



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 303 727**

51 Int. Cl.:

C12N 1/21 (2006.01)

A61K 39/106 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **98964347 .3**

86 Fecha de presentación : **30.12.1998**

87 Número de publicación de la solicitud: **1099759**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **16.05.2001**

54 Título: **Candidatos de vacuna de *Vibrio cholerae* y procedimientos para su construcción.**

30 Prioridad: **30.12.1997 CU 142/97**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.08.2008

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.08.2008

73 Titular/es: **CENTRO NACIONAL DE
INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS
Avenida 25 15202 esq. a 158, Cubanacán, Playa
Ciudad de la Habana 12100, CU**

72 Inventor/es: **Campos Gomez, Javier;
Fando Calzada, Rafael Alfredo;
Rodriguez Gonzalez, Boris Luis;
Ledon Perez, Talena Yamile;
Valle Diaz, Edgar;
Silva Cabrera, Anisia Juana y
Benítez Robles, Jorge Antonio**

74 Agente: **Curell Suñol, Marcelino**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Candidatos de vacuna de *Vibrio Cholerae* y procedimientos para su construcción.

5 **Campo técnico**

El campo de la invención es el de la biotecnología y, más específicamente, la generación de vacunas de *Vibrio cholerae* y los procedimientos de construcción de las mismas usando herramientas de ingeniería genética.

10 **Antecedentes de la invención**

A continuación, se enumera una breve explicación de la terminología utilizada en el texto de la invención.

15 Por virus ctxΦ quiere decirse la partícula de ADN recubierto con proteína, producida por ciertas cepas de *Vibrio cholerae*, que puede transducir su ADN, que comprende genes de la toxina colérica, a otras cepas de *Vibrio cholerae*.

Por toxina colérica, quiere decirse la proteína responsable de los síntomas clínicos de los tipos de cólera que están producidos por las bacterias.

20 Por genes de toxina codificados por ctxΦ quiere decirse, además de los genes de la toxina colérica, genes *zot* y *ace*, que codifican para la “toxina de zónula occludens” y para la “enterotoxina colérica accesoria”, respectivamente.

25 Para cepas no toxigenas de *Vibrio cholerae*, ha de entenderse cualquier cepa que carece de los genes que codifican para las toxinas anteriores, que son también, útiles como vacunas pero que todavía producen un síndrome reactogénico no deseado.

La expresión vacuna segura o cepa segura se refiere a una cepa de este tipo que carece de la reactogenicidad residual de las cepas no toxigenas de *Vibrio cholerae*.

30 Por hemaglutinina/proteasa, quiere decirse la proteína que manifiesta una doble función, siendo una de ellas la capacidad para aglutinar eritrocitos de ciertas especies y la otra, la propiedad para degradar proteínas tales como mucina.

35 El término *celA* se refiere a la secuencia de nucleótidos que codifica para la proteína endoglucanasa A. Esta proteína se produce de manera natural en cepas de *Clostridium thermocellum* y presenta una actividad hidrolítica de β (1-4)glucan-glucano que puede degradar la celulosa y sus derivados.

40 Por timidilato sintasa, quiere decirse la proteína que puede catalizar la metilación reductora de desoxiuracilo monofosfato (dUMP) mediante N⁵-N¹⁰-metilen-tetrahidrofolato para proporcionar 2,5-desoxitimidina fosfato (dTMP) y dihidrofolato.

45 ADN sustancialmente puro es ADN que está libre de ambas secuencias codificantes inmediatamente contiguas al extremo 5' o el extremo 3' de la secuencia codificante de *thyA*, en el genoma que se produce de manera natural del microorganismo a partir del que se deriva el ADN de la invención. El término del mismo incluye, por ejemplo, un ADN recombinante que se incorpora en vector, cepa, línea celular o plásmido, o que existe como una molécula separada (por ejemplo, fragmento de PCR, restricción o ADNc). También incluye moléculas de ADN recombinante que son parte de un gen híbrido que codifica para secuencias adicionales.

50 Secuencias homólogas se refiere a secuencias de proteína o ADN que comparten residuos similares o idénticos que son nucleótidos o aminoácidos, respectivamente, en posiciones idénticas de dos o más cadenas dadas. Cuanto mayor es el número de residuos idénticos/similares en cierta posición, mayor es el porcentaje de identidad/similitud entre dos de ellas.

55 El cólera clínico es una enfermedad diarreica aguda que resulta de una infección oral con la bacteria *Vibrio cholerae*. Después de más de 100 años de investigación sobre el cólera, sigue existiendo la necesidad de una vacuna eficaz y segura. La humanidad ha sido testigo de siete pandemias de cólera; las seis primeras estuvieron producidas por cepas del biotipo clásico y la séptima pandemia actual se caracteriza por el predominio de vibriones que pertenecen al biotipo El Tor. Recientemente, comenzando en enero de 1991, esta pandemia se ha extendido hasta Sudamérica, produciendo un número superior a 25.000 casos y más de 2.000 muertes en Perú, Ecuador, Colombia y Chile. Hacia noviembre de 60 1992, surgió un nuevo grupo serológico en India y Bangladesh, el O139, que mostraba un gran potencial epidémico que llegó a ser una nueva causa de preocupación en todo el mundo en vías de desarrollo. Estas experiencias recientes reafirman la necesidad de vacunas contra el cólera eficaces contra la enfermedad producida por *V. cholerae* de grupos serológicos O1 (El Tor) y O139.

65 Debido a que la convalecencia del cólera va seguida por un estado de inmunidad que dura al menos 3 años, gran parte de los esfuerzos en la vacunología contra *Vibrio cholerae* se han realizado para producir vacunas contra el cólera vivas, atenuadas que imitan estrechamente las propiedades de inmunización de la enfermedad tras la administración oral, pero que no resultan reactogénicas para los individuos que las ingieren. Las vacunas de este tipo implican muta-

ciones por delección de todos los genes de toxina codificados por el fago *ctx ϕ* de *Vibrio*. Véanse las patentes de Kaper, J. *et al.*; el documento WO 91.18979 y Mekalanos, J., documento WO 95.18633).

La primera vacuna que se sometió a ensayo contra el cólera data de 1885-1892. Era una vacuna tradicional que comprendía la administración por vía parenteral de vibriones "atenuados". Resultó tener una eficacia limitada y ser inaceptablemente reactogénica (Finkelstein R. A., International Symposium on Cholera on the America Continent. Sao Paulo, SP Brasil, 1992). La vacunación oral se intentó por primera vez en 1892, usando cepas de *Vibrio cholerae* atenuadas. Los resultados de este intento se malinterpretaron y se abandonó inmediatamente la estrategia. La vacunación oral se rescató más tarde en 1970-1980 en el Centro para el Desarrollo de Vacunas de Maryland, EE.UU. usando vibriones mutagenizados químicamente como agentes de inmunización. La reversión a la virulencia de estos mutantes impidió una difusión adicional de la estrategia (Levine *et al.*, Infect and Imm, N°2, 1984; Finkelstein *et al.*, patente US 4.328.209) e indujo a los investigadores a generar mutantes no toxinógenos genéticamente definidos que no podían revertir. Aunque se ha demostrado que estos mutantes confieren una sólida protección inmunológica frente a la enfermedad (Kaper J. B. y Levine M. patentes US 06.472.276 y 581.406), el inconveniente esencial para su utilización es el alto nivel de reacciones adversas que producen en las personas vacunadas (Levine *et al.*, Infect. and Imm. Vol 56, N°1, 1988). Según estos datos, la principal cuestión que ha de superarse cuando se produce una vacuna eficaz contra el cólera es la seguridad. Adicionalmente, los investigadores de todo el mundo están preocupados actualmente con respecto a la transferencia horizontal de información genética entre bacterias, por tanto es necesario prestar atención a este aspecto cuando se diseñan vacunas de bacterias vivas, con el objetivo de mejorar el impacto ambiental durante la vacunación. También es necesario conseguir buenos niveles de estabilidad e inmunogenicidad.

Está disponible una vacuna contra el cólera inactivada que consiste en células completas complementadas con la subunidad B de la toxina colérica (Holmgren *et al.*, Current topics in Microbiology and Immunology, Vol. 146, 1989). Una vacuna de este tipo es segura y eficaz pero requiere múltiples dosis para generar una respuesta inmunitaria equivalente a la de una infección de cólera y, por consiguiente, es muy cara.

Otra alternativa para la vacunación contra el cólera es la CVD103-HgR recientemente autorizada, una vacuna contra el cólera viva que pertenece al biotipo clásico. Es segura, eficaz y barata; sin embargo su eficacia de protección frente a los vibriones El Tor y O139 circulantes actualmente no es tan buena como frente a los vibriones clásicos (véase la patente USA, 5399494).

Se han descrito otros candidatos de vacuna viva en la patente WO 95/18633. Tales mutantes representan todos los serotipos de la pandemia actual, incluyendo el O139. Son seguras, su producción es barata y se ha demostrado que son eficaces de forma preliminar; sin embargo no se han sometido a prueba de manera tan extensa como CVD103-HgR. Todos estos candidatos son bacterias protótrofas que pueden sobrevivir a las condiciones naturales del entorno. Adicionalmente, aunque en el documento se describe un procedimiento para obtener mutantes definidos, los candidatos propuestos constituyen mutantes espontáneos inmóviles. Los inventores han propuesto que la naturaleza inmóvil de estos candidatos de vacuna limita su capacidad para alcanzar la superficie de los enterocitos e impide la provocación de la respuesta reactogénica característica de sus cepas originales.

Robert *et al.*, Vaccine, Vol, 14, N°16, 1517-22, 1996, demostraron la viabilidad de usar el locus de la hemaglutinina/proteasa para la inserción de etiquetas heterólogas, sin perjudicar la capacidad de colonización de los vibriones. La colonización del intestino delgado humano por *Vibrio cholerae* es esencial para inducir una fuerte respuesta inmunitaria localizada de IgA secretada en la mucosa intestinal y para producir una inmunidad de larga duración frente al cólera (Taylor *et al.*, The Journal of Infectious Diseases, 1994, 170: 1518-23).

El Dr. Mekalanos ha sostenido prudentemente que la captación de bacterias por las placas de Peyer es una consecuencia del proceso de colonización que no conduce a reactogenicidad y se considera una etapa esencial en la ruta de respuesta inmunitaria localizada. Por el contrario, la interacción de las bacterias con los enterocitos da como resultado reacciones adversas inaceptables para fines de vacuna (Mekalanos J. *et al.*, Bull. Inst. Pasteur, 93: 255-262, 1995). Según estos criterios, las mutaciones que interfieren con la capacidad de los vibriones para alcanzar los enterocitos son características deseadas de las vacunas contra el cólera.

Descripción de la invención

Esta invención se refiere a un procedimiento de producción de una cepa de vacuna adecuada para la administración oral a seres humanos para inducir protección inmunológica frente al cólera, caracterizado porque la reactogenicidad residual se elimina o se reduce hasta un nivel aceptable a partir de un mutante no toxinógeno de *Vibrio cholerae* mediante la interrupción del gen de la hemaglutinina/proteasa (*hap*) con el gen marcador *ceiA*, y caracterizado además porque se introduce una mutación definida e irreversible en su gen *thyA* mostrado en la SEC. ID n°:1 que codifica para timidilato sintasa de *Vibrio cholerae*, mediante lo cual se limita la proliferación en ecosistemas naturales. Se dan a conocer la cepa de vacuna que pertenece a cualquiera de los dos serotipos del biotipo El Tor o al serotipo O139 de *Vibrio cholerae*. Preferiblemente, esta cepa se deriva de un mutante no toxinógeno de *Vibrio cholerae*, obtenido por medio de herramientas de ingeniería genética y se marca con el gen marcador *celA* dentro del locus de *hap*. Del modo más preferido, la cepa es 638, 1333 o L911.

Puede manipularse cualquier cepa de vacuna de *Vibrio cholerae* que pertenece a biotipos y serotipos existentes o cualquier serotipo emergente contra el que las vacunas actuales no son eficaces, mediante ingeniería genética en

los genes que codifican para HA/P y timidilato sintasa, para proporcionarle a un mutante doble características de bioseguridad ambiental mejoradas. Más preferiblemente, el mutante es un derivado de 81, 413 o SG251a, y del modo más preferible la cepa, es 638T o los derivados de *thyA*⁻ de 1333 y L911. También esta versión contenida de cepas de vacuna es útil como entidad para el suministro de antígenos al sistema inmunitario de la mucosa.

Se ha descubierto que los mutantes de este tipo son poco reactogénicos en pruebas clínicas y/o de laboratorio, aunque aún pueden provocar fuertes respuestas inmunitarias cuando se administran por vía oral. Como resultado, estos mutantes defectuosos con respecto a hemaglutinina/proteasa y sus derivados adicionales comparten las propiedades deseables para una vacuna contra el cólera en seres humanos.

Adicionalmente, se da a conocer ADN sustancialmente puro que codifica para el gen *thyA* para timidilato sintasa de *Vibrio cholerae*. Por ADN de *thyA*, quiere decirse la secuencia de ADN mostrada en la figura 1, SEC. ID. No 1.

La construcción de cepas de vacuna descrita en la presente memoria supone la sustitución del gen cromosómico que codifica para la hemaglutinina/proteasa de tipo natural por un alelo interrumpido con *celA* en mutantes no toxinógenos de *Vibrio cholerae* a los que se les ha delecionado todos los genes que engloban el profago *ctxφ*. Estos mutantes están bien definidos genéticamente y son muy estables en su defecto proteolítico, sin mostrar una reversión detectable en 10⁹ células. Los mutantes de este tipo son igualmente estables en su actividad celulolítica conferida por el marcador cromosómico *celA*, incluso tras el paso por el intestino de ratones o seres humanos, y supone además introducir una delección genética en el gen *thyA* mostrado en la SEC ID No 1 del mutante, para obtener un derivado auxótrofo de timina/timidina. El triple mutante resultante está bien definido genéticamente y es estable. Como consecuencia de esta mutación, se proporciona a la cepa un marcador de resistencia al antibiótico trimetoprima, que está condicionado a la presencia de timina/timidina. Es improbable que un marcador de este tipo transforme otras bacterias mediante transferencia horizontal debido a su naturaleza recesiva.

Se dan a conocer mutantes no toxinógenos, genéticamente definidos, estables y seguros de *Vibrio cholerae* que son útiles como vacunas orales vivas para inducir protección inmunológica frente al cólera en seres humanos. Cuando se diseñaron estos candidatos de vacuna contra el cólera no reactogénica, se ha estado ciñéndose a la idea de reactogenicidad como consecuencia de la interacción entre *Vibrio cholerae* y los enterocitos. Se ha razonado que la inactivación de la principal proteasa secretada, responsable de la degradación de mucina, produciría una cepa de *Vibrio cholerae* ineficaz en la penetración de la gruesa capa mucosa de los enterocitos, pero inalterada en la capacidad para alcanzar la superficie de las células M y provocar una fuerte respuesta inmunitaria. Se descubrió que la principal proteasa que degrada mucina secretada en las cepas C7258, C6706 y SG25-1 era la hemaglutinina/proteasa soluble, un supuesto factor de virulencia descrito por Finkelstein, *et al.* Journal of Bacteriology, Vol. 173, N° 11, págs. 3311-3317, 1991. En paralelo a la inactivación del gen de la hemaglutinina/proteasa, se insertó un fragmento de ADN que codifica para la endoglucanasa A de *Clostridium thermocellum* en el cromosoma de *Vibrio cholerae*. Esta mutación combinada con la delección de genes de toxina colérica del genoma de *ctxφ* dio como resultado candidatos de vacuna marcados con excelentes propiedades como agentes de inmunización para vacunar seres humanos contra el cólera.

Como ejemplo, en lugar de como interés de ser limitante; los mutantes no toxinógenos de *Vibrio cholerae* útiles para construir mutantes seguros defectuosos en la expresión de hemaglutinina/proteasa para fines de vacuna, se describen en la tabla 1 a. Los mutantes no toxinógenos se caracterizan específicamente por la ausencia de las secuencias codificantes de *ctxφ* en su cromosoma y por la presencia de un solo elemento RS1, cuya secuencia de nucleótidos se confirmó mediante secuenciación del ADN. Los procedimientos de producción de los mutantes no toxinógenos de *Vibrio cholerae* se describen bien en otra parte (Archives of Medical Research, 27, N° 3, págs. 275-283).

TABLA 1a

Cepas de partida para construir mutantes defectuosos con respecto a HA/P

Candidato de vacuna	Biotipo/Serotipo	Genotipo
81	EI Tor/Ogawa	Δctxφ
413	EI Tor/Inaba	Δctxφ
SG25-1 ^a	O139	Δctxφ
Se describen todas las cepas y los procedimientos de preparación en Archives of Medical Research. Vol. 27. N° 3. págs. 275-283, 1996. 81 y 413 se derivan de C7258 y C6706, respectivamente; siendo ambos aislados clínicos procedentes de Perú, 1991. SG25-1a es un derivado del aislado de O139, SG25-1, procedente de Calcuta, India, 1993.		

De modo similar, la tabla 1b proporciona los mutantes de hemaglutinina/proteasa útiles para construir los derivados defectuosos con respecto a *thyA* con mejores características de bioseguridad.

TABLA 1b

Mutantes de hemaglutinina/proteasa útiles para construir mutantes de thyA

Candidato de vacuna	Propiedades relevantes
638	81 <i>hap::ce/A</i>
1333	413 <i>hap::ce/A</i>
L911	SG251a <i>hap::ce/A</i>

*Caracterización de vacunas no toxinógenas con mutaciones adicionales destinadas a mejorar su bioseguridad**Caracterización serológica*

Tras introducirse cualquier nueva mutación en las cepas de vacuna descritas en la presente memoria, se demostró que el derivado conservaba el serotipo esperado. Se recogieron células de una placa, suspendidas en solución salina y se sometieron a prueba inmediatamente con suero de tipificación de Difco específico para Inaba, Ogawa u O139.

La principal respuesta inmunitaria provocada por las vacunas se dirige contra el LPS de la bacteria. Todas las cepas que se hacen públicas en la presente invención conservaron la expresión del O-antígeno esperado, tal como se confirmó mediante pruebas serológicas. Adicionalmente, los perfiles de LPS permanecieron inalterados en electroforesis en gel de poliacrilamida e inmunotransferencia de tipo Western.

Ensayo de colonización en ratón recién nacido

Se utilizó el ensayo de colonización en ratón recién nacido (Herrington *et al.*, J. Exper. Med. 168:1487:1492, 1988) para evaluar las propiedades de colonización de cada mutante. Se administró por vía intragástrica un inóculo de 10^5 - 10^6 vibriones en un volumen final de 50 μ l a grupos de al menos cinco ratones. Tras 18-24 horas a 30°C, se sacrificaron los ratones, se diseccionó el intestino, se homogeneizó y se sembró en placa sobre medios bacteriológicos que contenían complementos apropiados para soportar el crecimiento de mutantes. Se sometieron a prueba las colonias que crecieron tras la incubación durante la noche, para determinar marcadores adicionales.

En la tabla 2, puede observarse la capacidad de las cepas doble y triplemente mutadas (Δ ctx ϕ , HA/P)/(*thyA*⁻) de *Vibrio cholerae* para colonizar el intestino de ratones lactantes. Las cepas 638, 1333 y 638T son buenos colonizadores del intestino delgado de los ratones. Se acepta ampliamente que la colonización del tracto gastrointestinal de ratones recién nacidos se correlaciona bien con la colonización del intestino humano, lo que es necesario para sensibilizar el sistema inmunitario de la mucosa e inducir una fuerte respuesta secretora de IgA. Aunque L911 lo coloniza de manera menos eficaz que el resto, todavía puede colonizarlo.

Debe observarse que 638T es un mutante *thyA*⁻ de 638. La mutación introducida en esta cepa produce una dependencia de timina o timidina que reduce la capacidad de esta cepa para multiplicarse en entornos naturales en los que normalmente están ausentes las pirimidinas libres.

TABLA 2

Capacidades de colonización de cepas de vacuna hap::ce/A

Cepa	Entrada	Salida	Biotipo/Serotipo	Genotipo relevante
638	1×10^6	$2,8 \times 10^5$	El Tor/Ogawa	Δ ctx ϕ , <i>hap::ce/A</i>
1333	2×10^6	$4,2 \times 10^5$	El Tor/Inaba	Δ ctx ϕ , <i>hap::ce/A</i>
L911	$1,2 \times 10^6$	8×10^3	O139	Δ ctx ϕ , <i>hap::ce/A</i>
638T	$1,7 \times 10^6$	6×10^5	El Tor/Ogawa	Δ ctx ϕ , <i>hap::ce/A</i> , <i>thyA</i> ⁻

Detección de actividad proteasa

Se utilizaron placas de leche-LB para detectar las actividades proteolíticas en sobrenadantes de vibriones hechos crecer en TSB. Para la cuantificación de la actividad proteasa, se adaptó el método de azocaseína a partir de Ginther CL., Antimicrob. Agents Chemother. 15, 522-526, 1979. Brevemente, se mezclaron 1,1 ml de tampón (CaCl₂ 1 mM; Tris 0,2 M, pH 7,2; azocaseína al 1%) con 200 μ l de sobrenadante de cultivo y se incubaron durante 1 h a 37°C. Se precipitó el sustrato sin reaccionar con 83 μ l de TCA al 40% durante 10 min. seguido por centrifugación durante 10 min. a 12000 rpm. Se neutralizó el producto coloreado que permaneció en disolución con NaOH y se hizo una lectura a 450 nm. Se definió una unidad de actividad enzimática como la cantidad de enzima que producía un aumento neto de uno en la densidad óptica de la muestra en una hora de reacción.

ES 2 303 727 T3

La mutación introducida en el gen de la hemaglutinina/proteasa de las cepas dadas a conocer en la presente memoria, representa una reducción del 60-80% de la actividad proteolítica, tal como se observó en los mutantes en comparación con las cepas originales no toxinógenas.

Detección de vibriones que expresan el marcador endoglucanasa A

Para la detección de la actividad de CelA, se hicieron crecer vibriones en placas de LB durante 24 horas, recubiertos con agar indicador-CMC y se incubaron durante 4 horas a 60°C. Se visualizaron las colonias positivas para la endoglucanasa A tras tinción con rojo Congo y lavado, como colonias rojas rodeadas por un halo transparente en el fondo rojo de la placa. El agar indicador-CMC se componía de un 0,7% de agarosa, un 0,5% de CM-celulosa en tampón fosfato-citrato, pH 6,3 y la disolución de tinción era un 1% de rojo Congo en agua.

El marcador *celA* usado para distinguir de manera inequívoca la vacuna se expresa de manera estable y se hereda en *Vibrio cholerae*. En la figura 2, puede observarse el aspecto de los vibriones marcados.

Puntuación para una auxotrofia de timidina en cepas de vacuna generadas mediante mutagénesis específica de un gen *thyA*

Se usaron sales M9 complementadas con glucosa como fuente de carbono y timina/timidina (200 µg/ml) para detectar el crecimiento de mutantes defectuosos con respecto a *thyA* afectados en el crecimiento en medio de sales M9-glucosa. Se utilizaron placas de LB complementadas con 200 µg/ml de timidina para comprobar la resistencia a trimetoprima en los mutantes de *thyA* generados. Se analizó la estabilidad de la auxotrofia de timidina mediante replicación en placas de colonias de M9-glucosa-timidina en placas de M9-glucosa.

Las cepas 638, 1333 y L911 son bacterias protótrofas que pueden crecer en sales minerales empleando glucosa como la única fuente de carbono. La cepa 638T requiere la adición de timidina o timina para el crecimiento en medio mínimo. Cuando está presente uno de estos complementos, 638T es resistente hasta 200 µg/ml de trimetoprima.

Ensayo para determinar la movilidad

Se cogieron células de colonias individuales bien aisladas de una placa maestra con la ayuda de la punta de una aguja de platino y se inocularon mediante inserción (2-3 mm) en una placa de agar de movilidad (LB; agar al 0,4%). Se registró el diámetro en el que se extendió cada colonia a través del agar blando a las 24 horas de incubación a 30°C. Los criterios para la movilidad fueron los siguientes. Una extensión de la cepa bacteriana de 3 mm o menos desde el punto de aplicación se consideró inmóvil. Una extensión de la cepa bacteriana > 3 mm más allá del punto de inoculación se consideró móvil.

Se encontró que todas las cepas bajo el alcance de esta patente, menos L911 eran móviles. L911 es un derivado de SG251, que en estos ensayos, resultó inmóvil cuando se sometió a ensayo en agar de movilidad.

Ensayo para determinar flagelos

Se sometieron a ensayo bacterias móviles e inmóviles para determinar la presencia de flagelos mediante microscopía electrónica. Brevemente, se hizo crecer *Vibrio cholerae* durante 4 horas a 37°C sobre agar con antígeno del factor de colonización (CFA, casaminoácidos, 1%; extracto de levaduras, 0,15%; sulfato de magnesio, 0,05%; cloruro de magnesio, 0,005%), se recogieron y se lavaron con solución salina (NaCl, 0,9%). Se tiñeron negativamente las bacterias con 1% de acetato de uranilo durante 3 min. y se analizaron mediante microscopía electrónica de transmisión.

También se demostró la naturaleza flagelada de las bacterias para todas las cepas de vacuna como anteriormente, con mayor énfasis sobre la cepa de O139 inmóvil, L911 (figura 3). Todas las cepas descritas en la presente memoria mostraron que eran flageladas, incluyendo la L911 inmóvil.

Ensayos para determinar TCP

Se examinaron las cepas mutantes para determinar la presencia de pilosidades correguladas con toxina sobre la superficie bacteriana mediante microscopía electrónica con marcaje inmunológico con oro. Se cultivaron las células como para el ensayo de los flagelos. Se depositaron suspensiones recién recogidas de vibriones (10 µl) sobre una rejilla de níquel recubierta con carbono, se fijaron durante 1 min. exponiendo la rejilla a una lámpara de 60 vatios y se eliminó el exceso de líquido sobre una almohadilla filtrante. Se invirtió la rejilla en una gota de sueros específicos de TCP diluidos en solución salina, un 1% de BSA, un 0,05% de tween-80, se incubó durante 15 min. para la reacción y se lavó con solución salina-BSA-Tween. Se incubaron las rejillas lavadas con el conjugado marcado con oro diluido con el mismo tampón, se dejaron en reposo durante 15 min. y se lavaron 3 veces con solución salina-BSA-Tween. Tras el lavado, se tiñeron las muestras durante 1 min. con una disolución de molibdato de amonio al 1%.

Las características más importantes de las vacunas contra el cólera son la seguridad y la antigenicidad. Mediante manipulación genética, se hacen seguras las cepas de *V. cholerae*, pero debe tenerse cuidado para que conserven su antigenicidad inalterada. Se evaluaron las cepas de *Vibrio cholerae* dadas a conocer en la presente solicitud de patente para determinar la expresión de los antígenos más destacados en la bacteria. Se visualizó TCP sobre la superficie

bacteriana mediante microscopía electrónica con marcaje inmunológico con oro. Alternativamente, se detectó la expresión de este factor de colonización clave mediante análisis de inmunotransferencia de tipo Western. Todas las cepas analizadas (por ejemplo, 638, 1333, L911 y 638T) produjeron niveles normales de proteína TCP y se ensamblaron en grandes apéndices sobre la superficie bacteriana (figura 4).

Cepas de vacuna vivas

Pueden utilizarse las cepas 638, 1333, L911 y 638T descritas en la presente memoria, para lograr una protección inmunológica adecuada frente al cólera en seres humanos, siempre que provoquen altas tasas de seroconversión y produzcan bajos niveles de reacciones adversas cuando se administran por vía oral a voluntarios humanos. Dependiendo de la epidemiología local relevante, podría utilizarse una única cepa o combinaciones de ellas para la inmunización.

Capacidad de cultivo de la cepa bacteriana

Se cultivaron las cepas de vacuna en medio de laboratorio habitual. Se añadieron complementos de timidina (200 µg/ml) cuando fue necesario para el crecimiento, pero no se incluyeron complementos en el inóculo.

Dosificación

Se administró una dosis oral única de la vacuna viva a personas en tampón bicarbonato (2%) tras recoger las bacterias de una placa nueva en solución salina aséptica (NaCl al 0,9%). Un inóculo útil son 10^7 - 10^9 células por dosis de inmunización. Alternativamente, pueden administrarse más de una dosis, separadas 7-28 días, a cada sujeto. Preferiblemente, los vibriones pueden liofilizarse en una formulación que conserve la viabilidad y mezclarse con bicarbonato antes de la inoculación.

Pruebas clínicas de 638

Se ha sometido a prueba la cepa 638 en ensayos con seres humanos en los que participaron 42 voluntarios con edades comprendidas entre 18-40 años. En la tabla 3, se muestra un resumen de los hallazgos clínicos tras la ingestión de la cepa 638 y placebo. Todas las manifestaciones clínicas observadas fueron leves y de corta duración. No pudo demostrarse significación estadística entre los grupos inoculados y de placebo con los presentes datos. Los dolores abdominales y el ruido de gorgoteo fueron las reacciones notificadas más frecuentemente por los voluntarios, independientemente de la dosis. Cuatro voluntarios desarrollaron diarrea leve (grado 3). Tres de estos voluntarios recibieron la dosis alta y uno la dosis media. Un voluntario que recibió la dosis alta, defecó 5 veces heces blandas (72 h tras la inoculación) y una cantidad total de 680 g. Dos voluntarios defecaron 2 veces heces blandas 28 y 72 h tras la inoculación con cantidades totales de 220 y 500 g, respectivamente. El otro voluntario defecó una única vez una cantidad de diarrea de 300 g 73 h tras la inoculación.

Aislamiento bacteriológico de la cepa de vacuna

Tal como se indica en la tabla 4, se recuperó la cepa 638 en 37 de 42 voluntarios inoculados (88%). Para la dosis superior, la excreción de la cepa de vacuna tendía a ser máxima a las 72 h tras la inoculación. Tres de los 4 casos de diarrea se produjeron en este momento. De los 37 voluntarios que excretaron vibriones, 12 los excretaron al menos en 4 días, 19 al menos en 3 días y 28 en 2 días. El número de voluntarios que excretaron la cepa 638 y el número medio de vibriones/g de heces disminuyeron en la dosis inferior. Los vibriones aislados de las heces de los voluntarios produjeron endoglucanasa A, lo que indica que el gen indicador *celA* se mantuvo de manera estable durante el crecimiento en el intestino humano. Se concluye que la cepa 638 es un buen colonizador del intestino delgado humano.

Respuesta inmunitaria a la cepa de vacuna

La cepa 638 provocó una respuesta inmunitaria sistemática y significativa en cuanto a los anticuerpos vibriocidas séricos, IgG o IgA anti-LPS de Ogawa séricos y ASC de IgA específica de LPS de Ogawa (tablas 5 y 6). Aunque la inversa de la MGT tuvo un máximo a los 14 días tras la inoculación, se obtuvo seroconversión en el día 7 y los títulos siguieron siendo altos hasta el día 28. Las tasas de seroconversión, inversa de la MGT máxima y los títulos de ELISA fueron dependientes de la dosis. Sin embargo, incluso con la dosis menor, la cepa 638 provocó una respuesta de anticuerpos vibriocidas significativa en comparación con el placebo. Una proporción significativa de los voluntarios que experimentaron seroconversión desarrollaron títulos vibriocidas relativamente altos (≥ 1024) (tabla 6). El alto porcentaje de sujetos que respondieron en la evaluación de las ASC (tabla 5) refleja una estimulación eficaz de la inmunidad de la mucosa, principalmente de sIgA, por la cepa 638 en correspondencia con los títulos elevados de IgA anti-LPS encontrados 14 días tras la inoculación. Un voluntario que ingirió placebo experimentó seroconversión para IgG anti-LPS. Este voluntario tenía un valor de IgG sérica anti-LPS antes de la inoculación muy bajo, que aumentó hasta el valor de corte en el día 7 y permaneció constante posteriormente. Otro voluntario que ingirió placebo alcanzó el valor de corte de las ASC. De manera similar, este voluntario tuvo un número antes de la inoculación muy bajo de ASC específicas de LPS. Se concluye que la cepa 638 provoca una respuesta inmunitaria significativa.

ES 2 303 727 T3

TABLA 3

Frecuencia de aparición de reacciones adversas tras la ingestión de la cepa 638 de vacuna candidata de El Tor Ogawa

Síntoma	Grupos de voluntarios				R.R. ³	Intervalo de confianza ⁴	Probabilidad de Fisher
Diarrea	Inoculados ¹		Placebo		1,33	0,16-10,96	0,6329
	+	-	+	-			
	4	38	1	13			
	13	29	2	12			
	14	28	3	11			
Calambres abdominales	6	36	2	12	1,00	0,23-4,40	0,6850
Ruido de gorgoteo	7	35	0	14	-	-	0,1163
Pirosis	1	41	0	14	-	-	0,7500
Cefalea	Voluntarios con diarrea						
Vómitos	Peso medio de las heces diarreicas (intervalo)					425 g (220-680)	
Número medio de veces de heces diarreicas por voluntario enfermo (intervalo)						2 (1-5)	
Notas: ¹ N = 42, ² N = 14, ³ Riesgo relativo, ⁴ (95 %).							

TABLA 4

Recuperación de la cepa 638 de Vibrio cholerae a partir de las heces de voluntarios

Grupo de voluntarios	Voluntarios que excretan la cepa de vacuna/total						Media de UFC/deposición
	Tiempo tras la inoculación (h)					Total	
	24	48	72	96	120		
Dosis alta (1-2 x 10 ⁹)	7/29	10/29	16/29	15/29	10/29	28/29	4,4 x 10 ⁶
Dosis media (2 x 10 ⁸)	6/6	5/6	4/6	4/6	3/6	6/6	5,5 x 10 ⁶
Dosis baja (4 x 10 ⁷)	1/7	2/7	2/7	2/7	2/7	3/7	2,7 x 10 ⁵

TABLA 5

Respuesta de ASC de IgA anti-LPS en sangre periférica de voluntarios tras la ingestión de la cepa 638 de Vibrio cholerae

Dosis	Positivos (%)	ASC medias por 10 PBMC (intervalo)
Alta	27/29 (93,1)	485 (0-4750)
Media	6/6 (100)	377 (40-1285)
Baja	6/7 (85,7)	5 (0-65)
Placebo	1/14 (7,1)	371 (0-2040)

TABLA 6

Respuestas de anticuerpos séricos en voluntarios a los que se administra por vía oral la cepa 638 El Tor Ogawa de *Vibrio cholerae*

Grupo de voluntarios				
Respuesta	Dosis alta	Dosis media	Dosis baja	Placebo
Anticuerpos vibriocidas				
Tasa de seroconversión ¹ (%)	24/29 (82)	5/6 (83)	5/7 (71)	0/14 (0)
MGT (intervalo):				
Antes de la inoculación	47 (0-160)	32 (0-40)	33 (0-40)	37 (0-320)
Máximo tras la inoculación [14 días]	873 (0-20480)	639 (0-2560)	389 (40-2560)	46 (3-320)
Sujetos que responden con títulos ≥ 1024	10/24	4/5	4/5	0
IgG anti-LPS de Ogawa				
Tasa de seroconversión ² (%)	23/29 (79)	4/6 (67)	3/7 (44)	1/14 (7)
Log de la inversa del título ³ $\pm$ DE:				
Antes de la inoculación	0,12 $\pm$ 0,25	0,12 $\pm$ 0,29	0	0,03 $\pm$ 0,12
Máximo tras la inoculación [14 días]	1,86 $\pm$ 1,12	1,59 $\pm$ 1,49	1,07 $\pm$ 1,36	0,19 $\pm$ 0,57
IgA anti-LPS de Ogawa				
Tasa de seroconversión ² (%)	26/29 (90)	6/6 (100)	5/7 (71)	0/14 (0)
Log de la inversa del título ³ $\pm$ DE:				
Antes de la inoculación	0,1 $\pm$ 0,37	0	0,27 $\pm$ 0,37	0,13 $\pm$ 0,39
Máximo tras la inoculación [14 días]	2,43 $\pm$ 1,0	2,68 $\pm$ 0,48	1,96 $\pm$ 1,25	0,19 $\pm$ 0,53
Notas: ¹ Número de voluntarios con un aumento de cuatro veces en el título/total, ² Número de voluntarios con un aumento de dos veces en el título/total, ³ Logaritmo de la inversa de la media aritmética de los títulos. Abreviaturas: MGT, media geométrica de los títulos; DE, desviación estándar de la media				

IV Ejemplos

Los ejemplos descritos en la presente memoria se concibieron para ilustrar en vez de limitar la invención.

Construcción de candidatos de vacunas seguros a partir de cepas originales no toxinógenas

Para construir derivados defectuosos con respecto a hemaglutinina/proteasa a partir de los mutantes no toxinógenos descritos en la tabla 1 a, se procesó de igual manera cada cepa original. En primer lugar, se transfirió el vector suicida pGPH6 (figura 5) que contenía el gen de la HA/P (*hap*), inactivado mediante la inserción del gen indicador *celA*, de *E. coli* SM10.¹ al mutante no toxinógeno para producir un vector cointegrado resistente a la ampicilina. En segundo lugar, la hibridación de tipo Southern demostró que el vector cointegrado contenía el gen *hap* inactivado por inserción (*hap::celA*) y su alelo de tipo natural (*hap*) separado por ADN de vector. En tercer lugar, se permitió que el vector cointegrado resistente a la ampicilina anterior se segregara en un medio sin antibióticos y se seleccionaron las colonias sensibles a la ampicilina. Las colonias sensibles a la ampicilina designadas como 638, 1333 y L911, se caracterizaron mediante análisis de tipo Southern y demostraron que contenía el alelo mutante *hap::celA*.

Construcción de 638T, un derivado defectuoso con respecto a timidilato sintasa de cepas 638 de *Vibrio cholerae*

Para construir mutantes de *Vibrio cholerae* que eran defectuosos en la expresión de la timidilato sintasa, se clonó en primer lugar su gen codificante *thyA* y se secuenció. Se clonó el primer lugar el gen *thyA* de *Vibrio cholerae* complementando un mutante espontáneo que requiere timidina, resistente a trimetoprima de la cepa 81, con una biblioteca genómica de la cepa C7258 construida en pBR322. Se seleccionó un clon, se purificó y se llevó el inserto a

ES 2 303 727 T3

pUC19 que sirvió como molde para facilitar la secuenciación con cebadores universales. En la figura 1, SEC ID No 1, se muestran la secuencia de nucleótidos del gen *thyA* y su polipéptido previsto de la proteína ThyA.

Para construir una cepa de vacuna defectuosa con respecto a timidilato sintasa, se delecionó “*in vitro*” un fragmento de restricción interno del marco de lectura abierto de *thyA*. La delección comprendía los nucleótidos entre los sitios de restricción *MluI* y *BglII* y eliminó la secuencia de ADN que codifican para el aminoácido 7 al aminoácido 105 de la proteína ThyA. El constructo génico resultante estaba alterado en su capacidad para complementar el defecto de *thyA* del mutante espontáneo de *Vibrio cholerae* 815.

Se clonó este fragmento en el sitio de restricción *SacI* único de pCVD442 para obtener pEST (figura 6). Se transfirió este plásmido de *E. coli* SM10λpir *Vibrio cholerae* cepa 638 y se seleccionó un vector cointegrado resistente a la ampicilina. El análisis de tipo Southern del vector cointegrado demostró que pEST estaba integrado específicamente dentro del gen *thyA*. Se permitió que se segregara el vector cointegrado resistente a la ampicilina en medio sin antibióticos complementado con timidina. Se seleccionaron las colonias resistentes a la sacarosa en presencia de timidina. Se caracterizó una colonia sensible a la ampicilina, que requería timidina designada como 638T, mediante análisis de tipo Southern y demostró que contenía el alelo de *thyA* disfuncional. Se utilizó pEST para construir 638T y también será útil para construir 1333T y L911 T o cualquier otra cepa de *V. cholerae* con derivado defectuoso de *thyA* definido adicional.

Sigue una breve descripción de los dibujos.

Figura 1. Secuencia de nucleótidos del gen *thyA* y secuencia de aminoácidos prevista del polipéptido codificado.

Figura 2. Detección de vibriones del cólera marcados con *celA* en ensayos en placa que emplean agar indicador-CMC.

Figura 3. Detección de flagelos en el mutante L911 de *Vibrio cholerae* del serogrupo O139.

Figura 4. Detección de TCP sobre la superficie bacteriana de 638T.

Figura 5. Representación esquemática del vector suicida pGPH6 utilizado para construir mutantes *hap::celA* de *V. cholerae*.

Figura 6. Representación esquemática del vector suicida de pEST utilizado para construir mutantes de *thyA*.

Ventajas

Esta invención proporciona un enfoque para producir mutantes más seguros de *Vibrio cholerae* mediante inactivación del gen de la hemaglutinina/proteasa de los mutantes no toxinógenos. Tales derivados son útiles como vacunas.

La seguridad e inmunogenicidad de las cepas 638, 1333 y L911 son similares a las presentadas en la patente WO 95/18633. Adicionalmente, son representativas de todas las cepas de *Vibrio cholerae* circulantes durante la pandemia actual y del nuevo serogrupo O139. Dichas cepas también se marcan con un marcador distinguible para facilitar la toma de muestras ambiental de la vacuna. Todas las mutaciones introducidas para construir las vacunas descritas en la presente memoria están bien definidas como delecciones génicas o como inserciones génicas de naturaleza conocida. Esta invención también da a conocer un procedimiento para mejorar la bioseguridad ambiental de las cepas de cólera vivas que van a utilizarse como vacunas orales. Se logra esta mejora produciendo una mutación definida en el gen *thyA* que también se describe en la presente memoria.

La cepa de vacuna 638T se caracteriza por su bioseguridad ambiental mejorada. Presenta una auxotrofia de timidina que limita su proliferación en ecosistemas naturales, en los que son escasas las pirimidinas libres, si acaso existen.

Es improbable que la resistencia a trimetoprima conferida al candidato de vacuna de *Vibrio cholerae* 638T por su gen *thyA* mutante se transmita a otras bacterias debido a su naturaleza recesiva. Adicionalmente, la resistencia a trimetoprima está condicionada a la presencia de timina o timidina en un cultivo.

La readquisición de los genes de toxina colérica u otro ADN por medio de transferencia génica horizontal es superflua en estas cepas, puesto que no proliferan fuera del laboratorio.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de producción de una cepa de vacuna adecuada para la administración oral a seres humanos para inducir una protección inmunológica frente al cólera, **caracterizado** porque la reactogenicidad residual se elimina o se reduce hasta un nivel aceptable a partir de un mutante no toxinógeno de *Vibrio cholerae* mediante la interrupción del gen de la hemaglutinina/proteasa (*hap*) con el gen marcador *celA*, y **caracterizado** además porque se introduce una mutación definida e irreversible en su gen *thyA* mostrado en la SEC ID n°:1 que codifica para timidilato sintasa de *Vibrio cholerae*, mediante lo cual se limita la proliferación en ecosistemas naturales.

2. Utilización de una o más cepas de vacuna de *Vibrio cholerae* derivadas de cepas originales no toxinógenas en las que el nivel de reactogenicidad residual se ha eliminado o reducido hasta un nivel aceptable mediante la interrupción del gen de hemaglutinina/proteasa (*hap*) con el gen marcador *celA*, en la fabricación de una preparación farmacéutica adecuada para la administración oral a seres humanos para inducir una protección inmunológica frente al cólera y en la que dicha cepa o dichas cepas de vacuna de *Vibrio cholerae* están **caracterizadas** además porque presentan una mutación definida e irreversible introducida en su gen *thyA* mostrado en la SEC ID n°:1 que codifica para timidilato sintasa, mediante lo cual se limita la proliferación en ecosistemas naturales.

3. Utilización según la reivindicación 2, en la que dicha(s) cepa o cepas de vacuna de *Vibrio cholerae* se mezcla(n) con un 2% de tampón bicarbonato.

4. Utilización según la reivindicación 2 ó 3, de una formulación liofilizada.

5. Preparación farmacéutica con bioseguridad ambiental mejorada adecuada para la administración a seres humanos para inducir protección inmunológica frente al cólera que comprende como componente esencial una o más cepas de vacuna de *Vibrio cholerae* derivada(s) de una cepa original no toxinógena, estando la cepa o cepas **caracterizadas** porque presentan un nivel aceptable de reactogenicidad residual debido a la presencia de un gen de hemaglutinina/proteasa (*hap*) disfuncional que resulta de la interrupción del gen *hap* con el gen marcador *celA* y porque presenta además una mutación definida e irreversible introducida en el gen *thyA* mostrado en la SEC ID n°:1 que codifica para timidilato sintasa, mediante lo cual se limita la proliferación en ecosistemas naturales.



Figura 1

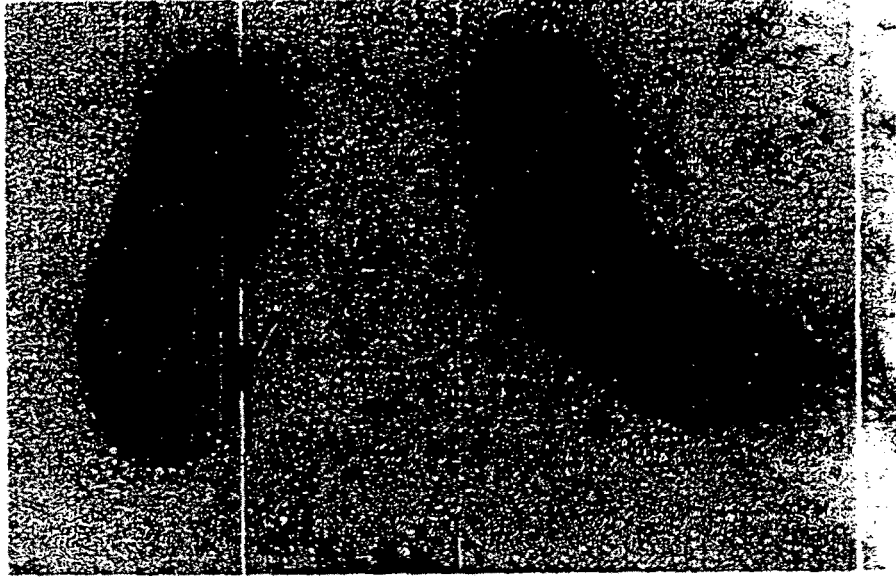


Figura 2

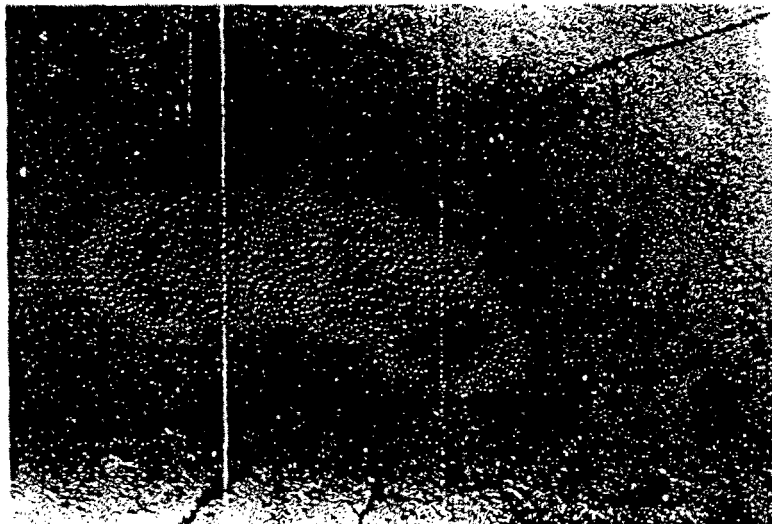


Figura 3

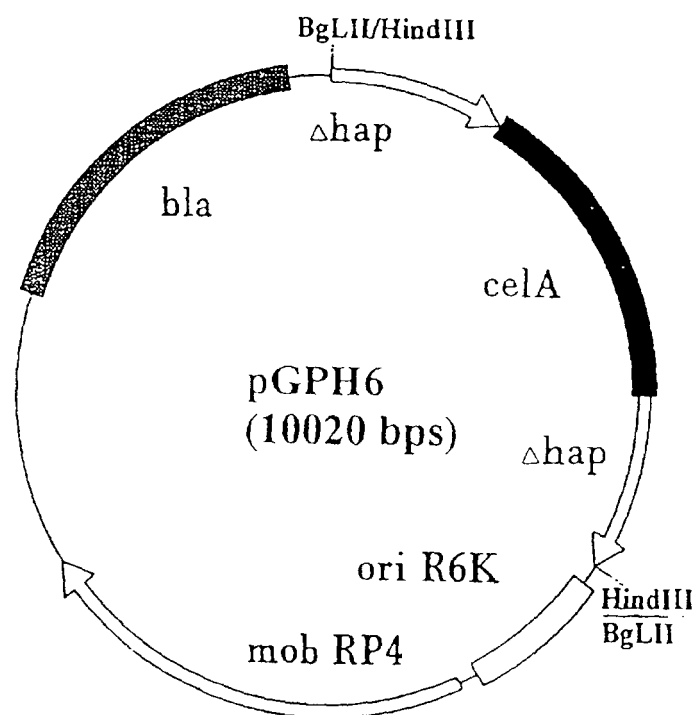


Figura 4

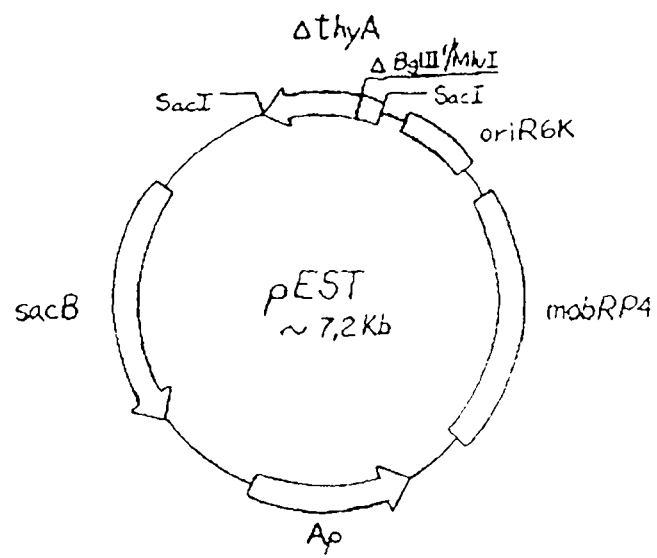


Figura 5

LISTA DE SECUENCIAS

INFORMACIÓN GENERAL

5 SOLICITANTE

NOMBRE: Centro Nacional de Investigaciones Científicas.

10 CALLE: Avenida 25, esquina a 158.

CIUDAD: Ciudad de La Habana.

PROVINCIA: Ciudad de La Habana.

PAÍS: Cuba.

15 CÓDIGO POSTAL: 12 100.

TELÉFONO: 218066, extensión 248.

FAX: 537 330497

E-MAIL: "Rafael Fando" <Fando@biocnic.cneuro.edu.cu>

20 TÍTULO: Candidatos de vacuna de *Vibrio cholerae* novedosos y procedimientos para su construcción.

NÚMERO DE SECUENCIAS: 1

DIRECCIÓN DE CORRESPONDENCIA

25 DESTINATARIO: Consultores de Marcas y Patentes "CLAIMS".

CALLE: 14 #308 e/ 3ra y 5ta Ave. Miramar, Playa.

CIUDAD: Ciudad Habana.

30 PROVINCIA: Ciudad de La Habana.

PAÍS: Cuba.

CÓDIGO POSTAL: 11 300.

35 DATOS DE LA SOLICITUD ACTUAL

NÚMERO DE SOLICITUD: 142/97

FECHA DE PRESENTACIÓN: 30 de diciembre de 1997.

40 INFORMACIÓN DEL APODERADO/AGENTE:

NOMBRE: Maria Lourdes Ruiz Sotolongo.

45 NÚMERO DE REGISTRO: 5

INFORMACIÓN PARA SEC. ID. n°: 1

50 CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

LONGITUD: 852 pares de bases.

55 TIPO: Ácido nucleico.

TIPO DE CADENA: Sencilla.

TOPOLOGÍA: lineal.

60 TIPO DE MOLÉCULA: ADN genómico.

FUENTE:

MICROORGANISMO: *Vibrio cholerae*.

65 CEPA: C7258

ES 2 303 727 T3

CARACTERÍSTICA:

NOMBRE: secuencia codificante del gen *thyA*.

UBICACIÓN: 1-852

CARACTERÍSTICA:

NOMBRE: Polipéptido deducido a partir de la secuencia codificante de *thyA*.

UBICACIÓN: 1-284.

DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº: 1

15	GTG AGA CAG TAT TTA GAT CTT TGT CAG CGC ATC GTC GAT CAA GGT	45
	M R Q Y L D L C Q R I V D Q G	
	1 5 10 15	
	GTT TGG GTT GAA AAT GAA CGA ACG GGC AAG CGT TGT TTG ACT GTG	90
	V W V E N E R T G K R C L T V	
	20 25 30	
20	ATT AAT GCC GAT TTG ACC TAC GAT GTG GGC AAC AAT CAG TTT CCT	135
	I N A D L T Y D V G N N Q F P	
	35 40 45	
	CTA GTC ACT ACA CGC AAG AGT TTT TGG AAA GCC GCC GTG GCC GAG	180
	L V T T R K S F W K A A V A E	
	50 55 60	
25	TTG CTC GGC TAT ATT CGT GGT TAC GAT AAT GCG GCG GAT TTT CGC	225
	L L G Y I R G Y D N A A D F R	
	65 70 75	
	CAA TTA GGT ACC AAA ACC TGG GAT GCT AAT GCC AAT TTA AAC CAA	270
	Q L G T K T W D A N A N L N Q	
	80 85 90	
	GCA TGG CTC AAC AAT CCT TAC CGT AAA GGT GAG GAT GAC ATG GGA	315
	A W L N N P Y R K G E D D M G	
	95 100 105	
30	CGC GTG TAT GGA GTT CAG GGT AGA GCT TGG GCT AAG CCT GAT GGT	360
	R V Y G V Q G R A W A K P D G	
	110 115 120	
	GGT CAT ATT GAC CAG TTG AAA AAG ATT GTT GAT GAT TTG AGC CGT	405
	G H I D Q L K K I V D D L S R	
	125 130 135	
35	GGC GTT GAT GAC CGA GGT GAA ATT CTT AAC TTC TAC AAT CCG GGT	450
	G V D D R G E I L N F Y N P G	
	140 145 150	
	GAA TTT CAC ATG GGG TGT TTG CGC CCT TGC ATG TAC AGC CAT CAT	495
	E F H M G C L R P C M Y S H H	
	155 160 165	
40	TTT TCA TTG CTG GGT GAT ACC TTG TAT CTC AAC AGT ACT CAG CGT	540
	F S L L G D T L Y L N S T Q R	
	170 175 180	
	TCA TGT GAT GTG CCC TTG GGG TTG AAT TTC AAC ATG GTG CAG GTT	585
	S C D V P L G L N F N M V Q V	
	185 190 195	
45	TAT GTG TTC CTT GCG CTG ATG GCA CAG ATC ACA GGG AAA AAG CCG	630
	Y V F L A L M A Q I T G K K P	
	200 205 210	
	GGC TTG GCG TAT CAC AAG ATC GTC AAT GCG CAC ATT TAC CAA GAT	675
	G L A Y H K I V N A H I Y Q D	
	215 220 225	
	CAA CTC GAA TTG ATG CGC GAT GTG CAG CTA AAA CGT GAG CCA TTC	720
	Q L E L M R D V Q L K R E P F	
	230 235 240	
50	CCA GCG CCT CAG TTC CAT ATC AAT CCA AAG ATT AAA ACA CTG CAG	765
	P A P Q F H I N P K I K T L Q	
	245 250 255	
	GAT TTG GAA ACT TGG GTC ACT TTG GAT GAT TTT GAC GTC ACC GGA	810
	D L E T W V T L D D F D V T G	
	260 265 270	
55	TAT CAG TTC CAC GAT CCT ATT CAA TAC CCG TTT TCA GTC TAA	852
	Y Q F H D P I Q Y P F S V -	
	275 280	

ES 2 303 727 T3

LISTADO DE SECUENCIAS

	<110> Centro Nacional de Investigaciones Científicas	
5	<120> Candidatos de vacuna de <i>Vibrio cholerae</i> novedosos y procedimientos para su construcción.	
	<130> incierto	
10	<140> Documento PCT/CU 98/00008	
	<141> 30-12-1998	
15	<150> Documento CU 142/97	
	<151> 30-12-1997	
	<160> 2	
20	<170> PatentIn Ver. 2.1	
	<210> 1	
	<211> 852	
25	<212> ADN	
	<213> <i>Vibrio cholerae</i>	
30	<220>	
	<221> CDS	
	<222> (1).(852)	
	<223> Secuencia de nucleótidos de <i>thyA</i>	
35	<400> 1	
	gtg aga cag tat tta gat ctt tgt cag cgc atc gtc gat caa ggt gtt 48	
40	Val Arg Gln Tyr Leu Asp Leu Cys Gln Arg Ile Val Asp Gln Gly Val	
	1 5 10 15	
	tgg gtt gaa aat gaa cga acg ggc aag cgt tgt ttg act gtg att aat 96	
	Trp Val Glu Asn Glu Arg Thr Gly Lys Arg Cys Leu Thr Val Ile Asn	
45	20 25 30	
	gcc gat ttg acc tac gat gtg ggc aac aat cag ttt cct cta gtc act 144	
	Ala Asp Leu Thr Tyr Asp Val Gly Asn Asn Gln Phe Pro Leu Val Thr	
	35 40 45	
50	aca cgc aag agt ttt tgg aaa gcc gcc gtg gcc gag ttg ctc ggc tat 192	
	Thr Arg Lys Ser Phe Trp Lys Ala Ala Val Ala Glu Leu Leu Gly Tyr	
	50 55 60	
55	att cgt ggt tac gat aat gcg gcg gat ttt cgc caa tta ggt acc aaa 240	
	Ile Arg Gly Tyr Asp Asn Ala Ala Asp Phe Arg Gln Leu Gly Thr Lys	
	65 70 75 80	
	acc tgg gat gct aat gcc aat tta aac caa gca tgg ctc aac aat cct 288	
60	Thr Trp Asp Ala Asn Ala Asn Leu Asn Gln Ala Trp Leu Asn Asn Pro	
	85 90 95	
	tac cgt aaa ggt gag gat gac atg gga cgc gtg tat gga gtt cag ggt 336	
65	Tyr Arg Lys Gly Glu Asp Asp Met Gly Arg Val Tyr Gly Val Gln Gly	
	100 105 110	

ES 2 303 727 T3

	aga gct tgg gct aag cct gat ggt ggt cat att gac cag ttg aaa aag	384
	Arg Ala Trp Ala Lys Pro Asp Gly Gly His Ile Asp Gln Leu Lys Lys	
	115 120 125	
5	att gtt gat gat ttg agc cgt ggc gtt gat gac cga ggt gaa att ctt	432
	Ile Val Asp Asp Leu Ser Arg Gly Val Asp Asp Arg Gly Glu Ile Leu	
	130 135 140	
10	aac ttc tac aat ccg ggt gaa ttt cac atg ggg tgt ttg cgc cct tgc	480
	Asn Phe Tyr Asn Pro Gly Glu Phe His Met Gly Cys Leu Arg Pro Cys	
	145 150 155 160	
15	atg tac agc cat cat ttt tca ttg ctg ggt gat acc ttg tat ctc aac	528
	Met Tyr Ser His His Phe Ser Leu Leu Gly Asp Thr Leu Tyr Leu Asn	
	165 170 175	
20	agt act cag cgt tca tgt gat gtg ccc ttg ggg ttg aat ttc aac atg	576
	Ser Thr Gln Arg Ser Cys Asp Val Pro Leu Gly Leu Asn Phe Asn Met	
	180 185 190	
25	gtg cag gtt tat gtg ttc ctt gcg ctg atg gca cag atc aca ggg aaa	624
	Val Gln Val Tyr Val Phe Leu Ala Leu Met Ala Gln Ile Thr Gly Lys	
	195 200 205	
30	aag ccg ggc ttg gcg tat cac aag atc gtc aat gcg cac att tac caa	672
	Lys Pro Gly Leu Ala Tyr His Lys Ile Val Asn Ala His Ile Tyr Gln	
	210 215 220	
35	gat caa ctc gaa ttg atg cgc gat gtg cag cta aaa cgt gag cca ttc	720
	Asp Gln Leu Glu Leu Met Arg Asp Val Gln Leu Lys Arg Glu Pro Phe	
	225 230 235 240	
40	cca gcg cct cag ttc cat atc aat cca aag att aaa aca ctg cag gat	768
	Pro Ala Pro Gln Phe His Ile Asn Pro Lys Ile Lys Thr Leu Gln Asp	
	245 250 255	
45	ttg gaa act tgg gtc act ttg gat gat ttt gac gtc acc gga tat cag	816
	Leu Glu Thr Trp Val Thr Leu Asp Asp Phe Asp Val Thr Gly Tyr Gln	
	260 265 270	
50	ttc cac gat cct att caa tac ccg ttt tca gtc taa	852
	Phe His Asp Pro Ile Gln Tyr Pro Phe Ser Val	
	275 280	

<210> 2

<211> 284

<212> PRT

<213> *Vibrio cholerae*

ES 2 303 727 T3

<400> 2

	Val Arg Gln Tyr Leu Asp Leu Cys Gln Arg Ile Val Asp Gln Gly Val
	1 5 10 15
5	Trp Val Glu Asn Glu Arg Thr Gly Lys Arg Cys Leu Thr Val Ile Asn
	20 25 30
10	Ala Asp Leu Thr Tyr Asp Val Gly Asn Asn Gln Phe Pro Leu Val Thr
	35 40 45
	Thr Arg Lys Ser Phe Trp Lys Ala Ala Val Ala Glu Leu Leu Gly Tyr
	50 55 60
15	Ile Arg Gly Tyr Asp Asn Ala Ala Asp Phe Arg Gln Leu Gly Thr Lys
	65 70 75 80
	Thr Trp Asp Ala Asn Ala Asn Leu Asn Gln Ala Trp Leu Asn Asn Pro
20	85 90 95
	Tyr Arg Lys Gly Glu Asp Asp Met Gly Arg Val Tyr Gly Val Gln Gly
	100 105 110
25	Arg Ala Trp Ala Lys Pro Asp Gly Gly His Ile Asp Gln Leu Lys Lys
	115 120 125
	Ile Val Asp Asp Leu Ser Arg Gly Val Asp Asp Arg Gly Glu Ile Leu
30	130 135 140
	Asn Phe Tyr Asn Pro Gly Glu Phe His Met Gly Cys Leu Arg Pro Cys
	145 150 155 160
35	Met Tyr Ser His His Phe Ser Leu Leu Gly Asp Thr Leu Tyr Leu Asn
	165 170 175
	Ser Thr Gln Arg Ser Cys Asp Val Pro Leu Gly Leu Asn Phe Asn Met
	180 185 190
40	Val Gln Val Tyr Val Phe Leu Ala Leu Met Ala Gln Ile Thr Gly Lys
	195 200 205
	Lys Pro Gly Leu Ala Tyr His Lys Ile Val Asn Ala His Ile Tyr Gln
45	210 215 220
	Asp Gln Leu Glu Leu Met Arg Asp Val Gln Leu Lys Arg Glu Pro Phe
	225 230 235 240
50	Pro Ala Pro Gln Phe His Ile Asn Pro Lys Ile Lys Thr Leu Gln Asp
	245 250 255
	Leu Glu Thr Trp Val Thr Leu Asp Asp Phe Asp Val Thr Gly Tyr Gln
55	260 265 270
	Phe His Asp Pro Ile Gln Tyr Pro Phe Ser Val
	275 280