (clase S) se asocia con HlgB (clase F) por lo que forman una toxina AB en cepas que 25 producen tanto hemolisinas gamma como leucocidinas

(HlgA y LukF-PV también pueden formar un complejo).

La transcripción del operón HlgA está regulada de manera ascendente en TSB mediante la detección de *quorum* de activación de *agr*, pero *agr* está regulado de
5 manera descendente en suero mientras que *hlgA* está regulado de manera ascendente, por lo que la regulación ascendente de *hlgA* es independiente de la vía *agr* en suero. En un artículo, las hemolisinas se regularon de manera descendente 5.7 veces en comparación con TSB
10 durante la colonización, específicamente, los explantes nasales porcinos colonizados con MRSA ST398; ver Tulinski et al 2014. Sin embargo, en estos experimentos, no se observó evidencia de expresión de *hlgA* durante la colonización. El regulador *sarT* reprime
15 la transcripción del operón de hemolisina y puede ser una "abrazadera de expresión" útil si se usa *P_{hlgA}* para impulsar el KS, por ejemplo, mediante sobreexpresión de *sarT* de un promotor de colonización.

En otra modalidad, un microorganismo sintético
20 comprende al menos una modificación molecular que comprende un primer gen de muerte celular ligado operativamente a una primera región reguladora que comprende una multiplicidad de promotores que se activan por suero o sangre, pero que exhiben poca o
25 ninguna expresión en la piel o mucosa humana o en TSB.

Hay más certeza de una menor expresión en la piel para *hlgA*, porque se regula de manera descendente en la colonización. Hay más certeza de una menor expresión en TSB para *leuA*.

5 Ejemplo 3. Selección de uno o más genes de muerte

En este ejemplo, los candidatos de genes de muerte celular se evalúan para preparar un microorganismo sintético que tiene al menos una modificación molecular que comprende un primer gen de muerte celular ligado operativamente a una primera región reguladora que comprende un primer promotor inducible. Se desconocen las potencias relativas de los genes de muerte. Lo que parece ser el mejor gen de muerte no es necesariamente el más potente debido a la expresión permeable. La diversidad del mecanismo de acción podría dar como resultado la sinergia de inactivación para dos o más combinaciones de genes de muerte. Los candidatos de genes de muerte incluyen: *SprA1*: alteración de la membrana; *sma1*: destrucción del genoma; y *rsaE*: bloqueo del metabolismo central. Diversas combinaciones de genes de muerte se muestran en la Tabla 14. Estos plásmidos son plásmidos creados y secuenciados para la prueba de variantes de KS impulsadas por *P_{leuA}* y *P_{hlgA}*.

Tabla 14. Constructos de KS de gen de muerte

	N.° de cepa	Nombre del plásmido	Promotor	Gen de muerte (PCD)	Propósito	Comentarios
5	1	pTK1	Cadmio inducible	<i>SprA1</i>	Control + muestra que <i>sprA1</i> <i>SprA1</i> es un gen de muerte funcional	Las células en TSB tratadas con Cd deberían morir rápidamente
	1A	pTK2	Cadmio inducible	<i>sprA1</i> <i>SprA1</i> inverso	Control negativo	Las células en TSB tratadas con Cd NO deberían morir rápidamente
	2	pTK3	LeuA	<i>sprA1</i> <i>SprA1</i>	KS	Las células cambiadas a suero o sangre deberían morir rápidamente
10	3	pTK4	LeuA	<i>sprA1</i> <i>SprA1</i> inverso	Plásmido más fácilmente obtenible que el n.° 2	Comparar frecuencia de inserción con el n.° 2
	4	pTK5	LeuA	<i>sprA1</i> <i>SprA1</i> + CLFB:: <i>sprA1</i> <i>SprA1</i> as	KS	Variante de abrazadera de expresión del n.° 2
	5	pTK6	HlgA	<i>sprA1</i> <i>SprA1</i>	KS	Puede que no sea saludable o que incluso se pueda obtener una exp. basal
15	6	pTK7	HlgA	<i>SprA1</i> + CLFB:: <i>SprA1</i> as	KS	Probablemente más saludable que el n.° 5
	7	pTK8	Cadmio inducible	enzima de restricción de <i>sma1</i>	Control +	Las células en TSB tratadas con Cd deberían morir rápidamente
	8	pTK9	HlgA	enzima de restricción de <i>sma1</i>	KS	Abrazadera de expresión realizada mediante antisentido
20	9	pTK10	LeuA	enzima de restricción de <i>sma1</i>	KS	Abrazadera de expresión realizada mediante antisentido
	10	pTK11	Cadmio inducible	sARN de <i>rsaE</i>	Control +	Las células en TSB tratadas con Cd deberían morir rápidamente
	11	pTK12	HlgA	sARN de <i>rsaE</i>	KS	Abrazadera de expresión realizada mediante antisentido
	12	pTK13	LeuA	sARN de <i>rsaE</i>	KS	La abrazadera de expresión no existe, pero se podría realizar mediante antisentido

Los genes de muerte se pueden obtener en el comercio (Atum) y el vector también se puede obtener en el comercio

(BEI). Las combinaciones que comprenden dos genes de muerte se construyen después de que se obtienen los resultados de genes de muerte únicos. Los plásmidos sintéticos, los vectores y los microorganismos sintéticos se preparan en
5 función de la Tabla 14.

Las etapas para crear una cepa sintética que comprende un gen de muerte celular son las siguientes.

1. Producir el vector transportador pCN51 a mediana escala en *E. coli*.
- 10 2. Clonar genes de muerte en pCN51 en *E. coli* (bajo P_{cad} inducible por Cd).
3. Reemplazar P_{cad} con promotores sensibles al suero; e insertar la abrazadera de expresión donde corresponda.
4. Verificar las construcciones mediante secuenciación
15 de los casetes de KS.
5. Electroporar en *Staphylococcus aureus* RN4220 y seleccionar transformantes en placas de eritromicina (esta cepa tiene menos restricción y genera el patrón de metilación correcto para sobrevivir en BioPlx-01). RN4220 es una cepa de
20 *Staphylococcus aureus* usada como un intermediario; menos restricción, metilación +; número de producto BEI NR-45946.
6. Preparar el plásmido a partir de RN4220 y la digestión de restricción para confirmar la ID.
7. Electroporar plásmidos en BioPlx-01 y seleccionar en
25 placas de eritromicina.

8. Cepas de microorganismos sintéticos listas para el experimento con suero.

Las etapas para evaluar una cepa de microorganismo sintético que tiene al menos una modificación molecular que
5 comprende un primer gen de muerte celular ligado operativamente a una primera región reguladora que comprende un primer promotor son las siguientes.

1. Crecimiento en TSB más antibiótico como presión selectiva para el plásmido.

10 2. ¿Cómo se compara el crecimiento con WT Bioplax-01? Preparar la curva de crecimiento.

3. Variantes del promotor Cd: lavar y cambiar las células al medio Cd (el control es WT Bioplax-01 que contiene un vector vacío sin gen de muerte).

15 4. Variantes de KS: lavar y cambiar las células al suero (el control es WT Bioplax-01 que contiene un vector vacío sin gen de muerte).

5. Monitorear el crecimiento mediante el uso de OD_{630 nm} con lector de placas (período prolongado, monitorear la
20 aparición de mutantes de escape).

6. Para el análisis de sangre, solo realizarlo en los candidatos seleccionados y usar CFU en agar TSB como lectura de muerte.

7. Si hay mutantes de escape aparentes, transportar el
25 plásmido a *E. coli* y secuenciar el plásmido completo.

Los plásmidos se pueden preparar a partir de productos disponibles en el comercio. En una modalidad, pCN51 (6430 bp) es el plásmido comercial para modificación. pCN51 es un vector transportador de *E. coli*-SA, con ampR para la selección de *E. coli* y ermC para la selección de *Staphylococcus aureus*. Este es un plásmido de círculo rodante de bajo número de copias basado en pT181, que contiene un promotor inducible por cadmio y un terminador BLA. Número de producto BEI NR-46149. Son posibles combinaciones de variantes de KS en un plásmido. Es posible insertar más de un KS en el MCS de un plásmido vector transportador.

1. Se solicitan los 3 constructos que codifican los 3 genes de muerte a Atum/DNA2.0, con sitios de restricción ubicados estratégicamente en los extremos de cada gen para la clonación direccional.

2. El vector transportador pCN51 (BEI NR-46149), RN4220 *Staphylococcus aureus* (BEI NR-45946) y DC10B *E. coli* (BEI NR-49804) se solicitan a BEI Resources.

3. Los oligonucleótidos de ADN que se muestran en la Tabla 15 se solicitan para: i) amplificación por PCR de las RR a partir de BioPlx-01 gADN, con enzimas de restricción en los extremos para la clonación direccional y ii) secuenciación de ADN de constructos de KS.

Tabla 15: oligonucleótidos usados para secuenciar constructos de KS

	Nombre del oligo	Secuencia (5' a 3')	Propósito
5	TKO1	gatgcGCATGCGAAACAGATTATCTATTC (SEC. ID NO.: 9)	Amplificación por PCR de P _{leuA} con Sph1 (pr corriente arriba)
	TKO2	gatgcGCATGCCAGATTATCTATTCAAAG (SEC. ID NO.: 10)	Amplificación por PCR de P _{leuA} con Sph1 (alternativa a pr corriente arriba)
	TKO3	catgatCTGCAGAGTAAATCCCCCGTAAATT (SEC. ID NO.: 11)	Amplificación por PCR de P _{leuA} con Pst1 (pr corriente abajo)
	TKO4	cacgtgatCTGCAGAGTAAATCCCCCGTAAA (SEC. ID NO.: 12)	Amplificación por PCR de P _{leuA} con Pst1 (alternativa a pr corriente abajo)
	TKO5	gactacGAATTC AGGTGATGAA AAATTTAGAA (SEC. ID NO.: 13)	Cebador corriente arriba para amplificar P _{clfB} con EcoRI
10	TKO6	gactacGAATTCGATGAA AAATTTAGAACTT (SEC. ID NO.: 14)	Copia de seguridad de TKO5
	TKO7	cttagctGGATCCAAATATTACTCCATTTCAA (SEC. ID NO.: 15)	Cebador corriente abajo para amplificar P _{clfB} con BamHI
	TKO8	cttagctGGATCCAAATATTACTCCATTTCAATTTT (SEC. ID NO.: 16)	Copia de seguridad de TKO7
	TKO9	gatgcGCATGC TCACAACTA TTGCGAAATC (SEC. ID NO.: 17)	Cebador corriente arriba para amplificar el P _{hlgA1} contiene Sph1
	TKO10	gatgcGCATGC AAATA TTGCGAAATC CATTC (SEC. ID NO.: 18)	Copia de seguridad de TKO9
15	TKO11	catgatCTGCAG ATATATAATAATCCATTTGT (SEC. ID NO.: 19)	Cebador corriente abajo para amplificar P _{hlgA1} contiene PstI
	TKO12	catgatCTGCAGATATATAATAATCCATTTGTAAGCG (SEC. ID NO.: 20)	Copia de seguridad de TKO11
	TKO13	GTGTTACGATAGCAAATGCA (SEC. ID NO.: 21)	Primer cebador sentido para secuenciar constructos que contienen P _{cad}
	TKO14	TTATTGGCTAAGTAGACGCA (SEC. ID NO.: 22)	Segundo cebador de secuenciación sentido recocado aproximadamente en el medio del gen <i>sprA1</i>
	TKO15	CACATGTTCTTCTCGCGTT (SEC. ID NO.: 23)	Cebador para recocer solo corriente arriba del P _{leuA} y P _{hlgA} sensibles al suero. Recocado en el vector pCN51 alrededor de 75 nt corriente arriba del sitio Sph1
20	TKO16	ACGCGGCCTTTTACGGTTC (SEC. ID NO.: 24)	Copia de seguridad para TKO15
	TKO17	GAATGGGACTTGTAACGTC (SEC. ID NO.: 25)	cebador para recocer cerca de un tercio corriente abajo del P _{leuA} porque es un segmento bastante grande y es posible que TKO15 no se lea completamente
	TKO18	GAATGGGACTTGTAACG (SEC. ID NO.: 26)	Copia de seguridad para TKO17
	TKO19	ATAACGCCTGCGACCAATA (SEC. ID NO.: 27)	cebador para recocer cerca de un tercio corriente abajo del P _{hlgA} porque es un segmento bastante grande y es posible que TKO15 no se lea completamente
	TKO20	GCGACCAATAAATCTTTTAA (SEC. ID NO.: 28)	Copia de seguridad para TKO19

CLONACIÓN

Todos los geles de agarosa de electroforesis en gel son 1.0-2.0% de agarosa en amortiguador TAE 1X y verde midori (Nippon Genetics Europe GmbH) agregados de acuerdo con las

instrucciones del fabricante.

Ejemplo 3A. CONSTRUCCIÓN de pTK1 y pTK2

1. Preparar cantidades de minipreparación de pCN51 y de plásmidos de *sprA1*, *sma1* y *rsaE* de la siguiente manera:

- 5 A. Sembrar por estría las cepas en placas de LB + carbenicilina (100 µg/mL) e incubar 15-18 h a 37°C.
- B. Inocular LB + carbenicilina (100 µg/mL) de líquido con una sola colonia de cada uno e incubar con agitación (240 rpm) durante 15-18 h a 37°C.
- 10 C. Preparar minipreparaciones replicadas 5X de cada cepa con el kit de minipreparación de centrifugación Qiagen de acuerdo con las instrucciones del fabricante, eluir el ADN de cada columna con 30 µL y agrupar las preparaciones de plásmidos replicados (congelar el ADN a -20°C).

15 2. Digestiones, ligadura, colocación en placas

- 2.1. Cortar pCN51 con PstI y EcoRI para linealizar (37°C, 30 min). El tamaño esperado es de ~6400 bp (un fragmento de 35 bp del sitio de clonación múltiple (MCS) se retira/no es visible en el gel).
- 20 2.2. Cortar el plásmido pCN51 con KpnI y BamHI para linealizar (37°C, 30 min). El tamaño esperado es de 6400 bp (se retira un fragmento de 35 bp del MCS).
- 2.3. Cortar el plásmido *sprA1* de DNA2.0 con PstI y EcoRI para liberar el inserto de *sprA1* de 233 bp deseado.
- 25 2.4. Cortar el plásmido *sprA1* de DNA2.0 con KpnI y BamHI para

liberar el inserto de *sprA1* de 233 bp deseado.

2.5. Durante la digestión del ADN, verter un gel que sea 1.5% de gel de agarosa para electroforesis como se describe.

2.6. Agregar 8 μ L de colorante de carga 6X a las 4 reacciones
5 y a la escala de 1 kb más la escala de tamaño del ADN (3 μ L en 30 μ L).

2.7. Ejecutar el gel a 100 V durante 1.5 h.

2.8. Extirpar las bandas de interés mencionadas anteriormente con una cuchilla de afeitar limpia.

10 2.9. Fundir las porciones en 3 volúmenes de amortiguador QG del kit de extracción de gel Qiagen (56°C) mediante agitación en vórtice ocasionalmente.

2.10. Aislar el vector emparejado e insertar juntos en una columna y eluir el material en 30 μ L de amortiguador de
15 elución de Qiagen.

A. Inserto de Pst1 + EcoRI más vector Pst1/EcoRI pCN51.

B. Inserto de Kpn1 + BamHI más Kpn1/BamHI pCN51.

2.11. Preparar un baño de agua mediante la adición de un poco de hielo a 500 mL de agua a RT en una caja de espuma de
20 poliestireno; agregar suficiente hielo para alcanzar 16°C.

2.12. Agregar 3.4 μ L de amortiguador de ADN ligasa T4 10X y mezclar. Agregar 1 μ L de ADN ligasa T4 (4×10^5 U/mL de reserva de NEB) e incubar durante 2 h a 16°C.

2.13. Ajustar la unidad de electroporación a 1500 V/200
25 ohmios /25 μ F.

2.14. Descongelar 2 viales de DH5 α *E. coli* y agregar 40 μ L en cada uno en 2 tubos Eppendorf. Enfriar 2 cubetas de electroporación en hielo.

2.15. Agregar 1 μ L de ligadura sin diluir a 40 μ L de la DH5 α *E. coli* descongelada y transferir a una cubeta de electroporación helada con espacio de 1 mm.

2.16. Tener listo: 1 mL de medio SOC en una pipeta de 1 mL, puntas estériles de 1 mL y 2 tubos de cultivo estériles de 14 mL

2.17. Electroporar las células (ligadura A primero) y luego, lo antes posible, agregar 1 mL de SOC a la cubeta, mezclar con la pipeta hacia arriba y hacia abajo 6X, y transferir todo el volumen a un tubo de cultivo nuevo de 14 mL para su recuperación. Repetir este proceso para la electroporación de la ligadura B. Colocar las dos muestras de recuperación en el baño de agua con agitación a 37°C durante 1 h.

2.18. Colocar 2 placas de agar de LB + cabenicilina (100 μ g/mL) invertidas con sus tapas levemente cerradas en la incubadora a 37°C (no humidificada) mientras las células se recuperan.

2.19. Después del período de recuperación de 1 h, retirar y etiquetar las placas de agar de LB + cabenicilina (1050 μ g/mL) en consecuencia, y retirar los tubos de 14 mL del baño de agua.

2.20. Usar microesferas de vidrio estériles, esparcir 150 μ L

de cada mezcla de recuperación de 1 mL en una placa.

2.21. Colocar las placas en la incubadora a 37°C durante 16-18 h.

2.22. Registrar recuentos de colonias para

5 Ligadura A ($P_{cad}::sprA1$ directo) y

Ligadura B ($P_{cad}::sprA1$ inverso).

3. Cribado para detectar positivos:

3.1. Elegir 6 colonias para cribado

3.2. Inocular 6 colonias de ligadura A y 6 de ligadura B,
10 cada una en 3 mL de LB + cabenicilina líquida (1050 µg/mL) en un tubo de cultivo de 14 mL.

3.3. Agitar durante 16 h a 37°C.

3.4. Aislar los ADN plasmídicos mediante el uso del mini kit de centrifugación Qiagen de acuerdo con las instrucciones del
15 fabricante, y eluir el ADN en 40 µL de amortiguador de elución.

3.5. Digerir 5 µL de cada uno de los 12 ADN plasmídicos con

A. PST1 más ECOR1

B. Kpn1 + BamHI

20 C. Xmn1 solo

Mezclar para 7 reacciones si Pst1+EcoRI. Agregar 5 µL de solución de ADN a 15 µL de mezcla de digestión e incubar 2 h a 37°C. Hacer lo mismo para las digestiones Kpn1 + BamHI y Xmn1.

25 Comparar con los patrones de gel esperados: patrón correcto

para digestiones de pTK1: i) EcoRI y PstI; ii) KpnI y BamHI; iii) XmnI. Patrón correcto para digestiones de pTK2: i) EcoRI y PstI; ii) KpnI y BamHI; iii) XmnI.

Ejemplo 3B. Elaboración de pTK3 (*P_{leuA}::sprA1*), pTK6 (*P_{hlgA}::sprA1*) y pTK4 (*P_{leuA}::sprA1* inverso)

1. Extraer el gADN de un cultivo en fase logarítmica de BioPlx-01 mediante el uso del kit Qiagen "All prep".
2. Digerir pTK1 SprA1 con SphI y PstI para eliminar el promotor inducible por cadmio (*P_{cad}*).
- 10 3. Amplificar por PCR la región reguladora de *leuA* (*P_{leuA}*) del gADN Bioplax-01 mediante el uso de cebadores de PCR que contienen la secuencia de restricción SphI dirección 5' y la secuencia de restricción Pst-1 dirección 3'. (Secuencias de TK01 y TK03 a continuación; o copias de seguridad de TK02 +
- 15 TK04). Verificar la restricción con electroforesis en gel como se describió anteriormente.

Mezcla de PCR:

- 1.0 µL de gADN de 50 ng/µL de BioPlx-01
- 25.0 µL de agua dI
- 20 10.0 µL de amortiguador de HF 5X
- 5.0 µL de mezcla de dTNP 2mM
- 4.0 µL de cebador TK01 (5 pmol/µL de reserva)
- 4.0 µL de TK03 (5 pmol/µL de reserva)
- 1.0 µL de polimerasa Phusion NEB

50.0 μ L en total

Ciclos:

98°C durante 2 min

20 ciclos de: 98°C 15 s - 64°C 30 s - 72°C 1 min

5 15 ciclos de: 98°C durante 15 s - 55°C durante 30 s - 72°C durante 1 min

Mantenimiento: 4°C, indefinidamente

4. Amplificar por PCR la región reguladora de *lhlgA* (*P_{hlgA}*) del gADN Biopl_x-01 mediante el uso de cebadores de PCR que
10 contienen la secuencia de restricción Sph1 dirección 5' y la secuencia de restricción Pst-1 dirección 3'. (TK09 y TK011 o copia de seguridad de TK010 o TK012). Las condiciones de PCR son como las anteriores para *P_{leuA}* excepto por la identidad de los cebadores.

15 5. Con el kit de limpieza de PCR Qiagen, limpiar las reacciones de PCR y eluir en 43 μ L de amortiguador de elución.

6. Cortar el producto de PCR *P_{leuA}* de la etapa 3 y el producto de PCR *P_{hlgA}* de la etapa 4 con Sph1 y Pst1. Hacer esto al
20 agregar 5 μ L de CutSmart (NEB) 10X y 1 μ L de cada uno de Sph1 y Pst1 e incubar durante 2 h a 37°C.

7. Digerir pTK1 con Sph1/Pst1.

8. Fraccionar la digestión de pTK1 Sph/Pst y los *P_{leuA}* y *P_{hlgA}* digeridos con Sph/Pst en 1.5% de gel de agarosa y extirpar la
25 cadena principal de pTK1 de ~6000 y los fragmentos de *P_{leuA}*

(390 bp) y *P_{hlgA}* (253 bp) con una cuchilla de afeitar limpia.

9. Dividir la porción de la cadena principal de pTK1 en dos y combinar una mitad con la porción de *LeuA* y la otra mitad con la porción de *HlgA*. Fundir y aislar juntas mediante el uso
5 del kit de extracción de gel Qiagen. Eluir cada uno en 30 µL de EB.

10. Agregar 3.4 µL de amortiguador de ADN ligasa T4 10X y 1 µL de ADN ligasa T4, e incubar a 16°C durante al menos 1 h.

11. Seguir las etapas en la sección 2.13-2.22 para la
10 electroporación, la recuperación y la colocación de colonias en placas.

12. El objetivo de las dos ligaduras es generar *P_{leuA}::sprA1* wt en la orientación directa (pTK3) y *P_{hlgA}::sprA1* wt en la orientación inversa (pTK6).

15 **Ejemplo 3C. Elaboración de pTK4 (realizar las etapas simultáneamente con pTK3)**

1. Extraer el gADN de un cultivo en fase logarítmica de BioPlx-01 mediante el uso del kit de aislamiento de gADN.

2. Digerir pTK2 (*sprA1* sentido) con Sph1 y Pst1 para eliminar
20 el *P_{cad}* (ver arriba para las condiciones de digestión).

3. Insertar el fragmento de *P_{leuA}* digerido con Sph1/Pst1 anterior en el pTK2 digerido con Sph1/Pst1 para generar *P_{leuA}::sprA1* wt en la orientación inversa (pTK4). Los detalles de los procesos de extracción de gel, ligadura y
25 electroporación son los mismos que en la Sección 2 de la

clonación anterior.

Cribado de pTK3, pTK4 y pTK6:

3.1 Elegir 6 colonias de cada ligadura para cribado

3.2 Inocular 6 colonias de pTK3, 6 de pTK4 y 6 de pTK6, cada
5 una en 3 mL de LB + cabenicilina (100 µg/mL) en tubos de cultivo de 14 mL.

3.3 Incubar con agitación durante 16 h (37°C, 240 rpm).

3.4 Aislar el ADN plasmídico mediante el uso de un kit de
10 minipreparación y eluir el ADN con 40 µL de amortiguador de elución.

3.5 Digerir 5 µL de cada uno de los 18 ADN plasmídicos de la siguiente manera (preparar suficiente mezcla de reacción de digestión para 20 reacciones para tener en cuenta errores de pipeteo):

15 A. Sph1 más Pst1

B. Xmn1.

Agregar 5 µL de ADN a la mezcla de reacción de digestión de 15 µL e incubar 2 h a 37°C

3.6. Verificar la digestión con electroforesis en gel,
20 comparar con los patrones de gel esperados para pTK3, pTK4 y pTK6.

Elaboración de pTK5 y pTK7

1. Usar el gADN de BioPlx-01 preparado anteriormente.

2. Amplificar por PCR el *clfB* RR (*P_{clfB}*) del ADN genómico
25 BioPlx-01 mediante el uso de cebadores con una secuencia de

restricción EcoRI dirección 5' y una secuencia de restricción BamHI dirección 3' (cebadores: TK05 y TK07).

Mezcla de PCR (50 µL de volumen total)

1.0 µL de gADN de 50 ng/µL de BioPlx-01

5 25.0 µL de agua dI

10.0 µL de amortiguador de HF 5X (NEB)

5.0 µL de mezcla de dTNP 2mM

4.0 µL de cebador TK05 (5 pmol/µL de reserva)

4.0 µL de TK07 (5 pmol/µL de reserva)

10 1.0 µL de polimerasa Phusion (NEB)

Ciclos:

98°C durante 2 min

20 ciclos de: 98°C 15 s - 64°C 30 s - 72°C 1 min

15 ciclos de: 98°C durante 15 s - 55°C durante 30 s - 72°C

15 durante 1 min

Mantenimiento: 4°C, indefinidamente

3. Usar 5 µL de las reacciones de PCR para la electroforesis en gel como se describió anteriormente.

4. Con el kit de limpieza de PCR, limpiar la reacción de PCR y eluir con 30 µL de amortiguador de elución.

5. Digerir el producto de PCR *P_{c1fB}* con BamH1 y EcoR1 e insertarlo en la cadena principal de pTK3 digerido con EcoR1/BamH1 para generar pTK5. Este plásmido contendrá el *sprA1* regulado por *P_{leuA}* y el *sprA1_{AS}* regulado por *P_{c1fB}*. Usar

25 el mismo fragmento *P_{c1fB}*

, insertarlo en el pTK6 digerido con EcoR1/BamH1 para generar pTK7. Este plásmido contendrá el *sprA1* regulado por *P_{hlgA}* y el *sprA1_{AS}* regulado por *P_{c1fB}SprA1*.

Los detalles de los procesos de extracción de gel, ligadura y electroporación son los mismos que en la sección 2 de la clonación anterior.

Cribado para pTK5 y pTK7

3.1 Inocular 6 colonias de ligadura pTK5 y 6 colonias de ligadura pTK7 en 3 mL de LB + cabenicilina (100 µg/mL) en tubos de cultivo de 14 mL.

3.3 Incubar con agitación durante 16 h (37°C, 240 rpm).

3.3 Aislar el ADN plasmídico mediante el uso de un kit de minipreparación y eluir el ADN en 40 µL de amortiguador de elución.

3.5 Digerir 5 µL de cada uno de los 12 ADN plasmídicos con:

A. BamHI + EcoRI

B. Xmn1 solo

Preparar la mezcla de reacción de digestión con BamHI/EcoRI y Xmn1 de acuerdo con las sugerencias del fabricante.

Agregar 5 µL de solución de plásmido a 15 µL de mezcla de reacción de digestión e incubar durante 2 h a 37°C. Verificar la digestión con electroforesis en gel como se describió anteriormente.

Ejemplo 3D. Construcción de pTK8, pTK9 y pTK10 (*P_{cad}-sma1*, *P_{hlgA}-sma1* y *P_{leuA}-sma1*, respectivamente).

El gen *sma1* se solicitó a DNA2.0 con un sitio de restricción

Pst1 dirección 5' y un sitio de restricción EcoR1 dirección 3' para permitir la inserción en lo siguiente:

- pCN51 para elaborar $P_{cad}::smaI$ que da como resultado pTK8

5 • pTK6 del cual *sprA1* se ha suprimido con Pst1/EcoR1 para elaborar $P_{hlqA}-smaI$ que da como resultado pTK9

- pTK3 del cual *sprA1* se ha suprimido con Pst1/EcoR1 para elaborar $P_{leuA}-smaI$ que da como resultado pTK10

1. Digerir pCN51, pTK6 y pTK3 con Pst1 y EcoR1 mediante
10 *sprA1*. Incubar cada uno durante 2 h a 37°C.

2. Generar el fragmento de *smaI* al digerir el plásmido solicitado que contiene el gen con Pst1 y EcoR1 (2 h a 37°C). Verificar la digestión con electroforesis en gel

(el tamaño de fragmento esperado es de 757 bp).

15 3. Seguir las etapas 2.5 a 2.22 para la extracción de gel, la ligadura, la electroporación, la recuperación y la selección de antibióticos.

Cribado para pTK8, pTK9 y pTK10

3.1. Inocular 6 colonias de ligadura pTK8 y 6 colonias de
20 ligadura pTK9 y 6 colonias de ligadura pTK10 en 3 mL de LB + cabenicilina (100 µg/mL) en tubos de cultivo de 14 mL.

3.3 Incubar con agitación durante 16 h (37°C, 240 rpm).

3.3. Aislar el ADN plasmídico mediante el uso de un kit de minipreparación y eluir el ADN en 40 µL de amortiguador de
25 elución.

3.5. Digerir 5 µL de cada uno de los 12 ADN plasmídicos con

A. Pst1 y EcoRI

B. Sph1 y Xcm1

C. Xmn1 solo

5 Seguir los procesos de reacción de restricción y electroforesis en gel descritos anteriormente.

Ejemplo 3E. Elaboración de pTK11, pTK12 y pTK13 (*P_{cad}-rsaE*, *P_{hlgA}-rsaE* y *P_{leuA}-rsaE*, respectivamente).

El gen *rsaE* se solicitó a DNA2.0 con un sitio de restricción

10 Pst1 dirección 5' y un sitio de restricción EcoRI dirección 3' para permitir la inserción en los siguientes plásmidos:

- pCN51 para elaborar *P_{cad}-rsaE* que da como resultado pTK11

- pTK6 del cual *sprA1* se ha suprimido con la
15 restricción Pst1/EcoRI para elaborar *P_{hlgA}-rsaE* que da como resultado pTK12

- pTK3 del cual *sprA1**sprA1* se ha suprimido con la restricción Pst1/EcoRI para elaborar *P_{leuA}-rsaE* que da como resultado pTK13

20 1. Digerir pCN51, pTK6 y pTK3 con Pst1 y EcoRI *sprA1* como se describe en las secciones anteriores.

2. Digerir el ADN solicitado que *contiene rsaE* con Pst1 y EcoRI de acuerdo con las sugerencias del fabricante.

Verificar la digestión con electroforesis en gel (el
25 fragmento de *rsaE* debe ser de 142 bp).

3. Seguir las etapas 2.5 a 2.22 para el aislamiento de gel, la ligadura, la electroporación, la recuperación y la selección de antibióticos.

Ejemplo 4. Producción de constructos con abrazadera y sin abrazadera *sprA1* mediante el uso de DNA2.0 para elaborar insertos:

En este caso, pCN51 se emplea como la cadena principal del vector porque tiene un promotor inducible por cadmio (*P_{cad}*), un terminador *Bla*, resistencia a la ampicilina para *E. coli* y resistencia a la eritromicina para *Staphylococcus aureus*. En Drutz 1965, se demostró que 502a es sensible a 2 µg/mL de eritromicina.

Plásmido pTK1: casete de control positivo para demostrar que *sprA1*, cuando se induce, causa la muerte.

1. Solicitar el siguiente inserto de DNA2.0. Se extrae del vector solicitado con enzimas de restricción *Pst*I y *Eco*R1, y se inserta en el pCN51 digerido con *Pst*I/*Eco*R1. Es solo el marco de lectura abierto y un pequeño flaqueo dirección 3' para capturar *sprA1*, esencialmente como en Sayed *et al.* 2012, excepto que se usa la característica de *P_{cad}* en lugar del promotor aTc (*P_{tet}*). Esta secuencia se verificó en pDRAW, para asegurar que la estrategia funcionará.

CTGCAGggtaccgcagagaggaggtgtataaggtg

ATGCTTATTTTCGTTACATCATAGCACAGTCATCAGTGGCTGTGC

CATTGCGTTTTTTTCTTATTGGCTAAGTAGACGCAATACAAAATAGGTGA

CATATAGCCGCACCAATAAAAAATCCCCTCACTACCGCAAATAGTGAGGGG

ATTGGTG Tataagtaaataacttatttttcgttgt

ggatccttgactGAATTC SEC. ID NO.: 122

Plásmido resultante: pTKXXX

5 Mayúscula subrayada: codón de inicio

Cursiva: codón de detención

NEGRITA: sitio PstI dirección 5'

MAYÚSCULA NEGRITA CURSIVA: sitio EcoRI

minúscula negrita cursiva: sitio KpnI

10 Color óxido: Shine-Delgarno (usado naturalmente para SprA1)

Minúscula subrayada: sitio BamHI

Producir pTK2: invertir el inserto en pTK1

1. Extraer el inserto de pTK1 con KpnI y BamHI, e insertarlo en el pCN51 digerido con KpnI y BamHI. Esto crea
15 la orientación antisentido del gen de toxina y la toxina no debe expresarse en absoluto, ya sea que se induzca con cadmio o no. El producto es pTK2.

PTK3 y PTK4: El *PhlGA* que regula la toxina *sprA1* para demostrar que *sprA1*, cuando se induce mediante suero o
20 sangre, causa la muerte celular (constructos directos e inversos, respectivamente).

sprA1_{AS} está presente pero solo tiene su promotor natural, por lo que la abrazadera de expresión debe estar inactiva, y también si *PhlGA* es permeable, se puede producir
25 cierta toxicidad celular porque la abrazadera de expresión no

está presente.

pTK3:

1. Digerir pTK1 (*sprA1* sentido) con Sph1 y Pst1 para eliminar el *P_{cad}*.

5 2. Amplificar por PCR la región reguladora de *hlgA* (*PhlgA*) de la cepa 502a mediante el uso de cebadores de PCR que contienen un sitio de restricción Sph1 dirección 5' y un sitio de restricción Pst1 dirección 3'. (Cebadores: TK01 y TK02)

10 3. Cortar el producto de PCR *PhlgA* con Sph1 y Pst1 e insertarlo en el pTK1 digerido con Sph1/Pst1 para generar *PhlgA::sprA1* wt en la orientación directa que genera pTK3.

1 TTGCGAAATC CATTCTCTT CCACTACAAG CACCATAATT AAACAACAAT
15 AACGCTTTAG GTAAGGAGAA GGTGATGTTT GTGGTATTAA TTTGTTGTTA
51 TCAATAGAAT AAGACTTGCA AAACATAGTT ATGTCGCTAT ATAAACGCCT
AGTTATCTTA TTCTGAACGT TTTGTATCAA TACAGCGATA TATTTGCGGA
101 GCGACCAATA AATCTTTTAA ACATAACATA ATGCAAAAAC ATCATTTAAC
CGCTGGTTAT TTAGAAAATT TGTATTGTAT TACGTTTTTG TAGTAAATTG
20 151 AATGCTAAAA ATGTCTCTTC AATACATGTT GATAGTAATT AACTTTTAAC
TTACGATTTT TACAGAGAAG TTATGTACAA CTATCATTA TGGAAAATTG
201 GAACAGTTAATTCGAAAACGCTTACAAATGGATTATTATATAT SEC. ID NO.:
327
CTTGTC AATT AAGCTTTTGC GAATGTTTAC CTAATAATATATA SEC. ID NO.:
25 328

TK01: 5'-gatgc**GCATGC**TTGC GAAATC CATTCCTCTT-3' (contiene SphI)
SEC. ID NO.: 329

TK02: 5'-catgat**CTGCAG**ATATATAATAATCCATTTGTAAGCG-3' (contiene
PstI) SEC. ID NO.: 20

5 pTK4:

1. Digerir PtK2 (*sprA1* inverso) con SphI y PstI para
eliminar el promotor de cadmio.

2. Insertar el mismo producto de PCR *PhlgA* digerido con
SphI/PstI. Esto proporciona el *SprA1* de orientación inversa.

10 pTK5: abrazadera de expresión para pTK3, mediante el uso
de *P_{clfB}* para impulsar *SprA1_{AS}*

1. Amplificar por PCR el *P_{clfB}* de 502a gADN mediante el
uso de cebadores para generar un sitio de restricción EcoRI
dirección 5' y un sitio de restricción BamHI dirección 3'.

15 2. Digerir pTK3 con EcoRI y BamHI e insertar el *P_{clfB}*
digerido con EcoRI/BamHI.

El plásmido resultante se denomina pTK5 y contendrá el
SprA1 sentido regulado por el *PhlgA* sensible al suero (regulado
de manera ascendente) y el *sprA1_{AS}* *SprA1* regulado por el *P_{clfB}*
20 sensible al suero (regulado de manera descendente).

La siguiente secuencia es el *P_{clfB}* (219 nucleótidos
inmediatamente dirección 5' del codón de inicio TTG).

1 AGGTGATGAA AAATTTAGAA CTTCTAAGTT TTTGAAAAGT AAAAAATTTG
TCCACTACTT TTAAATCTT GAAGATTCAA AAACTTTCA TTTTAAAC

25 51 TAATAGTGTA AAAATAGTAT ATTGATTTTT GCTAGTTAAC AGAAAATTTT

ATTATCACAT TTTTATCATA TAACTAAAAA CGATCAATTG TCTTTTAAAA

101 AAGTTATATA AATAGGAAGA AAACAAATTT TACGTAATTT TTTTCGAAAA

TTCAATATAT TTATCCTTCT TTTGTTTAAA ATGCATTAAA AAAAGCTTTT

151 GCAATTGATA TAATTCTTAT TTCATTATAC AATTTAGACT AATCTAGAAA

5 CGTTAACTAT ATTAAGAATA AAGTAATATG TTAAATCTGA TTAGATCTTT

201 TTGAAATGGA GTAATATTT SEC. ID NO.: 129

AACTTTACCT CATTATAAA SEC. ID NO.: 130

Cebador: 5'--gactacGAATTC AGGTGATGAA AAATTTAGAA-3' SEC.
ID NO.: 13

10 Cebador: 5' cttagctGGATCCAAATATTACTCCATTTCAA-3' SEC. ID
NO.: 15

PepA1 (SA newman)

MQGFKEKHQELKKALCQIGLMRSISEVKQLNIA SEC. ID NO.: 113

pTK6. promotor sensible al suero 2-- *SprA1*

15 En este constructo, el promotor sensible 2 es *P_{leuA}*.

1. Digerir pTK1 (que contiene el *sprA1* sentido) con
Sph1 y Pst1 para eliminar el *P_{cad}*.

2. Amplificar por PCR *P_{leuA}* de *Staphylococcus aureus*
502a gADN mediante el uso de cebadores de PCR que contienen
20 un sitio de restricción Sph1 dirección 5' y un sitio de
restricción Pst1 dirección 3' (cebadores: TK05 y TK06).

3. Digerir el producto de PCR *P_{leuA}* con Sph1 y Pst1 e
insertarlo en el pTK1 digerido con Sph1/Pst1 para generar
P_{leuA}::SprA1 wt en la orientación directa que genera pTK6.

25 En *Staphylococcus aureus*, el operón *ilvleu* consiste en

ilvDBHC-leuABCD-ilvA (9 genes). Es el operón biosintético BCAA.

Ejemplo 5. Preparación de DC10B electrocompetente

Las bacterias electrocompetentes se preparan al
5 recolectar células en fase logarítmica y lavar las células
ampliamente en agua desionizada estéril para disminuir la
conductividad y hacer que las células lleguen a un estado
osmótico adecuado para el proceso de electroporación.

1. A partir de placas libres de antibióticos recién
10 sembradas por estría, inocular 250 mL de medio LB con cada
cepa e incubar con agitación (37°C, 240 rpm).

2. Encender la centrifugadora y enfriar el rotor hasta
4°C mucho antes de recolectar las células. Colocar 1 L de 10%
glicerol filtrado estéril en hielo mucho antes de recolectar
15 las células.

3. Monitorear el crecimiento mediante OD₆₃₀ y cuando las
células estén a 1.0 de unidades de OD₆₃₀ por mL, colocar el
matraz inmediatamente sobre hielo húmedo durante 10 minutos.
A partir de este momento, los cultivos deben mantenerse
20 helados. Verter cada cultivo de 250 mL en botellas de
centrifugación estériles enfriadas de 500 mL.

4. Centrifugar (15 min, 3500 rpm, 4°C). Retirar el
sobrenadante y aspirar cualquier caldo residual.

5. Agregar 250 mL de 10% de glicerol estéril a cada una
25 de las botellas de centrifugación y suspender por completo

las células al mezclar con la pipeta hacia arriba y hacia abajo.

6. Repetir las etapas 4 y 5 dos veces más.

7. Retirar el sobrenadante y suspender las células en 2
5 mL de 10% de glicerol al mezclar con la pipeta hacia arriba y hacia abajo.

8. Para congelar, dividir en alícuotas de 100 μ L del cultivo en tubos de microcentrífuga en hielo húmedo. Una vez que haya usado todo el cultivo, transferir los tubos a un
10 baño de hielo seco/etanol durante 10 minutos. Una vez que los cultivos están congelados, transferir las células a un congelador a -80°C para su almacenamiento.

Para confirmar la eficacia de la célula, transformar las células con 1 μ L de pUC19 (10pM).

15 Las condiciones de electroporación para *E. coli* son 1500 V, 25 μ F, 200 ohmios. Usar 1 μ L de minipreparación de plásmido de DH5 α y electroporarla en 50 μ L de la DC10B electrocompetente.

1. Las *E. coli* electrocompetentes se descongelan en
20 hielo y se agrega 1 μ L de plásmido a 50 μ L de células en una cubeta de electroporación con espacio de hielo de 0.1 cm.

2. Electroporar como se indicó anteriormente y agregar inmediatamente medio de recuperación (1 mL, medio SOC).

3. Agitar a 37°C durante 1 h a 250 rpm y colocar en
25 placas 100 μ L en LB + 100 $\mu\text{g/mL}$ de carbenicilina. Incubar las

placas durante 16 h a 37°C.

Ejemplo 6. Transformación SA

Las técnicas para la transformación se adaptan de Chen, W., et al. 2017, Rapid and Efficient Genome Editing in *Staphylococcus aureus* by Using an Engineered CRISPR/Cas9 System. J Am Chem Soc 139, 3790-3795. Materiales a tener disponibles: placa de agar LB que contiene 50 µg/mL de kanamicina; cebadores de secuenciación para cribado por PCR de 12 clones; caldo TSB con kanamicina, tubos estériles para el crecimiento bacteriano; reactivos de PCR para realizar PCR de colonia (mezcla maestra para 500 µL) y H₂O de grado PCR.

10 µL de producto de ensamblaje Golden Gate se transforman en 100 µL de células competentes de *E. coli* DH10B. Las colonias exitosas se seleccionan en una placa de agar LB que contiene 50 µg/mL de kanamicina. El éxito para la construcción del plásmido pCasSA-NN_spacer se verificó mediante PCR o secuenciación.

Ejemplo 7. Plásmidos de purificación de *E. coli* DH10B para confirmar la secuencia

1. Secuenciación de ADN de insertos

Los cebadores TK013 a TK020 se usan de diversas maneras para secuenciar los insertos de estos 13 plásmidos. Los cebadores a usar para cada plásmido se indican en la Tabla 15. Los insertos del gen de muerte se obtienen de DNA2.0. La PCR amplificó los promotores *P_{leuA}* y *P_{hlgA}* para evaluar

cualquier posible error de polimerasa para estos fragmentos.

2. Ensamblaje y confirmación de secuencias

2.1 Los cromatogramas sin procesar se inspeccionan y solo se eligen regiones de alta calidad (señal/ruido muy
5 altos y buena separación de picos) para usar en el proceso de ensamblaje.

2.2 Las regiones de superposición de lecturas de secuencia de cebadores sucesivos se identifican y se eliminan; las lecturas únicas se encadenan de cabeza a cola
10 en Microsoft Word con codificación de color del texto.

2.3 Clustal W se usa para generar alineamientos de secuencias de secuencias teóricas a las reales. Cualquier discrepancia se confirma mediante inspección manual de cromatogramas.

15 **Ejemplo 8. Preparación de BioPlx-01 y RN4220 electrocompetentes**

Las bacterias electrocompetentes se preparan al recolectar células en fase logarítmica y lavar las células ampliamente en agua desionizada estéril para disminuir la
20 conductividad y hacer que las células lleguen a un estado osmótico adecuado para el proceso de electroporación.

Materiales a tener disponibles:

1. Botellas de centrifugación Corning con fondo en V de 500 mL con tapa naranja

25 2. Tubos Falcon de 50 mL

3. Tubos de microcentrífuga estériles de 1.5 mL
4. Placa de 96 cavidades para mediciones A630
5. Pipetas estériles de 10 y 25 mL y puntas de pipetas estériles de todos los tamaños
- 5 6. Caldo TSB (se necesita 600 mL en total)
7. 1L de sacarosa estéril 500 mM en hielo húmedo mucho antes de recolectar las células

Protocolo

1. A partir de placas libres de antibióticos recién
10 sembradas por estría, inocular 250 mL de medio TSB con cada cepa e incubar con agitación (37°C, 250 rpm).

2. Encender la centrifugadora y enfriar el rotor hasta 4°C mucho antes de recolectar las células. Colocar 1 L de 10% glicerol en hielo mucho antes de recolectar
15 las células.

3. Monitorear el crecimiento mediante OD₆₃₀ y cuando las células estén a 1.0 de unidades de OD₆₃₀ por mL, colocar el matraz inmediatamente sobre hielo húmedo durante 15 min. A partir de este momento, los cultivos
20 deben mantenerse helados. Verter cada cultivo de 250 mL en botellas de centrifugación estériles enfriadas de 500 mL.

4. Centrifugar a 2900 rpm durante 15 min. Retirar el sobrenadante y aspirar cualquier caldo residual.

5. Agregar 250 mL de 10% de glicerol a cada una de
25 las botellas de centrifugación y suspender por completo

las células al mezclar con la pipeta hacia arriba y hacia abajo.

6. Centrifugar a 2900 rpm durante 15 min. Retirar el sobrenadante, no es necesario aspirar. Suspende por
5 completo las células en 250 mL de glicerol y volver a centrifugar.

7. Retirar el sobrenadante y suspender las células en el glicerol residual al mezclar con la pipeta hacia arriba y hacia abajo.

10 8. Para congelar, agregar 100 microlitros del cultivo a tubos de microcentrífuga en hielo húmedo. Una vez que haya usado todo el cultivo, transferir los tubos a un baño de hielo seco/etanol durante 10 minutos. Una vez que los cultivos están congelados, transferirlos a un
15 congelador a -80°C .

Ejemplo 9. Diseño y prueba de secuencias de gARN CRISPR y prueba de pCasSA de manera simultánea

En este ejemplo, se obtiene un sistema CRISPR-Cas que es eficaz en *Staphylococcus aureus* (pCasSA) de
20 Addgene (depósito de plásmidos Addgene, Cambridge, MA), se identifica una región intergénica a la que se dirigen los experimentos previos y, finalmente, se diseña y se prueba el gARN dirigido a la región intergénica.

1. Solicitar componentes CRISPR verificados de Addgene
25 como se muestra en la Tabla 16.

Tabla 16. Plásmidos CRISPR

ID	Plásmido	Gen/inserto	Tipo de vector
42876	pCas9	tracr/Cas9	Expresión bacteriana, CRISPR; E. coli
42875	pCRISPR	CRISPR-Bsal	Expresión bacteriana, CRISPR; E. coli
65770	BPK2101	CRISPR-Cas9	Plásmido de expresión bacteriana para <i>Staphylococcus aureus</i> Cas9 & sgARN (es necesario clonar en el espaciador en sitios Bsal): T7-humanSaCas9-NLS-3xFLAG-T7-Bsalcassette-Sa-sgRNA
98211	pCasSA	CRISPR-Cas9	CRISPR específica de Sa

5

2. Seleccionar los sitios diana gARN CRISPR. Encontrar el direccionamiento, este debería estar en una región intergénica para no interrumpir la viabilidad. Actualmente, una de estas regiones se ha identificado entre 1,102,100 y 1,102,700 bp en el genoma 502a, GenBank: CP007454.1, como se muestra en la Figura 8. Esta región se alinea con la región previamente identificada en el enfoque recombinante.

10

3. Una vez que se elige la región, usar CRISPRScan (<http://www.crisprscan.org/>) Moreno-Mateos et al., 2012, Nature Methods 12, 982-988, para encontrar gARN putativos como se muestra en la Figura 9; tener en cuenta que la secuencia usable está en mayúsculas.

15

4. Verificar la posible fijación diana secundaria con BLAST

20

(https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch&PROG_DEF=blastn&BLAST_PROG_DEF=megaBlast&BLAST_SPEC=MicrobialGenomes1280&DB_GROUP=AllMG) o buscar directamente la secuencia (APE o similar). Nota: el gARN marcado como no canónico a menudo tendrá un único par de bases con error de

25

apareamiento, estos probablemente seguirán funcionando pero pueden causar efectos secundarios adicionales.

5. Modificar y ordenar oligos como se muestra en la Tabla 4B, Figura 4A-4D. El nombre de oligos se muestra en el
5 formato = oligo #, BPC (BioPlx CRISPR), diana #, dirección (FOR o REV), seguido de la secuencia diana.

6. Agregar cada una de las secuencias de direccionamiento CRISPR al plásmido pCasSA según el protocolo que se muestra a continuación, adaptado de Chen, W. et al.
10 2017. *Rapid and Efficient Genome Editing in Staphylococcus aureus by Using an Engineered CRISPR/Cas9 System*. J Am Chem Soc 139, 3790-3795.

a. Diseño de oligo

Seleccionar una secuencia espaciadora de 20 bp antes de
15 NGG (NGG no está incluido en el espaciador) en el gen diana de *Staphylococcus aureus* (la relación GC 40%~60% es la mejor). Sintetizar los dos oligos en la siguiente forma (descrita anteriormente):

Nota: El cebador FOR debe estar inmediatamente dirección
20 5' del NGG en la secuencia diana.

5'-GAAANNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN-3'

3'-NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNCAAA-5'

b. Fosforilación

Preparar la mezcla de fosforilación como se muestra en
25 la Tabla 17.

Tabla 17. Mezcla de fosforilación

5

2 µL	oligo I (50 µM)
2 µL	oligo II (50 µM)
5 µL	Amortiguador de ADN ligasa T4 10x (NEB)
1 µL	Polinucleótido cinasa T4 (Takara)
40 µL	ddH ₂ O
50 µL	total

Incubar a 37°C durante 1 hora.

c. Recocido

Agregar 2.5 µL de NaCl 1 M a los pares de oligo fosforilados. Incubar a 95°C durante 3 min y enfriar lentamente hasta temperatura ambiente (usar un termociclador). (Alternativamente, usar un bloque de calor y quitar el bloque del calentador y dejarlo enfriar naturalmente durante 2 horas). Diluir los oligos recocidos 20 veces mediante ddH₂O.

15

d. Digestión de vector

Digerir 1-2ug de pCas9 con BsaI (NEB) como se muestra en la Tabla 18.

Tabla 18. Mezcla de digestión de vector

20

x µL (1-2 µg)	pCas9
1 µL	BsaI (NEB)
5 µL	10 x amortiguador NEB
0.5 µL	BSA 100X
y µL (hasta 50 µL)	ddH ₂ O
50 µL	total

25

pCas9 digerido y purificado en gel (importante para una clonación exitosa).

e. Ligadura

Preparar la mezcla de ligadura como se muestra en la
5 Tabla 19.

Tabla 19. Mezcla de ligadura

10	1 uL (posiblemente más)	Cas9 purificado en gel, digerido con BsaI
	2 uL	Oligos diluidos
	2 uL	Amortiguador de ligasa T4 10x
	1 uL	Ligasa T4
	x uL (hasta 20 uL)	ddH ₂ O
	20 uL	total

Incubar a RT durante 2h o 16C para O/N.

Transformar en células de *E. coli* (DH5a, DH10B o DC10B).

15 f. Selección para la absorción de plásmido

Seleccionar para la absorción del plásmido al colocar las células en placas de agar LB con kanamicina (50 ug/mL).

Nota: el plásmido pCasSA hace que *E. coli* crezca muy lentamente a 30°C y es posible que las placas deban incubarse
20 durante 24-36 horas para observar colonias.

Una vez que las colonias son visibles, seleccionar algunas para que el líquido crezca en caldo LB con kanamicina (50 ug/mL). Guardar una alícuota de cultivo líquido para un crecimiento más fácil en una fecha posterior.

25 En un criotubo, agregar 50% de glicerol estéril a la

mezcla de cultivo líquida mediante inversión, luego colocar a -80°C para su almacenamiento a largo plazo.

Extraer los plásmidos mediante el uso del kit Qiagen, espec. y almacenar a -20°C .

5 7. Verificación de inclusión mediante PCR y/o secuenciación

a. Prueba de PCR

Evaluar con 21BPC FOR (SEC. ID NO.: 63) y 22BPC REV (SEC. ID NO.: 64) en las plantillas generadas anteriormente
10 en la etapa 6.

Realizar la PCR de constructos. Los productos de PCR serán de ~275 bp en el vector pCasSA sin cortar (control positivo = vector pCasSA intacto). La PCR que usa el vector pCasSA digerido no debería producir ningún producto (control
15 negativo = vector pCasSA digerido con Bsa1).

Se debe evaluar una pequeña porción del producto digerido para garantizar una eficacia de 100%. Las pruebas pueden realizarse mediante PCR o electroforesis en gel directamente sobre el plásmido digerido. La PCR en el vector
20 pCasSA con las secuencias de gARN producirán ~278 bp de amplicones. Nota: estos no serán visiblemente diferentes en comparación con el vector pCasSA intacto. Como tal, la digestión de Bsa1 debe ser de 100%.

b. Método de secuenciación

25 Preparar los productos de PCR generados anteriormente

para la secuenciación. Limpiar la reacción de PCR mediante el uso del kit de limpieza de columna de centrifugación de acuerdo con el protocolo del fabricante.

Medir la concentración del producto de PCR purificado
5 mediante NanoDrop.

Mezclar la muestra con cebador directo o inverso (21BPC FOR y 22BPC REV, respectivamente) para secuenciar con Quintara Biosciences.

Producto de PCR a 5 ng/uL y cebador a 5 pmol/uL (5 uM).
10 Los productos de PCR del vector pCasSA intacto se deben secuenciar junto con los otros productos para proporcionar un valor inicial.

8. Prueba de eficacia/direccionamiento de CRISPR-Cas

La introducción de cualquier plásmido con las secuencias
15 de gARN insertadas debería causar una ruptura de doble cadena en el sitio diana CRISPR. Además, la falta de una secuencia homóloga para la reparación dirigida por homología (HDR, por sus siglas en inglés) causará letalidad inducida por la ruptura de doble cadena. Por lo tanto, la transformación de
20 los plásmidos dirigidos con el plásmido dirigido debería dar como resultado una tasa de mortalidad correspondiente a la eficacia de direccionamiento CRISPR.

Transformar cada una de las 10 (se supone que todas las combinaciones de direccionamiento funcionan) en alícuotas
25 separadas de células *Staphylococcus aureus* RN4220

electrocompetentes.

En este caso, las dianas 1, 4 y 6-10 deberían mostrar actividad en las células RN4220 (las secuencias son lo suficientemente similares como para permitir la fijación de gARN CRISPR).

Ejemplo 10. Diseño y prueba de plantillas de reparación dependientes de homología y eficacia mediante el uso de un indicador fluorescente controlado por un promotor constitutivo

a. Los brazos homólogos están diseñados de diferentes longitudes (200, 300 y 400 bp) que corresponden a la región intergénica de ~600 bp identificada anteriormente. Para probar la viabilidad, se inserta un gen indicador fluorescente (por ejemplo, mCherry) bajo el control de un promotor constitutivo (rspL). El promotor y el indicador estarán flanqueados con sitios de restricción (NotI y XmaI) para permitir el intercambio de transgenes. El diseño actual contiene un codón de detención único. Opcionalmente, se pueden agregar codones de detención adicionales. Los constructos se diseñan y se solicitan a través de ATUM (anteriormente DNA2.0). Esta secuencia completa (brazos homólogos + promotor + mCherry) se coloca en el vector pCasSA mediante el uso de los sitios de restricción XhoI y XbaI.

b. Comprobación de la incorporación/expresión de mCherry

Una vez que se ensambla el vector pCasSA-XX-XXX completo

y se transforma en una cepa de *Staphylococcus aureus*, verificar: 1) la expresión de mCherry y 2) la incorporación genómica de la secuencia de mCherry. Actualmente se encuentran disponibles algunos métodos viables para verificar
5 lo anterior. Nota: la expresión de mCherry debe ocurrir en bacterias que mantienen el plásmido, así como en aquellas con incorporación exitosa. Para diferenciarlos, el plásmido debe curarse (eliminarse), excepto en el caso de PCR que puede diferenciar entre los dos.

10 Para el curado de plásmidos (con casete de repF):
 Desarrollar un cultivo líquido a 30°C con antibiótico como se indicó anteriormente;

 Diluir 3-5 µL de este cultivo 1000 veces en TSB fresco (sin antibiótico);

15 Colocar a 42-43°C hasta que el crecimiento sea aparente (por ejemplo, durante la noche).

 Sembrar por estría el cultivo líquido en placas de TSA con y sin cloranfenicol y cultivar a 37°C.

 Los cultivos deben crecer en placa de cloro - y no en
20 placa de cloro + a 37°C, de ser así, el plásmido se ha suprimido.

 Para microscopía de fluorescencia:

 El fluoróforo mCherry se excita con ~587 nm de luz y emite ~610 nm.

25 Para PCR:

PCR a través de la región insertada para confirmar la incorporación. Cebadores diseñados para amplificar: a través de la región de inserción (41/42 y 43/44). Para evaluar la presencia de mCherry (51/45). Para verificar la presencia de ADN genómico (TKO 1/3). La mezcla y el apareamiento de la inserción y los cebadores mCherry también pueden servir para evaluar la incorporación de mCherry.

La incorporación también se puede confirmar mediante análisis de Western blot.

Emplear el equipo de Western blot: caja de gel y sistema de transferencia iBlot. Emplear el anticuerpo anti-mCherry primario, el anticuerpo colorimétrico secundario, geles prefundidos (o equipos y reactivos de fundición en gel), kits de transferencia iBlot, inhibidores de la proteasa, soluciones de extracción de proteínas (por ejemplo, RIPA), marcadores de proteínas (escalas) y amortiguadores (TBS, Tween, etc.) como se conoce en la técnica.

Ejemplo 11. Análisis de promotores KS con indicadores fluorescentes

El indicador fluorescente está bajo el control de los promotores identificados en el enfoque recombinante (*PleuA*, *PhlgA*, etc). Esta combinación permite evaluar la eficacia del promotor elegido con un resultado medible (positivo). Preferentemente, el mCherry se colocaría en los constructos que se basan en la cadena principal de pCN51. La combinación

se usa para evaluar múltiples problemas posibles:

Si las células que contienen el plásmido están expuestas a sangre/suero, se debe expresar mCherry. Esto se puede verificar con microscopía de fluorescencia (Ex 587 nm, Em 610 nm) o mediante Western blot para la proteína mCherry.

Si la proteína mCherry se crea en condiciones "normales" (sin activación de sangre/suero), entonces el promotor es "permeable". La activación permeable podría explicar algunos de los problemas para obtener plásmidos KS con ciertos promotores (es decir, *P_{leuA}*), ya que incluso niveles bajos de expresión de KS podrían causar una pérdida de viabilidad.

¿Cuál es la velocidad y la conformidad de la regulación ascendente generada por un cebador específico?

Las células se visualizan en tiempo real (microscopía de fluorescencia) o a través de muestreo del transcurso del tiempo (Western blot) para observar la velocidad de generación de fluorescencia tras la exposición a sangre y/o suero.

Ejemplo 12. Inserción de KS en BioPlx-01, verificar la incorporación, evaluar la eficacia y la longevidad

Se inserta un KS de elección en un vector pCasSA mediante el uso de sitios de restricción Not1 y Xma1 que flanquean cada secuencia. La pTK se amplifica mediante el uso del cebador BP-40 que agrega el sitio de restricción Xma1. El KS se inserta en las células *Staphylococcus aureus* 502a y se

verifica la incorporación genómica. Las células incorporadas se curan del plásmido y se evalúan para determinar la actividad de KS cuando se exponen a sangre/suero. Las células de KS denominadas "BioPlx-XX" se pasan como se describe en la presente para analizar la longevidad y la viabilidad.

Ejemplo 13. Confirmar/caracterizar la tasa y el grado de muerte celular inducida por suero.

Las células de KS BioPlx-XX que tienen el KS se cultivan de manera paralela con BioPlx-01 (*Staphylococcus aureus* 502a WT) en TSB, y luego se lavan y se cambian a suero humano fresco. La cepa KS se "alineará" poco después del cambio, mientras que la cepa WT comenzará a crecer en el suero.

Ejemplo 14. Evaluar la estabilidad de la cepa KS BioPlx-XX

Este experimento se realiza para demostrar que el KS en BioPlx-XX es fenotípicamente y genotípicamente estable durante la propagación *in vitro*.

La estabilidad fenotípica (en este caso, el rendimiento de KS) se evaluará al determinar la tasa de muerte celular en suero después de pasar la cepa para las generaciones X, Y y Z, en donde X es la cantidad de duplicaciones experimentadas en la elaboración de cepas para producir un solo lote clínico de material suficiente para tratar a 200 pacientes, e Y y Z son la cantidad de generaciones experimentadas luego de hasta 41 duplicaciones de cultivo total. El objetivo es 4×10^9 células por paciente X 200 pacientes = 8×10^{11} células

totales.

Una dosis de 4×10^9 células por paciente X 200 pacientes = 8×10^{11} células totales.

1. Inocular 5 mL de TSB con una sola colonia grande de BioPlx-01 y un segundo 5 mL de BioPlx-02, ambos se han sembrado por estría a partir de los bancos de células maestras congelados. (la densidad aproximada es de 0.05 A630/mL).

2. Permitir que las 2 cepas crezcan a 1.6 unidades A630 por mL (monitor en el lector de placas Biotek; 5 duplicaciones). Esta es ~ la fase exponencial media. (recordar que el intervalo lineal del instrumento se encuentra entre 0.1 y 0.9, por lo que se deben diluir las muestras en TSB para permanecer en ese intervalo lineal).

15 Mantener notas detalladas sobre las tasas de crecimiento. Se supone, para este cálculo, que alrededor de 4 unidades A630/mL = 8×10^9 CFU/mL. Volumen de cultivo saturado necesario para obtener 8×10^{11} CFU total = $(8 \times 10^{11} \text{ CFU} / 8 \times 10^9 \text{ CFU/mL}) = 100 \text{ mL}$

20 3. Usar los cultivos iniciadores de (2) para inocular cultivos "finales" de 100 mL de cada uno hasta una densidad de 0.05 unidades A630 por mL. Se agregan 1.6 mL de iniciador a 98.4 mL de TSB.

4. Permitir que las dos cepas crezcan a 37°C/250 rpm.

25 Monitorear la densidad hasta alcanzar un A630 de 3.2. (6

duplicaciones). Crear un nuevo cultivo de cada cepa: 100 mL iniciados a 0.05 unidades A630/mL (es decir, "ronda 2"). Devolver los matraces al agitador a 250 rpm/37°C.

5 5. Recolectar un volumen de 1 mL de células de la etapa 4 en 50 mL de PBS para cada cepa.

5A. Congelar rápidamente un segundo 1 mL de cultivo y colocarlo a -80°C para pruebas genéticas posteriores (ver la estabilidad genotípica a continuación).

6. Centrifugar 2900 rpm durante 15 min.

10 7. Aspirar el sobrenadante y agitar en vórtice la pelotilla celular para volver a suspender.

8. Volver a llevar el volumen a 50 mL en PBS y recolectar como en la etapa 6.

15 9. Volver a suspender las pelotillas de cada cepa (BioPlx-01, BioPlx-02) en suero humano fresco precalentado de 20 mL cada uno.

10. Agitar a 250 rpm/37°C y monitorear el crecimiento. El resultado esperado es que BioPlx-01 crezca y BioPlx-02 (KS) no lo haga. Recolectar suficientes puntos de datos para
20 que las pendientes de cada uno se puedan calcular a partir de gráficos semilogarítmicos y se pueda determinar la relación. Esta relación será una medida de rendimiento de KS. Relación de muerte (KR)=pendiente del crecimiento de BioPlx-01 en suero/pendiente del crecimiento de BioPlx-02 en suero. Esta
25 KR es una medida de rendimiento de KS en 11 duplicaciones

totales alcanzadas en TSB.

11. El cultivo de "ronda 2" de la etapa 4A se monitoreará hasta que se alcance un A630 de 3.2 (6 duplicaciones). Usar esto para sembrar un cultivo de 5 "ronda 3" a 0.05 A630/mL, luego seguir las etapas 5-10 mediante el uso del cultivo saturado de ronda 2. La KR es una medida del rendimiento de KS en 17 duplicaciones totales.

12. El cultivo de "ronda 3" de la etapa 11 se 10 monitoreará hasta que se alcance un A630 de 3.2 (6 duplicaciones), luego se dividirá nuevamente en 0.05 A630/mL. Este proceso de crecimiento a 3.2 seguido de división en 0.05 se realizó 4 veces de la siguiente manera: ronda 3: fue de 23 duplicaciones; ronda 4: 29 15 duplicaciones; ronda 5: 35 duplicaciones; ronda 6: 41 duplicaciones. Seguir las etapas 5-10. La KR es una medida del rendimiento de KS con 41 duplicaciones.

Trazar KR en función de la cantidad de duplicaciones de cultivo.

20 Estabilidad genotípica:

1. Encontrar las muestras de células BioPlx-02 de cada duplicación 11, 17 y 41 de punto temporal, ver la etapa 5A.

2. Realizar la secuenciación NextGen para determinar 25 la homogeneidad de secuencia de esta muestra. La

secuenciación de una sola molécula se puede usar para determinar el % de mutaciones que ocurren en una población de células en un punto temporal dado.

Ejemplo 15. Promotores candidatos sensibles al suero y la sangre cribados mediante fluorescencia para detectar regulación ascendente

Descripción general. En este ejemplo, se evaluaron los posibles promotores de *Staphylococcus aureus* para determinar su actividad en sangre y/o suero. Los promotores candidatos se seleccionaron de la literatura en función de la regulación ascendente de la expresión génica después de la exposición a sangre o suero. Estos promotores se clonaron dirección 5' de una molécula indicadora, la proteína verde fluorescente (GFP, por sus siglas en inglés), que fluoresce cuando se activa el promotor. Después de varias etapas de crecimiento, las células de *Staphylococcus aureus* que contienen este casete promotor-GFP se expusieron a sangre o suero, y la actividad de GFP se observó con microscopía fluorescente. Los resultados de este cribado muestran varios promotores con diversos grados de actividad en sangre y/o suero, que se pueden usar para regular una modificación molecular, tal como un interruptor de inactivación, un bloqueo de virulencia o una nanofábrica.

En el ejemplo 1, se usó una cepa no patógena de

Staphylococcus aureus, denominada 502a, para excluir *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA) del microbioma de la piel humana. Si bien la aplicación de 502a no ha mostrado efectos secundarios adversos en este ensayo, se diseñó un interruptor de inactivación como una medida de seguridad adicional. La modificación molecular de interruptor de inactivación descrita en la presente se puede incorporar a microorganismos diana, tales como células de *Staphylococcus aureus* 502a o RN4220, y funcionará para inhibir el crecimiento celular, ya sea al ralentizar el crecimiento celular o al promover la muerte celular, tras la exposición a sangre o suero. De esta forma, la posibilidad de infección sistémica en pacientes se reducirá o eliminará. El interruptor de inactivación comprende dos elementos clave: un gen de muerte para ralentizar o detener el crecimiento celular, y un promotor sensible a la sangre o al suero para controlar la expresión del gen de muerte. En este ejemplo, se evaluaron los promotores de *Staphylococcus aureus* candidatos para detectar una mayor actividad en sangre o suero. Las secuencias de promotores candidatos derivadas del genoma de la cepa 502a de *Staphylococcus aureus* (NCBI CP007454.1), que incluyen alrededor de 300 bp dirección 5' e incluyen el codón de inicio, se muestran en la Tabla 20.

Tabla 20. Secuencias de promotor candidato

Gen/ Descripción	Secuencia de nucleótidos
5	<i>leuA</i> Attttagacaattctaactataaagtgatataaccattcacggaaggagtataataaaatgcttaatacaataactgaacatcaaccgaca actcaaataattatttattataactcttaggactcgaacgttagtaaaatattactaaacgcttaagtcctattctgttgaatgggactgtaaa cgccaataataatgggacgtttttatgtttatctttcaattactattttattactataaaacatgattaatcaataaaattacgggggaattact atg (SEC. ID NO.: 132)
	<i>hlgA2</i> Actcaaatttcacaaactattgcgaatccactcttccactacaagcaccataaataaacaacaattcaatagaataagactgtcaaa acatagtattgtcgctatataaaacgctcgaccaataaacttttaacataacataatgcaaaacatcatttaacaatgtcaaaaatgtct ctcaatacagtgtgatagtaattaaactttaacgaacagtaattcgaaaacgcttacaatggattatataatgaacttaaaataaatag aaagaaagtgtattctatg (SEC. ID NO.: 133)
	<i>hrtAB</i> Gttcatattgagttcatattcaaccttatactgacgctaaagaagaataggagaagtgaatcgatatg (SEC. ID NO.: 134)
	<i>hlyb</i> Ttcaggctatcaataatgcttgaatcagcctgtagagtcataataataaccaattattacatcgacgcaatgaagacac (SEC. ID NO.: 135)
	<i>sbnC</i> Actcattgtcttattactagcaaaaggtgtatctatacatttctaaaagattaggtcataaaaaatagcaat (SEC. ID NO.: 136)
10	<i>isdI</i> Aactacatccgtgtattcgattgttagaagaaaaatgaagaggacaaaaaacaactaaaatttagaaagta (SEC. ID NO.: 137)
	<i>isdG</i> Tgtaatttagggaccattagggactccaaacccaataaatactgtttgtacaagggtttctatg (SEC. ID NO.: 138)
	<i>sbnE</i> Gaatactcaaggattaaacataatgctgattcaaggtgcatgtttgttgcgtgaatgctgtcatcaacaactaaaggcacattgttg gaacgacgaacagatgttagttgttggtcaaatattgacagtccttagggcgctgcattacaagtatactacaccagctactactgttatcg ttatggcgtagtattgcagtaagtagtttttaattgttcaaccatcactaatcaaatcaacgatcacacattaatgaaattatgggagttg aaacaaaaaagt (SEC. ID NO.: 139)
15	<i>lrgA</i> Atgaaaaacgattgaatccactattttatacgtattcatctgtatataattataacacgaacacattaaagaagtgaacaatggttaact acacttatatggaatattgacaaatggtgtcaagatgaagttggacgttcatttatgaagattttaaagcgtgataggattactttaacagt aatccctttttatgcattttacatgatattttgtatttcggactaaaaatcacgcaaatgaagtgagccatctacttttagttaaataaacgt aggaggcaatg (SEC. ID NO.: 140)
	<i>lrgB</i> Gtttagtattattttgtattattatgtactggtgtgtaagttaggcggaagtcgaaaaagtaggaacgacactaacaataacattggcttact cttctgaccagccggtatctcagttgttaactctttaggtgtcattagccaagcaccatttttaatacattggactaataatgctcacaataactatt acttattgtactggctatgtcacacaaattattatgaagttactcagatctaaaggtgacaaagtcacaaaaaagatcaaaaatagagga ggcacaagctcatg (SEC. ID NO.: 141)
	<i>hlgB</i> Aagatcttagagattatttgcgtccagacagtgagttacctcctctgtacaaagtggatttaacccttattatcgccacagtatctcatgaaa aagggtcaagcgatacaagcgaatttgaaattacttacggaagaacaatggatgtcactcatgccattaaaagatcaacgcatattggcaa cagttatttagacggacatagagtcataatgcattcgtaaatagaactatactgttaatacagaggtaattggaagactcatgaaatcaa ggtgaaaggacagaattgatag (SEC. ID NO.: 142)
20	<i>fluB</i> Tcaaatgtaacaatgatcagaggcatatgttaattattgtatgattctagcaggtattgcagttgctatcgctggacaagttgcattgttaggt ttgatgttacctcatatagcaagatttttaattggaactgattatgctaaaattctaccattaacagcctgttaggtgggatactcgtgtgttgcc gatgtgatagcagataatttaggagaagcgctgttggtcaatcatttctatcgtgttcctacttttatatttagttaaaaaaggaggacg ctcaatatg (SEC. ID NO.: 143)
	<i>spIF</i> Gttcacctataaataagtaagcgagaagcaattggtgttatgtatgctagtataaaaccaacaggtgaaagtacaaggtcattgtctgtttat ttctctctgaaattaagaaatttattgcagataatttagataaaataaatccatccatacattgataaatgatttttagaaattaacaacaaaa tcaacaattttaaacaatctctgtgatctatttctgaatgalltaaaaaataaaactcaaaaacctaacctatattatcgaataacttagag gagcacaataatg (SEC. ID NO.: 144)
	<i>SAUSA300_2268</i> Gatgatgtatgttcgaattatcaattaacatgtgaggacctcccgagggaatacatggcattaaatacacglttaattattataaagggtgactta attttgtcaagttgattttaccacgctttttcttttactaagactttgaatgaagtttaaaaaatattgttatcagtgataaaatattgtcaataa gaagagaatggctaaataatcttaatttcagaaaagtaattgaaccitactggtcttatgtaatatatttcaatatatcgacgaggatgtgtta acaatg (SEC. ID NO.: 145)
25	<i>SAUSA300_2616</i> Ctatcattataatgagataatgtcatttttaattgagctaaacagacagggaagacgattattatgattacgatgatgtcattttgtctgag tatagtcaagaacagttgtattatcaaaagacaagtcgttgcgtgataccacgacgattgatataaatgataaaaaatctgtgagattg catcattgagacaacatcgctatttgaaatggccgaatatatagggttagcgagccacagaatagtagaattatttaaacatgata ggaaggtgagacgcaatg (SEC. ID NO.: 146)

5

10

15

20

25

SAUSA3 00_2617	Caggcctatttttaggaaatcgatgatttttaatatcggtcaaattattgcgaatattttgctgggcacttattgcaccaacattagatatttgatt tataacgaaccggctaacaagggtttatcacacaagggtttatctctgcagtttaaatatttttcagttggtatttgggacaattatttaaagcat atgcttcatctcaataaaaaaaggtagttacgttaagaataatcattttgtgaatcagatatgtaaatgaatgtagaaggtaatgatatcat g (SEC. ID NO.: 147)
isdA	CTATCTGCGGCATTTCGAGAATTACTGAATGTCGCGATGATGATAATTAACGCTAAAATCGTTGTAT TAAAACTTTTAAAATATTTTTCAAAACATAATCCTCCTTTTATGATTGCTTTTAAAGTCTTTAGTAAA ATCATAAATAAATGATTATCATTGTCAATATTTATTTTATAATCAATTTATTATTGTTATACGGAAA TAGATGTGCTAGTATAATTGATAACCATTATCAATTGCAATGGTTAATCATCTCATATAACAACACAT AATTTGTATCCTTAGGAGGAAAAACAACATG (SEC. ID NO.: 148)
isdB	CTTCAGTTGATAACTTTTATTAGCACAGTTGCCTTCGCAACACTTGCCCTTTTAGGTTTCATTATCTTTA TTACTTTTCAAAGAAAAGAATCTAAATAAATCATCGTCACACTCATAACTTAATATATTTTTTATTTT AAATTTTATTTAACCTATGTCATAGATATTTTATAATCTATAACATAGGTTATTTTTTATAAAAAAAT GTTGCAATTAACACTACCATTTCAATGTACAATACAAGTAATCAATTGATAATGATTATCAGTTGATAAT ATACAATTAGGAGTTGTTTCTACAACATG (SEC. ID NO.: 149)
fhuA/C	Ctttctgcagatgaataaataaaggatgagcacacatactaaatagaagtcacggacaagttttgaactatgaagactatctgtggcggt ttttattataaaagtaatacaagacatgacaaatcgagctatccaatttaaaagtaagttagtcaataagattgaaaaatgtataatgatgt catgataatcattatcaattggatgccttgaatgtataaataaataaataaataaataaataaataaataaataaataaataaataaataa ttatg (SEC. ID NO.: 150)
ear	Tgacaccgctaattcaaacattttagacatcttttcaaataattataaaattttacctatagactagttgataittatctacatctcaaaattctcat caacaatcttccatccaacattttttagttttataaattcaaaacaacaaacagatgttaaaaaattattctatttttagttaatagatagtaata cattttgatatttagttaattgttcttttaaaaaatattattattttcatgttaacgtttacaataaaaaaaggagcaattaaatg (SEC. ID NO.: 151)
fnb	Tgtacaggcgataattatgaacacttagtatattgttttaaatagataatgatgaatttaattgaaaaaagataaaaaatacaagccttgt gacaagggtttatgatgactgaatacaattataggtatattcaataataaaattatcaattaacataaaaattatgacaatcttaactttcattaa ctcgtctttttgattgcttttaaaaaccgaacaatatagacttgcatttataagtttaaaaaaattaatgaatttgcatttaaggagatattatagtg (SEC. ID NO.: 152)
spID	Attttaattttgatgcatacattgaaccgggaattcaggatcaccagttctaaattcaacaatgaggtcataggtgtggtgtaigggcgttattgga aaaattggttctgaataatgtgtcgtatattacgcctcaaatcaaaagattttatcaaaagcacattgaacaataaacaatttaaatataca ccaigagcatgtgtcaataattttatgaaaaacatcggtcgaatataacataaaaaaacgtctatatcaaaagcatcatgaataaacagagga gcacaaaaatg (SEC. ID NO.: 153)
dps	Ataatagaatagaatgtggaacaacatgacaccaaccaaatgattatgaaaaatggtcttttttagatgataatgcaagtaaaactact gattgataaaacatacttcttaattgataatggatatactagatgatgaattaaaattagacatttaaaaagggaacaccttacatttagataga ataattataaaaaagagagtaaaaacattacagattagaatcattataataataataataaataaacaagcaagacgtagacaatttaagg agtgtattaaatag (SEC. ID NO.: 154)
CH52_0 0360	GAATTCCTTTATAGCGCGTGCAATCACACCACAAGATAAAAAGATTAAAAAGTGACAAAGCATTATTTATTG CATTTTTAGAAGAAACCTTCGATCAGTTCTTACCATTTTATTCTGCATAAATAACTTTGTTTAAATAAT AGAGCACGTAATCACATCCATGATTTTCGTGCTCTTTTTCTTAATATTAAATCGAACGTTCAACATAA TAATTCATACTTTTAAAAAATTTAAATAAATTTAGGTTGACCTAACATTTTATTAGGTTATTATATT GTCCATAAGAAGTAGAGGTGAGTCAAA (SEC. ID NO.: 155)
CH52_0 0305	CATAATCCCCCTCCTTAAATTTGTTTCATATAAGATTATGATATCTTAGATTGCATAAAAAGACTAGGT TTAATAAAATTTAAATGTGACAAATTAACGACAAGAGAAAATGTCAATTTTGTGACACAAATAACATT TAATTTATTGCTATAATGTATATGTTAGAAAATTTTAAATAAGTAGAATCATGCATCTAAAAGAGATTA ATATTTAAGCTTCAAATTTGAGTAAACGTGGATTACATAATTATCCCAATAAAAAAATCATTACGATT AAGTTCTTTTTATGTCGTCCACATACAATAC (SEC. ID NO.: 156)
CH52_0 1670	CATTTTATATTCCTCCGTAAAAATATAAAGTTTTCTTAACTAGTTTATAATAATTTTAAATTTGATGCA AAAAGACTTTGTAATAATGCGTTCAAGTTAATTATAAATTACTTATACCTTAATATAAACAACCTTAAAC CCTTTTTATTATTTTAAATAACTCTAAAGTACAACCTAATCCGCTCTCTTTAAAAATATAAATGATAA TAAGTGCACATAATTTCTCAATGGATTTTATGAATTTAAATATGTTATCATTTCACTAGGACATTTG TAATATGGTATGATGCTATTTATGATTTT (SEC. ID NO.: 157)

M. et al. (2008). Neutrophil microbicides induce a pathogen survival response in community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J Immunol 180(1):500-509: fnb, hlb, hlgB, isdA, isdB, isdG, fhuA, fhuB, dps. Por último, Stauff D. L. et al., (2007). Signaling and DNA-binding activities of the *Staphylococcus aureus* HssR-HssS two-component system required for heme sensing. J Biol Chem, 7 de septiembre; 282(36):26111-21, describe hrtAB. Para capturar todos los elementos reguladores relevantes de estos genes, se seleccionaron 300 pares de bases dirección 5' del codón de inicio de cada gen como la región promotora. Luego, cada región promotora se clonó dirección 5' de la proteína verde fluorescente (GFP) para visualizar la actividad promotora en los medios, la sangre y el suero. Los promotores se clonaron frente a GFPmut2 (una variante de GFP), de modo que cuando se activa el promotor, GFP se transcribe y se traduce en una proteína fluorescente. La alta fluorescencia se correlaciona con la alta actividad promotora.

Materiales y métodos

Clonación. Para cada gen sensible a la sangre o al suero seleccionado de la literatura, se seleccionaron 300 pares de bases de secuencia inmediatamente dirección 5' del codón de inicio como la región promotora. Los

promotores se amplificaron a partir del genoma de *Staphylococcus aureus* 502a y se clonaron frente a GFP mediante el ensamblaje Gibson (GA) o la digestión con enzima de restricción (RE). Para el ensamblaje Gibson, los

5 promotores se amplificaron mediante el uso de cebadores con homología a la cadena principal del vector. En la tabla a continuación, la secuencia del cebador que coincide con el promotor está en mayúscula, mientras que la secuencia del cebador que es homóloga a la cadena

10 principal del vector está en minúscula. Para la digestión con enzimas de restricción, los promotores se amplificaron mediante el uso de cebadores con sitios de restricción SphI o PstI. En la tabla a continuación, la secuencia del cebador que contiene sitios de restricción está en

15 negrita. La cadena principal del vector, el plásmido pCN56 (BEI Resources), se amplificó mediante PCR para el ensamblaje Gibson, o simplemente se digirió con enzimas de restricción para la clonación de enzimas de restricción. Cabe destacar que el promotor dps nunca se clonó con éxito

20 con GFP. Después de varios intentos, se abandonó el casete dps-GFP. Los casetes plasmídicos finales para el cribado son: pCN56-promotor-GFP. Los cebadores usados para la amplificación de promotores se muestran en la Tabla 21. Los cebadores usados para la amplificación de la cadena

25 principal del vector se muestran en la Tabla 22.

Tabla 21. Cebadores usados para la amplificación de promotores

5

10

15

20

25

Promotor	Método de clonación	Cebador directo (BPC#:secuencia)	Cebador inverso (BPC#:secuencia)
<i>isdA</i>	RE	366:TATAT GCATGC CTATCTGCGGC ATTTGCAG (SEC. ID NO.: 164)	367:GATAC CTGCAG GTTGTTTTCTCTCT AAGGATA (SEC. ID NO.: 165)
<i>isdB</i>	RE	368:GATGCG CATG CCCTTCAGTTGAT AACTTTATTA (SEC. ID NO.: 166)	369:GATGC CTGCAG GTTGTAGAAACAAC TCCTAAT (SEC. ID NO.: 167)
<i>isdI</i>	RE	379:GATAC GCATG CTTACTCGTAGC AGTTTTTTGT (SEC. ID NO.: 168)	380:GATAG CTGCAG GGGCAATCACTCTCT CTATTTT (SEC. ID NO.: 169)
<i>isdG</i>	RE	377:GATGCG CATG CAAACACAAGAT AATTGAATTT (SEC. ID NO.: 170)	378:GATGC CTGCAG AATTATCCTCTTTT CTGTTTAA (SEC. ID NO.: 171)
<i>sbnC</i>	RE	381:GAATCG CATG CCCTTTATTAAAG CTGACAAAGTCGTA (SEC. ID NO.: 172)	382:GAAATC CTGCAG TGTTTCAGACACCT CGCATTC (SEC. ID NO.: 173)
<i>sbnE</i>	GA	305:taactgactaggcgccgcGAATACTTC AAGGATTAACATATAGTGCATTG (SEC. ID NO.: 174)	306:ccagtgaaggtcttctcttactcatTTTTTG TTTCAACTCCCATATTTTCATTAATG (SEC. ID NO.: 175)
<i>lrgA</i>	GA	307:taactgactaggcgccgcATGAAAAAC GATTGAATCCCACTTATTTTATACG (SEC. ID NO.: 176)	308:ccagtgaaggtcttctcttactcatTGCCTCC TACGTTTGATTTAACTAAAG (SEC. ID NO.: 177)
<i>lrgB</i>	GA	309:taactgactaggcgccgcGTTTAGTAT TATTATTTGTATTATTATGTACTGGT GCTG (SEC. ID NO.: 178)	310:ccagtgaaggtcttctcttactcatGAGCTTG TGCCTCCTCTATTTTG (SEC. ID NO.: 179)
<i>hlgB</i>	GA	311:taactgactaggcgccgcAAGATCCTA GAGATTATTTCTGTTCCAG (SEC. ID NO.: 180)	312:ccagtgaaggtcttctcttactcatATCAATT CTGTCCTTTCACCTTGATTTTC (SEC. ID NO.: 181)
<i>fhuA</i>	GA	313:taactgactaggcgccgcCTTTCTTGC AGATGAATAAAATAATGGTATGAGC (SEC. ID NO.: 182)	314:ccagtgaaggtcttctcttactcatAATTTCC CTACTTTCAATAAAATCTTTCTG (SEC. ID NO.: 183)
<i>fhuB</i>	GA	315:taactgactaggcgccgcTCAAAATGT AACAATGATCAGAGGC (SEC. ID NO.: 184)	316:ccagtgaaggtcttctcttactcatATTGAGC GTCCTCCTTTTTTAACTAAATATAAAAAG (SEC. ID NO.: 185)

5

10

15

20

25

<i>ear</i>	GA	317:taactgactagggcgccgcTGACACCT GCTAATTCAAACATTATTTG (SEC. ID NO.: 186)	318:ccagtgaaggtcttctcttactcatTTTAATT GCTCCTTTTTTATATTGTAAACGTTTAC (SEC. ID NO.: 187)
<i>fnb</i>	GA	319:taactgactagggcgccgcGTACAGG CGATAATTATGAAACACTTAG (SEC. ID NO.: 188)	320:ccagtgaaggtcttctcttactcatTATAATA TCTCCCTTTAAATGCAAAATTCATTAATT TTTTTAAAC (SEC. ID NO.: 189)
<i>hfb</i>	GA	321:taactgactagggcgccgcTTCAGGCT ATCAATAATGCTTTGAAATC (SEC. ID NO.: 190)	322:ccagtgaaggtcttctcttactcatAGAAAC CTTGTAACAACAGTATTTATTGGG (SEC. ID NO.: 191)
<i>spIF</i>	GA	323:taactgactagggcgccgcGTTACCT ATATTAAATAGTAAGCGAGAAGC (SEC. ID NO.: 192)	324:ccagtgaaggtcttctcttactcatTTTTGTG CTCCTCTAAGTATTCGTATAAATATAAG G (SEC. ID NO.: 193)
<i>spID</i>	GA	325:taactgactagggcgccgcATTTTAAAT TTTGATGCATACATTGAACCCGG (SEC. ID NO.: 194)	326:ccagtgaaggtcttctcttactcatTTTTGTG CTCCTCTGTTTATTCATGATGC (SEC. ID NO.: 195)
<i>dps</i>	GA	327:taactgactagggcgccgcATAATAGAA ATAGAATGTGGAACAACATGGC (SEC. ID NO.: 196)	328:ccagtgaaggtcttctcttactcatATTTAAT ACACTCCTTAAATGTCTACGTC (SEC. ID NO.: 197)
SAUSA 300_2268	GA	329:taactgactagggcgccgcGATGATGT ATGTTTCGAATTTATCAATTAACATG TG (SEC. ID NO.: 198)	330:ccagtgaaggtcttctcttactcatTGTTAAC ACATCCTCGTCGATAATATTG (SEC. ID NO.: 199)
SAUSA 300_2616	GA	331:taactgactagggcgccgcCTATCATT TAATGAGATAATGTCATTTTAATTG AGC (SEC. ID NO.: 200)	332:ccagtgaaggtcttctcttactcatTGGCGT CTCACCTTCCTATC (SEC. ID NO.: 201)
SAUSA 300_2617	GA	333:taactgactagggcgccgcCAGGCCTA TTTTCTAGGAAATCGATG (SEC. ID NO.: 202)	334:ccagtgaaggtcttctcttactcatGATATAT CATTACCTTTCTACATTATTACATATC (SEC. ID NO.: 203)
<i>hlgA2</i>	GA	201:cgtaaactaattaattaagaaggagatat tACTTCAAATTTTCACAACTATTGC G (SEC. ID NO.: 204)	185:ccagtgaaggtcttctcttactcatAGAAAT CACTTTCTTTCTATTTAATTTTAAGTTCA TATATA (SEC. ID NO.: 205)
<i>hrtAB</i>	GA	205:cgtaaactaattaattaagaaggagatat tGTTTCATATTGAGTTCATATTTCAAC C (SEC. ID NO.: 206)	188:ccagtgaaggtcttctcttactcatATCGATT CACTTCTCCCTATTTCTTC (SEC. ID NO.: 207)

Tabla 22. Cebadores usados para la amplificación de la cadena principal del vector

5

Plásmido	Método de clonación	Cebador directo	Cebador inverso
pCN56	GA (hlgA2, hrtAB)	197:ATGAGTAAAGGAGAAGAAGCTTTTC ACTGG (SEC. ID NO.: 208)	198:ATGTATATCTCCTTCTTAAATTAA TTAGTTAACGAATTCG (SEC. ID NO.: 209)
pCN56	GA (todos los demás promotores)	197:ATGAGTAAAGGAGAAGAAGCTTTTC ACTGG (SEC. ID NO.: 210)	265:gccggccgcctagtcagttaACTCAAAGG CGGTAATACGG (SEC. ID NO.: 211)

Muestras de sangre y suero. Para las muestras de sangre, se extrajeron 4-8 mL de sangre humana en tubos heparinizados y se congelaron. Para las muestras de suero, se extrajeron 4-8 mL de sangre humana en tubos no heparinizados, se dejaron reposar a temperatura ambiente durante 15-30 minutos hasta que se coagularon por completo y se centrifugaron a 3,000 rpm durante 15 minutos. El sobrenadante de suero se retiró cuidadosamente, se transfirió a un nuevo tubo y se congeló.

Construcción de líneas celulares. Las células de *Staphylococcus aureus* RN4220 se transformaron con plásmidos pCN56-promotor-GFP mediante electroporación. Las reservas de glicerol de cada línea celular se conservaron como material de inicio para el siguiente ensayo de inducción de sangre/suero. Las líneas celulares finales para el cribado son: RN4220 + pCN56-promotor-GFP.

Inducción de sangre y suero. Para cada línea celular, se inocularon 1-3 mL de medio triptico de caldo de soja (TSB) con 10 µg/mL de eritromicina con una pequeña cucharada de reserva de glicerol. El cultivo se
5 cultivó a 37°C con agitación durante la noche a 240 rpm. Por la mañana, se midió la densidad óptica (OD) del cultivo y se usó el cultivo para inocular 1 mL de TSB fresco + eritromicina a una OD de 0.1. Este cultivo de OD de 0.1 se cultivó a 37°C con agitación a 240 rpm durante
10 2-3 horas hasta que la OD alcanzó 1-2. Luego, el cultivo se usó para inocular tres cultivos separados de 500 µL de sangre, suero o TSB recién descongelados, todos con eritromicina, a una OD de 0.1. Estos tres cultivos se cultivaron a 37°C con agitación a 240 rpm durante 1.5-2
15 horas. Se colocaron 10 µL de cada cultivo en un portaobjetos de microscopio, se cubrieron con un cubreobjetos y se observaron con microscopía fluorescente.

Microscopía. Se tomaron imágenes con un iPhone a
20 través del ocular de un microscopio fluorescente.

Resultados y conclusiones. Se leyeron las imágenes fluorescentes de cada línea celular *Staphylococcus aureus* RN4220 + pCN56-promotor-GFP cultivada en cualquier medio (control negativo), sangre o suero, y se calificó el
25 nivel de fluorescencia como se resume en la Tabla 23.

Tabla 23. Niveles de fluorescencia de GFP del promotor relativo en TSB, sangre o suero

		Nivel de fluorescencia		
	Promotor	Medio TSB	Sangre	Suero
5	isdA	alto	alto	alto
	isdB	alto	(sin muestra)	alto
	isdI	bajo	alto	alto
	isdG	muy bajo	alto	alto
	sbnC	muy bajo	medio	medio
10	sbnE	muy bajo	bajo	bajo
	lrgA	muy bajo	bajo	bajo
	lrgB	muy bajo	bajo	ninguno
	hlgB	muy bajo/ninguno	medio	medio
	fhuA	alto	alto	alto
15	fhuB	muy bajo	bajo	bajo
	ear	alto	alto	alto
	fnb	medio	medio	medio
	hlb	muy bajo/ninguno	medio	medio
	spIF	muy bajo/ninguno	bajo	bajo
20	spID	muy bajo/ninguno	muy bajo/ninguno	muy bajo/ninguno
	SAUSA 300_2268	bajo	alto	medio
	SAUSA 300_2616	muy bajo/ninguno	bajo	bajo
	SAUSA 300_2617	muy bajo/ninguno	bajo	bajo
	hlgA2	bajo	alto	medio
25	hrtAB	muy bajo/ninguno	medio	medio

El promotor para el interruptor de inactivación requiere dos características esenciales. Primero, el promotor debe activarse, o estar regulado de manera ascendente, cuando las células se exponen a la sangre o al suero. Este cribado muestra claramente un espectro de actividad promotora en presencia de sangre o suero; algunos promotores son muy activos en sangre o suero, y otros menos. En función del mecanismo de actividad, los diferentes genes de muerte probablemente requerirán promotores con diferentes niveles de actividad. Por ejemplo, un gen de muerte que es extremadamente letal, en lugar de tóxico, puede requerir un promotor con muy baja resistencia. A medida que se evalúan diversos genes de muerte, será posible volver a esta lista de promotores y construir de manera racional interruptores de inactivación.

El segundo requisito es que el promotor candidato debe tener poca o ninguna actividad cuando las células no están expuestas a sangre o suero. Como el propósito principal de 502a es colonizar la piel antes de la exposición a MRSA, es crucial que las células crezcan normalmente en su nicho previsto y la actividad del interruptor de inactivación no interfiera con esta función. Los promotores candidatos de interruptor de inactivación más deseables en este cribado exhibieron una actividad muy baja en TSB y una actividad media/alta en sangre o suero que incluye *isdG*, *sbnC*, *sbnE*,

hlgB, hlb, SAUSA300_2268, hlgA2 y hrtAB. Sin embargo, isdI, lrgA, lrgB, fhuB, splF, dps, SAUSA300_2616, SAUSA300_2617 también pueden ser candidatos de promotores útiles para una evaluación adicional. Este cribado muestra que varios
5 promotores candidatos (isdA, isdB, fhuA, ear y fnb) estaban activos antes de la exposición a la sangre y al suero, por lo que estos dejaron de ser prioritarios de la lista de posibles promotores del interruptor de inactivación.

Se seleccionaron promotores candidatos adicionales de la
10 literatura para futuros cribados, que incluyen lukG, lukH, chs, efb, icaB, SAUSA300_1059, SAUSA300_0370, aur y SAUSA300_0169, como se describe en Malachowa N, 2011 y Palazzolo-Ballance AM, 2008.

Ejemplo 16. PCR qRT para la expresión genómica de promotores 15 sensibles a la sangre y al suero

En este ejemplo, PCR qRT se realizó para 20 genes endógenos de *Staphylococcus aureus* que, de acuerdo con la literatura, son sensibles a la sangre y/o al suero. El cribado se usó para ayudar a identificar promotores
20 candidatos sensibles a la sangre y/o al suero para usarse en la construcción de una modificación molecular de interruptor de inactivación que comprende un gen de muerte celular. Brevemente, se cultivaron células 502a en medio TSB, sangre o suero, y se extrajo ARN en diversos puntos temporales.
25 Además, se evaluaron varios genes de *Staphylococcus aureus*

que se predice que no responden en sangre o suero. Se considera que estos son candidatos para que un segundo promotor se ligue operativamente a una antitoxina específica para el gen de muerte celular. Los resultados muestran varios
5 genes que están regulados de manera ascendente en sangre o suero, y algunos que son estables en sangre o suero.

Proceso de crecimiento. Se realizó un experimento de crecimiento de la siguiente manera. Se inocularon 4 mL de cultivo de células 502a realizado durante la noche con una
10 pequeña cucharada de células competentes. Por la mañana, se inoculó un matraz de agitación estéril desechable de 125 mL con 50 mL de cultivo realizado durante la noche hasta una densidad óptica (OD) de 0.1. Las células se cultivaron hasta una OD de 2 (varias horas). En una OD de 2, se eliminaron 500
15 μ L para una muestra de ARN T=0. Se transfirieron 3 x 7 mL de las células restantes para triplicar tubos cónicos de 50 mL. Los tubos se centrifugaron, se decantó el sobrenadante, se lavaron con PBS, se volvieron a centrifugar, se eliminó el sobrenadante y las células se volvieron a suspender en 7 mL
20 de TSB, suero o sangre. Los tubos se colocaron a 37°C con agitación a 240 rpm. Se recolectaron muestras de ARN adicionales a T=1 (se tomaron muestras de los tubos inmediatamente y no se agitaron a 37°C), T=15 y T=45 minutos después de la exposición al suero o la sangre. El método de
25 muestreo de ARN para cultivos de TSB y suero consistió en 500

μL transferidos a un tubo de 1.5 mL, células centrifugadas a 13,200 rpm durante 1 minuto, sobrenadante decantado y 100 μL de RNALater agregado. El muestreo para cultivos de sangre fue el mismo, excepto que se aspiró el sobrenadante y se
5 agregaron 200 μL de RNALater. Todas las muestras se almacenaron a -20°C hasta su posterior procesamiento (10 meses de almacenamiento).

Procesamiento de muestras de qPCR y análisis de datos. Se realizó extracción de ARN y síntesis de cADN. Las pelotillas de
10 ARN congelados almacenados en RNALater se lavaron una vez en PBS, se extrajeron mediante el uso del kit Ambion RiboPure Bacteria y se eluyeron en 2 x 25 uL. Las muestras de ARN se trataron con ADNasa mediante el uso del kit ADNasa Ambion Turbo. Las muestras con una concentración final de menos de 50 ng/uL se
15 precipitaron con etanol para concentrar el ADN. Se usaron 10 μL de ARN tratado con ADNasa en el kit de transcripción inversa de cADN de alta capacidad de Applied Biosystems. qPCR se realizó con la mezcla maestra verde PowerUp SYBR de Applied Biosystems (reacción de 10 μL con 1 μL de cADN). Las muestras se evaluaron
20 para buscar cambios en la expresión génica a lo largo del tiempo y en diferentes medios, y se normalizaron al gen de mantenimiento, *gyrB*, a través del método $\Delta\Delta Ct$. Los valores de *Ct* (ciclos hasta el umbral) para las transcripciones de *gyrB* se restaron de los valores de *Ct* para las transcripciones génicas
25 para cada muestra de ARN. Estos valores de ΔCt luego se

normalizaron al punto temporal inicial. En la Tabla 24 se muestran los cebadores para el cribado por PCR qRT de genes candidatos sensibles al suero y/o la sangre.

Tabla 24. Cebadores para el cribado por PCR qRT de genes candidatos sensibles al suero y/o la sangre

	Gen	Cebadores por PCR qRT (BPC#-secuencia) Directo Inverso	
10	<i>gyrB</i>	BPC802-TTGGTACAGGAATCGGTGGC (SEC. ID NO.: 212)	BPC803-TCCATCCACATCGGCATCAG (SEC. ID NO.: 213)
	<i>isdA</i>	BPC114-GCAACAGAAGCTACGAACGC (SEC. ID NO.: 214)	BPC115-AGAGCCATCTTTTTGCACTTGG (SEC. ID NO.: 215)
	<i>isdB</i>	BPC116-GCAACAATTTTATCATTATGCCAGC (SEC. ID NO.: 216)	BPC117-TGGCAACTTTTGTACACCTTCA (SEC. ID NO.: 217)
	<i>isdI</i>	BPC764-ACCGAGGATACAGACGAAGTT (SEC. ID NO.: 218)	BPC765-TGCTGTCCATCGTCATCACTT (SEC. ID NO.: 219)
	<i>isdG</i>	BPC120-AACCAATCCGTAAAAGCTTGC (SEC. ID NO.: 220)	BPC121-AGGCTTTGATGGCATGTTTG (SEC. ID NO.: 221)
15	<i>sbnC</i>	BPC768-AGGGAAGGGTGTCTAAGCAAC (SEC. ID NO.: 222)	BPC769-TCAGTCCTTCTTCAACGCGA (SEC. ID NO.: 223)
	<i>sbnE</i>	BPC124-ATTCGCTTTAGCCGCAATGG (SEC. ID NO.: 224)	BPC125-GCAACTTGTAGCGCATCGTC (SEC. ID NO.: 225)
	<i>lrgA</i>	BPC126-GATACCGGCTGCTACGAAGAG (SEC. ID NO.: 226)	BPC127-TGGTGCTGTTAAGTTAGGCGA (SEC. ID NO.: 227)
	<i>lrgB</i>	BPC128-ACAAAGACAGGCACAACTGC (SEC. ID NO.: 228)	BPC129-GGTGTAGCAACCAGCCAAAGA (SEC. ID NO.: 229)
	<i>hlgB</i>	BPC760-TGGTTGGGGACCTTATGCAAG (SEC. ID NO.: 230)	BPC761-GGCATTTGGTGTTCGGCTAT (SEC. ID NO.: 231)
20	<i>fhuA</i>	BPC132-CACGTTGTCTTTGACCACCAC (SEC. ID NO.: 232)	BPC133-TGGGCAATGGAAGTTACAGGA (SEC. ID NO.: 233)
	<i>fhuB</i>	BPC134-CAATACCTGCTGGAACCCCA (SEC. ID NO.: 234)	BPC135-GGGTCCGCATATTGCCAAAC (SEC. ID NO.: 235)
	<i>ear</i>	BPC136-CCACTTGTGAGATCTGCTCCT (SEC. ID NO.: 236)	BPC137-GGTTTGGTTACAGATGGACAAACA (SEC. ID NO.: 237)
	<i>fmb</i>	BPC772-CGCAGTGAGCGACCATACA (SEC. ID NO.: 238)	BPC773-TTGGTCCTTGTGCTTGACCA (SEC. ID NO.: 239)
	25		

5	<i>hlgB</i>	BPC140-CTACGCCACCATCTTCAGCA (SEC. ID NO.: 240)	BPC141-ACACCTGTACTCGGTCGTTT (SEC. ID NO.: 241)
	<i>spIF</i>	BPC142-TGCAATTATTCAGCCTGGTAGC (SEC. ID NO.: 242)	BPC143-CCTGATGGCTTATTACCGGCAT (SEC. ID NO.: 243)
	<i>spID</i>	BPC144-AGTGACATCTGATGCGGTTG (SEC. ID NO.: 244)	BPC145-AACACCAATTGCTTCTCGCTT (SEC. ID NO.: 245)
	<i>dps</i>	BPC146-AGCGGTAGGAGGAAACCCTG (SEC. ID NO.: 246)	BPC147-GTTCTGCAGAGTAACCTTTGCG (SEC. ID NO.: 247)
	<i>srtB</i>	BPC846-TGAGCGAGAACATCGACGTAA (SEC. ID NO.: 248)	BPC847-CCGACATGGTGCCCGTATAA (SEC. ID NO.: 249)
10	<i>emp</i>	BPC854-TGCGGTGAATGTAGCAACAAA (SEC. ID NO.: 250)	BPC855-ACTTCTGGGCGCTTTAGCAACA (SEC. ID NO.: 251)
	<i>sbnA</i>	BPC858-CCTGGAGGCAGCATGAAAGA (SEC. ID NO.: 252)	BPC859-CATTGCCAACGCAATGCCTA (SEC. ID NO.: 253)
	CH52_360	BPC834-TTCAACTCGAACGCTGACGA (SEC. ID NO.: 254)	BPC835-TTGCACCCATTGTTGCACCT (SEC. ID NO.: 255)
	CH52_305	BPC838-TTCCTGGAGCAGTACCACCA (SEC. ID NO.: 256)	BPC839-CAGCGCAATCGCTGTAAACTA (SEC. ID NO.: 257)
	CH521670	BPC842-GCGATTATGGGACCAAAACGG (SEC. ID NO.: 258)	BPC843-ACTTCATAGCTTGGGTGTCCC (SEC. ID NO.: 259)
15	<i>clfA</i>	BPC850-TCCAGCACAAACAGGAAACGA (SEC. ID NO.: 260)	BPC851-TAGCTTCACCAGTTACCGGC (SEC. ID NO.: 261)
	SAUSA300_2268	BPC778-GCTTCTACAGCTTTGCCGAT (SEC. ID NO.: 262)	BPC779-GATTTGGTGCTTACTGCCACC (SEC. ID NO.: 263)
	SAUSA300_2616	BPC774-ACAAGCGCAACAAGCAAGAG (SEC. ID NO.: 264)	BPC775-TGCGTTTGATACCTTTAACACGG (SEC. ID NO.: 265)
	SAUSA300_2617	BPC152-GGGCTGAAAAAGTTGGCATGA (SEC. ID NO.: 266)	BPC153-ACGCGTTGTTTTGACCTCC (SEC. ID NO.: 267)
	<i>hlgA2</i>	BPC179-TGATTTCTGCACCTTGACCGA (SEC. ID NO.: 268)	BPC180-AGCCCCTTTAGCCAATCCAT (SEC. ID NO.: 269)
20	<i>hrtAB</i>	BPC713-ACACAACAACAACGTGATGAGC (SEC. ID NO.: 270)	BPC714-TAACGGTGCTTGCTCTGCTT (SEC. ID NO.: 271)

Los resultados de qPCR se muestran en las Figuras 13A y 13B que muestran varios genes que están regulados de manera ascendente en sangre y/o suero. La Figura 13A muestra los

candidatos de promotores *isdA*, *isdB*, *hlgA2*, *hrtAB*, *isdG*, *sbnE*, *lrgA*, *lrgB*, *fhuA*, *fhuB*, *ear*, *hlb*, *splF*, *splD*, *dps* y SAUSA300_2617 a 1 min, 15 min y 45 min en suero, y las relaciones de cambio en la expresión génica en comparación con los medios. Los candidatos preferidos de promotores sensibles al suero en este cribado incluyen *hlgA2*, *hrtAB*, *isdA*, *isdB*, *isdG*, *sbnE*, *ear* y *splD*, como se muestra en la Tabla 25, porque exhiben al menos un aumento de 9 veces de la expresión génica cuando se exponen al suero después de 45 min, una respuesta al suero ligeramente retrasada, y no se regulan significativamente de manera ascendente a T=1 min.

Tabla 25. Candidatos de promotores preferidos para genes sensibles al suero por qPCR

15

Gen regulado de manera ascendente	Relación de cambio en suero a T=45 min
<i>hlgA2</i>	9
<i>hrtAB</i>	209
<i>isdA</i>	15
<i>isdB</i>	172
<i>isdG</i>	42
<i>sbnE</i>	30
<i>ear</i>	10
<i>splD</i>	9

La Figura 13B muestra la actividad de promotores candidatos cuando se exponen a sangre de candidatos de promotores *isdA*, *isdB*, *hlgA2*, *hrtAB*, *isdG*, *sbnE*, *lrgA*, *lrgB*, *fhuA*, *fhuB*, *ear*, *hlb*, *splF*, *splD*, *dps* y SAUSA300_2617 a 1 min, 15 min y 45 min en suero y las relaciones de cambio en la expresión génica en comparación con los medios por qPCR. Los candidatos de promotores preferidos exhibieron una

respuesta de expresión génica levemente retrasada a 1 minuto, pero se regularon de manera significativamente ascendente al menos 30 veces los puntos temporales de 15 y 45 min. Los candidatos de promotores preferidos para genes sensibles a la sangre por qPCR incluyeron isdA, isdB, isdG, sbnE y SAUSA300_2617, como se muestra en la Tabla 26.

Tabla 26. Candidatos de promotores preferidos para genes sensibles a la sangre por qPCR

Gen regulado de manera ascendente	Relación de cambio en sangre a T=45
isdA	77
isdB	66
isdG	69
sbnE	33
SAUSA300_2617	150

Otra PCR qRT para la expresión genómica de promotores sensibles al suero

En este ejemplo, PCR qRT también se realiza para cribar genes adicionales de *Staphylococcus aureus* que se encuentran en la literatura que son sensibles a la sangre y/o al suero. Brevemente, se cultivaron células 502a en medio TSB o suero, y se extrajo ARN en diversos puntos temporales. Los resultados muestran varios genes que están altamente regulados de manera ascendente en suero. Esencialmente, el protocolo experimental fue similar al ejemplo anterior, excepto que las muestras de ARN se normalizaron antes de la conversión a cADN, y las muestras se recolectaron a T=90 min.

Proceso de crecimiento. El experimento de crecimiento se

realizó de la siguiente manera. Una reserva de glicerol de 502a se sembró en una placa bacteriana nueva y se cultivó durante la noche. Se inocularon 3-5 colonias individuales de la placa en un cultivo de 4 mL de medio BHI y se cultivaron 5 durante la noche a 37°C con agitación a 240 rpm. Por la mañana, el cultivo se diluyó a una densidad óptica (OD) de 0.05 en 5 mL de medio BHI fresco. Las células se cultivaron a 37°C con agitación a 150 rpm durante varias horas hasta una OD de aproximadamente 1. En ese momento, se recolectaron 10 muestras de ARN durante un punto temporal T=0 (se transfirió 1 mL a un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL, se centrifugó a 16,000 rpm durante 1 minuto, se vertió el sobrenadante, se volvieron a suspender las células en 1 mL de PBS estéril, se centrifugaron a 16,000 rpm durante 1 minuto, se aspiró el 15 sobrenadante, las células se volvieron a suspender en 200 µL RNALater y se almacenaron a -20°C). El cultivo restante se volvió a diluir hasta una OD de 0.05 en 3 tubos heparinizados replicados de 10 mL de medio BHI fresco o suero humano descongelado, y se incubó a 37°C con agitación a 150 rpm. Se 20 recolectaron muestras adicionales para ARN a T=90 minutos y T=180 minutos. Para estas muestras posteriores, se centrifugó un tubo de 10 mL a 3,000 rpm durante 10 minutos, se vertió el sobrenadante, se volvieron a suspender las células en 1 mL de PBS, se transfirieron a un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL, 25 se centrifugaron a 16,000 rpm durante 1 minuto, se aspiró el

sobrenadante, las células se volvieron a suspender en 200 μ L de RNeasy Lysis Buffer y se almacenaron a -20°C .

Procesamiento de muestras de qPCR y análisis de datos. La extracción de ARN y la síntesis de cADN se realizaron de la siguiente manera. Las pelletillas de ARN congelados almacenados en RNeasy Lysis Buffer se lavaron una vez en PBS, se extrajeron mediante el uso del kit Ambion RiboPure Bacteria y se eluyeron en 2 x 50 μ L. Las muestras de ARN se trataron con DNase mediante el uso del kit DNase Ambion Turbo. Las muestras con una concentración final de menos de 50 ng/ μ L se precipitaron con etanol para concentrar el ADN. Se usaron 500 ng de ARN tratado con DNase en el kit de transcripción inversa de cADN de alta capacidad de Applied Biosystems. qPCR se realizó con la mezcla maestra verde PowerUp SYBR de Applied Biosystems (reacción de 10 μ L con 1 μ L de cADN).

Las muestras se evaluaron para buscar cambios en la expresión génica a lo largo del tiempo y en diferentes medios, y se normalizaron a genes de mantenimiento, *gyrB*, *sigB*, *rho* o un promedio de los tres, a través del método $\Delta\Delta\text{Ct}$. Los valores de Ct (ciclos hasta el umbral) para las transcripciones de los genes de mantenimiento se restaron de los valores de Ct para las transcripciones génicas para cada muestra de ARN. Estos valores de ΔCt luego se normalizaron al punto temporal inicial. La expresión génica a los 90 minutos tanto en TSB como en suero se normalizó a valores en $T=0$.

Los resultados se muestran en la Figura 13C que muestra la expresión génica en suero a T=90 min para los candidatos de promotores *hlgB*, *ear*, *fnb*, *splF*, *splD*, *clfA*, CH52_360, CH52_305, CH52_1670, *hlyB*, *lrgB*, *lrgA*, *emp*, *fhuA*, *fhuB*, *isdI*,
5 *isdA*, *srtB*, *isdG*, *sbnE*, *sbnA*, *sbnC* e *isdB* por qPCR, en comparación con TSB. La Figura 13C muestra que los genes regulados de manera ascendente más de 5 veces en suero incluyen *fhuA*, *fhuB*, *isdI*, *isdA*, *srtB*, *isdG*, *sbnE*, *sbnA*, *sbnC* e *isdB*. La Figura 13C muestra que varios genes se regulan de
10 manera ascendente más de 100 veces después de 90 minutos de incubación en suero, incluidos *isdA*, *srtB*, *isdG*, *sbnE*, *sbnA*, *sbnC* e *isdB*. Específicamente, los genes en las familias *isd*, *sbn* y *fhu* están regulados de manera ascendente en diversos grados. Todos los genes estudiados en la presente tienen una
15 expresión estable de T=0 a T=90 minutos en TSB. Varios genes de este experimento muestran una alta regulación de manera ascendente en suero, mientras que otros muestran una expresión estable en suero. Ambas características pueden ser útiles en la construcción de un interruptor de inactivación.
20 Por ejemplo, un gen de muerte celular se puede controlar con un promotor que regulará de manera ascendente en suero y/o sangre, y un gen de antitoxina específico para el gen de muerte celular se puede controlar con un promotor que regulará de manera descendente o permanecerá estable en
25 suero.

Ejemplo 17. Spral como una toxina del gen de muerte celular candidata mediante el uso de sistemas de inducción a base de plásmidos

En este ejemplo, el gen de muerte celular candidato
 5 sprA1 se evaluó mediante el uso de dos sistemas de inducción a base de diferentes plásmidos en dos cepas de *Staphylococcus aureus*.

Ejemplo 17A. La prueba inicial de sprA1 como inhibidor del crecimiento celular de las células de Staph aureus
 10 (RN4220) se realizó mediante un promotor inducible por cadmio. Se clonó un gen de toxina spral detrás del promotor de cadmio en pCN51 (pTK1). El vector pCN51 es un plásmido de bajo número de copias que contiene un promotor inducible por cadmio.

15 Esta versión de spral contiene un antisentido que regula spral. A continuación se muestra la secuencia completa del sprA1-sprA1AS que está dirección 3' del promotor de cadmio. Este constructo se denomina pTK1.

pTK1: sprA1-sprA1AS: gen de toxina sprA1 y sitio de
 20 fijación de ribosomas, y gen de antitoxina (pTK1 o p001). Se usó pTK1 en experimentos con el promotor de cadmio.

CGCAGAGAGGAGGTGTATAAGGTGATGCTTATTTTCGTTACATCATAGCACCAAGT
 CATCAGTGGCTGTGCCATTGCGTTTTTTTCTTATTGGCTAAGTAGACGCAATACAAAATAG
 GTGACATATAGCCGCACCAATAAAAATCCCCTCACTACCGCAAATAGTGAGGGGATTGGTG
 25 TATAAGTAAATACTTATTTTCGTTGT (SEC. ID NO.: 272)

Región del sitio de fijación de ribosomas

Gen de toxina sprA1

Gen de antitoxina sprA1

CCCCTCACTACCGCAAATAGTGAGGGGATTGGTGTATAAGTAAATACTTATTTTCGTTGT

5 (SEC. ID NO.: 273) gen de antitoxina sprA1

El cadmio es un compuesto tóxico, por lo que la primera etapa fue encontrar la concentración subinhibitoria en la que el cadmio tiene un efecto mínimo suficiente sobre el crecimiento para observar un delta marcado si sprA1 tiene un crecimiento negativo de RN4220. RN4220 se cultivaron durante la noche en medio TSB y se diluyeron hasta OD de 0.5 y se separaron en ocho tubos de cultivo de 14 mL que contenían cada uno 3 mL de células RN4220 diluidas. Se inocularon cuatro concentraciones de cadmio en 4 tubos, cada uno sin control de cadmio. 10 nM, 100 nM, 1 µM y 10 µM fueron las concentraciones de cadmio finales. Los resultados se evaluaron a las 2 y 22 horas de crecimiento a 30°C con 240 RPM de agitación (datos no mostrados). Después de 22 horas, 10 µM de cadmio mostró el mayor efecto negativo.

20 El experimento de determinar la concentración subinhibitoria mínima de cadmio se repitió por duplicado mediante el uso de 10 nM, 100 nM y 1 µM de cadmio a través de células de *Staphylococcus aureus* RN4220. Después de 2 horas, los resultados de crecimiento celular de la prueba de cadmio muestran una buena tolerancia de hasta 1 µM (datos no

25

mostrados).

A continuación, se evaluó 500 nM y 1 μ M de cadmio mediante el uso de células RN4220 transformadas con pCN54 que tiene un promotor inducible por cadmio como control
5 adicional. Las células RN4220 se diluyeron hasta OD de 0.5 (630 nm) y se dividieron en alícuotas en 4 tubos de cultivo, cada uno con 3 mL. Dos de los tubos se inocularon con 500 nM y 1 μ M de cadmio. Las células RN4220 que contenían pCN54 se diluyeron hasta OD de 0.5 (630 nm) y se dividieron en
10 alícuotas en 4 tubos de cultivo, cada uno con 3 mL. Dos de los tubos se inocularon con 500 nM y 1 μ M de cadmio. Todos los cultivos de pCN54 contenían eritromicina 10 como selección antibiótica. Después de 2 horas de crecimiento a 30°C, se midieron las OD (630 nm). Los resultados mostraron
15 buena tolerancia a 500 nM y 1 μ M de cadmio. (datos no mostrados). Se concluyó que las células 4220 exhibieron buena tolerancia al cadmio a los niveles evaluados, excepto por 10 μ M, que era una concentración demasiado alta para observar potencialmente una diferencia entre los efectos del cadmio
20 solamente y una toxina inducida.

Los siguientes experimentos incluyeron una toxina (sprA1) detrás de un promotor de cadmio en un plásmido pCN51 (pTK1) que se había transformado en células RN4220. Ambas concentraciones de 500 nM y 1 μ M se evaluaron con 2 clones
25 pTK1 y células RN4220 (wt). Los cultivos de células wt RN4220

que se realizaron durante la noche y dos clones de pTK1 en células RN4220 se diluyeron hasta OD de 0.5. Las células RN4220 de tipo silvestre (WT) se dividieron en 3 tubos de cultivo a 3 mL/tubo. Se inocularon dos tubos con 500 nM y 1
5 uM de cadmio y se leyeron las OD después de 2 horas posteriores a la inducción. Cada clon pTK1 se dividió en 3 tubos de cultivo a 3 mL/tubo (6 tubos en total). Cada clon pTK1 se indujo con 500 nm y 1 μ M, en donde uno fue un control. Las OD se leyeron después de 2 horas posteriores a
10 la inducción. Los resultados se muestran en la Tabla 27 y en la Figura 14.

La Figura 14 muestra la inhibición inducible del crecimiento celular de las células pTK1 de microorganismo sintético que comprenden un gen de toxina de muerte celular
15 (sprA1) detrás de un promotor de cadmio en un plásmido pCN51 (pTK1) que se transformó en células de *Staphylococcus aureus* RN4220. OD (630 nm) leída a las 2 horas después de la inducción, como se muestra en la Tabla 27. Las células 4220 de tipo silvestre mostraron un buen crecimiento
20 celular tanto en ausencia de cadmio como en presencia de 500 nM y 1 μ M de cadmio. Las células pTK1-1 y pTK1-2 mostraron un buen crecimiento en ausencia de cadmio, pero el crecimiento celular se inhibió significativamente en presencia de 500 nM y 1 μ M de cadmio 2 horas después de la
25 inducción.

Tabla 27. Densidad óptica de células de *Staphylococcus aureus* RN4220 (630 nm) 2 horas después de la inducción

5

Células	OD 2 h posteriores (630 nm)
WT4220 Cad -	3.0
WT 4220 Cad+ 500nM	2.9
WT 4220 Cad+ 1µM	2.9
ptK1-1 Cad-	2.6
pTK1-1 Cad+ 500nM	0.19
pTK1-1 Cad+ 1µM	0.25
ptK1-2 Cad-	2.4
pTK1-2 Cad+ 500nM	0.16
pTK1-2 Cad+ 1µM	0.22

El experimento se reprodujo y cada muestra exhibió resultados de OD similares (630 nm) a las 2 horas después de la inducción (datos no mostrados). En resumen, se realizó una prueba de tolerancia al cadmio en células wt RN4220, y 500nM-1 µM de cadmio mostró un mínimo negativo en las células RN4220. Este ejemplo muestra que la inducción de pTK1 mostró supresión del crecimiento celular cuando se indujo con cadmio.

Ejemplo 17B. El gen de muerte celular candidato SprA1 se evaluó como un inhibidor del crecimiento celular de las células de *Staph aureus* (502a) mediante el uso de un promotor inducible por anhidrotetraciclina (ATc): pRAB11, que es un plásmido de alto número de copias que contiene un promotor inducible por tetraciclina. Se clonaron dos versiones de la toxina sprA1 detrás del promotor tet en pRAB11-2. Los clones evaluados fueron el plásmido p174 que contiene un antisentido sprA1 suprimido (Das) y el plásmido p175 que contiene un

antisentido sprA1 suprimido más un sitio RBS faltante. Un mapa plasmídico de p174 (pRAB11_Ptet-sprA1) se muestra en la Figura 15A y 15B. La Figura 15A muestra una vista ampliada de la región del plásmido que contiene el casete Ptet-sprA. La
5 Figura 15B muestra el plásmido p174 completo en su forma circular nativa.

Las secuencias empleadas en p174 y p175 se muestran a continuación. Tanto p174 como p175 se usaron en experimentos mediante el uso de un promotor de tetraciclina

10 p174 sprA1: gen de toxina sprA1 y sitio de fijación de ribosomas (p174):

CGCAGAGAGGAGGTGTATAAGGTGATGCTTATTTTCGTTACATCATAGCACCAGTCATCA
GTGGCTGTGCCATTGCGTTTTTTTCTTATTGGCTAAGTAGACGCAATACAAAATAGGTGAC
ATATAGCCGCACCAATAAAAAT (SEC. ID NO.: 274)

15 p175 sprA1 (ATG): gen de toxina sprA1 que comienza en el codón de inicio (sitio de fijación de ribosomas suprimido) (p175):

ATGCTTATTTTCGTTACATCATAGCACCAGTCATCAGTGGCTGTGCCATTGCGTTTTTTT
CTTATTGGCTAAGTAGACGCAATACAAAATAGGTGACATATAGCCGCACCAATAAAAAT

20 (SEC. ID NO.: 275)

Crecimiento celular. Específicamente, los genes inducibles por tet en el vector pRAB11 en células 502a se cultivaron durante la noche en BHI. El p174 pRAB11-pro-tet-sprA1Das exhibió OD de 5.4. El p175 pRAB11-pro-tet-sprA1Das(ATG) exhibió OD de 6.2. Los 5 cultivos que se
25

realizaron durante la noche se diluyeron hasta OD de 0.5 en 1 mL final (tubos de 14 mL) de BHI-chlor10 (502a wt solo BHI). Cada línea celular se dividió en 2 tubos para anhidrotetraciclina (ATc)-10 no inducida e inducida en 5 total.

Inducción. La literatura muestra que la inducción a 100 ng/mL de ATc es eficaz, por lo que esta concentración se seleccionó para la inducción en estos experimentos. Se indujo un tubo de cada conjunto con una concentración 10 final de 100 ng/mL. Una reserva de ATc de 1 mg/mL en etanol se diluyó hasta 100 ug/mL en EtOH. Se agregó un microlitro a los tubos adecuados para un final de 100 ng/mL.

Las OD a 630 nm se tomaron a las 2, 4 y 6 horas. Las OD 15 de 2 y 4 horas se leyeron a una dilución de 1/10, mientras que la OD de 6 horas se tomó a una dilución de 1/100 para asegurarse de que las lecturas permanecían en el intervalo lineal.

Los tubos 502a (no inducido e inducido) y p174 (pRAB11- 20 pro-tet-spralDas) se diluyeron en serie a 10^{-5} y 10^{-6} para la dilución en placas sobre BHI y BHI-chlor10, respectivamente.

Los resultados se muestran en las Tablas 28 y 29 para las OD, y una imagen de comparación de placas se muestra en 25 la Figura 15C.

Tabla 28. Tabla de cálculos para curvas de crecimiento por inducción.

5

Nombre de la muestra	OD O/N	uL de cultivo O/N	BHI	Cantidad de tubos	Condiciones
502a wt	4.7	106	1 mL	2	No inducido e inducido
502a p174 pRAB11-ptet-spa1Das	5.4	93	1 mL	2	No inducido e inducido
502a p175 pRAB11-ptet-spa1Das(ATG)	6.2	81	1 mL	2	No inducido e inducido

Tabla 29. Experimento de inducción por tet de 502a pRAB11

10

	Lecturas de OD ₆₃₀ en punto temporal (horas)			
Nombre de la muestra	0.0	2.0	4.0	6.0
502a wt	0.5	4.8	8.0	14
502a wt + 100 ng de ATc	0.5	4.4	7.1	11
502a p174 pRAB11-ptet-spa1Das	0.5	4.5	7.7	13
502a p174 pRAB11-ptet-spa1Das + 100 ng de ATc	0.5	0.7	0.3	0
502a p175 pRAB11-ptet-spa1Das(ATG)	0.5	4.3	7.7	7
502a p175 pRAB11-ptet-spa1Das(ATG) + 100 ng de ATc	0.5	3.8	8.1	13

15

20

La Figura 15C muestra diluciones de placa a 10e-5 después de 6 horas de inducción para 502a p174 no inducido (izquierdo) e inducido (derecho) (tet-spra1Das). La placa de la izquierda = p174 no inducido (tet-spra1Das) a una dilución 10e-5 en BHI chlor10. La placa de la derecha es el p174 inducido (tet-spra1Das) a 10e-5 en BHI chlor10. Ambas placas

25

son muestras del punto temporal posterior a la inducción de 6 h. La placa de la izquierda (no inducida) era incontable a $10e-5$ pero a $10e-6$ contaba ~720 colonias. La placa inducida de la derecha a $10e-5$ produjo 16 colonias como se muestra en la Tabla 30.

Tabla 30. Porcentaje de supervivencia de células de *Staphylococcus aureus* 502a p174 (tet-spralDas) inducidas a las 6 horas después de la inducción

Condición	Colonias	Dilución contable	Cálculo para 0.1 mL colocadas en placas	CFU/mL
No inducida	720	$10e-6$	$(720 \times 10e6)/0.1$	$7.2 \times 10e9$
Inducida	16	$10e-5$	$(16 \times 10e5)/0.1$	$1.6 \times 10e7$

Como se muestra en la Tabla 30, el porcentaje de supervivencia de las células inducidas a las 6 horas después de la inducción se calculó como $1.6 \times 10e7 / 7.2 \times 10e9 = .00222 \times 100 = 0.222\%$. El porcentaje de supervivencia de las células de *Staphylococcus aureus* 502a p174 (tet-spralDas) inducidas a las 6 horas después de la inducción fue de solo de 0.222% en comparación con las células no inducidas. Por lo tanto, las células de *Staphylococcus aureus* 502a p174 exhibieron $100\% - 0.222\% = 99.78\%$ de muerte celular promedio medible a las 6 horas después de la inducción en comparación con las células no inducidas.

En resumen, la inducción con 100 ng/mL de ATc mostró una buena supresión del crecimiento de p174 en células 502a hasta 6 horas después de la inducción de menos de 1%, menos de 0.5%

o menos de 0.25%. Específicamente, los recuentos de CFU al final de las 6 horas mostraron un porcentaje de supervivencia de solo 0.22% en comparación con la muestra no inducida y el tipo silvestre 502a. La inducción del control p175 con el sitio RBS suprimido para spral no mostró efectos negativos sobre el crecimiento hasta 6 horas. En resumen, la inducción de p174 mostró supresión del crecimiento celular cuando se indujo con ATc. Sin embargo, la inducción del control de p175 que carece de RBS no mostró supresión del crecimiento celular cuando se indujo con ATc, en comparación con las células 502a de tipo silvestre.

Ejemplo 18. Expresión a base de plásmido inducible 502a de diversos genes de toxina

Este ejemplo muestra la eficacia de diversos genes de toxina de muerte celular candidatos que se pueden usar para un interruptor de inactivación en *Staphylococcus aureus* 502a. Se usó una expresión de toxina inducible a base de plásmido para este experimento. pRAB11 es un plásmido de alto número de copias en *Staph aureus Staphylococcus aureus*, y el promotor Ptet se desreprime mediante la adición de 100 ng/mL de AtC (anhidrotetraciclina), lo que permite altas tasas de transcripción. pRAB11 se describe en Helle, Leonie, et al. "Vectors for improved Tet repressor-dependent gradual gene induction or silencing in *Staphylococcus aureus*." *Microbiology* 157.12 (2011): 3314-3323. Cuatro genes de toxina

de muerte celular candidatos se seleccionaron para evaluación: sprA1, 187-lysK, holina y sprG.

sprA1(PepA1). Se ha demostrado que el gen srpA1 encontrado en las cepas de *Staphylococcus aureus* codifica una
5 pequeña toxina de membrana PepA1. Sayed, Nour et al. "Functional and Structural Insights of A Staphylococcus Aureus Apoptotic-like Membrane Peptide from a Toxin-Antitoxin Module." *Journal of Biological Chemistry*, vol. 287, N.º 52, 2012, págs. 43454-43463, doi:10.1074/jbc.m112.402693. Sayed
10 et al. describió cómo el gen sprA1 codifica la proteína de toxina denominada PepA1, que se localiza en la membrana bacteriana y causa la muerte celular. Esto es parte de un sistema de antitoxina de toxina tipo I en *Staphylococcus aureus*, y se ha conservado evolutivamente en su genoma.

187-lysK. Esta es una proteína de lisina de fago diseñada por ingeniería genética del fago *Staphylococcus aureus*. K. Horgan, Marianne et al. "Phage lysin LysK can be truncated to its CHAP domain and retain lytic activity against live antibiotic-resistant staphylococci." *Applied and
20 environmental microbiology* 75.3 (2009): 872-874. O'Flaherty et al. diseñó y truncó este péptido y determinó que aún retiene su actividad lítica para muchas cepas de *Staphylococcus aureus*. O'Flaherty, S., et al. "The recombinant phage lysin LysK has a broad spectrum of lytic
25 activity against clinically relevant staphylococci, including

methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*." *Journal of bacteriology* 187.20 (2005): 7161-7164.

holina. La toxina holina que se evalúa en este experimento es parte del genoma de muchos fagos líticos que se dirigen a *Staphylococcus aureus*. Se ha demostrado que interrumpe el crecimiento celular en *E. coli* cuando se induce a partir de un vector de expresión de plásmido al formar lesiones en la membrana celular. Song, Jun, et al. *Journal of General Virology* 97.5 (2016): 1272-1281.

sprG. La región de codificación denominada sprG es parte de otro sistema de antitoxina de toxina tipo I en *Staphylococcus aureus*. Se codifican dos péptidos en el mismo marco de lectura de sprG, y se ha demostrado que ambos causan la muerte celular cuando se inducen. Pinel-Marie et al. *Cell reports* 7.2 (2014): 424-435.

Materiales. Se prepararon diversas cepas sintéticas como se muestra a continuación y también se empleó 502a wt. Las cepas incluyen:

- BP_068 (502a pRAB11-Ptet-sprA1)
- BP_069 (502a pRAB11-Ptet-187lysK)
- BP_070 (502a pRAB11-Ptet-holin)
- BP_071 (502a pRAB11-Ptet-sprG1)
- BP_001 (502a wt).

Los medios de crecimiento usados en este ejemplo incluyeron medios de caldo BHI (37 g/L) (Alpha Biosciences),

placas de agar BHI, placas de agar BHI cloranfenicol (10 µg/mL (Teknova)) y placas de agar de cloruro de BHI (10 µg/mL (Teknova)) + AtC (100 ng/mL (Alfa Aesar)). La Tabla 31 a continuación muestra una lista de secuencias de oligonucleótidos usadas para construir los plásmidos.

Tabla 31. Lista de oligos y sus secuencias usadas para construir plásmidos.

	Nombre del oligo	Secuencia de ADN (5' - 3')
	BPC_670	GCTCAGATCTGTTAACGGTACCATCATACTC (SEC. ID NO.: 276)
10	BPC_671	CACTGGCCGTCGTTTACAAC (SEC. ID NO.: 277)
	BPC_672	gagta ~~gat~~ ggtaccg ~~g~~ taacagatctgagcCGCAGAGAGGAGGTGTATAAGGTG (SEC. ID NO.: 278)
	BPC_674	gagta ~~gat~~ ggtaccg ~~g~~ taacagatctgagcATGGTGGCATTACTGAAATCTTTAGAAAG (SEC. ID NO.: 279)
	BPC_675	gagta ~~gat~~ ggtaccg ~~g~~ taacagatctgagcATGGCACTGCCTAAAACGGG (SEC. ID NO.: 280)
15	BPC_676	gagta ~~gat~~ ggtaccg ~~g~~ taacagatctgagcATGGCTAATGAACTAAACAACCTAAAGTT (SEC. ID NO.: 281)
	BPC_677	g ~~tt~~ gt ~~aaa~~ acgacg ~~g~~ ccagtgCCCGGGCTCAGCTATTATCA (SEC. ID NO.: 282)
	BPC_678	g ~~tt~~ gt ~~aaa~~ acgacg ~~g~~ ccagtgGCGGCCGCCCATGCATGC (SEC. ID NO.: 283)

La Tabla 32 muestra la secuencia de ADN y la secuencia de aminoácidos para los genes de toxina. sprA1, 187-lysK, holina y sprG se evaluaron en este experimento. El gen de toxina sprG tiene dos marcos de lectura que han demostrado tener actividad de toxina en *Staphylococcus aureus*. La secuencia más corta está en negrita.

Tabla 32. Secuencias de ADN y aminoácidos para toxinas

	Toxina	Secuencia de ADN	Secuencia de proteínas
	<i>sprA1</i>	ATGCTTATTTTCGTTACATCATAGCACAGTCATCAGTGGC TGTGCCATTGCGTTTTTTTCTTATTGGCTAAGTAGACGCAAT ACAAAATAG (SEC. ID NO.: 284)	LIFVHIIAPVISGCAIAFFSYWLSRR NTK (SEC. ID NO.: 285)
5	187- lysK	Atggcactgcctaaaacgggttaaaccacggcaaaacaggtggtgactgggcaatc aatthaatcggcagtggtgtcgatgttgatggttattatggcggaatgtgggattaccta actatattttaatagatactggaacttaagacaccaggcaacgaagagalatggcat ggtatagatatcctgaagggtttaagtggttagaacaactctgatttgcctaaaccag gtgatagcagtggtgacaggtggttaattacaattggaacactgggacacactggtta ttgttaggtccatcaactaaaagttaactttatagtagatcagaattggaataactctaa ctctacgttggttagctcgcagcaagataaaacatagttatttgggtgaactcatttggta gacccgcatacaagcagaaccgaaacctacaccaccactggacagtacaccggc aactagaccagttacaggttcttggaaaaagaaccagtacggaactggataaaaccg gaaatgcaacatttgcattggttaaccaacctatagtaactagaatagggtctccattctt aatgctccagtagggcgtaactaccggcaggggctacaattgtatatgacgaagttg tatccaagcaggtcacatttgtagatgttataatgttacaacggtaacagagtatatgc cctgttagaactgtcaagggttccacctaatcaatacctggcgttgcctggggagtatt caaa (SEC. ID NO.: 286)	MALPKTGKPTAKQVVDWAINLIGS GVDVDGYYGRQCWDLPNYIFNRY WNFKTPGNARDMAWYRYPEGFK VFRNTSDFVPKPGDIAVWTGGNY NWNTWGHTGI/VGPSTKSYFYVS DQNWNNNSNSYVGSPAARIKHSYF GVTHFVRPAYKAEPKTPPLDSTP ATRPVTGSWKKNQYGTWYKPEN ATFVNGNQPIVTRIGSPFLNAPVG GNLPAGATIVYDEVCIQAGHIWIGY NAYNGNRVYCPVRTCQGVPPNQI PGVAWGVFK (SEC. ID NO.: 287)
10			
	Holina	Atggcctaataaactaaacacctaagttgttgaggataaactttagcacaagaac taagagtaaaacatttgggtagcaattatcagcagtagcagtagttgtaatacaaat caggtgtcttgggttagactactcagctcaaatgagcaaggtgtaaatatcataggttcta tactaacattattagcaggtttaggtatttggtagataataactaaaggtcttaagatag tgatattgtcaaacagattatataaaacctcgtgatagtaagaccctaataattgttca atggcaagcaaatgcaaacacagctagcactttgaattagacaactatgaaacaat gcagaacctgatacagatgatagtgatgaagtacctgctattgaagatgaaattgatggc ggttcagcaccttcaagatgaagaagataccgagggaacacggtaaaagtatttcag aggagggaagttaagtag (SEC. ID NO.: 288)	MANETKQPKVVGGINFSTRKSKT FWVAIISAVAVFANQITGAFGLDYS AQIEQGVNIIGSILTLAAGLIIVDNN TKGLKDSIVQTDYIKPRDSKDPN EFVQWQANANTASTFELDNYYNN AEPDTDDSDVEPAIEDEIDGGSAP SQDEEDTEEHGKVFAEEEVK (SEC. ID NO.: 289)
15			
	<i>sprG</i>	ATGGTGGCATTACTGAAATCTTTAGAAAGGAGACGCCTAAT GATTACAATTAGTACCATGTTGCAGTTTGGTTTATTCCTTAT TGCATTGATAGGTCTAGTAATCAAGCTTATTGAATTAAGCA ATAAAAAATAA (SEC. ID NO.: 290)	MVALLKSLERRRLMITISTMLQFGL FLIALIGLVIKLIELSNKK (SEC. ID NO.: 291)
20	<i>sprA2</i>	ATGTTCAATTTATTAATTAACATCATGACTTCAGCTTTAAGCG GCTGTCTTGTTCGTTTTTGCACATTGGTTACGAACGCGC AACAATAAAAAAGGTGACAAATAA (SEC. ID NO.: 304)	MFNLLINIMTSALSGCLVAFFAHL RTRNNKKGDK (SEC. ID NO.: 305)

Métodos

La construcción del plásmido se realizó de la siguiente manera.

- 1) Amplificar por PCR la cadena principal de pRAB11

mediante el uso de los cebadores BPC_670 y BPC_671 a través de un vector vacío como plantilla.

2) Amplificar por PCR los genes de toxina del ADN plasmídico sintetizado (Genscript). Esto permite diseñar un
5 cebador que se fija a la cadena principal del plásmido dirección 3' del gen diana, por lo que se niega la necesidad de diseñar y ordenar cebadores únicos para ambos extremos de cada gen.

3) Pares de cebadores

- 10 a) sprA - BPC_672/BPC_677
b) 187-lysK - BPC_675/BPC_678
c) Holina - BPC_676/BPC_678
d) sprG - BPC_674/BPC_678

4) Ejecutar los productos de PCR para verificar el
15 tamaño correcto, digerir el ADN de plantilla con DpnI (NEB) y limpiar las reacciones con una columna de centrifugación Zymo.

5) Ensamblar los productos de PCR limpiados mediante el ensamblaje Gibson y transformarlos en células *E. coli*
20 IM08B electrocompetentes mediante el uso del protocolo del fabricante (NEB).

6) Verificar las secuencias correctas para el promotor y las toxinas en los plásmidos.

7) Transformar los plásmidos verificados por secuencia
25 en *Staphylococcus aureus* electrocompetentes.

Los experimentos de crecimiento se realizaron de la siguiente manera.

1) Iniciar durante la noche los cultivos de cada cepa en 5 mL de medio de caldo BHI. Agregar 10 ug/mL de cloranfenicol a los medios para las cepas BP_068-BP_071.

2) Realizar una dilución de 1:100 del cultivo realizado durante la noche en BHI fresco. Agregar 10 ug/mL de cloranfenicol a los medios para las cepas BP_068-BP_071. Incubar a 37°C mediante agitación a 250 rpm durante 2 horas. Sembrar por estría una placa de cada cepa e incubar durante la noche a 37°C para confirmar que los cultivos estén bien.

3) Tomar lecturas de OD600 de cultivos de 2 h y diluir los cultivos hasta una OD de 0.05.

a) Cada cepa obtiene (4) tubos de 5 mL con caldo BHI
b) La siguiente tabla muestra las lecturas de OD registradas y las cantidades calculadas de cada cultivo usadas para inocular cultivos frescos hasta una OD de 0.05.

Tabla 33

Tabla 33. Lecturas de OD₆₀₀ de inicio.

Cepa	OD600	uL de inóculo	OD de inicio calculada
BP_068	2.1	119	0.0499
BP_069	1.7	147	0.0498
BP_070	2.0	125	0.05
BP_071	1.8	139	0.05
BP_001	1.7	147	0.0498

4) Guardar 100 μ L de muestra de cada cultivo para la dilución en placas. (3 placas/cultivo)

5) Incubar cultivos a 37°C hasta que la OD alcance 0.5. Agregar 150 ng/mL de anhidrotetraciclina (AtC) a 2
5 tubos para cada cepa y marcarlos con un signo + para indicar que recibieron el inductor (desrepresor). Continuar el crecimiento de las células durante otras 4 horas y tomar muestras como se describe a continuación.

6) Tomar lecturas de OD600 a T=30 min, 60 min, 120
10 min y 240 min. Registrar los valores en la tabla a continuación.

a) Realizar la dilución en placas a T=0, 60 min y 240 min, y colocar la dilución correcta en las siguientes placas (BHI, BHI Chlor10, BHI Chlor10+AtC
15 0.1)

La investigación de Cfu se realizó de la siguiente manera.

1) Identificar las placas de agar BHI (Chlor 10, AtC 0.1) con colonias que crecen en estas a partir de
20 cepas que contienen plásmidos con genes de toxina presentes. Las placas de T240 serían las mejores.

2) Si es posible, elegir 8 colonias por cepa. Sembrar por parche las colonias en una nueva placa de agar BHI (clor 10, AtC 1) y realizar el proceso de lisis
25 de *Staphylococcus aureus*. Usar 5 μ L de la reacción de

lisis como plantilla para la PCR de colonias mediante el uso del cebador DR_215/DR_216 a través de una polimerasa de HF, tal como Q5/Phusion.

5 a) Las reacciones que producen una buena banda, realizan digestión de DpnI durante 1 h y purifican en columna la reacción de PCR. Enviar el producto purificado para la secuenciación mediante el uso de los cebadores DR_215/DR_216.

Las lecturas calculadas de OD600 se tomaron a T=0,
10 30, 60, 120 y 240 min después de la inducción. Todos los valores después de T0 son el promedio de 2 tubos. Los resultados se muestran en la Tabla 34 y en la Figura 16. El + indica los cultivos que recibieron AtC, y el - indica los cultivos que no recibieron ningún factor
15 adicional. La Figura 16 muestra los valores calculados de OD600 en comparación con el tiempo. Las líneas discontinuas representan los cultivos que recibieron 150 ng/mL de AtC a T=0. La Figura 16 muestra que el gen sprA que codifica la proteína de toxina PepA1 mostró la mayor
20 reducción en las células viables de *Staphylococcus aureus* 502a después de 4 horas de crecimiento después de la inducción.

Específicamente, la Figura 16 muestra el crecimiento celular antes y después de la inducción de cuatro cepas
25 sintéticas derivadas de *Staphylococcus aureus* 502a que

tienen un sistema de expresión inducible a base de plásmido que comprende cuatro candidatos diferentes de genes de muerte celular *sprA1*, *187-lysK*, *holina* y *sprG*. Los candidatos de genes de muerte celular fueron

5 clonados detrás de un promotor inducible por tetraciclina en plásmidos *pRAB11* y se transformaron en células *Staphylococcus aureus* 502a. Las lecturas calculadas de OD600 se tomaron a T=0, 30, 60, 120, y 240 min después de la inducción de cepas inducidas (+) por

10 AtC ilustradas mediante líneas discontinuas (- - - - -) y cepas no inducidas (-) indicadas mediante líneas continuas (-----) para BP_068 (502a *pRAB11*-Ptet-*sprA1*), BP_069 (502a *pRAB11*-Ptet-*187lysK*), BP_070 (502a *pRAB11*-Ptet-*holina*) y BP_071 (502a *pRAB11*-Ptet-*sprG1*) y en

15 comparación con BP_001 (502a wt) en medios BHI. Cada una de las cepas inducidas (+) BP_068 (*sprA1*), BP_069 (*187lysK*) y BP_070 (*holina*) mostraron (i) buen crecimiento celular antes de la inducción e (ii) inhibición significativa del crecimiento celular después

20 de la inducción. BP_068 (+) exhibió la mejor inhibición del crecimiento celular en cada punto temporal T=30, T=60, T=60, T=120 y T=240 min después de la inducción, por lo que se seleccionó el gen *sprA1* para el desarrollo inicial adicional de un interruptor de inactivación en

25 *Staphylococcus aureus* 502a.

Tabla 34. OD600 calculada a T=0, 30, 60, 120 y 240 min después de la inducción como se muestra en la Figura 16

5

10

	Lecturas promedio de OD600				
Cepa ind. +/-	T0	T30 min	T60 min	T120 min	T240 min
68+	1.05	0.05	0	0	0
68-	1.05	1.45	2.05	3.4	5.7
69+	1	0.15	0	0.1	0
69-	0.95	1.25	1.75	2.8	5.5
70+	1	0.8	0.7	0.5	0.4
70-	0.9	1.3	1.8	2.9	5.6
71+	1	1.1	1.4	2.1	5.2
71-	1	1.5	2	3.1	5.8
502a+	1.1	1.15	1.45	2.1	3.7
502-	1.15	1.45	2.15	3.5	5.4

15

La Tabla 35 a continuación y la Figura 17 muestran unidades formadoras de colonias calculadas a partir de recuentos de placas de muestras de cultivo líquido diluido. La Figura 17 muestra un gráfico de barras que muestra la diferencia en las unidades formadoras de colonias/mL entre T=0 (gris) y 240 min (negro).

Tabla 35. CFU calculadas a partir de recuentos de placas de muestras de cultivo líquido diluido.

20

	AtC	T0 (cfu/mL)	T240 (cfu/mL)
68	68+	2.85E+09	7.50E+01
	68-	3.12E+09	7.75E+09
69	69+	8.75E+09	6.30E+03
	69-	1.40E+09	1.10E+09
70	70+	5.25E+09	4.75E+04
	70-	6.05E+09	1.41E+11
71	71+	3.00E+09	1.04E+11
	71-	1.34E+09	2.69E+11
502	502a+	1.29E+09	2.07E+11
	502a-	1.45E+09	2.62E+11

25

Este ejemplo investigó la eficacia de múltiples genes de toxina cuando están ligados operativamente a un promotor inducible para alterar la viabilidad celular cuando se cultivan en medios ricos complejos. Dos toxinas de estafilococo nativas *sprA* y *sprG*, una toxina de fago quimérico denominada 187lysK y una toxina fago holina más se evaluaron mediante un sistema de expresión inducible a base de plásmido. El gen *sprA1* que codifica la proteína de toxina PepA1 mostró la mayor reducción en las células viables de *Staphylococcus aureus* 502a después de 4 horas de crecimiento después de la inducción. El gen *sprA1* se seleccionó para el desarrollo inicial adicional de un interruptor de inactivación en *Staphylococcus aureus* 502a.

Ejemplo 19. Expresión inducida de GFP del genoma en la cepa BP_076 (502a $\Delta sprA1::P_{tet}-gfp$)

Descripción general. En este ejemplo, se confirmó la expresión de la proteína verde fluorescente (GFP) del genoma de una cepa variante de *Staphylococcus aureus* 502a (BP_076) con una reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR). El gen *gfp* se integró en el genoma junto con un promotor inducible por tetraciclina (P_{tet}) y un gen de proteína represora de tetraciclina (*tetR*). El sistema de expresión $P_{tet}-gfp$ se introdujo en el genoma a través del plásmido suicida pIMAYz para permitir la expresión controlable de un gen recombinante. La cepa de tipo silvestre

(BP_001) sirvió como control negativo y una cepa que portaba un plásmido de alto número de copias con el mismo sistema de expresión P_{tet} -*gfp* sirvió como control positivo. Debido a su menor toxicidad que la tetraciclina, se usó
5 anhidrotetraciclina (aTc) para inducir la expresión a 100 ng/mL.

Resultados resumidos. Al comparar las muestras $t=0$ min de BP_055 y BP_076 con BP_001, los datos de qPCR muestran una expresión de GFP menor antes de la inducción (lo que
10 indica que P_{tet} es permeable); sin embargo, la relación de cambio de expresión después de la inducción aún es claramente evidente. Se observan diferentes patrones de expresión entre *gfp* a base de plásmido e integrada. La *gfp* integrada muestra un aumento sostenido en la expresión a lo
15 largo del ensayo, mientras que la *gfp* a base de plásmido muestra una alta regulación de manera ascendente a los 30 minutos y casi ninguna expresión a los 90 minutos. La diferencia en la expresión entre BP_076 y BP_055 se debe al número de copias de *tetR* por célula en cada cepa. BP_076
20 tiene una copia por célula, mientras que BP_055 tiene 300-500 copias en función de la cantidad de plásmidos en cada célula. La alta cantidad de proteína TetR total presente en el cultivo BP_055 claramente excedió la cantidad de aTc usada para la inducción al final del ensayo, lo que condujo
25 a la represión de la expresión de *gfp*.

Cepas de bacterias y materiales.

Cepas

BP_001 (*Staphylococcus aureus* 502a)

BP_055 (SA 502a, p229_pRAB11-Ptet-GFP)

5 BP_076 (SA 502a, Δ sprA1::Ptet-GFP)

Se emplearon medios de infusión de cerebro y corazón (BHI), placas de agar BHI + cloranfenicol (10 μ g/mL), anhidrotetraciclina (aTc).

Las muestras fueron ARN (cultivo de 1 mL): t=0, 30 y 90
10 minutos.

Métodos - construcción de cepa

1. Para realizar una modificación en el genoma de *Staph aureus Staphylococcus aureus*, primero se deben agregar los elementos genéticos necesarios a un plásmido capaz de
15 realizar esas modificaciones.

2. La cadena principal del plásmido es un vector transportador de *E. coli - Staphylococcus aureus* denominado pIMAYz, y tiene resistencia al cloranfenicol, un origen de replicación de *E. coli* de bajo número de copias, un origen de
20 replicación de *Staphylococcus aureus* sensible a la temperatura de bajo número de copias (replicación permitida a 30°C, pero no a 37°C), la toxina secY bajo el control de un promotor Ptet y un gen lacZ para el cribado azul/blanco durante la integración en *Staphylococcus aureus*.

25 3. El plásmido se construyó mediante el uso de

productos de PCR lineales que se ensamblaron en un constructo circular mediante el ensamblaje Gibson.

a. Usar los cebadores DR_022/DR_023 para amplificar por PCR la cadena principal del vector pIMAYz para
5 linealizarlo para usarse en ensamblajes dirección 3'. El ADN de plantilla de fondo se debe digerir enzimáticamente con DpnI (NEB) de acuerdo con las instrucciones del fabricante antes de su uso posterior.

b. Usar los cebadores DR_255/DR_241 para amplificar
10 por PCR la región tetR-Ptet-GFP mediante el uso del plásmido pRAB11 como plantilla.

c. Usar los cebadores DR_256/DR_257 y DR_240/DR_236 para amplificar por PCR las regiones de 1 kb del genoma de *Staphylococcus aureus* 502a. Estos se usarán como brazos de
15 homología para dirigir la región para su integración en el genoma de *Staphylococcus aureus*.

d. Estos fragmentos lineales se ensamblan en un plásmido circular con la mezcla Gibson Assembly Master (NEB), de acuerdo con las instrucciones del fabricante, y se
20 transforman en células IM08B.

4. Una vez que se puede confirmar la secuencia del nuevo ADN plasmídico, se inician cultivos de 50 mL para obtener una cantidad suficiente para la transformación en *Staphylococcus aureus* 502a mediante electroporación.

25 5. Integración en *Staphylococcus aureus* mediante

recombinación homóloga

a. Usar entre 1 y 5 microgramos de ADN plasmídico para electroporar en *Staphylococcus aureus*. Recuperar a 37°C durante 1 hora y colocar en placas sobre BHI + 10 µg/mL de cloranfenicol y 100 µg/mL de x-Gal, e incubar durante la noche a 37°C.

b. Al día siguiente, elegir varias colonias azules e iniciar cultivos de caldo BHI de 5 mL a temperatura ambiente, y permitir que crezcan en una unidad de agitación giratoria durante 12-20 horas.

c. Realizar y colocar en placas diluciones en serie (generalmente 10^{-4} - 10^{-6}) en BHI + 1 µg/mL de anhidrotetraciclina (AtC) y 100 µg/mL de X-gal. Incubar durante la noche a 37°C.

d. Al día siguiente, elegir y cribar colonias blancas al sembrar por parche en placas de agar BHI, BHI + 1 µg/mL de anhidrotetraciclina (AtC) y 100 µg/mL de X-gal, y BHI + 10 µg/mL de cloranfenicol y 100 µg/mL de x-Gal para confirmar la sensibilidad al cloro y la resistencia a la AtC.

e. Las colonias que muestran los fenotipos deseados se deben cribar mediante PCR con los cebadores DR_237/DR_238. Las colonias que han tomado los nuevos genes deberían producir una banda de 4.4 kb, y las colonias que han vuelto al tipo silvestre deberían tener una banda de 2.86 kb. Se

deben secuenciar varios clones positivos para verificar las secuencias correctas, y uno de los clones verificados por secuencia se debe seleccionar para usarse en experimentos posteriores.

5 Proceso de crecimiento celular

1. Iniciar durante la noche los cultivos de cada cepa en medio de caldo BHI (5 mL) e incubar con agitación (37°C, 240 rpm). Agregar cloranfenicol (concentración final 10 µg/ml) a los medios para BP_055.

10 2. Medir la densidad óptica (OD) del cultivo realizado durante la noche y registrar.

La densidad óptica (OD) de los cultivos se midió a 630 nm, los medios frescos sirvieron como blanco. La OD de los cultivos realizados durante la noche se indica como la OD inicial. El inóculo transferido a 5 mL de medio fresco redujo la OD hasta 0.05 para que los nuevos cultivos estuvieran en la fase de crecimiento exponencial dos horas después de la inoculación, como se muestra en la Tabla 36.

Tabla 36. OD de cultivos para P_001, BP_055 y BP_076

20

Cepa	OD inicial	Inóculo para 5 mL [µL]	OD a las 2 h
BP_001	8.2	30.5	1.01
BP_055	9.1	27.5	0.88
BP_076	8.7	28.7	1.01

25

3. Diluir cultivos realizados durante la noche hasta

OD de 0.05 en BHI fresca (5 mL) en tubos de cultivo de 2 × 14 mL por cultivo; agregar nuevamente cloranfenicol a los cultivos de BP_055.

4. Incubar con agitación (37°C, 240 rpm) hasta que la
5 OD alcance 0.5 - 1 ("cultivo de 2 h").

5. Retirar 1 mL de cultivo para las muestras de ARN
t=0 min y transferirlas a microtubos de 1.5 mL. Centrifugar
las muestras (16,000× g, 1 min, RT), aspirar el sobrenadante
y volver a suspender la pelletilla en 200 µL de RNALater.
10 Permitir que se incuben durante unos minutos a temperatura
ambiente (RT) y luego almacenar a -20°C.

6. Agregar aTc (4 µL, 100 µg/mL) al primer tubo de
cultivo de 14 mL para cada cepa. Agregar 4 µL de 100% de
etanol al segundo tubo para cada cepa como controles de
15 inducción (la aTc se solvató en 100% de etanol).

7. Incubar los cultivos con agitación (37°C, 240 rpm)
hasta otros puntos temporales de muestreo.

8. Repetir el muestreo de ARN a t = 30 y 90 min, medir
la OD a t=90 min.

20 Procesamiento de muestras de qPCR y análisis de datos.

El ARN se extrajo de pelletillas celulares congelados
almacenados en RNALater mediante el uso del kit de bacterias
Ambion RiboPure de acuerdo con los protocolos en el ejemplo
anterior. El nivel de expresión de *gfp* se normalizó al gen de
25 mantenimiento *gyrB* y se cuantificó a través del método $\Delta\Delta Ct$,

ver las secuencias de cebadores en la Tabla 37.

Tabla 37: secuencias de cebadores por qPCR.

Diana	Número de base de datos	Secuencia
<i>gyrB</i>	BP 802	5'-TTGGTACAGGAATCGGTGGC (SEC. ID NO.: 212)
<i>gyrB</i>	BP 803	5'-TCCATCCACATCGGCATCAG (SEC. ID NO.: 213)
<i>gfp</i>	BP 195	5'-CTGTCCACACAATCTGCCCT (SEC. ID NO.: 292)
<i>gfp</i>	BP 196	5'-TGCCATGTGTAATCCCAGCA (SEC. ID NO.: 293)

Las secuencias de cebadores usadas para la construcción de plásmidos y cepas se muestran en la Tabla 38.

Tabla 38. Cebadores usados para la construcción de plásmidos y cepas

Nombre del cebador	Secuencia de ssADN (5'-3')
DR_022	Caagcttatcgataccgctcgacctc (SEC. ID NO.: 294)
DR_023	Gggatccactagttctagagcgg (SEC. ID NO.: 295)
DR_237	GCAACTGGTACATCACAATTGGTACTCTCAC (SEC. ID NO.: 296)
DR_238	GACCACGCATACCTATCTATAAACGGACAATG (SEC. ID NO.: 297)
DR_255	GTCCAATTAGATGGCATGTAAGTGGGCAGTGTCTTAAAAAATCG (SEC. ID NO.: 298)
DR_241	CAGGCCAATTTGGCATAGAGCCGGATGTGCTGCAAGGCGATTAAGTTGGG TAACG (SEC. ID NO.: 299)
DR_256	GTTACATGCCATCTAATTGGACAAATTCTATGAGAGTAGATTTTG (SEC. ID NO.: 300)
DR_257	GCCAAATCGCTTTTCGTGTATACGATTCCCAGTC (SEC. ID NO.: 301)
DR_240	GGCTCTATGCCAAATTGGCCTGATGAGTTC (SEC. ID NO.: 302)
DR_236	gctctagaactagtgatcccGGCGATTTTATTGTGACAAGAGACTGAAGAGC (SEC. ID NO.: 303)

La Figura 19 muestra un mapa del genoma de la cepa BP_076 (SA 502a, Δ sprA1::Ptet-GFP).

La Figura 20 muestra un mapa de plásmido construido para realizar la integración genómica en *Staphylococcus aureus*.

5 Resultados. Las muestras t=0 de ambas cepas que tenían el sistema *P_{tet}-gfp* mostraron cierta expresión de GFP antes de la inducción, la Tabla 2 muestra los valores de Ct de las tres cepas investigadas en t=0. La curva de amplificación de la cepa de tipo silvestre BP_001 cruzó el umbral (0.4) 10 después de 30 ciclos, lo que puede atribuirse a alguna forma de amplificación inespecífica o formación de dímero de cebador.

La Tabla 39 muestra los valores de ciclos hasta el umbral (Ct) antes de la inducción de la expresión para la 15 cepa de tipo silvestre BP_001, la cepa que porta *P_{tet}-gfp* BP_055 a base de plásmido y la cepa *P_{tet}-gfp* modificada por ingeniería genética BP_076. El umbral se configuró en 0.4.

Tabla 39. Valores de ciclos hasta el umbral (Ct) antes de la inducción para BP_001, BP_055 y BP_076

20

Cepa	BP_001	BP_055	BP_076
Valor de Ct	33.65 ± 0.61	22.99 ± 0.06	23.09 ± 0.10

El nivel de expresión basal de GFP se tuvo en cuenta en los cálculos de $\Delta\Delta$ Ct al normalizar los puntos temporales experimentales (t = 30 min, 90 min) al punto temporal de 25 control (t=0) para cada cepa individualmente. Los niveles de

expresión de GFP determinados por qPCR se muestran a continuación en la Figura 18. La Figura 18 muestra la relación de cambio de expresión de GFP de subcultivos inducidos (+) y no inducidos (-) de cepas de *Staphylococcus aureus* BP_001, BP_055 y BP_076. Se observan diferentes patrones de expresión entre *gfp* a base de plásmido e integrada. La *gfp* integrada muestra un aumento sostenido en la expresión a lo largo del ensayo, mientras que la *gfp* a base de plásmido muestra una alta regulación de manera ascendente a los 30 minutos y casi ninguna expresión a los 90 minutos. El subcultivo inducido (+) y el subcultivo no inducido (-) para las tres cepas muestran dependencia de la inducción de la expresión en presencia de aTc y el sistema de expresión P_{tet} -*gfp*. Como se esperaba, BP_001 no mostró expresión durante todo el experimento. La expresión de GFP en BP_076 aumentó a lo largo del experimento, lo que demuestra la expresión del genoma de *Staphylococcus aureus* 502a. El patrón de expresión determinado para BP_055 se puede atribuir a un diseño experimental menos que ideal; sin embargo, cumplió su propósito como control positivo para la inducción. BP_055 tiene el sistema de expresión P_{tet} -*gfp* en el plásmido pRAB11, un plásmido de alto número de copias. Cada plásmido tiene dos sitios de fijación a proteínas TetR, que reprimen la expresión de GFP en ausencia de aTc. Dentro de los 30 minutos de inducción, la alta cantidad de plásmidos

multiplicada por el recuento celular dio como resultado aproximadamente una regulación ascendente de 1300 veces en la expresión de GFP, lo que confirma que la aTc estaba en forma activa durante el ensayo. Se podría esperar que el nivel de expresión de GFP sería aún mayor a 90 minutos, pero los datos muestran casi ninguna expresión (aproximadamente una regulación ascendente de 7 veces en comparación con t=0). Esto no es sorprendente dada la cantidad total de proteínas TetR presentes en el cultivo en t=90 minutos. La cantidad de aTc no fue suficiente para inhibir la represión por TetR en el punto temporal de 90 minutos, lo que dio como resultado casi ninguna expresión. La expresión génica de una cepa modificada a nivel molecular de *Staphylococcus aureus* 502a se confirmó mediante análisis qPCR de la expresión de GFP inducida por tetraciclina.

Ejemplo 20. Promotores candidatos sensibles al suero cribados mediante secuenciación de ARN para detectar regulación ascendente

En este experimento, se realizó la secuenciación de ARN de la cepa variante 502a *Staphylococcus aureus* BP_001 WT cuando se cultivó en suero humano en comparación con TSB para obtener una comprensión holística de los cambios transcripcionales que ocurren dentro del microorganismo al ingresar en el sistema circulatorio. La secuenciación de ARN se realizó en muestras recolectadas de medio de crecimiento de laboratorio y suero humano.

Se realizó un cultivo (ensayo de crecimiento) en TSB con o sin suero humano de la siguiente manera. Las células de *S. aureus* 502a se sembraron a partir de una crioreserva en una placa de agar de caldo de soja tríptico (TSB) con 5% de sangre de oveja y se cultivaron durante la noche (37°C). Al día siguiente, se usaron cinco colonias individuales para inocular 5 mL de TSB en un tubo de cultivo de 14 mL y se cultivaron durante la noche con agitación (37°C, 240 rpm). A la mañana siguiente, se transfirieron 50 mL de TSB a un matraz de 250 mL y se calentaron hasta 37°C. Se midió la OD₆₀₀ del cultivo realizado durante la noche (OD₆₀₀ = 6.0) y se usó para inocular (416 µL) el TSB calentado a una OD₆₀₀ de 0.05. Este cultivo creció durante aproximadamente dos horas (37°C, 100 rpm) y alcanzó una OD₆₀₀ de 1.24. Durante este tiempo, se colocó una alícuota de 50 mL de suero humano en la incubadora a 37°C para descongelar y calentar, también se calentó TSB fresco. Con una pipeta serológica, se transfirieron 15 mL de cultivo a un tubo Falcon de 15 mL y se centrifugaron (RT, 2000 × *g*, 10 min). El sobrenadante se decantó, la pelletilla se volvió a suspender en PBS estéril (15 ml) y se centrifugó (RT, 2000 × *g*, 10 min). El sobrenadante de la etapa de lavado se decantó y la pelletilla se volvió a suspender en PBS estéril (7.5 mL), y se duplicó la OD₆₀₀ del inóculo hasta 2.48. La suspensión de PBS se usó para inocular las muestras de cultivo de suero y TSB a una OD₆₀₀ de 0.05 (202 µL por 10 mL de medio).

La preparación de la muestra de secuenciación de ARN se realizó de la siguiente manera.

Las muestras de $t=0$ min (3×) fueron cada una de 1 mL del cultivo iniciador original de 50 mL antes del lavado. En el
5 punto temporal asignado, los tubos de cultivo se retiraron de la incubadora y se colocaron en un baño de agua con hielo durante 5 minutos y luego se centrifugaron (4°C , $2000 \times g$, 10 min). El sobrenadante se decantó, la pelletilla se volvió a suspender en 1 mL de PBS estéril helada y se transfirió a
10 microtubos. Las suspensiones se centrifugaron (4°C , $6000 \times g$, 3 min), el sobrenadante se aspiró y las pelletillas se volvieron a suspender en RNAlater. Las suspensiones en RNAlater se almacenaron a -20°C .

Las muestras se retiraron del congelador a -20°C para la
15 extracción de ARN y se descongelaron a RT. Las células se peletizaron (RT, $16000 \times g$, 1 min), se aspiró el sobrenadante y luego se lavaron las células con PBS; el lavado ayudó a eliminar el arrastre del suero. Para lavar las células, las pelletillas se volvieron a suspender en PBS y se centrifugaron
20 (RT, $16000 \times g$, 1 min), y se descartó el sobrenadante. El ARN se extrajo mediante el uso del kit de bacterias RiboPure de Invitrogen de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El ARN extraído se trató con DNasa I y se precipitó con etanol. Por solicitud de la empresa de secuenciación, las
25 muestras se enviaron como pélets en etanol sobre hielo seco.

Del total de muestras de ARN, las moléculas de ARN ribosómico disminuyeron mediante el uso del kit de eliminación de rARN Ribo-Zero para bacterias (Illumina). La calidad de las muestras de ARN se analizó en un sistema de electroforesis con microchip Shimadzu MultiNA y luego se fragmentó con ultrasonido (4 pulsos, 30 s, 4°C). Se ligó un adaptador al extremo 3' de las moléculas para permitir la síntesis de cADN de la primera cadena con la transcriptasa inversa M-MLV. El cADN se purificó y un adaptador 5' Illumina TruSeq se ligó al extremo 3' del cADN antisentido. Luego, el cADN se amplificó por PCR mediante el uso de una polimerasa de alta fidelidad; la concentración después de la amplificación fue de 10-20 ng/μL. Las muestras de cADN se codificaron con un código de barras de acuerdo con la condición de crecimiento que representaban, se purificaron mediante el uso de un kit Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter Genomics) y se analizaron mediante electroforesis capilar. Luego se agrupó el cADN, la agrupación cubrió moléculas de 200 a 500 bp.

Para Illumina NextSeq, los cebadores usados para la amplificación por PCR se diseñaron para la secuenciación TruSeq de acuerdo con las instrucciones de Illumina. El cADN se secuenció en un sistema Illumina NextSeq 500 con una longitud de lectura de 75 bp. La expresión diferencial de genes se analizó a través de DESeq2 mediante SARTools.

Los resultados para genes regulados de manera ascendente mediante secuenciación de ARN se muestran en la Tabla 40; t= tiempo en minutos después de la exposición al suero humano.

Tabla 40. Genes en *Staphylococcus aureus* 502a WT regulados de manera ascendente tras la exposición al suero humano mediante ARNseq

Gen		t=30 en suero en comparación con t=0	t=30 en suero en comparación con t=30 en TSB	t=90 en suero en comparación con t=0	t=90 en suero en comparación con t=90 en TSB
nombre del gen	número del gen	relación de cambio	relación de cambio	relación de cambio	relación de cambio
isdB	CH52_00245	479.653	471.648	2052.474	1240.112
sbnB	CH52_05135	158.756	44.41	310.08	130.622
isdC	CH52_00235	93.006	56.211	173.376	149.117
sbnA	CH52_05140	88.832	37.808	143.558	93.474
srtB	CH52_00215	73.135	47.421	143.059	170.578
sbnE	CH52_05120	70.475	50.083	190.255	171.279
sbnD	CH52_05125	66.84	52.434	187.025	224.017
isdI	CH52_00210	65.951	53.426	115.302	118.724
transportador ABC de hemo 2	CH52_00225	65.024	43.415	117.603	135.956
sbnC	CH52_05130	63.092	51.306	162.927	147.385
transportador ABC de hemo	CH52_00230	60.967	40.137	125.227	196.142
isd ORF3	CH52_00220	51.262	35.978	97.439	119.584
sbnF	CH52_05115	43.997	44.31	129.516	127.889
alanina deshidrogenasa	CH52_11875	43.589	20.237	304.444	NA
HarA	CH52_10455	43.215	28.041	114.425	117.787
sbnG	CH52_05110	42.446	34.095	133.373	120.433
diaminopimelato descarboxilasa	CH52_05105	32.541	25.864	102.838	141.629
transportador ABC de hierro	CH52_05145	31.417	19.576	44.885	47.226
treonina deshidratasa	CH52_11880	24.559	20.237	NA	NA
isdA	CH52_00240	21.471	40.712	44.477	115.432
transportador ABC de sideróforo	CH52_05150	NA	NA	33.201	37.267
sbnI	CH52_05100	NA	22.602	101.548	89.778
SAM dep Metrans	CH52_04385	NA	NA	75.292	25.847

Se descubrió que varios genes se regulaban de manera ascendente más de 20 veces después de la exposición al suero humano a t=30 min en comparación con t=0, o en comparación con t=30 en TSB, mediante secuenciación de ARN que incluyen
5 isdB, sbnB, isdC, sbnA, srtB, sbnE, sbnD, isdI, transportador ABC de hemo 2, transportador ABC de hemo 2, transportador ABC de hemo, isd ORF3, sbnF, alanina deshidrogenasa, HarA, sbnG, diaminopimelato descarboxilasa, transportador ABC de hierro, treonina deshidratasa, isdA y sbnI.

10 Varios genes se regularon de manera ascendente más de 50 veces después de la exposición al suero humano a t=30 min en comparación con t=0, o en comparación con t=30 en TSB, mediante secuenciación de ARN que incluyen isdB, sbnB, isdC, sbnA, srtB, sbnE, sbnD, isdI, transportador ABC de hemo 2,
15 transportador ABC de hemo 2, transportador ABC de hemo, isd ORF3. Los genes regulados de manera ascendente más de 100 veces después de la exposición al suero humano a t=30 min en comparación con t=0, o en comparación con t=30 en TSB, mediante secuenciación de ARN incluyen isdB y sbnB.

20 Varios genes se regularon de manera ascendente más de 100 veces después de la exposición al suero humano a t=90 min en comparación con t=0, o en comparación con t=90 en TSB, mediante secuenciación de ARN que incluyen isdB, sbnB, isdC, sbnA, srtB, sbnE, sbnD, isdI, transportador ABC de hemo 2,
25 transportador ABC de hemo 2, transportador ABC de hemo, isd

ORF3, sbnF, alanina deshidrogenasa, HarA, sbnG, diaminopimelato descarboxilasa, isdA.

Los genes regulados de manera ascendente preferidos en *Staphylococcus aureus* 502a cuando se exponen al suero incluyen el gen isdB CH52_00245, el gen srtB CH52_00215, el gen transportador ABC de hemo 2 CH52_00215 y el gen HarA CH52_00215.

Se descubrió que varios genes de *Staphylococcus aureus* 502aWT se regulan de manera descendente cuando se exponen al suero humano mediante secuenciación de ARN como se muestra en la Tabla 41 y la Tabla 42.

Tabla 41. Genes en *Staphylococcus aureus* 502a WT regulados de manera descendente tras la exposición al suero humano a los 30 min mediante ARNseq

15

20

25

nombre del gen	número del gen	t=30 en suero en comparación con t=0	t=30 en suero en comparación con t=30 en TSB
fosforibosilglicinamida formiltransferasa	CH52_00525	-4.307	-2.001
fosforibosilaminoimidazol sintetasa	CH52_00530	-4.271	-2.063
amidofosforibosiltransferasa	CH52_00535	-4.131	-2.117
fosforibosilformilglicinamidina sintasa	CH52_00540	-4.046	-2.244
fosforibosilformilglicinamidina sintasa	CH52_00545	-3.498	-2.215
fosforibosilaminoimidazol-succinocarboxamida	CH52_00555	-3.345	-2.134
trehalosa permeasa IIC	CH52_03480	-3.338	-2.401
regulador de la transcripción de la familia DeoR	CH52_02275	-2.55	-2.171
fosfofructocinasa	CH52_02270	-2.464	-1.984
subunidad del transportador de fructosa PTS IIC	CH52_02265	-2.042	-1.806
galactosa-6-fosfato isomerasa	CH52_07975	NA	-2.137

Tabla 42. Genes en *Staphylococcus aureus* 502a WT regulados de manera descendente tras la exposición al suero humano a los 90 min mediante ARNseq

5	nombre del gen	número del gen	t=90 en suero en comparación con t=0	t=90 en suero en comparación con t=90 en TSB
			relación de cambio	relación de cambio
	NarZ	CH52_07000	-5.012	-3.989
	fosforibosilglicinamida formiltransferasa	CH52_00525	-3.737	-1.680
	trehalosa permeasa IIC	CH52_03480	-3.279	-4.381
	NarH	CH52_07005	-3.265	NA
	alquilhidroperoxidasa	CH52_06615	-3.211	-3.573
	NarT	CH52_07045	-3.108	-3.680
	proteína hipotética	CH52_04875	-2.911	-3.396
	factor trans deoR	CH52_02275	-2.245	-3.322
10	subunidad del transportador de fructosa PTS IIC	CH52_02265	-2.211	-4.474
	lisofosfolipasa	CH52_02680	-1.837	-3.000
	chaperona de desagregación de proteínas	CH52_01005	-0.009	-2.989
	alquilhidroperoxidasa	CH52_06615	NA	-3.573
	fosfofructocinasa	CH52_02270	NA	-3.878

15 Varios genes en *Staphylococcus aureus* 502a se regularon de manera descendente al menos 2 veces después de t=30 o t=90 minutos en suero en comparación con t=0 o en TSB, que incluyen el gen de fosforibosilglicinamida formiltransferasa CH52_00525, el gen de trehalosa permeasa IIC CH52_03480, el gen regulador de la transcripción de la familia DeoR CH52_02275, el gen de fosfofructocinasa CH52_02270 y el gen de la subunidad del transportador de fructosa PTS IIC CH52_02265.

Ejemplo 21. Construcción del interruptor de inactivación

25 Para este experimento, se diseñó y construyó un casete de interruptor de inactivación sensible al suero con el

propósito de producir una cepa de *Staphylococcus aureus* (SA) 502a que no pueda crecer en suero o sangre. Este casete se situó alrededor del sistema de antitoxina de toxina sprA1 endógeno en SA. Este es un sistema de T/AT tipo I en donde la

5 toxina es un péptido de porina de membrana pequeña (PepA1) que se reprime traduccionalmente mediante un ARN antisentido. El ARN antisentido se fija a la UTR 5' de sprA1 que cubre el RBS y bloquea su capacidad de fijarse al mRNA monocatenario y sintetizar la proteína.

10 El diseño de este interruptor de inactivación cambia la región promotora que dirige la expresión de la toxina PepA1 de su sistema endógeno a uno que está altamente regulado de manera ascendente cuando el organismo se cultiva en suero humano. Este constructo se realizó con el promotor sbnA de SA

15 502a. Para este interruptor de inactivación, la región promotora no se modificó para el ARN antisentido, pero hay versiones adicionales de interruptores de inactivación que también cambiarán esta región a los promotores que se han identificado como altamente regulados de manera ascendente

20 durante el crecimiento en medios complejos normales, pero altamente reprimidos o regulados de manera descendente cuando el organismo crece en sangre o suero. Esto debería facilitar aún más la superación de la supresión de antitoxinas de sprA1 en condiciones de sangre o suero.

25 Para evaluar la funcionalidad del interruptor de

inactivación, se indujo la expresión de la toxina PepA1 al tomar un cultivo que estaba creciendo en una fase exponencial temprana en medios complejos, caldo de soja triptico (TSB) y al cambiar los medios de crecimiento a suero humano. Se
5 monitorizó la OD y se realizaron diluciones en serie a la placa y se contaron las CFU para controlar el número de células viables en el cultivo y compararlo con SA 502a de tipo silvestre que se cultivó en las mismas condiciones. La Figura 21 muestra un mapa del interruptor de inactivación
10 PsbnA-sprA1 en el genoma de *Staphylococcus aureus* 502a.

Los métodos usados para la construcción de plásmidos, los oligos, el protocolo para hacer cambios en el genoma de *Staphylococcus aureus* 502a mediante recombinación homóloga, y el ensayo de inactivación se muestran a continuación.

15 Cepas

502a - *Staphylococcus aureus* de tipo silvestre

BP_011 - 502a Δ sprA1-sprA1 (AS)

BP_084 - 502a Δ PsprA::PsbnA

En este experimento, BP_011 ha inactivado tanto el gen de
20 toxina sprA1 como la región de antitoxina sprA1, porque se consideró que era más fácil "curar" el KO al integrar el interruptor de inactivación en ese sitio que hacer la integración directamente en la 502a de tipo silvestre. Esto se debe a que el sistema usado para las integraciones, es decir, la
25 recombinación homóloga, se basa en segmentos de homología entre

el gen insertado y la diana cromosómica para determinar la ubicación de la integración, y se consideró que la toxina/antitoxina sprA1 endógena podría interferir con la integración si está presente en el genoma. La cepa BP_011 es la
5 cepa parental de la cepa del interruptor de inactivación BP_084. La cepa BP-011 se incluyó en este experimento como control.

Construcción del plásmido

- 1) Amplificar por PCR regiones de homología del genoma SA 502a
 - 10 a. Brazo de homología dirección 5' - DR_233/DR_296
 - b. Brazo de homología dirección 3' - DR_280/DR_236
- 2) Amplificar por PCR PsbnA-sprA1 del fragmento de ADN lineal sintetizado de IDT
 - a. PsbnA-sprA1 - DR_297/DR_228
- 15 3) Amplificar por PCR el vector de cadena principal pIMAYz
 - a. DR_022/DR_023
- 4) Purificar en gel todos los fragmentos con el kit Qiagen de acuerdo con las instrucciones del fabricante
- 20 5) Ensamblar los fragmentos de ADN lineales en plásmido circular y transformarlos en células *E. coli* IM08B electrocompetentes de acuerdo con las instrucciones del fabricante.
- 6) Realizar PCR de colonias para cribar colonias de plásmido completamente ensamblado.
- 25 a. DR_117/DR_228 (fragmento de 1571bp)

7) Elegir múltiples colonias positivas, cultivar el cultivo durante la noche y secuenciar el plásmido para confirmar que no hay mutaciones en el plásmido recién ensamblado.

5 8) Transformar el plásmido confirmado por secuencia en SA 502a electrocompetente y seguir el protocolo para realizar ediciones en el genoma de SA a través de recombinación homóloga.

9) Cribar colonias finales mediante PCR para detectar integrante con el par de cebadores DR_303/DR_304.

10 a. Enviar el producto de PCR para la confirmación de la secuencia si se observa el tamaño de banda correcto.

Tabla 43. Secuencias de oligo usadas en la construcción del plásmido

15	Nombre del cebador	Secuencia de ADN 5'-3'
	DR_233	cgacggtatcgataagcttgGCCACTGGCGTCAAATACTGTAATGAAGAATG (SEC. ID NO.: 330)
	DR_296	CATCTAATTGGACAAATTCTATGAGAGTAGATTTTGTTAATTTAAG (SEC. ID NO.: 331)
	DR_280	GTAGACGCAATACAAAATAGGTGACATATAGCCGCACC (SEC. ID NO.: 332)
	DR_236	gctctagaactagtgatcccGGCGATTTTATTGTGACAAGAGACTGAAGAGC (SEC. ID NO.: 333)
	DR_297	CATAGAATTTGTCCAATTAGATGTCCCACTACATCCTGCTAAAACAAGTAGGAAAGC (SEC. ID NO.: 334)
	DR_228	CTATTTTGTATTGCGTCTACTTAGCCAATAAG (SEC. ID NO.: 335)
	DR_022	Caagcttatcgataccgctcgacctc (SEC. ID NO.: 336)
	DR_023	Gggatccactagttctagagcgg (SEC. ID NO.: 337)
	DR_303	CAAGCCACCAAAGCACGTGCCTATTTGCC (SEC. ID NO.: 338)
20	DR_304	CAGTGAAATAGATAGATTGGTTGAAAAACAATCTTCAAAAGTCGGACG (SEC. ID NO.: 339)

A continuación se muestra el protocolo usado para realizar cambios en el genoma de *Staphylococcus aureus* 502a mediante recombinación homóloga.

Materiales

- 5 • Agar BHI (10 ug/mL de cloranfenicol) (100 ug/mL de X-Gal)
- Agar BHI (1 ug/mL de anhidrotet) (100 ug/mL de X-Gal)
- Agar BHI
- 10 • Caldo BHI
- Cebadores para cribar colonias después de eventos de recombinación primaria y secundaria

Protocolo

1. Preparar un plásmido de integración pIMAYz
15 altamente concentrado. Se centrifugaron ~25 mL de cultivo realizado durante la noche en (4) volúmenes 2x del protocolo de minipreparación. Esto se puede purificar a través de 2 columnas, si se desea, y se puede realizar para maximizar el rendimiento de ADN. Las eluciones se deben agrupar y
20 concentrar mediante el uso del kit concentrador Zymo realizado para maximizar la concentración.

2. Usar hasta 5 µL de plásmido concentrado anterior para transformar 502a mediante el protocolo de electroporación optimizado de laboratorio.

- 25 3. Recuperar células durante 1 h a 30°C en agitador

4. Colocar en placas la mezcla de recuperación completa entre 3-4 placas de agar BHI (clor 10, X-Gal 100). Incubar 1 placa a 30°C y el resto a 37°C durante la noche (asegurarse de que la incubadora esté a 37°C o más)

5 5. Cribar las colonias azules en las placas para detectar la presencia de plásmido circular mediante el uso de los cebadores DR_116/DR_117. Los cebadores flanquean el sitio de clonación múltiple en pIMAYz y, para las placas a 30C, producirán una banda del mismo tamaño que los brazos de
10 homología más cualquier región que se integre. Las placas a 37°C no deben producir ninguna banda.

6. Las colonias azules en las placas a 37°C se deben cribar para detectar el plásmido integrado en el genoma mediante el uso de cebadores que se fijan fuera de los brazos
15 de homología. Cada cebador debe emparejarse con DR_116 o DR_117. Esto confirmará que el plásmido está integrado en la ubicación adecuada en el genoma.

7. Si no hay colonias en las placas a 37°C, se producen bandas que indican que el plásmido se ha integrado;
20 las colonias que muestran una banda de plásmido en las placas a 30°C se pueden diluir y colocar en placas en agar BHI (clor 10, X-Gal 100) e incubar a 37°C. Repetir las etapas 5-6 para volver a cribar las nuevas colonias para detectar la integración.

25 8. Si la PCR muestra un plásmido integrado, elegir un

par de colonias, si es posible, elegir clones que se hayan integrado en cada sentido. Cultivar durante la noche (~16 h) en 5 mL de caldo BHI en agitador a temperatura ambiente.

9. Diluir hasta 10^{-5} y 10^{-6} , y colocar en placas
5 50uL en agar BHI (1 ug/mL de anhidrotet, 100 ug/mL de X-Gal). Incubar las placas durante la noche a 37°C.

10. Sembrar por parche las colonias blancas en agar BHI (clor 10 μ G/mL, X-Gal 100), agar BHI (1 ug/mL de anhidrotet, 100 ug/mL de X-Gal), agar BHI para detectar resistencia a la
10 anhidrotet y sensibilidad al cloranfenicol. Las colonias con ambos fenotipos se deben recolectar de la placa de agar BHI y cribarse para detectar la inactivación o la activación. Al menos uno de los cebadores usados para cribar el genotipo final se debe fijar fuera de las regiones usadas como brazos
15 de homología.

11. Sembrar por estría la placa de parche de varios clones positivos, realizar una PCR de HF mediante el uso de cebadores que se fijan fuera de los brazos de homología y enviar para la secuenciación. Incubar las placas durante la
20 noche a 37°C.

12. Elegir al menos 3 colonias de placas sembradas y realizar una PCR de colonias para confirmar el genotipo. Si las PCR son todas positivas, la placa se usa para crear reservas de cepas y se asigna un nuevo número de cepa.

25 A continuación se muestra el ensayo de inactivación

usado para la evaluación preliminar del interruptor de inactivación sintético PsbnA-sprA1 en el genoma de *Staphylococcus aureus* 502a.

Ensayo de inactivación

5 1) Iniciar cultivos de TSB de 5 mL de cepas a evaluar y cepa de control de tipo silvestre y cultivar durante la noche a 37°C en una incubadora con agitación orbital a 250 RPM.

 2) Al día siguiente, realizar diluciones de 1:100 en medios TSB frescos y permitir que los cultivos crezcan
10 durante 2 horas.

 3) Tomar una lectura de OD600 y registrar los valores. Calcular el volumen de cultivo celular requerido para inocular cultivos de 5 mL hasta una OD de 0.05. Inocular nuevos cultivos con volumen calculado en medios precalentados
15 (TSB/suero)

 4) Continuar el cultivo de los cultivos a 37°C. Realizar diluciones en serie y colocar varias diluciones de células en placas de agar BHI o TSB. Incubar las placas durante la noche a 37°C y contabilizar las colonias en cada
20 placa después de que aparezcan (>16 h).

Los resultados preliminares mediante el uso del interruptor de inactivación PsbnA-sprA1 en el genoma de *Staphylococcus aureus* 502a mostraron que no había diferencias en las curvas de crecimiento entre el KS y el tipo silvestre

en condiciones normales de crecimiento en TSB, según se desee. Los recuentos de colonias registrados se muestran en la Tabla 44 y en la Figura 23.

Tabla 44. Recuentos de colonias registrados después de 180 min cuando se exponen al suero humano

Cepa		Recuento de colonias registrado				
		t = min	t = 0 min	t = 45 min	t = 90 min	t = 180 min
BP_011	TSB		188*10 ⁴	409*10 ⁴	30*10 ⁶	68*10 ⁷
	Suero		560*10 ³	76*10 ⁴	63*10 ⁵	5*10 ⁷
502a	TSB			305*10 ⁴	199*10 ⁵	89*10 ⁶
	Suero			305*10 ⁴	35*10 ⁵	6*10 ⁷
BP_084	TSB		220*10 ⁴	75*10 ⁵	77*10 ⁵	135*10 ⁶
	Suero		62*10 ⁴	180*10 ⁴	34*10 ⁵	157*10 ⁴

Como se muestra en la Tabla 44 y en la Figura 23, después de tres horas de exposición al suero humano, la cepa BP_084 de *Staphylococcus aureus* KS que tenía el interruptor de inactivación incorporado al genoma tenía menos colonias que la cepa de tipo silvestre en un factor de alrededor de 1000.

La cfu/mL calculada se obtuvo al tomar el número de colonias contadas*factor de dilución*20 (para dar cuenta de que se colocaron en placas 50 µL de cada dilución), como se muestra en la Tabla 45.

Tabla 45. Cfu/mL calculada en suero humano y TSB

Cepa		CFU/mL calculada			
	t = min	0	45	90	180
BP_011	TSB	37600000	81800000	600000000	13600000000
	Suero	11200000	15200000	126000000	1000000000
502a	TSB		61000000	398000000	1780000000
	Suero		61000000	70000000	1200000000
BP_084	TSB	44000000	150000000	154000000	2700000000
	Suero	12400000	36000000	68000000	31400000

Mediante los datos de la Tabla 45, se comparó la cfu/ml de la cepa del interruptor de inactivación con la 502a de tipo silvestre. Después de 3 horas posteriores a la inducción del suero, la cepa que alberga el interruptor de inactivación
5 integrado *Staphylococcus aureus* KS cepa BP_084 (502a Δ PsprA::PsbA) mostró una tasa de supervivencia de 2.61%, que corresponde a una reducción de 97.39% en células viables en comparación con el tipo silvestre en suero.

También como se muestra en la Tabla 45, después de tres
10 horas de exposición al suero humano, la cepa de *Staphylococcus aureus* KS BP_084 que tiene el interruptor de inactivación incorporado al genoma exhibió el porcentaje de supervivencia de BP_084 (suero)/BP_084(TSB)*100=1.16% de porcentaje de supervivencia. Por lo tanto, cuando se expuso
15 al suero humano, las células de la cepa de *Staphylococcus aureus* KS BP_084 (502a Δ PsprA::PsbA) a las 3 horas posteriores a la inducción exhibieron 100%-1.16%=98.84% de muerte celular promedio medible en comparación con las mismas células BP_084 en TSB.

20 El microorganismo sintético BP_084 que comprende la modificación molecular del interruptor de inactivación incorporado al genoma exhibió las propiedades de crecimiento deseadas en condiciones normales, pero redujo significativamente el crecimiento celular cuando se expuso al
25 suero humano.

Ejemplo 22. Construcción del interruptor de inactivación con abrazadera de expresión

La construcción del interruptor de inactivación con abrazadera de expresión se realizará de la siguiente manera.

5 En ejemplos anteriores, se identificaron ciertos genes que están regulados de manera ascendente o descendente en *Staphylococcus aureus* cuando se exponen al suero y la sangre humanos. Por ejemplo, *isdB* se selecciona como un promotor que está significativamente regulado de manera ascendente como un
10 promotor sensible a la sangre y al suero. Además, *clfB* se selecciona como un segundo promotor para usar en una abrazadera de expresión que está activa en ausencia de suero o sangre, pero se regula de manera descendente en presencia de suero o sangre.

15 En ejemplos anteriores, se identificó una toxina endógena en *Staph aureus* que, cuando se regula significativamente de manera ascendente, mata la célula. Por ejemplo, la toxina *sprA1* se selecciona como un gen de muerte celular.

20 Mediante el uso de PCR de puntada y ensamblaje Gibson, se construyen operones que usan la región promotora responsable de la regulación ascendente de los genes de suero/sangre en *Staphylococcus aureus* para dirigir la expresión de la toxina *sprA1*, y el uso de las regiones
25 promotoras responsables de la regulación descendente de los

genes de suero/sangre en *Staphylococcus aureus* para dirigir la expresión del *sprA*_{AS}. La Figura 22 muestra una caricatura de la construcción del interruptor de inactivación mediante el promotor sensible al suero y la sangre *isdB* ligado operativamente al gen de muerte celular *sprA*1 y un segundo promotor *clfB* ligado operativamente a *sprA* AS para evitar la expresión de la toxina en ausencia de sangre o suero. Este casete se integrará en la ubicación nativa de *sprA*1 en el genoma de *Staphylococcus aureus* 502a mediante recombinación homóloga, al usar la misma técnica descrita en ejemplos anteriores.

Para confirmar la utilidad, los experimentos de ensayo de inactivación se realizarán mediante el uso de *Staphylococcus aureus* 502a sintético para determinar la funcionalidad del interruptor de inactivación en diversas condiciones de cultivo y ensayos dérmicos en ausencia y presencia de sangre o suero. El *Staphylococcus aureus* 502a sintético exhibirá un buen crecimiento en condiciones dérmicas o mucosas, pero exhibirá un crecimiento significativamente reducido o muerte celular cuando se expone a sangre o suero. Se contempla que el *Staphylococcus aureus* 502a sintético colonizado será seguro para administrar a un sujeto porque no podrá sobrevivir o reproducirse en condiciones sistémicas. También se contempla que el *Staphylococcus aureus* 502a sintético pueda ocupar de manera

duradera un nicho vacante en un microbioma del hospedero creado mediante la descolonización de una cepa de *Staphylococcus aureus*, tal como MRSA.

Se hace constar que con relación a esta fecha, el mejor
5 método conocido por la solicitante para llevar a la práctica la citada invención, es el que resulta claro de la presente descripción de la invención.

10

15

20

25

REIVINDICACIONES

Habiéndose descrito la invención como antecede, se reclama como propiedad lo contenido en las siguientes
5 reivindicaciones:

1. Un microorganismo sintético, caracterizado porque comprende un nucleótido recombinante que comprende
al menos una modificación molecular de interruptor de inactivación que comprende
10 un primer gen de muerte celular asociado operativamente con
una primera región reguladora que comprende un primer promotor inducible, en donde
el primer promotor inducible exhibe una expresión
15 génica condicionalmente de alto nivel del nucleótido recombinante en respuesta a la exposición a sangre, suero o plasma de al menos tres veces el aumento de la productividad basal.

2. El microorganismo sintético de conformidad con la
20 reivindicación 1, caracterizado porque comprende además
al menos una segunda modificación molecular (abrazadera de expresión) que comprende
un gen de antitoxina específico para el primer gen de muerte celular, en donde el gen de antitoxina está asociado
25 operativamente con

una segunda región reguladora que comprende un segundo promotor que es activo (constitutivo) tras la colonización dérmica o mucosa o en un medio completo, pero no se induce, se induce menos de 1.5 veces o se reprime después de la
5 exposición a sangre, suero o plasma durante al menos 30 minutos.

3. El método de conformidad con la reivindicación 1 o 2, caracterizado porque el microorganismo sintético se deriva de un microorganismo diana que tiene el mismo género y
10 especie que un microorganismo no deseado.

4. El microorganismo sintético de conformidad con la reivindicación 1 o 2, caracterizado porque el primer promotor está regulado de manera ascendente en al menos 5 veces, al menos 10 veces, al menos 20 veces, al menos 50 veces o al
15 menos 100 veces dentro de al menos 30 min, 60 min, 90 min, 120 min, 180 min, 240 min, 300 min o al menos 360 min después de la exposición a sangre, suero o plasma.

5. El microorganismo sintético de conformidad con la reivindicación 1 o 2, caracterizado porque el primer promotor
20 no se induce, se induce menos de 1.5 veces, o se reprime en ausencia de sangre, suero o plasma.

6. El microorganismo sintético de conformidad con la reivindicación 2, caracterizado porque la segunda región reguladora que comprende un segundo promotor es activa tras
25 la colonización dérmica o mucosa o en medio TSB, pero se

reprime al menos 2 veces tras la exposición a sangre, suero o plasma después de un período seleccionado del grupo que consiste en al menos 30 min, 60 min, 90 min, 120 min, 180 min, 240 min, 300 min y al menos 360 min.

5 7. El microorganismo sintético de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado porque la muerte celular promedio medible del microorganismo sintético ocurre dentro de al menos un período preestablecido después de la inducción del primer promotor.

10 8. El microorganismo sintético de conformidad con la reivindicación 7, caracterizado porque la muerte celular promedio medible ocurre dentro de al menos un período preestablecido seleccionado del grupo que consiste en al menos 1, 5, 15, 30, 60, 90, 120, 180, 240, 300 o 360 min
15 después de la exposición a sangre, suero o plasma.

 9. El microorganismo sintético de conformidad con la reivindicación 8, caracterizado porque la muerte celular promedio medible es al menos 50% cfu, al menos 70%, al menos 80%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 99%, al menos
20 99.5%, al menos 99.8% o al menos 99.9% de reducción de recuento de cfu después del período preestablecido.

 10. El microorganismo sintético de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, caracterizado porque la modificación molecular de interruptor de
25 inactivación reduce o previene el crecimiento infeccioso del

microorganismo sintético en condiciones sistémicas en el sujeto.

11. El microorganismo sintético de conformidad con la reivindicación 1 o 2, caracterizado porque la al menos una
5 modificación molecular está integrada a un cromosoma del microorganismo sintético.

12. El microorganismo sintético de conformidad con la reivindicación 3, caracterizado porque el microorganismo diana es susceptible a al menos un agente antimicrobiano.

10 13. El microorganismo sintético de conformidad con la reivindicación 12, caracterizado porque el microorganismo diana se selecciona de un microorganismo diana bacteriano, fúngico o protozoario.

14. El método de conformidad con la reivindicación 13,
15 caracterizado porque el microorganismo diana es una especie bacteriana que puede colonizar un nicho dérmico y/o mucoso y es miembro de un género seleccionado del grupo que consiste en *Acinetobacter*, *Corynebacterium*, *Cutibacterium*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Propionibacterium* y
20 *Pseudomonas*.

15. El microorganismo sintético de conformidad con la reivindicación 14, caracterizado porque se deriva de una cepa de *Staphylococcus aureus*.

16. El microorganismo sintético de conformidad con la
25 reivindicación 15, caracterizado porque el gen de muerte

celular se selecciona del grupo que consiste en *sprA1*, *sprA2*, *kpn1*, *smal*, *sprG*, *relF*, *rsaE*, *yoeB*, *mazF*, *yefM* o gen de toxina lisostafina.

17. El microorganismo sintético de conformidad con la reivindicación 16, caracterizado porque el gen de muerte celular comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en SEC. ID NO.: 122, 124, 125, 126, 127, 128, 274, 275, 284, 286, 288, 290, 315 y 317, o una secuencia de nucleótidos sustancialmente idéntica.

18. El microorganismo sintético de conformidad con la reivindicación 16 o 17, caracterizado porque el primer promotor inducible comprende o se deriva de un gen seleccionado del grupo que consiste en *isdA* (proteína determinante de superficie regulada por hierro A), *isdB* (proteína determinante de superficie regulada por hierro B), *isdG* (monooxigenasa degradante de hemo), *hlgA* (componente gamma-hemolisina A), *hlgA1* (gamma-hemolisina), *hlgA2* (gamma-hemolisina), *hlgB* (componente gamma-hemolisina B), *hrtAB* (transportador regulado por hemo), *sbnC* (proteína de biosíntesis del sideróforo de la familia luc C), *sbnD*, *sbnI*, *sbnE* (proteína de biosíntesis de sideróforos de la familia lucA/lucC), *isdI*, *lrgA* (regulador de mureína hidrolasa A), *lrgB* (regulador de mureína hidrolasa B), *ear* (proteína ear), *fhuA* (proteína de fijación a ATP de transporte de ferricromo *fhuA*), *fhuB* (permeasa de transporte de ferricromo), *hlb*

(fosfolipasa C), gen transportador ABC de hemo 2, gen transportador ABC de hemo, *isd* ORF3, *sbnF*, gen alanina deshidrogenasa, gen de diaminopimelato descarboxilasa, gen transportador ABC de hierro, gen treonina deshidratasa, gen

5 transportador ABC de sideróforo, gen SAM dep Metrans, *HarA*, *splF* (serina proteasa SplF), *splD* (serina proteasa SplD), *dps* (proteína de estrés general 20U), SAUSA300_2617 (proteína de fijación a ATP de transportador ABC de cobalto putativa), SAUSA300_2268 (proteína de la familia de simportador de

10 sodio/ácido biliar), SAUSA300_2616 (proteína de transporte de la familia de cobalto), *srtB* (sortasa B), *sbnA* (proteína de biosíntesis de sideróforos probable *sbnA*), *sbnB*, *sbnG*, *leuA* (enzima biosintética de aminoácidos de 2-isopropilmalato sintasa), *sstA* (proteína de membrana de transporte de

15 hierro), *sirA* (proteína de fijación a sustrato de transportador ABC de hierro), *isdA* (transportador de hemo) y *spa* (proteína estafilocócica A).

19. El microorganismo sintético de conformidad con la reivindicación 18, caracterizado porque el primer promotor

20 comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en SEC. ID NO.: 114, 115, 119, 120, 121, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162 y 163, o una secuencia de

25 nucleótidos sustancialmente idéntica de estos.

20. El microorganismo sintético de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 15 a 19, caracterizado porque el gen de antitoxina codifica una secuencia de ARN antisentido capaz de hibridarse con al menos una porción del primer gen de muerte celular.

21. El microorganismo sintético de conformidad con la reivindicación 20, caracterizado porque el gen de antitoxina se selecciona del grupo que consiste en un gen de antitoxina *sprA1*, gen de antitoxina *sprA2*, gen de antitoxina *sprG* o *sprF*, gen de antitoxina holina, gen de antitoxina 187-lysK, gen de antitoxina *yefM*, gen de antitoxina lisostafina o gen de antitoxina *mazE*, gen de antitoxina *kpn1*, gen de antitoxina *smal*, gen de antitoxina *relF*, gen de antitoxina *rsaE* o gen de antitoxina *yoeB*, respectivamente.

22. El microorganismo sintético de conformidad con la reivindicación 21, caracterizado porque el gen de antitoxina comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en SEC. ID NO.: 273, 306, 307, 308, 309, 310, 311, 312, 314, 319 o 322, o una secuencia de nucleótidos sustancialmente idéntica.

23. El microorganismo sintético de conformidad con la reivindicación 21 o 22, caracterizado porque el segundo promotor comprende o se deriva de un gen seleccionado del grupo que consiste en *clfB* (factor de aglutinación B), *sceD* (autolisina, exoproteína D), *walkR* (regulador de virulencia),

atlA (autolisina principal), *oatA* (O-acetiltransferasa A);
 gen de fosforibosilglicinamida formiltransferasa, gen de
 fosforibosilglicinamida formiltransferasa, gen de
 amidofosforibosiltransferasa, gen de
 5 fosforibosilformilglicinamidina sintasa, gen de
 fosforibosilformilglicinamidina sintasa, gen de
 fosforibosilaminoimidazol-succinocarboxamida, gen de
 trehalosa permeasa IIC, gen regulador de la transcripción de
 la familia de DeoR, gen de fosfofructocinasa, gen de la
 10 subunidad del transportador de fructosa PTS IIC, gen de
 galactosa-6-fosfato isomerasa, NarZ, NarH, NarT, gen de
 alquilhidroperoxidasa, gen de proteína hipotética, gen de
 factor trans DeoR, gen de lisofosfolipasa, gen de chaperona
 de desagregación de proteínas, gen de alquilhidroperoxidasa,
 15 gen de fosfofructocinasa, *gyrB*, *sigB* y *rho*.

24. El microorganismo sintético de conformidad con la
 reivindicación 23, caracterizado porque el segundo promotor
 es un *P_{o1FB}* (factor de aglutinación B) y comprende una
 secuencia de nucleótidos de SEC. ID NO.: 117, 118, 129 o 130,
 20 o una secuencia de nucleótidos sustancialmente idéntica de
 estos.

25. El microorganismo sintético de conformidad con
 cualquiera de las reivindicaciones 1 a 24, caracterizado
 porque comprende además una modificación molecular
 25 seleccionada del grupo que consiste en una modificación

molecular de bloqueo de virulencia y una modificación molecular de nanofábrica.

26. El microorganismo sintético de conformidad con la reivindicación 25, caracterizado porque la modificación molecular de bloqueo de virulencia impide la transferencia horizontal de genes del material genético desde el microorganismo no deseado.

27. El microorganismo sintético de conformidad con la reivindicación 25, caracterizado porque la modificación molecular de nanofábrica comprende una inserción de un gen que codifica, una inactivación de un gen que codifica, o una modificación genética de un gen que codifica un producto seleccionado del grupo que consiste en una enzima, aminoácido, intermediario metabólico y una molécula pequeña.

28. Una composición caracterizada porque comprende una cantidad eficaz del microorganismo sintético de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 27, y un portador, diluyente, emoliente, aglutinante, excipiente, lubricante, agente endulzante, agente saborizante, agente humectante, conservador, amortiguador o absorbente aceptable desde el punto de vista farmacéutico, o una combinación de estos.

29. La composición farmacéutica de conformidad con la reivindicación 28, caracterizada porque comprende además un nutriente, un prebiótico, un comensal y/o una especie bacteriana probiótica.

30. Una unidad de dosis única caracterizada porque comprende la composición de conformidad con la reivindicación 28 o 29.

31. La unidad de dosis única de conformidad con la
5 reivindicación 30, caracterizada porque comprende al menos 10^5 , al menos 10^6 , al menos 10^7 , al menos 10^8 , al menos 10^9 , al menos 10^{10} CFU, o al menos 10^{11} de la cepa sintética y un portador aceptable desde el punto de vista farmacéutico.

32. La unidad de dosis de conformidad con la
10 reivindicación 31, caracterizada porque es formulada para administración tópica.

33. El microorganismo sintético de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 27 o la composición de conformidad con la reivindicación 28 o 29, para usarse en la
15 elaboración de un medicamento para eliminar y prevenir la recurrencia de un microorganismo no deseado en un sujeto.

34. Un método para eliminar y prevenir la recurrencia de un microorganismo no deseado en un sujeto que alberga un microbioma, caracterizado porque comprende:

20 a. descolonizar el microbioma del hospedero; y

b. reemplazar de manera duradera el microorganismo no deseado mediante la administración al sujeto de un microorganismo sintético que comprende al menos un elemento que imparte un atributo no nativo, en donde el microorganismo
25 sintético es capaz de integrarse de manera duradera al

microbioma del hospedero y ocupar el mismo nicho en el microbioma del hospedero que el microorganismo no deseado.

35. El método de conformidad con la reivindicación 34, caracterizado porque la descolonización se realiza en al
5 menos un sitio en el sujeto para reducir o eliminar sustancialmente la presencia detectable del microorganismo no deseado en el al menos un sitio.

36. El método de conformidad con la reivindicación 35, caracterizado porque la presencia detectable del
10 microorganismo no deseado se determina a través de un método que comprende un método fenotípico y/o un método genotípico, opcionalmente en donde el método fenotípico se selecciona del grupo que consiste en reacciones bioquímicas, reacciones serológicas, susceptibilidad a agentes antimicrobianos,
15 susceptibilidad a fagos, susceptibilidad a bacteriocinas y/o perfil de proteínas celulares y, opcionalmente

en donde el método genotípico se selecciona del grupo que consiste en hibridación, perfil de plásmidos, análisis de polimorfismo de plásmidos, digestión de enzimas de
20 restricción, reacción y separación por electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE), ribotipado, reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y sus variantes, reacción en cadena de la ligasa (LCR) y sistema de amplificación basado en la transcripción (TAS).

25 37. El método de conformidad con la reivindicación 35,

caracterizado porque el nicho es un entorno dérmico o mucoso que permite la colonización estable del microorganismo no deseado en el al menos un sitio.

38. El método de conformidad con la reivindicación 37,
5 caracterizado porque la capacidad de integrarse de manera duradera al microbioma del hospedero se determina mediante la presencia detectable del microorganismo sintético en el al menos un sitio durante un período de al menos dos semanas, al menos cuatro semanas, al menos seis semanas, al menos ocho
10 semanas, al menos diez semanas, al menos 12 semanas, al menos 16 semanas, al menos 26 semanas, al menos 30 semanas, al menos 36 semanas, al menos 42 semanas o al menos 52 semanas después de la etapa de administración.

39. El método de conformidad con la reivindicación 38,
15 caracterizado porque la capacidad de reemplazar de manera duradera el microorganismo no deseado se determina por la ausencia de presencia detectable del microorganismo no deseado en el al menos un sitio durante un período de al menos dos semanas, al menos cuatro semanas, al menos seis
20 semanas, al menos ocho semanas, al menos diez semanas, al menos 12 semanas, al menos 16 semanas, al menos 26 semanas, al menos 30 semanas, al menos 36 semanas, al menos 42 semanas o al menos 52 semanas después de la etapa de administración.

40. El método de conformidad con la reivindicación 39,
25 caracterizado porque la capacidad de ocupar el mismo nicho se

determina por la ausencia de colonización conjunta del microorganismo no deseado y el microorganismo sintético en el al menos un sitio después de la etapa de administración,

opcionalmente en donde la ausencia de colonización
5 conjunta se determina al menos una semana, al menos dos semanas, al menos cuatro semanas, al menos seis semanas, al menos ocho semanas, al menos diez semanas, al menos 12 semanas, al menos 16 semanas, al menos 26 semanas, al menos 30 semanas, al menos 36 semanas, al menos 42 semanas o al
10 menos 52 semanas después de la etapa de administración.

41. El método de conformidad con la reivindicación 34, caracterizado porque el al menos un elemento que imparte el atributo no nativo se incorpora de manera duradera al microorganismo sintético.

15 42. El método de conformidad con la reivindicación 41, caracterizado porque el al menos un elemento que imparte el atributo no nativo se incorpora de manera duradera al microbioma del hospedero a través del microorganismo sintético.

20 43. El método de conformidad con la reivindicación 42, caracterizado porque el al menos un elemento que imparte el atributo no nativo se selecciona del grupo que consiste en una modificación molecular de interruptor de inactivación, modificación molecular de bloqueo de virulencia, modificación
25 metabólica y modificación molecular de nanofábrica.

44. El método de conformidad con la reivindicación 43, caracterizado porque la modificación molecular está integrada a un cromosoma del microorganismo sintético.

5 45. El método de conformidad con la reivindicación 43, caracterizado porque el microorganismo sintético comprende una modificación molecular de bloqueo de virulencia que impide la transferencia horizontal de genes del material genético del microorganismo no deseado.

10 46. El método de conformidad con la reivindicación 43, caracterizado porque el microorganismo sintético comprende una modificación molecular de interruptor de inactivación que reduce o previene el crecimiento infeccioso del microorganismo sintético en condiciones sistémicas en el sujeto.

15 47. El método de conformidad con la reivindicación 43, caracterizado porque el microorganismo sintético se deriva de un microorganismo diana que tiene el mismo género y especie que el microorganismo no deseado.

20 48. El método de conformidad con la reivindicación 43, caracterizado porque el microorganismo sintético se deriva de un microorganismo diana que tiene la capacidad de integrarse biómicamente con el microbioma del hospedero descolonizado.

25 49. El método de conformidad con la reivindicación 43, caracterizado porque el microorganismo sintético se deriva de un microorganismo diana aislado del microbioma del hospedero.

50. El método de conformidad con la reivindicación 48 o 49, caracterizado porque el microorganismo diana es susceptible a al menos un agente antimicrobiano.

51. El método de conformidad con la reivindicación 50,
5 caracterizado porque el microorganismo diana se selecciona de un microorganismo diana bacteriano, fúngico o protozoario.

52. El método de conformidad con la reivindicación 51, caracterizado porque el microorganismo diana es una especie bacteriana que puede colonizar un nicho dérmico y/o mucoso y
10 es miembro de un género seleccionado del grupo que consiste en *Acinetobacter*, *Corynebacterium*, *Cutibacterium*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Propionibacterium* y *Pseudomonas*.

53. El método de conformidad con la reivindicación 52,
15 caracterizado porque el microorganismo diana se selecciona del grupo que consiste en *Acinetobacter johnsonii*, *Acinetobacter baumannii*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus lugdunensis*, *Staphylococcus warneri*, *Staphylococcus saprophyticus*,
20 *Corynebacterium acnes*, *Corynebacterium striatum*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Corynebacterium minutissimum*, *Cutibacterium acnes*, *Propionibacterium acnes*, *Propionibacterium granulosum*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus*
25 *mitis*, *Streptococcus viridans*, *Streptococcus pneumoniae*,

Streptococcus anginosus, *Streptococcus constellatus*,
Streptococcal intermedius, *Streptococcus agalactiae*,
Pseudomonas aeruginosa, *Pseudomonas oryzae*,
Pseudomonas stutzeri, *Pseudomonas putida* y *Pseudomonas*
5 *fluorescens*, opcionalmente en donde la cepa diana es una cepa
de *Staphylococcus aureus* 502a o una cepa RN4220.

54. El método de conformidad con la reivindicación 46,
caracterizado porque la modificación molecular de interruptor
de inactivación del microorganismo sintético comprende un
10 primer gen de muerte celular ligado operativamente a una
primera región reguladora que comprende un primer promotor
inducible.

55. El método de conformidad con la reivindicación 54,
caracterizado porque el primer promotor se activa (induce)
15 por un cambio de estado en el entorno del microorganismo en
comparación con las condiciones fisiológicas (nicho) normales
en el al menos un sitio en el sujeto.

56. El método de conformidad con la reivindicación 55,
caracterizado porque la muerte celular promedio medible del
20 microorganismo sintético ocurre dentro de al menos un período
preestablecido después de la inducción del primer promotor.

57. El método de conformidad con la reivindicación
56, caracterizado porque la muerte celular promedio medible
ocurre dentro de al menos un período preestablecido
25 seleccionado del grupo que consiste en al menos 1, 5, 15, 30,

60, 90, 120, 180, 240, 300 o 360 minutos después del cambio de estado.

58. El método de conformidad con la reivindicación 57, caracterizado porque la muerte celular promedio medible es al
5 menos 50% cfu, al menos 70%, al menos 80%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 99%, al menos 99.5%, al menos 99.8% o al menos 99.9% de reducción de recuento de cfu después del período preestablecido.

59. El método de conformidad con la reivindicación 55,
10 caracterizado porque el cambio de estado se selecciona de uno o más de pH, temperatura, presión osmótica, osmolalidad, nivel de oxígeno, concentración de nutrientes, concentración de sangre, concentración de plasma, concentración de suero, concentración de metal, concentración de metal quelado,
15 cambio de composición o concentración de uno o más factores inmunitarios, concentración de minerales y concentración de electrolitos.

60. El método de conformidad con la reivindicación 59, caracterizado porque el cambio de estado es una mayor
20 concentración y/o cambio en la composición de sangre, suero o plasma en comparación con las condiciones fisiológicas (nicho) normales en el al menos un sitio en el sujeto.

61. El método de conformidad con la reivindicación 60, caracterizado porque el primer promotor es un promotor
25 sensible a la sangre, suero, plasma y/o hemo.

62. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 55 a 61, caracterizado porque el primer promotor está regulado de manera ascendente en al menos 1.5 veces, al menos 3 veces, al menos 5 veces, al menos 10 veces, 5 al menos 20 veces, al menos 50 veces o al menos 100 veces dentro de un período seleccionado del grupo que consiste en al menos 30 min, 60 min, 90 min, 120 min, 180 min, 240 min, 300 min y al menos 360 min después del cambio de estado.

63. El método de conformidad con la reivindicación 62, 10 caracterizado porque el primer promotor no se induce, se induce menos de 1.5 veces o se reprime en ausencia del cambio de estado.

64. El método de conformidad con la reivindicación 63, caracterizado porque el primer promotor se induce al menos 15 1.5, 2, 3, 4, 5 o al menos 6 veces en un período de tiempo en presencia de suero o sangre.

65. El método de conformidad con la reivindicación 64, caracterizado porque el primer promotor no se induce, se induce menos de 1.5 veces o se reprime en las condiciones 20 fisiológicas (nicho) normales en el al menos un sitio.

66. El método de conformidad con la reivindicación 64, caracterizado porque el primer promotor no se induce, se induce menos de 1.5 veces o se reprime en ausencia de sangre, suero, plasma o hemo.

25 67. El método de conformidad con cualquiera de las

reivindicaciones 54 a 66, caracterizado porque el microorganismo sintético se deriva de un microorganismo diana que es una cepa de *Staphylococcus aureus*, y en donde el primer promotor se deriva de un gen seleccionado del grupo

5 que consiste en *isdA* (proteína determinante de superficie regulada por hierro A), *isdB* (proteína determinante de superficie regulada por hierro B), *isdG* (monooxigenasa degradante de hemo), *hlgA* (componente gamma-hemolisina A), *hlgA1* (gamma-hemolisina), *hlgA2* (gamma-hemolisina), *hlgB*

10 (componente gamma-hemolisina B), *hrtAB* (transportador regulado por hemo), *sbnC* (proteína de biosíntesis del sideróforo de la familia luc C), *sbnD*, *sbnI*, *sbnE* (proteína de biosíntesis de sideróforos de la familia lucA/lucC), *isdI*, *lrgA* (regulador de mureína hidrolasa A), *lrgB* (regulador de

15 mureína hidrolasa B), *ear* (proteína ear), *fhuA* (proteína de fijación a ATP de transporte de ferricromo fhuA), *fhuB* (permeasa de transporte de ferricromo), *hly* (fosfolipasa C), gen transportador ABC de hemo 2, gen transportador ABC de hemo, *isd* ORF3, *sbnF*, gen alanina deshidrogenasa, gen de

20 diaminopimelato descarboxilasa, gen transportador ABC de hierro, gen treonina deshidratasa, gen transportador ABC de sideróforo, gen SAM dep Metrans, *HarA*, *splF* (serina proteasa SplF), *splD* (serina proteasa SplD), *dps* (proteína de estrés general 20U), SAUSA300_2617 (proteína de fijación a ATP de

25 transportador ABC de cobalto putativa), SAUSA300_2268

(proteína de la familia de simportador de sodio/ácido biliar), SAUSA300_2616 (proteína de transporte de la familia de cobalto), *srtB* (sortasa B), *sbnA* (proteína de biosíntesis de sideróforos probable *sbnA*), *sbnB*, *sbnG*, *leuA* (enzima biosintética de aminoácidos de 2-isopropilmalato sintasa), *sstA* (proteína de membrana de transporte de hierro), *sirA* (proteína de fijación a sustrato de transportador ABC de hierro), *isdA* (transportador de hemo) y *spa* (proteína estafilocócica A).

68. El método de conformidad con la reivindicación 67, caracterizado porque el primer promotor se deriva de o comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en SEC. ID NO.: 114, 115, 119, 120, 121, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162 y 163, o una secuencia de nucleótidos sustancialmente idéntica de estos.

69. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 54 a 68, caracterizado porque el microorganismo no deseado es una cepa de *Staphylococcus aureus*, y en donde la presencia detectable se mide a través de un método que comprende obtener una muestra del al menos un sitio del sujeto, poner en contacto un agar cromogénico con la muestra, incubar el agar puesto en contacto y realizar el recuento de las cfu positivas de la especie bacteriana

después de un período predeterminado.

70. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 54 a 69, caracterizado porque el gen de muerte celular se selecciona de un gen de toxina seleccionado del grupo que consiste en sprA1, sprA2, kpn1, sma1, sprG, relF, rsaE, yoeB, mazF, yefM y gen de toxina lisostafina.

71. El método de conformidad con la reivindicación 70, caracterizado porque el gen de muerte celular comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en SEC. ID NO.: 122, 124, 125, 126, 127, 128, 274, 275, 284, 286, 288, 290, 315 y 317, o una secuencia de nucleótidos sustancialmente idéntica.

72. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 54 a 71, caracterizado porque el microorganismo sintético comprende además una modificación molecular de abrazadera de expresión que comprende un gen de antitoxina específico para el primer gen de muerte celular, en donde el gen de antitoxina está ligado operativamente a una segunda región reguladora que comprende un segundo promotor que es activo tras la colonización dérmica o mucosa o en medio TSB, pero se reprime al menos 2 veces tras la exposición a sangre, suero o plasma después de un período seleccionado del grupo que consiste en al menos 30 min, 60 min, 90 min, 120 min, 180 min, 240 min, 300 min y al menos 360 min.

73. El método de conformidad con la reivindicación 72, caracterizado porque el gen de antitoxina codifica una secuencia de ARN antisentido capaz de hibridarse con al menos una porción del primer gen de muerte celular.

5 74. El método de conformidad con la reivindicación 73, caracterizado porque el gen de antitoxina se selecciona del grupo que consiste en un gen de antitoxina *sprA1*, gen de antitoxina *sprA2*, gen de antitoxina *sprG* o *sprF*, gen de antitoxina *holina*, gen de antitoxina *187-lysK*, gen de
10 antitoxina *yefM*, gen de antitoxina *lisostafina* o gen de antitoxina *mazE*, gen de antitoxina *kpn1*, gen de antitoxina *smal*, gen de antitoxina *relF*, gen de antitoxina *rsaE* o gen de antitoxina *yoeB*, respectivamente.

75. El método de conformidad con la reivindicación 74,
15 caracterizado porque el gen de antitoxina comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en SEC. ID NO.: 273, 306, 307, 308, 309, 310, 311, 312, 314, 319 o 322 o una secuencia de nucleótidos sustancialmente idéntica

20 76. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 72 a 75, caracterizado porque el segundo promotor se deriva de un gen seleccionado del grupo que consiste en *clfB* (factor de aglutinación B), *sceD* (autolisina, exoproteína D), *walkR* (regulador de virulencia),
25 *atlA* (autolisina principal), *oatA* (O-acetiltransferasa A);

gen de fosforibosilglicinamida formiltransferasa, gen de
 fosforibosilglicinamida formiltransferasa, gen de
 amidofosforibosiltransferasa, gen de
 fosforibosilformilglicinamidina sintasa, gen de
 5 fosforibosilformilglicinamidina sintasa, gen de
 fosforibosilaminoimidazol-succinocarboxamida, gen de
 trehalosa permeasa IIC, gen regulador de la transcripción de
 la familia de DeoR, gen de fosfofructocinasa, gen de la
 subunidad del transportador de fructosa PTS IIC, gen de
 10 galactosa-6-fosfato isomerasa, NarZ, NarH, NarT, gen de
 alquilhidroperoxidasa, gen de proteína hipotética, gen de
 factor trans DeoR, gen de lisofosfolipasa, gen de chaperona
 de desagregación de proteínas, gen de alquilhidroperoxidasa,
 gen de fosfofructocinasa, *gyrB*, *sigB* y *rho*.

15 77. El método de conformidad con la reivindicación 76,
 caracterizado porque el segundo promotor es un P_{clfB} (factor
 de aglutinación B) y comprende una secuencia de nucleótidos
 de SEC. ID NO.: 117, 118, 129 o 130, o una secuencia de
 nucleótidos sustancialmente idéntica de estos.

20 78. El método de conformidad con cualquiera de las
 reivindicaciones 43 a 77, caracterizado porque la etapa de
 descolonización comprende administrar tópicamente un agente
 descolonizante al al menos un sitio en el sujeto para reducir
 o eliminar la presencia del microorganismo no deseado del al
 25 menos un sitio.

79. El método de conformidad con la reivindicación 78, caracterizado porque la etapa de descolonización comprende la administración tópica del agente descolonizante, en donde no se administra simultáneamente ningún agente antimicrobiano
5 sistémico.

80. El método de conformidad con la reivindicación 78 o 79, caracterizado porque no se administra ningún agente antimicrobiano sistémico dentro de una semana, dos semanas, tres semanas, un mes, dos meses, tres meses, seis meses o un
10 año de la primera administración tópica del agente descolonizante.

81. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 40 a 42, caracterizado porque el agente descolonizante se selecciona del grupo que consiste en un
15 agente desinfectante, bactericida, antiséptico, astringente y antimicrobiano.

82. El método de conformidad con la reivindicación 81, caracterizado porque el agente descolonizante se selecciona del grupo que consiste en alcoholes (alcohol etílico, alcohol
20 isopropílico), aldehídos (glutaraldehído, formaldehído, agentes liberadores de formaldehído (noxitiolina = oximetilentiourea, taurolina, hexamina, dantoína), o-ftalaldehído), anilidas (triclocarbán = TCC = 3,4,4'-triclorocarbanilida), biguanidas (clorhexidina, alexidina,
25 biguanidas poliméricas (polihexametilen biguanidas con MW>

3,000 g/mol, vantocil), diamidinas (propamidina, isetionato de propamidina, diclorhidrato de propamidina, dibromopropamidina, isetionato de dibromopropamidina), fenoles (fenticlor, p-cloro-m-xilenol, cloroxilenol, 5 hexaclorofeno), bisfenoles (triclosán, hexaclorofeno), cloroxilenol (PCMX), compuestos de amonio cuaternario (cetrimida, cloruro de benzalconio, cloruro de cetilpiridinio), compuestos de plata (sulfadiazina de plata, nitrato de plata), compuestos de peroxi (peróxido de 10 hidrógeno, ácido peracético, peróxido de benzoílo), compuestos de yodo (povidona-yodo, poloxámero-yodo, yodo), agentes liberadores de cloro (hipoclorito de sodio, ácido hipocloroso, dióxido de cloro, dicloroisocianurato de sodio, cloramina-T), compuestos de cobre (óxido de cobre), 15 isotretinoína, compuestos de azufre, extractos botánicos (*Melaleuca* spp. (aceite de árbol de té, (*Vaccinium* spp. (por ejemplo, proantocianidinas tipo A), *Cassia fistula* Linn, *Baekea frutesdens* L., *Melia azedarach* L., *Muntingia calabura*, *Vitis vinifera* L, *Terminalia avicennioides* Guill & Perr., 20 *Phyllanthus discoideus* Muel. Muel-Arg., *Ocimum gratissimum* Linn., *Acalypha wilkesiana* Muell-Arg., *Hypericum pruinatum* Boiss. & Bal., *Hypericum olympicum* L. e *Hypericum sabrum* L., *Hamamelis virginiana* (hamamelis), aceite de clavo de olor, *Eucalyptus* spp., *rosemarinus officinalis* spp. (romero), 25 *thymus* spp. (tomillo), *Lippia* spp. (orégano), lemongrass

spp., *cinnamomum* spp., *geranium* spp., *lavendula* spp.), ácido aminolevulínico, y compuestos antibióticos tópicos (bacteriocinas; mupirocina, bacitracina, neomicina, polimixina B, gentamicina).

5 83. El método de conformidad con la reivindicación 81 u
82, caracterizado porque el agente antimicrobiano se
selecciona del grupo que consiste en el agente antimicrobiano
se selecciona del grupo que consiste en vancomicina,
cefazolina, cefalotina, cefalexina, linezolid, daptomicina,
10 clindamicina, lincomicina, mupirocina, bacitracina,
neomicina, polimixina B, gentamicina, prulifloxacin,
ulifloxacin, fidaxomicina, minociclina, metronidazol,
metronidazol, sulfametoxazol, ampicilina, trimetoprima,
ofloxacin, norfloxacin, tinidazol, norfloxacin, ornidazol,
15 levofloxacin, ácido nalidíxico, ceftriaxona, azitromicina,
cefixima, ceftriaxona, cefalexina, ceftriaxona, rifaximina,
ciprofloxacina, norfloxacina, ofloxacina, levofloxacina,
gatifloxacina, gemifloxacina, prufloxacina, ulifloxacina,
moxifloxacina, nistatina, anfotericina B, flucitosina,
20 ketoconazol, posaconazol, clotrimazol, voriconazol,
griseofulvina, nitrato de miconazol y fluconazol.

84. El método de conformidad con cualquiera de las
reivindicaciones 78 a 83, caracterizado porque la
descolonización comprende administrar tópicamente el agente
25 descolonizante al menos una, dos, tres, cuatro, cinco o seis

o más veces antes de la etapa de reemplazo.

85. El método de conformidad con la reivindicación 84, caracterizado porque la etapa de descolonización comprende administrar el agente descolonizante al al menos un sitio
5 hospedero en el sujeto de una a seis o más veces o de dos a cuatro veces a intervalos de entre 0.5 y 48 horas, y en donde la etapa de reemplazo se realiza después de la etapa de descolonización final.

86. El método de conformidad con la reivindicación 85,
10 caracterizado porque la etapa de reemplazo comprende la administración tópica inicial de una composición que comprende al menos 10^5 , al menos 10^6 , al menos 10^7 , al menos 10^8 , al menos 10^9 , al menos 10^{10} CFU o al menos 10^{11} de la cepa sintética y un portador aceptable desde el punto de vista
15 farmacéutico al al menos un sitio hospedero en el sujeto.

87. El método de conformidad con la reivindicación 86, caracterizado porque la etapa de reemplazo inicial se realiza dentro de las 12 horas, 24 horas, 36 horas, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días o 7 días de la etapa de descolonización.

20 88. El método de conformidad con la reivindicación 86 u 87, caracterizado porque la etapa de reemplazo se repite a intervalos de no más de una vez cada dos semanas a seis meses después de la etapa de descolonización final.

89. El método de conformidad con la reivindicación 86 u
25 87, caracterizado porque la etapa de descolonización y la

etapa de reemplazo se repiten a intervalos de no más de una vez cada dos semanas a seis meses.

90. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 86 a 89, caracterizado porque el reemplazo
5 comprende administrar el microorganismo sintético al al menos un sitio al menos una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve o diez veces.

91. El método de conformidad con la reivindicación 90, caracterizado porque el reemplazo comprende administrar el
10 microorganismo sintético al al menos un sitio no más de una, no más de dos, no más de tres veces, o no más de cuatro veces por mes.

92. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 43 a 91, caracterizado porque comprende
15 además

promover la colonización del microorganismo sintético en el sujeto.

93. El método de conformidad con la reivindicación 92, caracterizado porque la colonización promotora del
20 microorganismo sintético en el sujeto comprende administrar al sujeto un agente promotor, opcionalmente donde el agente promotor es un nutriente, prebiótico, comensal, agente estabilizante, humectante y/o especie bacteriana probiótica.

94. El método de conformidad con la reivindicación 93,
25 caracterizado porque el promotor comprende administrar de 10^6

a 10^{10} cfu, o 10^7 a 10^9 cfu de la especie bacteriana probiótica al sujeto después de la etapa de descolonización inicial.

95. El método de conformidad con la reivindicación 93,
5 caracterizado porque el nutriente se selecciona de cloruro de sodio, cloruro de litio, glicerofosfato de sodio, feniletanol, manitol, triptona, péptido y extracto de levadura.

96. El método de conformidad con la reivindicación 93,
10 caracterizado porque el prebiótico se selecciona del grupo que consiste en ácidos grasos de cadena corta (ácido acético, ácido propiónico, ácido butírico, ácido isobutírico, ácido valérico, ácido isovalérico), glicerol, oligosacáridos derivados de pectina de subproductos agrícolas,
15 fructooligosacáridos (por ejemplo, prebióticos similares a la inulina), galactooligosacáridos (por ejemplo, rafinosa), ácido succínico, ácido láctico y mananooligosacáridos.

97. El método de conformidad con la reivindicación 93,
caracterizado porque el probiótico se selecciona del grupo
20 que consiste en *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium lactis*, *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium longum*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus rhamnosus*,
25 *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus salivarius*,

Lactobacillus casei, *Lactobacillus plantarum*, *Lactococcus lactis*, *Streptococcus thermophiles* y *Enterococcus faecalis*.

98. El método de conformidad con la reivindicación 93, caracterizado porque el comensal se selecciona del grupo que
 5 consiste en *Acinetobacter johnsonii*, *Acinetobacter baumannii*,
Staphylococcus aureus, *Staphylococcus epidermidis*,
Staphylococcus lugdunensis, *Staphylococcus warneri*,
Staphylococcus saprophyticus, *Corynebacterium acnes*,
Corynebacterium striatum, *Corynebacterium diphtheriae*,
 10 *Corynebacterium minutissimum*, *Cutibacterium acnes*,
Propionibacterium acnes, *Propionibacterium granulosum*,
Streptococcus pyogenes, *Streptococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*,
Streptococcus mitis, *Streptococcus viridans*,
Streptococcus pneumoniae, *Streptococcus anginosus*,
 15 *Streptococcus constellatus*, *Streptococcus intermedius*,
Streptococcus agalactiae, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas oryzae*,
Pseudomonas stutzeri, *Pseudomonas putida* y
Pseudomonas fluorescens.

99. El método de conformidad con cualquiera de las
 20 reivindicaciones 43 a 98, caracterizado porque el
 microorganismo no deseado es un microorganismo resistente a
 agentes antimicrobianos.

100. El método de conformidad con la reivindicación 99,
 caracterizado porque el microorganismo resistente a agentes
 25 antimicrobianos es una bacteria resistente a los

antibióticos.

101. El método de conformidad con la reivindicación 99, caracterizado porque la bacteria resistente a los antibióticos es una especie bacteriana grampositiva
5 seleccionada del grupo que consiste en un *Streptococcus* spp., *Cutibacterium* spp. y un *Staphylococcus* spp.

102. El método de conformidad con la reivindicación 101, caracterizado porque el *Streptococcus* spp. se selecciona del grupo que consiste en *Streptococcus pneumoniae*,
10 *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus pyogenes* y *Streptococcus agalactiae*.

103. El método de conformidad con la reivindicación 101, caracterizado porque *Cutibacterium* spp. se selecciona del grupo que consiste en *Cutibacterium acnes* subsp. *acnes*,
15 *Cutibacterium acnes* subsp. *defendens* y *Cutibacterium acnes* subsp. *elongatum*.

104. El método de conformidad con la reivindicación 101, caracterizado porque el *Staphylococcus* spp. se selecciona del grupo que consiste en *Staphylococcus aureus*,
20 *Staphylococcus epidermidis* y *Staphylococcus saprophyticus*.

105. El método de conformidad con la reivindicación 104, caracterizado porque el microorganismo no deseado es una cepa de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA) que contiene un casete de cromosoma estafilocócico (SCCmec
25 tipos I-III), que codifican uno (SCCmec tipo I) o múltiples

genes de resistencia a antibióticos (SCCmec tipo II y III) y/o produce una toxina.

106. El método de conformidad con la reivindicación 105, caracterizado porque la toxina se selecciona del grupo
5 que consiste en una toxina de leucocidina de Pantón-Valentine (PVL), toxina del síndrome de shock tóxico 1 (TSST-1), toxina de hemolisina alfa estafilocócica, toxina de hemolisina beta estafilocócica, toxina de hemolisina gamma estafilocócica, toxina de hemolisina delta estafilocócica, enterotoxina A,
10 enterotoxina B, enterotoxina C, enterotoxina D, enterotoxina E y una toxina coagulasa.

107. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 43 a 106, caracterizado porque el sujeto no exhibe recurrencia del microorganismo no deseado como se
15 evidencia al hisopar al sujeto en al menos un sitio durante al menos dos semanas, al menos cuatro semanas, al menos seis semanas, al menos ocho semanas, al menos diez semanas, al menos 12 semanas, al menos 16 semanas, al menos 24 semanas, al menos 30 semanas, al menos 36 semanas, al menos 42 semanas
20 o al menos 52 semanas después de la etapa de administración.

108. Un kit caracterizado porque comprende al menos un recipiente, el microorganismo sintético de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 27, la composición de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 28 o 29, o
25 la dosis única de conformidad con cualquiera de las

reivindicaciones 30 a 32, y opcionalmente al menos un segundo recipiente que comprende un agente descolonizante, una hoja de instrucciones, al menos un tercer recipiente que comprende un agente promotor y/o un aplicador.

5

10

15

20

25

RESUMEN DE LA INVENCIÓN

Se proporcionan métodos y composiciones para influir de manera duradera en los ecosistemas microbiológicos (microbiomas) en un sujeto con el fin de prevenir la infección y reducir la recurrencia de la infección por microorganismos. En algunas modalidades, se proporcionan composiciones y métodos para la creación y el uso de cepas bacterianas modificadas molecularmente con el potencial de prevenir una variedad de infecciones por microorganismos.

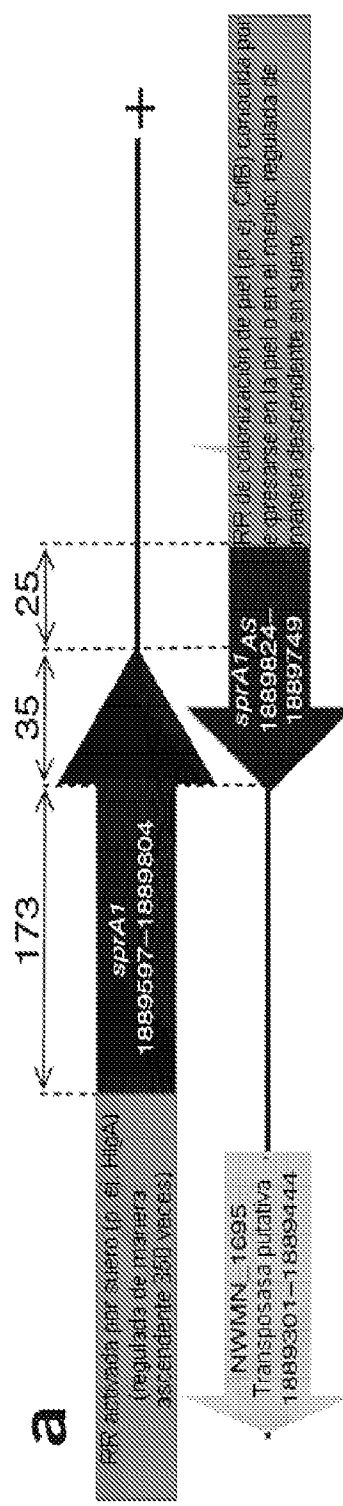


FIGURA 1



FIGURA 2

SEQ ID NO:	Nombre	Secuencia	Descripción
9	TKO1	GATGGCCATGGCGAAACAGATTATCTATTC	Amplificación por PCR de laA4 con SpH1 (pr corriente arriba)
10	TKO2	GATGGCCATGGCCAGATTATCTATTCAAAG	Amplificación por PCR de laA4 con SpH1 (alternativa a pr corriente arriba)
11	TKO3	CATGATCTGCAGAGATAAATTCCTCCCGTAAAT	Amplificación por PCR de laA4 con PrH1 (pr corriente abajo)
12	TKO4	CADGTGATCTGCAGAGATAAATTCCTCCCGTAAA	Amplificación por PCR de laA4 con PrH1 (alternativa a pr corriente abajo)
13	TKO5	GACTACGAAATTCAGGTGATGAAAAATTAGAA	Cebador corriente arriba para amplificar el promotor CIB con EcoRI
14	TKO6	GACTACGAAATTCGTGATGAAAAATTAGAACTT	Copia de seguridad de TKO5
15	TKO7	CTTAGCTGGATCCAAATATTACTCCATTTCAA	Cebador corriente abajo para amplificar el promotor CIB con BamHI
16	TKO8	CTTAGCTGGATCCAAATATTACTCCATTTCATTTTC	Copia de seguridad de TKO7
17	TKO9	GATGGCCATGCTCACAACAACTATTGGGAAATC	Cebador corriente arriba para amplificar la RR de H1GA, corriente SpH1
18	TKO10	GATGGCCATGCAAACTATTGGGAAATCCATTC	Copia de seguridad de TKO9
19	TKO11	CATGATCTGCAGATATATAATATCCATTGT	Cebador corriente abajo para amplificar la RR de H1GA, corriente PrH1
20	TKO12	CATGATCTGCAGATATATAATATCCATTGTGAAGCG	Copia de seguridad de TKO11
21	TKO13	GTGTTACGATAGCAAAATGCA	Primer cebador sentido para secuenciar constructos que contienen el promotor pCAD

FIGURA 3A

SEQ ID NO.	Nombre	Secuencia	Descripción
22	TKO14	TTATTGGCTAAGTAGAAGCA	Segunda cebador de secuenciación sentido reconocido aproximadamente en el medio del gen <i>SprA1</i>
23	TKO15	CACATGTTCTTTCTCTGGCTT	Cebador para reconocer solo corriente arriba de las RR sensibles al suero para LEUA y HLGA. Reconocido en el vector PCNS1 alrededor de 75 nt corriente arriba del sitio <i>SphI</i> .
24	TKO16	ACGGGGGCTTTTACGGTTC	Copia de seguridad en caso de que TKO15 produzcan lecturas de baja calidad
25	TKO17	GAATGGGACTTGTAAACGTC	Cebador para reconocer cerca de un tercio corriente abajo del promotor LEUA-RR
26	TKO18	GAATGGGACTTGTAAACG	Copia de seguridad de TKO17
27	TKO19	ATAAACGCTCGACCAATA	Cebador para reconocer cerca de un tercio corriente abajo del promotor HLGA-RR
28	TKO20	GCGACCAATAAATCTTTTAA	Copia de seguridad de TKO19 en caso de que produzcan lecturas de baja calidad
29	TKO21	TTGAATAGATAATCTGTTTCGCATGCAGCGGGGCCAGCT	Vector pTK1 con homología a leuA pro R
30	TKO22	AATTAAGGGGGAAATTATCTGAGGGTACTGCAGAGAG	Vector pTK1 con homología a leuA pro F
31	TKO23	AGCTGGGGCGGCTGCATGCAGAAACAGATTATCTTCAAGCTTAATTG	Inserto de leuA con homología a pTK1 F
32	TKO24	CTCTCTGGGTACCTGCAGAGTAAATTCCTCGTAAATTTTAATG	Inserto de leuA con homología a pTK1 R
33	TKO25	CATTAAATTAAGGGGCAATTACTCTGCAGATGACCACGCAAGA	Vector pTK2 con homología a leuA pro F

FIGURA 3B

SEQ ID NO:	Nombre	Secuencia	Descripción
34	TKO26	CAATTAACTTTGATAGATAATCTGTTTCGATGACGGCCGCCAGCT	Vector pTK9 con homología a leuA pro R
35	TKO27	CATTAAAAATTACGGGGGAAATTACTCTGCAGATGCTACACATAGC	Vector pTK12 con homología a leuA pro F
36	TKO28	GCTATCTCTAOCATCTGCAGAGTAAATTCGCCGTAATTTTAAATG	Inserto de leuA con homología a pTK12 R
37	TKO29	gcztccakhtgtccatcaTATAAACCCTCTTTAAATTGGTTATAATG	Vector pTK R con homología a kanR (eliminar ermR)
38	TKO30	ccmtgtacgaghtcttgTGTTAAGGGATGCTATAAACTGCA	Vector pTK F con homología a kanR (eliminar ermR)
39	TKO31	CATATAACCAAAATTAAAGAGGGTTATAagtgatgacagaggatgc	pCASSA kanR F con homología a pTK (agregar kanR)
40	TKO32	TGCAGTTTATGCATCCCTTAACTgagagaactgtctagagagg	pCASSA kanR R con homología a pTK (agregar kanR)
41	TKO33	GAATGGGACTTGTAAAGGTCCC	PCR para cribado de colonias de leuA F
42	TKO34	GGGACGTTTACAAGTCCATTC	PCR para cribado de colonias de leuA R

FIGURA 3C

SEQ ID NO:	N° de BPC	Nombre	Secuencia	Propósito
43	1	BPC - TI.1 - FOR	gaaaggagtaataatcgatggagta	Insertión de gARN para pCasSA
44	2	BPC - TI.1 - REV	caaaTACTCCATCGATATTACCC	Insertión de gARN para pCasSA
45	3	BPC - TI.2 - FOR	gaaaggagaggaatgaattataa	Insertión de gARN para pCasSA
46	4	BPC - TI.2 - REV	caaaTTATAATCAATCAATCCCTCC	Insertión de gARN para pCasSA
47	5	BPC - TI.3 - FOR	gaaaggagaggaatgaattata	Insertión de gARN para pCasSA
48	6	BPC - TI.3 - REV	caaaTATAATCAATCAATCCCTCC	Insertión de gARN para pCasSA
49	7	BPC - TI.4 - FOR	gaaagggtctaaatgatttcttta	Insertión de gARN para pCasSA
50	8	BPC - TI.4 - REV	caaaTAAGCAATAACATTAGACC	Insertión de gARN para pCasSA
51	9	BPC - TI.5 - FOR	gaaaggagaggaatgaattata	Insertión de gARN para pCasSA
52	10	BPC - TI.5 - REV	caaaTATAATCAATCAATCCCTCC	Insertión de gARN para pCasSA
53	11	BPC - TI.6 - FOR	gaaaggtagtaatgaatataatga	Insertión de gARN para pCasSA
54	12	BPC - TI.6 - REV	caaaTGGATAATACATACATACCC	Insertión de gARN para pCasSA
55	13	BPC - TI.7 - FOR	gaaaggaaTTATAAATAATAAG	Insertión de gARN para pCasSA
56	14	BPC - TI.7 - REV	caaaCTTTATATTTATAATTC	Insertión de gARN para pCasSA
57	15	BPC - TI.8 - FOR	gaaaggctaccctcatattttcta	Insertión de gARN para pCasSA
58	16	BPC - TI.8 - REV	caaaTAGAAATAATGAGGTAGCC	Insertión de gARN para pCasSA

FIGURA 4A

SEQ ID NO:	N.º de BPC	Nombre	Secuencia	Propósito
59	17	BPC - T1.9 - FOR	gaaacgataagaaactgtattagact	Insertión de gARN para pCasSA
60	18	BPC - T1.9 - REV	caaaagctctaatacagttctatcc	Insertión de gARN para pCasSA
61	19	BPC - T1.10 - FOR	gaaacgctgctctaatgcttattgctt	Insertión de gARN para pCasSA
62	20	BPC - T1.10 - REV	caaaagcaataacattagacacc	Insertión de gARN para pCasSA
63	21	BPC - gRNA - FOR	tgtctcttcttctgctgctgctg	Cebadores de secuenciación para inserción de gARN en el vector pCasSA
64	22	BPC - gRNA - REV	tggcattgcaagcttaataactacat	Cebadores de secuenciación para inserción de gARN en el vector pCasSA
65	23	BPC - T1.1.2 - REV	aagcttacttccatcgataattactcc	Cebadores inversos correctos para gARN
66	24	BPC - T1.2.2 - REV	aagcttataatcatcatctctctcc	Cebadores inversos correctos para gARN
67	25	BPC - T1.3.2 - REV	aagcttataatcatcatctctctcc	Cebadores inversos correctos para gARN
68	26	BPC - T1.4.2 - REV	aagcttaaccaataacattagaccc	Cebadores inversos correctos para gARN
69	27	BPC - T1.5.2 - REV	aagctataatcatcatctctctcc	Cebadores inversos correctos para gARN
70	28	BPC - T1.6.2 - REV	aagcttgataattactcattactacc	Cebadores inversos correctos para gARN
71	29	BPC - T1.7.2 - REV	aagcttttataatttataataattcc	Cebadores inversos correctos para gARN
72	30	BPC - T1.8.2 - REV	aagcttagaaaatatcgagctagcc	Cebadores inversos correctos para gARN

FIGURA 4B

SEQ ID NO:	N.º de BPC	Nombre	Secuencia	Propósito
73	31	BPC - T1.9.2 - REV	aaacagtciaatacagttctatcc	Cebadores inversos correctos para gARN
74	32	BPC - T1.10.2 - REV	aaacaaacaaataacattagacacc	Cebadores inversos correctos para gARN
75	33	BPC - pCN51.1 - FOR	tttgctggccttttgcctcac	Cebadores para comprobar la inserción en pCN51
76	34	BPC - pCN51.1 - REV	tgcctttttccgattgatgaacacct	Cebadores para comprobar la inserción en pCN51
77	35	BPC - pCN51.2 - FOR	cggcctttttacggttcctg	Cebadores para comprobar la inserción en pCN51
78	36	BPC - pCN51.2 - REV	acgttgctttttccgattgatgaac	Cebadores para comprobar la inserción en pCN51
79	37	BPC - mChr-1 - FOR	catgtgatctgacatgcacatggtagcaaggcc	mCherry mARN con PstI
80	38	BPC - mChr-1 - REV	gactaacgaattcaaaaactgattttggttgacctgg	mCherry mARN con EcoRI
81	39	BPC - mChr-2 - REV	cttagctgcatcctcaaaaactgattttggttgacctgg	mCherry mARN con BamHI; alternativo a #39
82	40	BPC - pCN51-hdr - REV	cttagctcgggggtgctttttccgattgatgaacacct	34BPC-REV con XmaI, usar con TKO15 para agregar brazos homólogos
83	41	BPC - 2a - FOR	cgcccaaacgttttcgtcagtt	Comprobación de incorporación genómica de 302a diéna 1
84	42	BPC - 2a - REV	ttcaagcggtagcaaaaagcagc	Comprobación de incorporación genómica de 302a diéna 1
85	43	BPC - 2a - FOR	tggcgaatggcctcaaaaagat	Comprobación de incorporación genómica de 302a diéna 1
86	44	BPC - 2a - REV	cgtgcttaacatcggcttcaa	Comprobación de incorporación genómica de 302a diéna 1

FIGURA 4C

SEQ ID	N° de BPC	Nombre	Secuencia	Propósito
37	45	BPC - mChr-1 - REV	AAAACTGATTTCGTGACCCG	mCherry
38	46	BPC - mChr-1 - FOR	cargatCTCCAGTCACATGGTTTCTAAAGGT	mCherry con PstI (sec. optimizada con codones en pJ204.300993)
39	47	BPC - pJ204.1 - FOR	ACGTTGCTTTTCGATTGAIGA	Comprobación de inserción entre los HA en pJ204
90	48	BPC - pJ204.1 - REV	TCCCAATGGAGAGATAGGG	Comprobación de inserción entre los HA en pJ204
91	49	BPC - pJ204.2 - FOR	GAATATTAAAGGGCCCTGTAC	Comprobación de inserción entre los HA en pJ204
92	50	BPC - pJ204.2 - REV	TATGGGGTGTGCCCTT	Comprobación de inserción entre los HA en pJ204
93	51	BPC - mChr-1 - FOR	ICACAAGGTTTCTAAAGGI	mCherry (sec. optimizada con codones en pJ204.300993)
94	52	BP - repF-1 - F	CATGCTGCAGAACGCATTG	Comprobación de eliminación de repF
95	53	BP - repF-1 - R	CCCGCGCAATATGATGCTAA	Comprobación de eliminación de repF
96	54	BP - repF-2 - F	AGGTCACTGATGCTGTGTTG	Comprobación de eliminación de repF
97	55	BP - repF-2 - R	TATGTCCTTTTCCGCAATGGG	Comprobación de eliminación de repF
98	56	BP - arA - F	gaaaCAAAACAATAATGCTGCCACT	Direccionamiento de arA CRISPR de Dong et al.
99	57	BP - arA - R	aaacAGTGGCAGCATATTTGTTG	Direccionamiento de arA CRISPR
100	58	BP - h2 - F	gaaaGCTTCCAAATACTGTAGTAC	Direccionamiento de h2 CRISPR de Dong et al.
101	59	BP - h2 - R	aaacGTACTACAGATATCGAAGC	Direccionamiento de h2 CRISPR
102	60	BP - coa - F	gaaaGCCATTTTTTAAATCTGTACG	Direccionamiento de coa CRISPR de Dong et al.
103	61	BP - coa - R	aaacCGTACAGATTTAAATAATGGC	Direccionamiento de coa CRISPR

FIGURA 4D

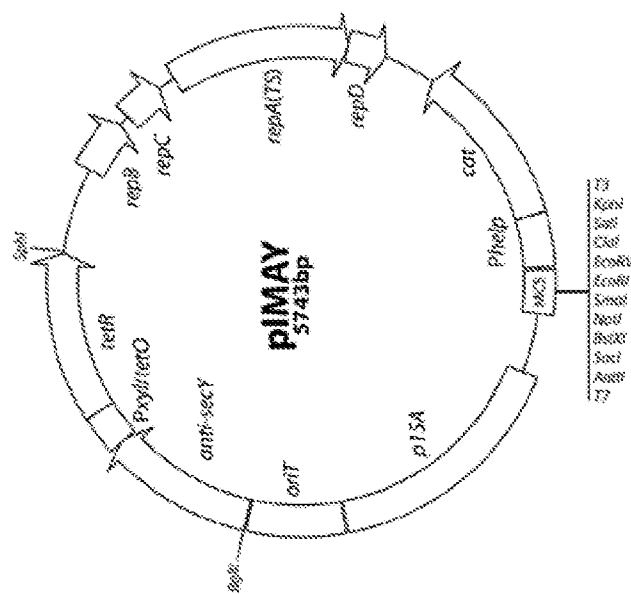


FIGURA 5B

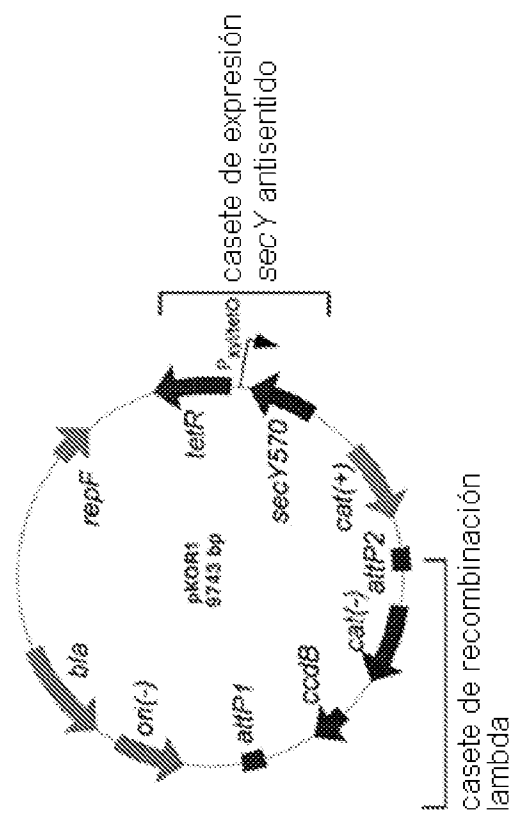
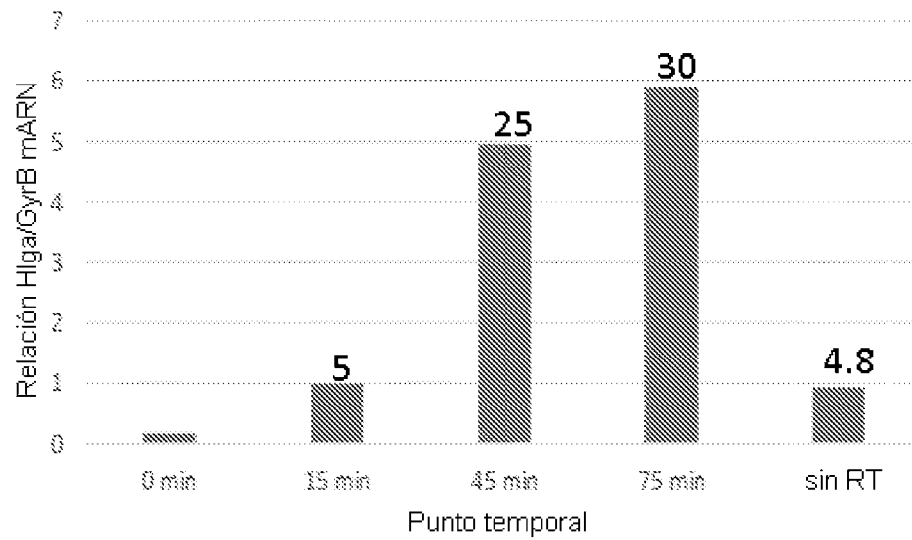
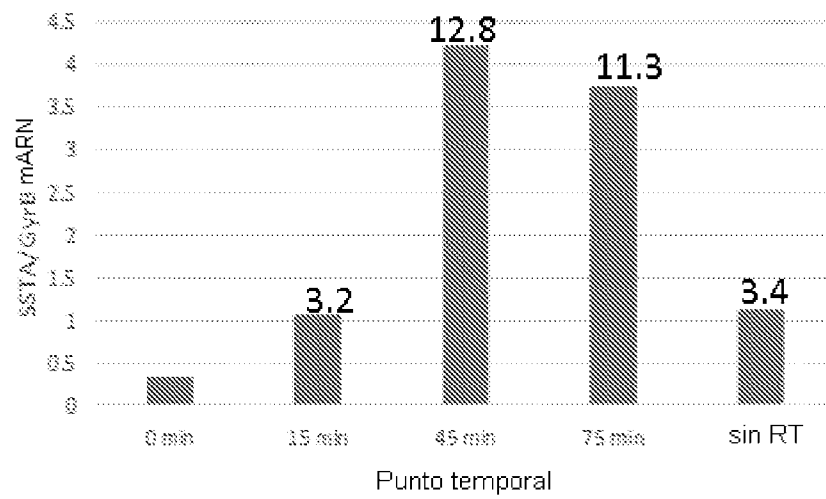


FIGURA 5A

**FIGURA 6****FIGURA 7**

Diseño del vector pCasSA

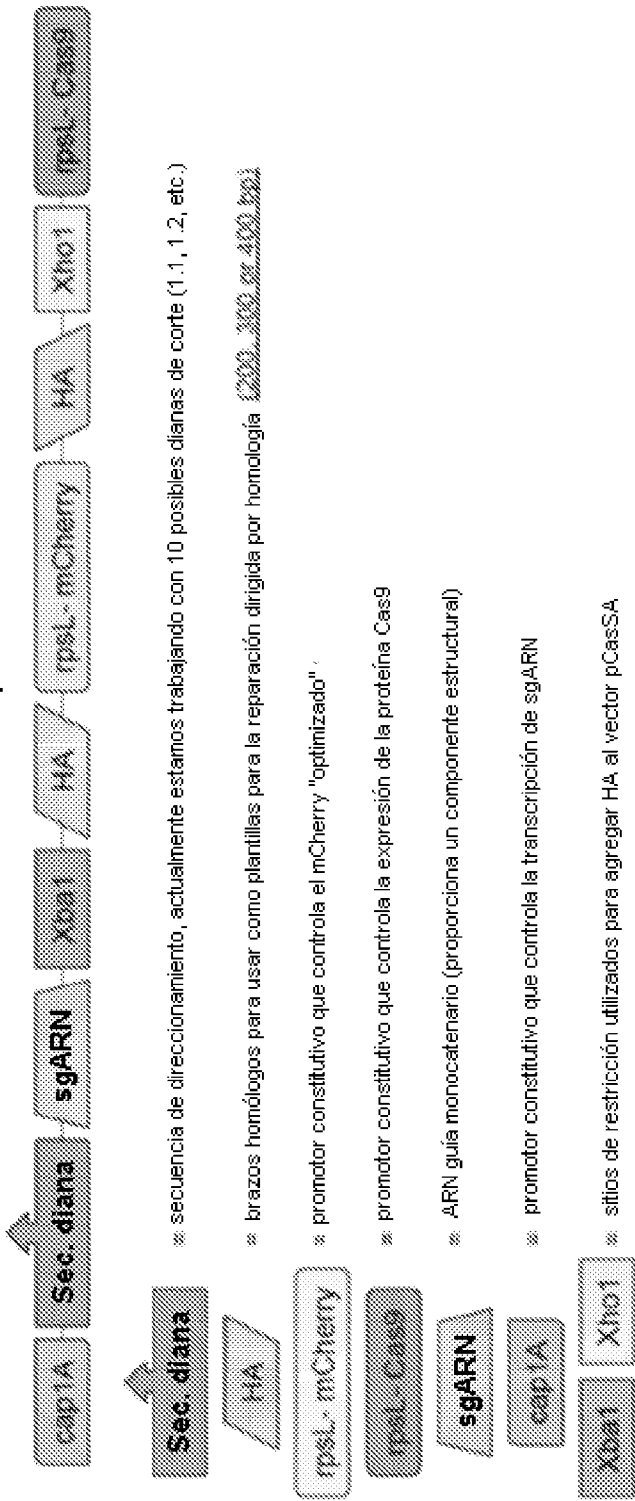


FIGURA 10

Cribado del promotor

FIG. 11A Vector para el cribado del promotor con fluorescencia

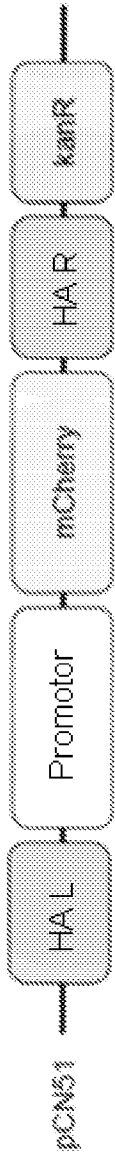
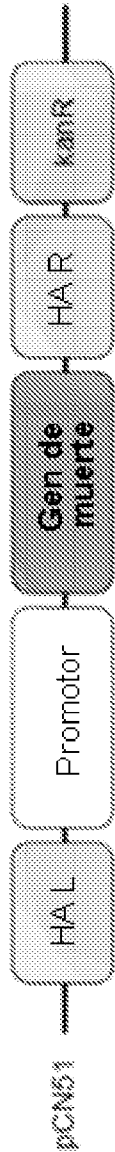


FIG. 11B Vector para el cribado del promotor con muerte celular



Integración

FIG. 11C Vector para la integración cromosómica mediante CRISPR

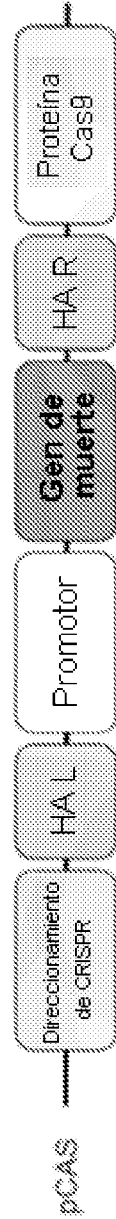
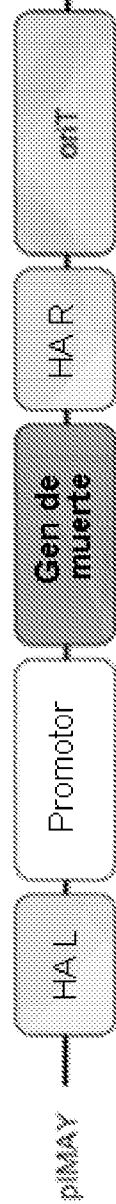


FIG. 11D Vector para la integración cromosómica mediante recombinación homóloga



```

1  gcatgagttt tagcgtttat ttctgttagt tatcggcata atcgttataa caggcgttat
61  cgttagcgtta aagcccttga gcttagcgtg gctttgcagc gaagatgttg tctgttagat
121  ttagaagcgc gatgactgaa tgaataata agcgcagcgc ccttctatct cgttgtaggg
181  aggcctcaagg gactatgagg gaatgaattt cctctatggg tttagattta aaatttgctt
241  gcaattttgc ctagcgttag cgttggaata tttttgaaa aaatttgga tttagaaaa
301  aatgggggga aaggaagcga attttgcttc cgtactacga ccccccatta agtgcogagt
361  gccsattttt gtgccasaaa cgtctatacc caactggctc aaggggttaa ggggttttc
421  aatggccaac gaatgcgcaa cgttttcgcc aactttttt ataactctat atttaagtag
481  ctttattgtt gtttttatga ttcaaatgtg atacactaac tttataaat tatttgattg
541  gactttttta aatgggtgatt tcagaatcga aaaaaagagt tatgtatttc ctagcaaaag
601  agcaagataa aaatttaaca gatattggga aacaaaaagg tttttcaaaa tctgcggttg
661  cggcgttagc tatagagaaa tatgcaagaa aggaatcaga acaaaaaaaa taagcgaag
721  ctgcggtttt tagaaggata cgaattttcg ctactgtttt ttgatgaagt aattatata
781  tggctattaa aaatactaaa gctagaattt ttggattttt atttatctct gactcaattc
841  ctaatgattg gaagaaaaaa tttagagagt tgggcgtatc tatggctgtc agtcccttaa
901  acgatattga cgaaaaaaaa gataaagata cctggaaata tagtaatat attcaaatag
961  gaaagcacta taaaaaaca cactatcagc ttatatatat tgcacgaatt cctgttaaaa
1021  tagaagcgtt taggaacaaag attaaagcaa aattggggaa tagttcagtt gctcagtgtg
1081  agatacttga ttatatcaaa ggttcatttg aatttttgac tcatgaatca aaggagccta
1141  ttgctaaaga taaactatata tangaacaaa aagatatttt gaacattaat gattttgata
1201  ttgacgccta tatcaacttt gatgaagccc aaaaaagaga attggaagat ttacttttag
1261  atatagttga tgaatataat ttggtasata caaaaagattt aatggctttt attcgcctta
1321  ggggagcggg gtttggaatt ttcaatacga atgatgtaaa agatattgtt tcaacaaact
1381  ctacgcgctt tagatttatg tttagagga atttatcagt tggatataga gcaagttatg
1441  caaaggttct tgaatgtgaa acgggggaaa taaaatgaca aacaaagaaa aagagttatt
1501  tgcagaaaat gaggaattaa aaaaagaatt taaggactta aaagaagcta ttgaaagata
1561  cagagaaatg gaagttagaa taagtacaa aatagattta ttgagaggag ggaattatga
1621  ataataaaa gccccctgac gaagtcgaa ggggggtttt attttggttt gatgttga
1681  ttaataagca taccattctat aatagaaggt atggaggatg ttataaatg agacagaatt
1741  atgatgatca tatgtcaact aacggggcag gttagtga ca ttgaaaaac gactgtaaaa
1801  agtacagtcg gcaattatct atattataaa agccagtcac taggcctatc tgacaattcc
1861  tgaatagagt tcataaaca tctgtcatga taaccatcac aaacagaatg atgtacgtgt
1921  aaagatagcg gtaaatatat tgaattaccc ttattaatga attttcctgc tgaataatg
1981  ggtagaagggt aattactatt attattgata tttaagttaa acccagtaaa tgaagtccat
2041  ggaataatag aaagagaaa agcattttca ggtataggtg ttttgggaaa caatttcccc
2101  gaacatttat atttctctac atcagaaagg tatasatcat aaactcttt gaagtcattc
2161  ttacagggag tccaaatacc agagaatgtt ttagatacac catcaaaaat tgtataaagt
2221  ggcctcaact tatcccaata aactaactct ccgtcgcctat tgtacccagt tctaaaagct
2281  gtatttgagt ttatccacct tgcactaag aaataaatg cagggtaaaa ttatatctct
2341  tcttgtttta tgtttcgtga taaaacata atatcaattt ctgtggttat actaaaagtc

```

FIGURA 12A (SEQ ID NO: 131 cont.)

```

2401 gtttgggtgggt tcaataaatg attaaatatc tttttttctc tccaattgtc taaatcaatt
2461 ttatttaaatg tcatgggtttt cactctctct ctacattttt taacntaata atgccaasta
2521 ccgttttgcca cccctctctc tgataattat aatattggcg aaattcgtct ctasagatga
2581 aacgcaatat tatatgcttg ctttatcggn cgtatgtgat tataccagcc cctcactac
2641 atgtcaagaa taaactggca aagcataatg ggataastaa cctcactaa aggggaacaa
2701 agctgggttac cgggcccccc ctcgaggctg acggtatcga taagcttgat atcgaattcc
2761 tgcagcccggt gggatccact agtcttagag cggccggccc cgggttgagc ctccaattcg
2821 cccataagtg agtctgtatt cgaagtccca gggcttcocg gtatcaacag ggaacaacag
2881 atttatttat tctgcaagt gatcttcctt ccaggtat ttttcggc aaagtgcgtc
2941 ggggtgatgct gcccaactac tgatttagtg tatgattgtg tttttgaggt gctccagtg
3001 cttctgtttc tatcagctgt cctctcctgt cagctactga cgggttggtg cgtaaaggca
3061 aaagcacccg cggacatcag cgttagcggg gtgtatactg gtttactatg ttggcactga
3121 tgaagggtgtc agtgaaagtgc tctatgtggc aggagaaaaa agcctgcacg ggtgctcag
3181 cagaaatatgt gatcacggat atatccgctt tctcgtcca ctgactcgt acgctcgtc
3241 gttcagctgc ggcagagcga aatggcttac gaacggggcg gagatttctt ggaagatgcc
3301 aggaagatgc ttaacaggga agtgagaggg ccgcgcaaaa gctgtttctc catagctcc
3361 gcccccctga caagcatcac gaaatctgac gctcaaatca gtggtggcga aacccgacag
3421 gactataaag ataccagggg tttcccccgt cgggttcctt cgtgcgtctt cctgttctg
3481 cctttcgtgt tacccggtgt attccgctgt tatggccggt tttgtctca tccacgcctg
3541 aacntcagtt ccgggtaggc agttagcttc aagctgact gtatgcagc accccctgt
3601 cagtcagacc gctgcgctct atcnggtaac tatgtcttg agtccaaac ggaagacat
3661 gcaaaaagcac cactggcagc agtcactggt aattgattta gaggaagtta tttgaaagt
3721 atgcccgggt taaggctaaa ctgaaaggac aagttttggt gactgcgtc ctccaagcca
3781 gttacctcgg ttcaaaaggt tggtagctca gagaaccttc gaaaaacgc cctgcaaggc
3841 ggtttttctg ttttcagagc aagagattac ggcagaccca aaacgctctc aagaagatca
3901 tcttattaat cagatasaat atttctagat ttcagtgcaa ttatctctc caaatgtagc
3961 acctgaagtc agcccccata gatataagtt gtaattcttc gcgcgttgcc ctcatctgtt
4021 acgcccggcg tagccggcca gctcgcaga gcaggatcc cgttgagcac cgcacggctg
4081 gaataaggga cagtgaagaa ggaacacccg ctccggggtg ggcctacctc acctatcctg
4141 cccggtgac gccgttggtt acaaccaagg aagctatacc gaaccccttg gcaaaatcct
4201 gtatacctg cgaaaaaagg tggatatacc gaaaaaatcg ctataatga cccgaagcag
4261 ggttatgcag cggaaaaagc ctgcttcctt gctgtttgt ggaatatca ccgactggaa
4321 acagycatat gcaggaaatt actgaactga ggggacaggc gagaggagat ctgtatctaa
4381 tgattcaaac cctgttgaa ctttttagaa caaaagaggt tctgaacaa attttctcca
4441 cactagcaat gttagtatt tttaaaatag ggaacttat accagctcca ggaatasaat
4501 ctgcagcttt tgaataatcc caaggttctc aaggcgccac tgaattatta aatacttttg
4561 gtggcgagc cttgaacga tttctattt ttgcaatggg tattgtacc tacatcactg
4621 catcaatcgt aatgcaatta ttacaastgg atattgtccc taatatctca gaatgggcaa
4681 sacaaaggtga agtaggtaga agaaggttaa ataacgttac ccgttatcta gcaattctct
4741 tagcatttat ccaatctata ggtatggcat tccaatttaa taattatctc aaaggtgctg

```

FIGURA 12B (SEQ ID NO: 131 cont.)

```

4801  tgattatcaa  tcagtcaatt  atgagttatt  tattaatago  actagttttg  acagcaggaa
4861  ctgcttttct  aatatggctt  ggtgatcaca  tcactcagtt  cgggtgttgg  aatgggtatt
4921  ctattatcat  attcccatca  agcttatttt  aattatactc  tatcaatgat  agagtgtcaa
4981  tatttttttt  agtttttcat  gaactcgagg  ggatccaaat  aaaaaactag  ttgacaaat
5041  aactctatca  atgatagagt  gtcaacaaaa  aggaggaatt  aatgatgtct  agattagata
5101  aaagtaaaat  gattaaacag  gcatttagag  cgcttaatga  ggtcgggaat  gaagggttaa
5161  caaccogtaa  actogcccag  aagcraggtg  tagagcagcc  tacattgtat  tggcatgtaa
5221  aaaataagcg  ggctttgctc  gacgccttag  ccattgagat  gttagatagg  caaccatact
5281  acttttgccc  tttagaaggg  gaaagctggc  aagatttttt  acgtastaac  gctaaaagtt
5341  ttagatgtgc  tttactaagt  catogcgatg  gagcaaaagt  acatttaggt  acacgggcta
5401  cagaaaaaca  gtatgaaact  ctcgaaaatc  aattagcctt  ttatgcca  caagggtttt
5461  caactagaga  tgcattatat  gcaactcagc  ctgtggggca  tttacttta  ggttgctat
5521  tggagatcaa  agagcatcaa  gtogctaaag  aagaaaggg  aacacotact  actgatagta
5581  tgcgcgcatt  attacgacaa  gctatcgaat  tatttgatca  ccaagggtgc  gagccagcct
5641  tcttattogg  ccttgaattg  atcatatggc  gattagaaaa  acaacttaaa  tgtgaaagtg
5701  ggtcttaaaa  gcagcataac  ctttttcogt  gatggtaact  tca

```

FIGURA 12C (SEQ ID NO: 131 cont.)

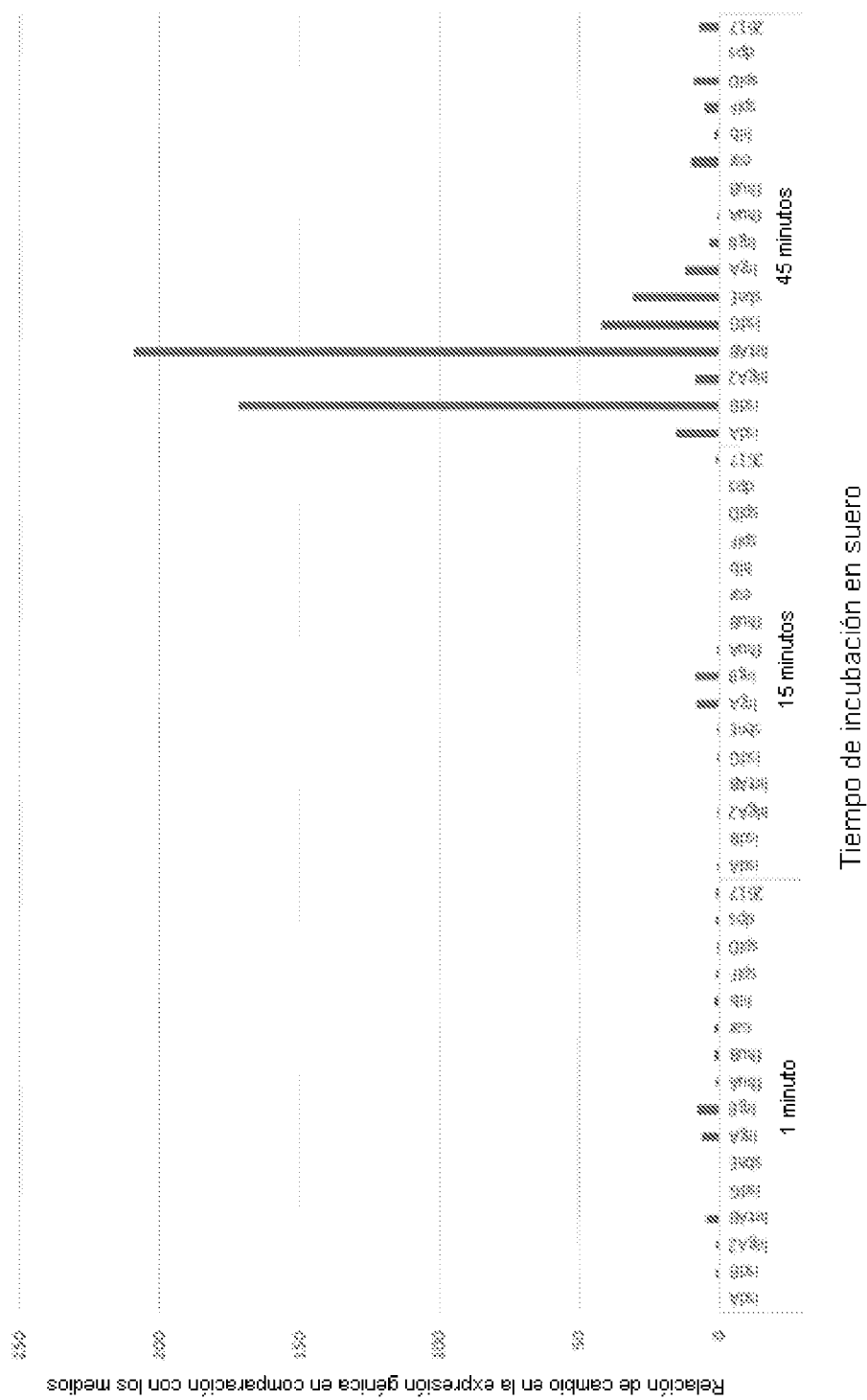


FIGURA 13A

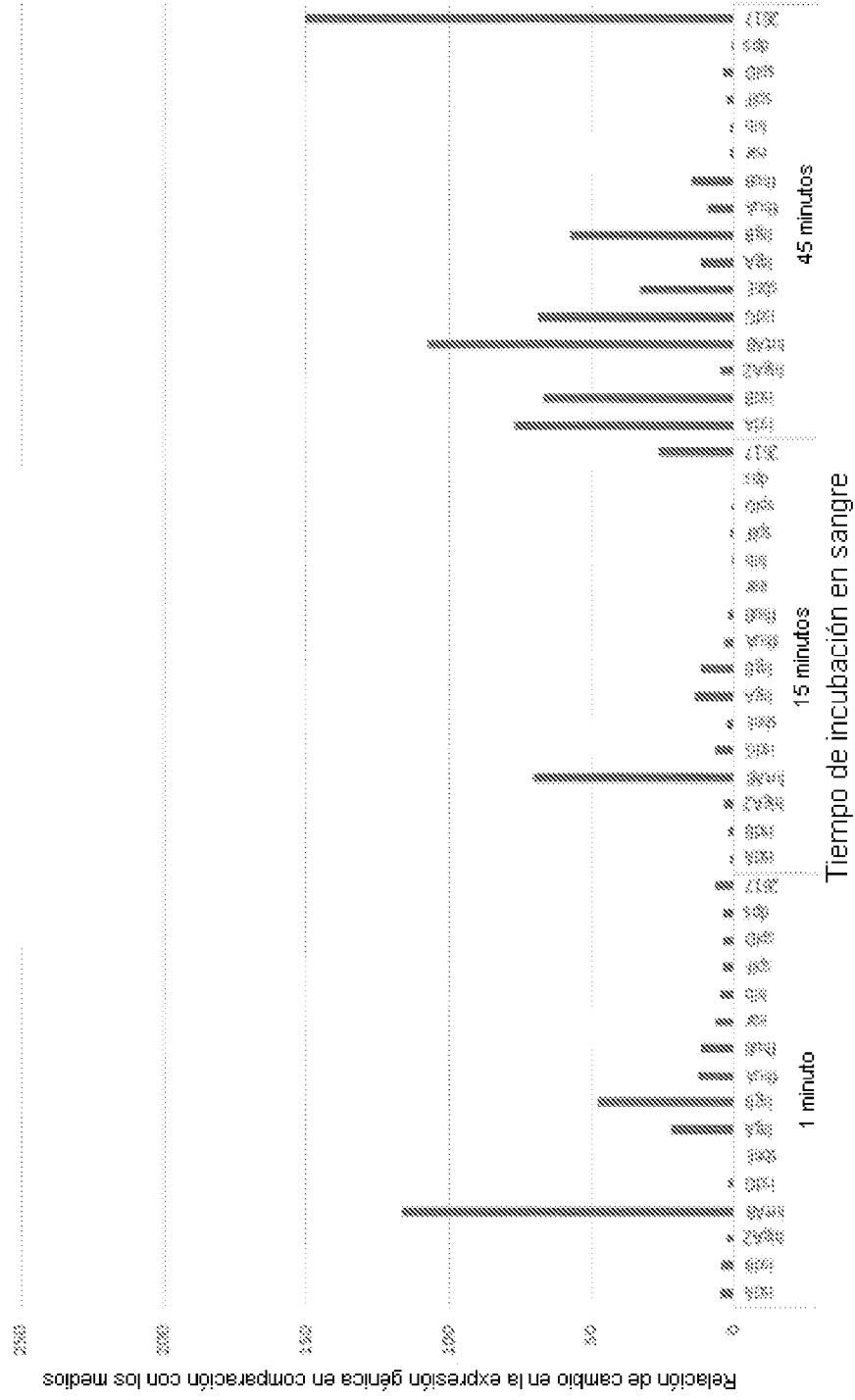


FIGURA 13B

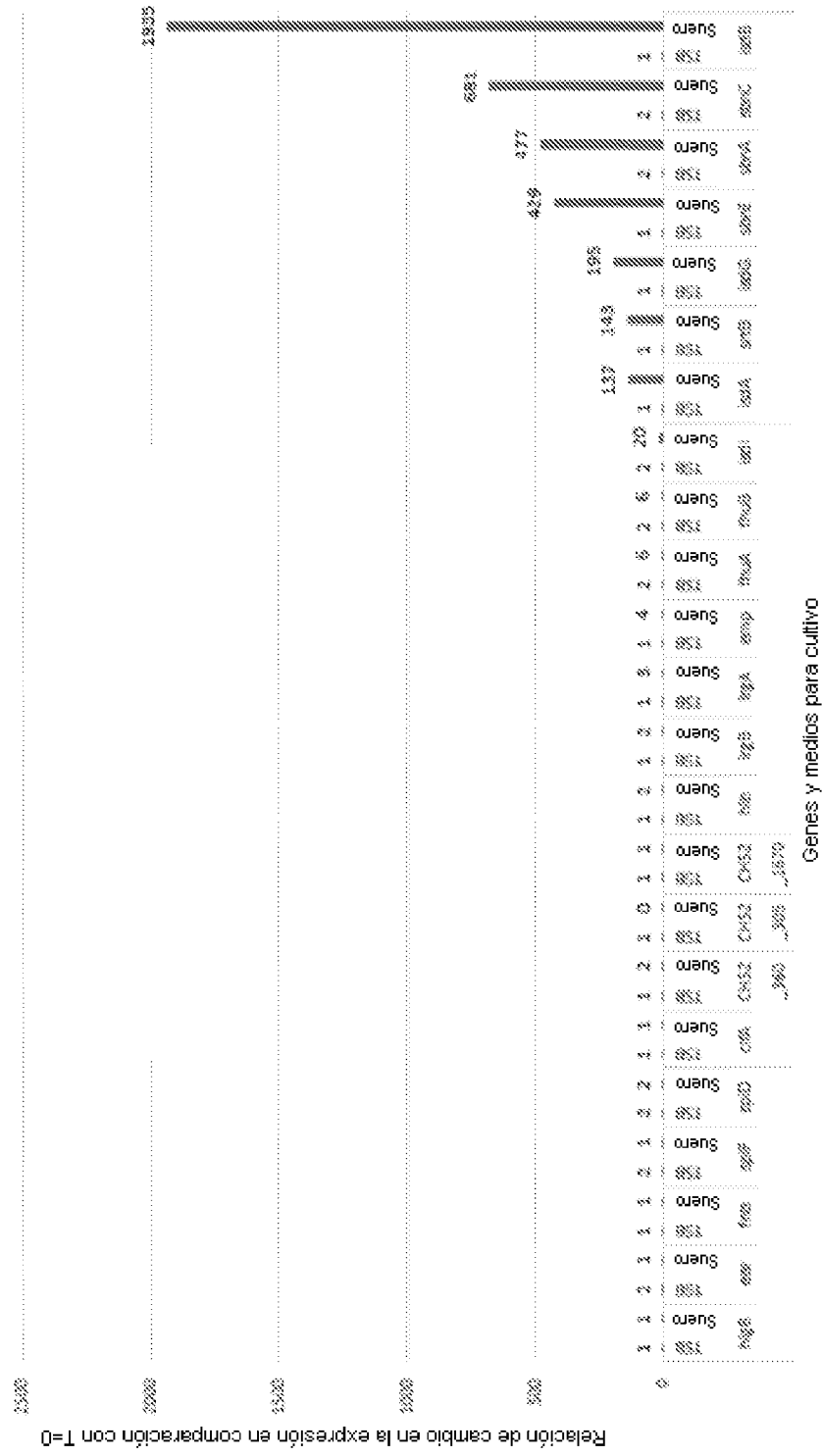


FIGURA 13C

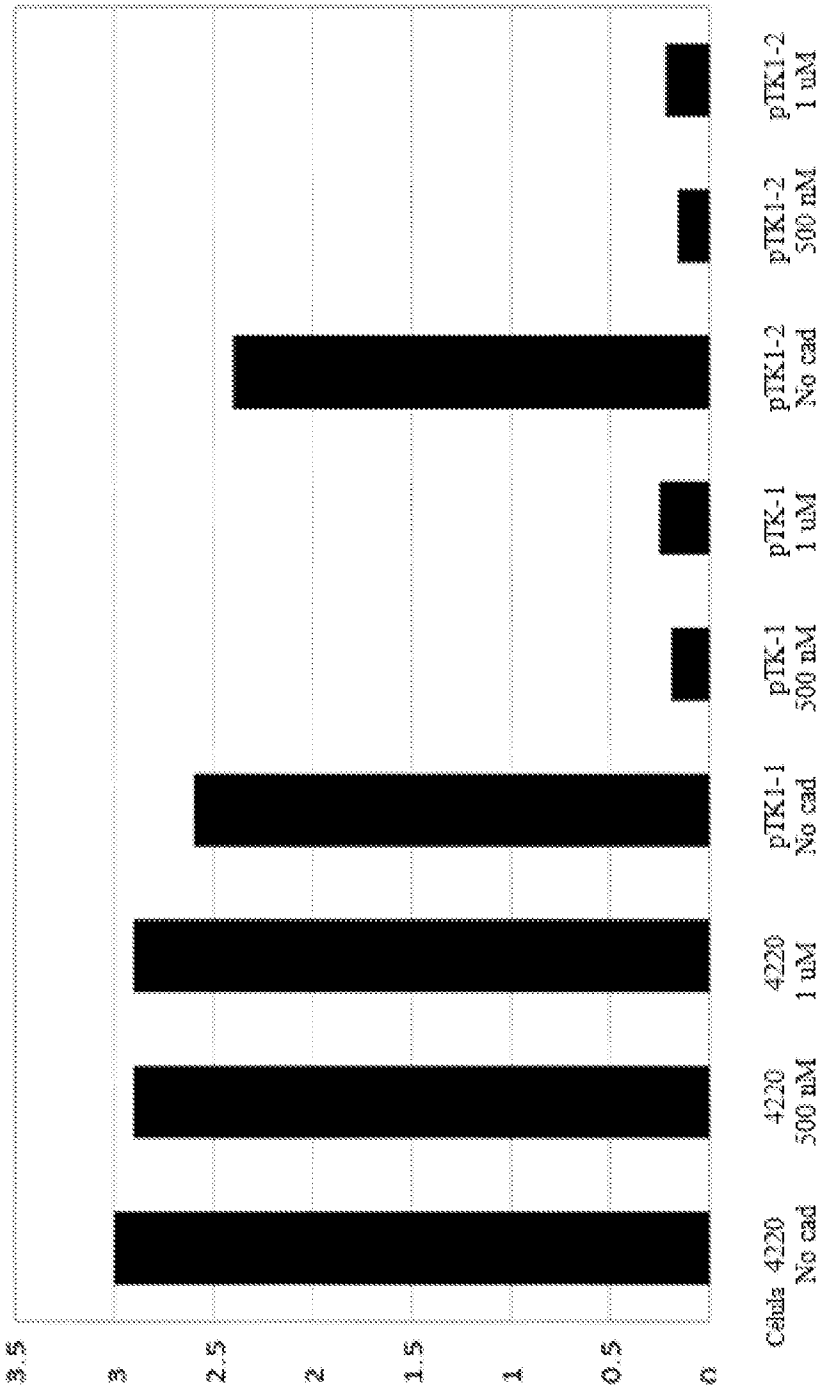


FIGURA 14

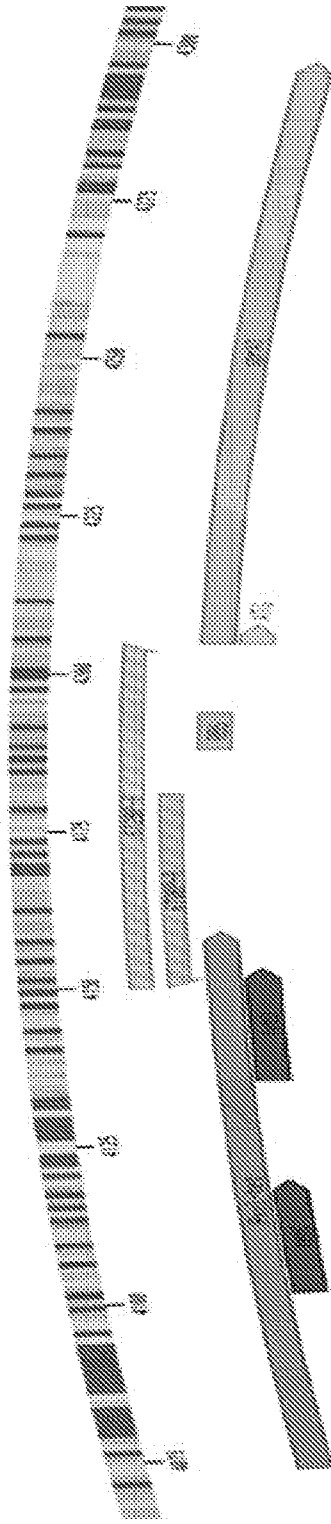


FIGURA 15A

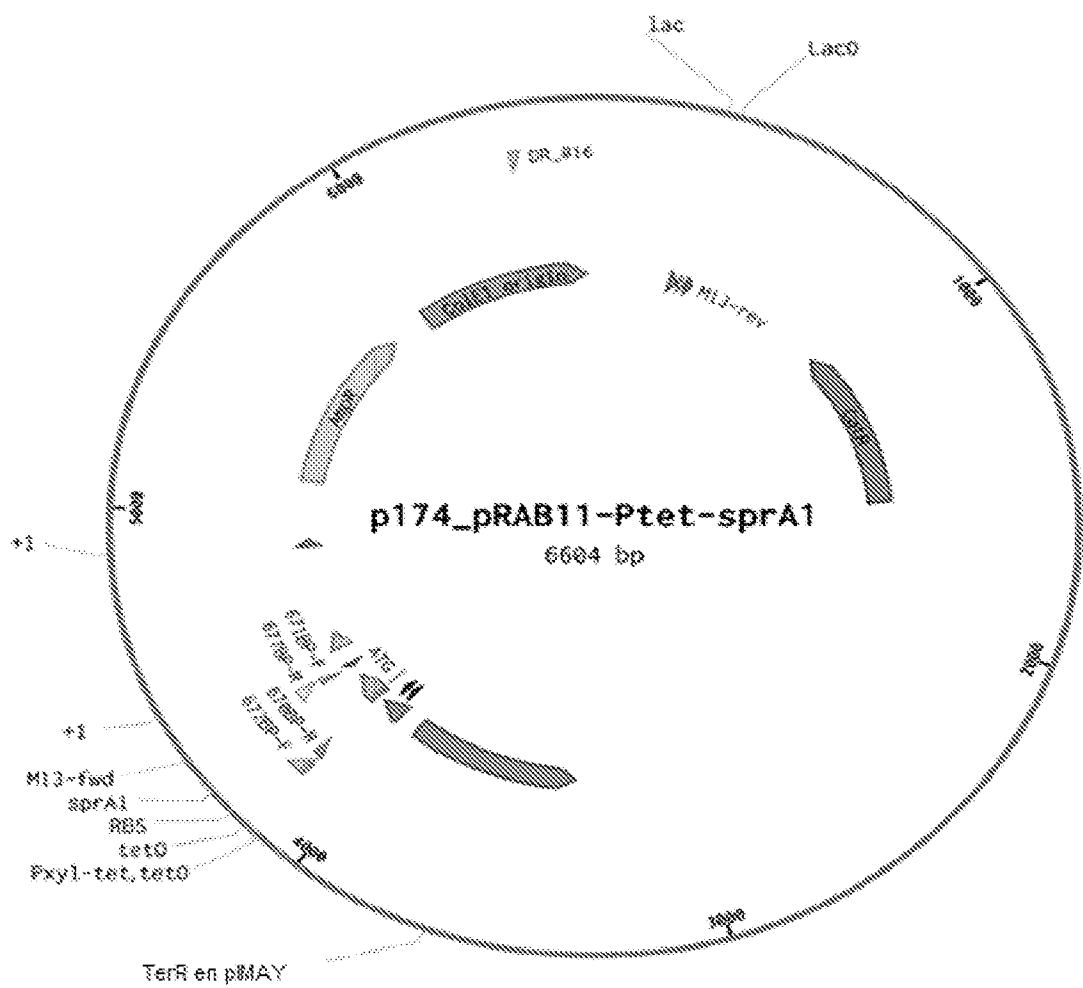
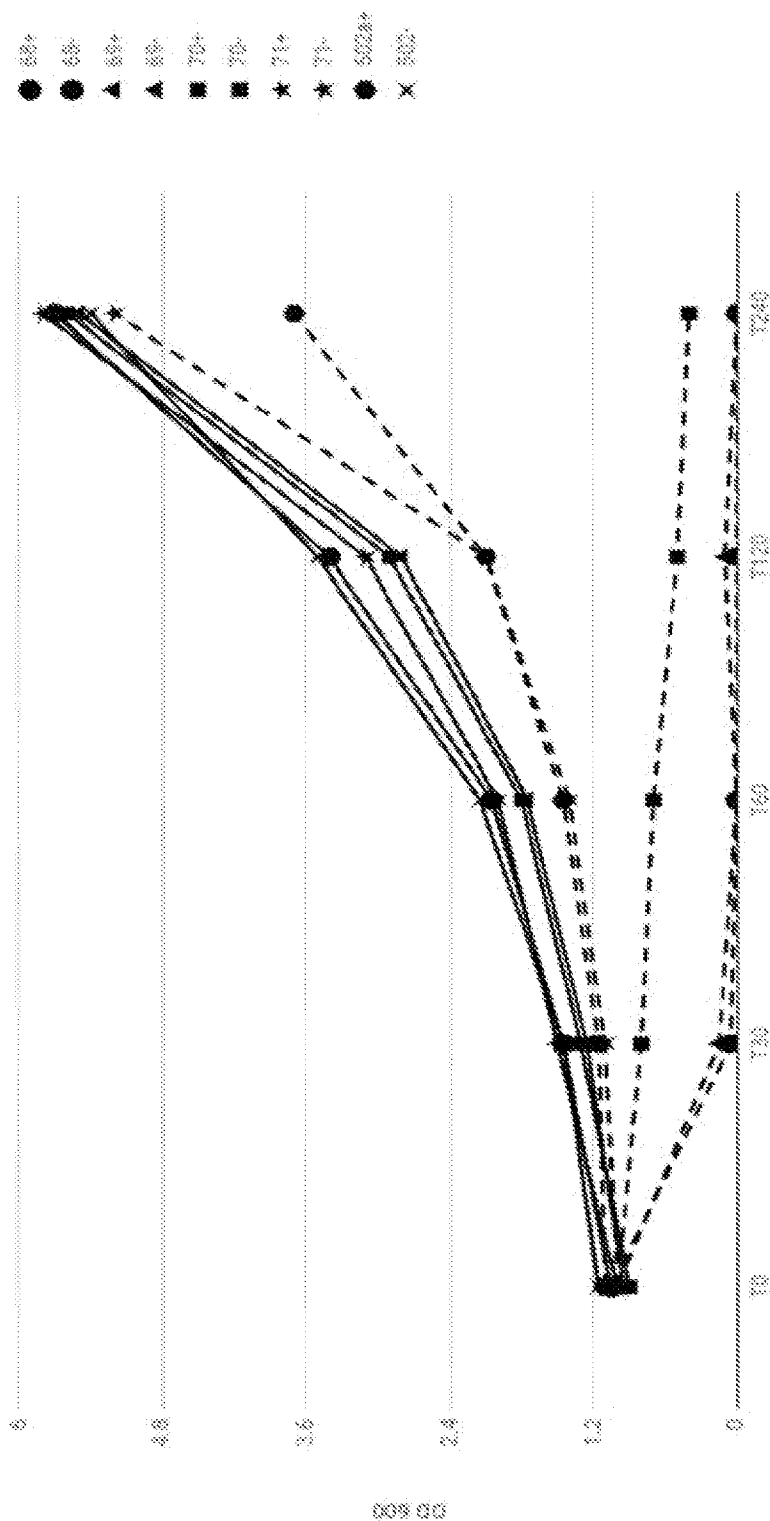


FIGURA 15B



FIGURA 15C



Tiempo (min)

FIGURA 16

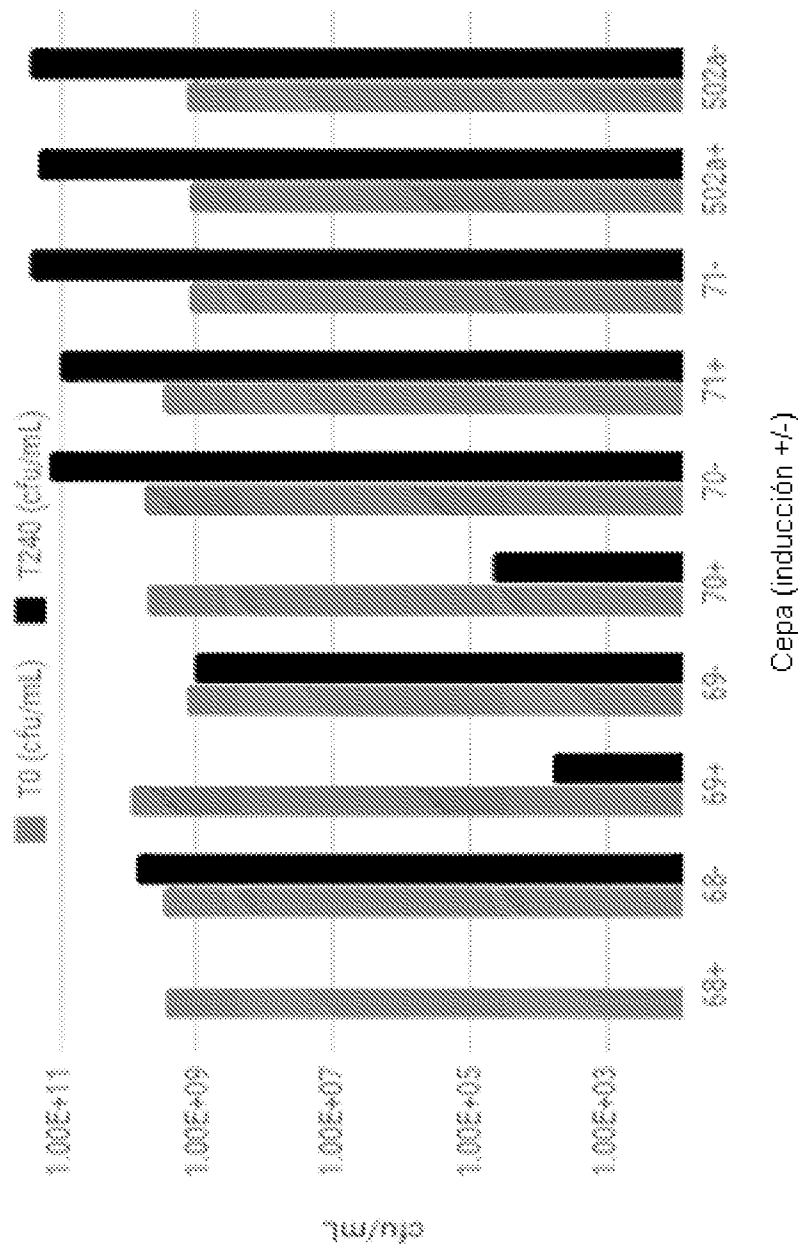


FIGURA 17

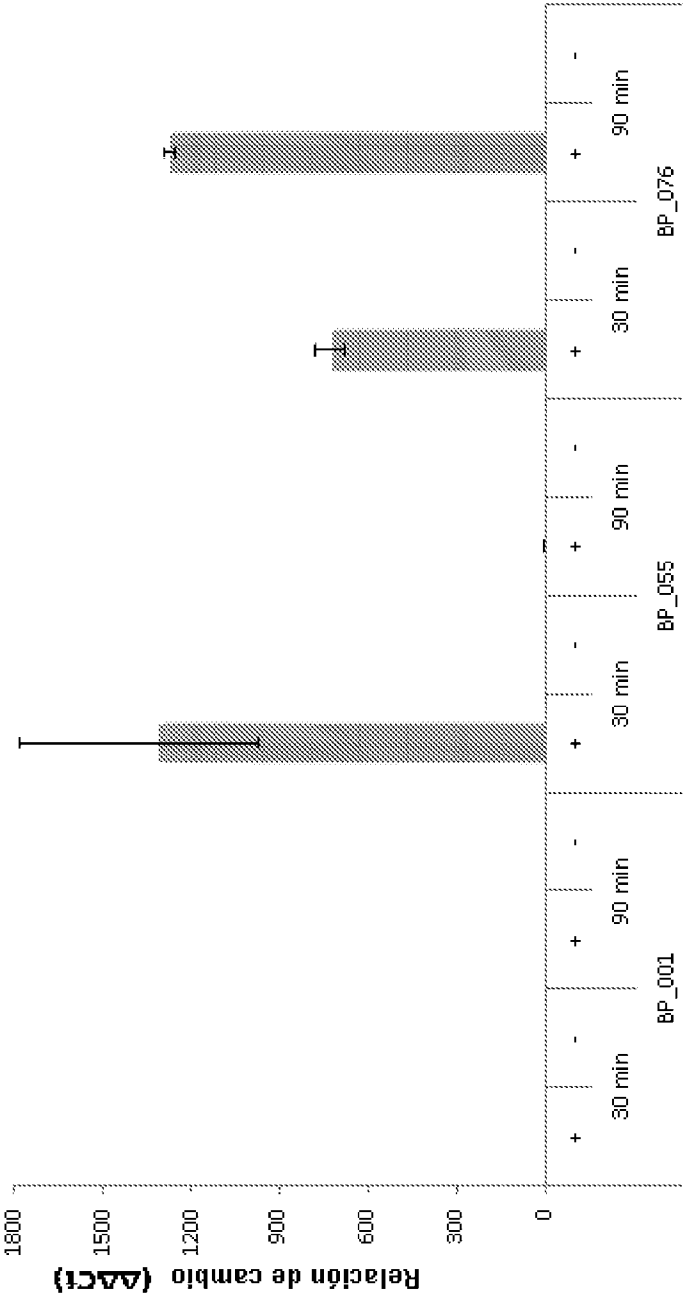


FIGURA 18

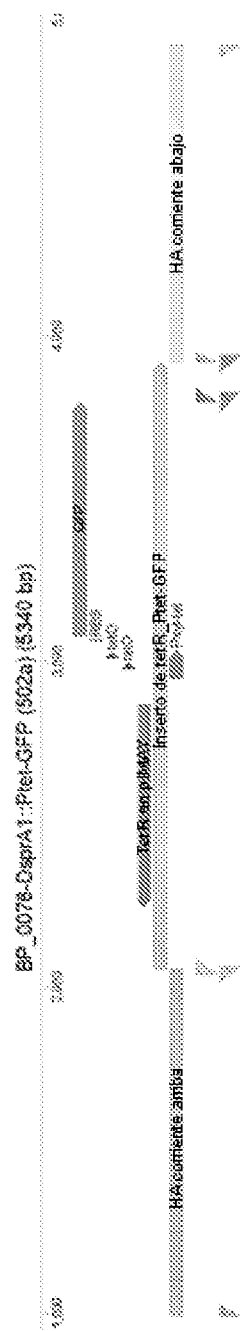


FIGURA 19

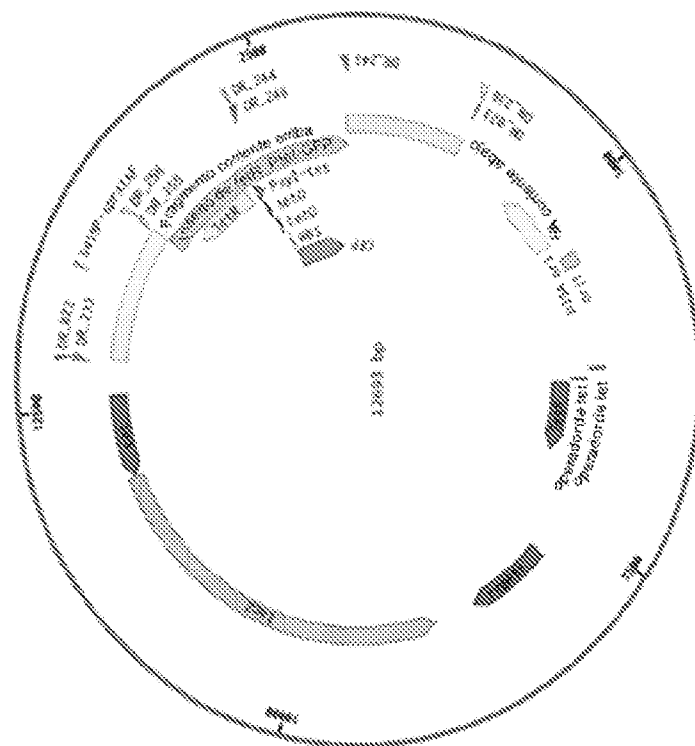


FIGURA 20

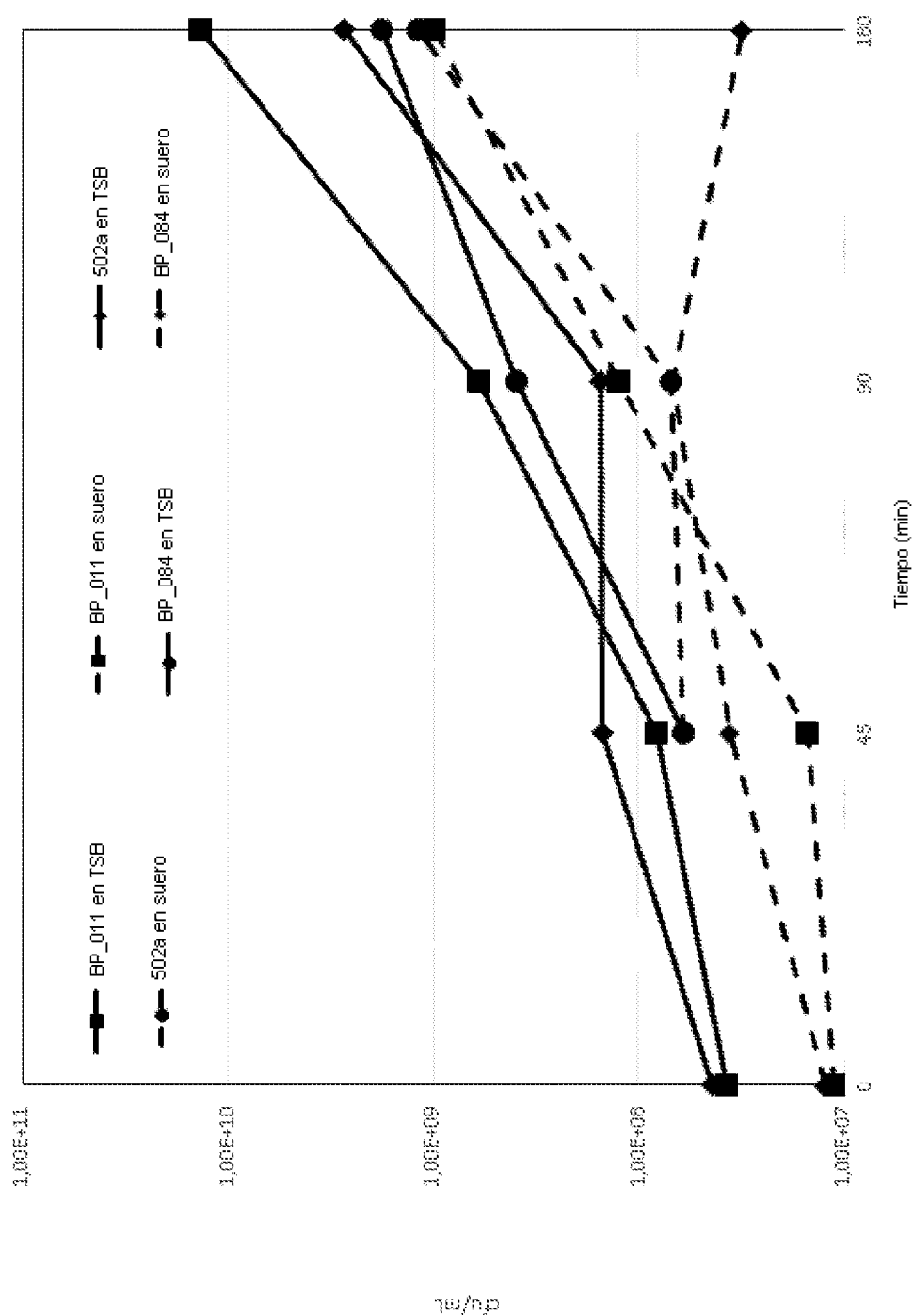


FIGURA 23