



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 365 035**

51 Int. Cl.:

A61K 39/108 (2006.01)

A61K 39/112 (2006.01)

C07K 14/25 (2006.01)

C07K 14/245 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04766245 .7**

96 Fecha de presentación : **16.07.2004**

97 Número de publicación de la solicitud: **1648501**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **26.04.2006**

54

Título: **Toxinas híbridas que comprenden subunidades de la toxina similar a Shiga condensadas con subunidades de la enterotoxina termolábil de *Escherichia coli* y vacunas de las mismas.**

30

Prioridad: **21.07.2003 EP 03077266**

73

Titular/es: **INTERVET INTERNATIONAL B.V.**
Wim de Körverstraat 35
5831 AN Boxmeer, NL

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
20.09.2011

72

Inventor/es: **Vermeij, Paul**

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
20.09.2011

74

Agente: **Ungría López, Javier**

ES 2 365 035 T3

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

DESCRIPCIÓN

Toxinas híbridas que comprenden subunidades de la toxina similar a Shiga condensadas con subunidades de la enterotoxina termolábil de *Escherichia coli* y vacunas de las mismas

La presente invención se refiere a una subunidad de toxina bacteriana híbrida, a una toxina bacteriana bipartita híbrida y a moléculas de ácido nucleico que comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica dichas toxinas bacterianas. Además, la invención se refiere a vacunas que comprenden dichas toxinas bacterianas y a su uso en vacunas, a procedimientos para la preparación de dichas vacunas y al uso de dichas toxinas bacterianas para la fabricación de dichas vacunas.

Muchos miembros de las enterobacterias, tales como *Shigella* y *Escherichia coli*, se sabe que producen una o más toxinas. Entre estas hay varias potentes citotoxinas y neurotoxinas. Se sabe que *Shigella dysenteriae* produce la denominada toxina Shiga (Sandvig, K., *Toxicon* 39: 1629-1635 (2001)). Un grupo de toxinas de *Escherichia coli* muy estrechamente relacionadas es tóxico para las células del mono verde africano (vero) y, por tanto, se han conocido como verotoxinas. Estas toxinas muestran una gran semejanza con una toxina citotóxica que anteriormente se descubrió en *Shigella dysenteriae* de tipo 1, lo que explica el nombre que se les da actualmente: Toxinas similares a Shiga (SLT). Las toxinas similares a Shiga se han descrito en, entre otros, una revisión de Agbodaze, D. (*Comp. Immunol., Microbiol. & infectious diseases* 22: 221-230 (1999)) y en una revisión de O'Brian, .D. y Holmes, R.K. (*Micro-biol. Review* 51: 206-220 (1987)).

No hace falta decir que la invención es aplicable tanto a la toxina Shiga como a las toxinas similares a Shiga. Actualmente se sabe que las toxinas similares a Shiga son la causa de, entre otros, colitis hemorrágica y síndrome urémico hemolítico en seres humanos (Karmali y col., *Lancet* I: 1299-1300 (1983)), diarrea en terneros (Chanter, N., *Vet. Microbiol.* 12: 241-253 (1986) y Mainil y col., *Am. J. Vet. Res.* 48: 734-748 (1987) y enfermedad de edema en cerdos (Dobrescu, L., *Am. J. Vet. Res.* 44: 31-34 (1983), Gannon, V.P.J. y col., *Can. J. Vet. Res.* 53: 306-312 (1989), Marques, L. R. M., y col., *FEMS Microbiol. Letters* 44: 33-38 (1987), Smith, H. W. y col., *J. Gen. Microbiol.* 129: 3121-3137 (1983) y Smith, HW. y col., *J. Med. Microbiol.* 1: 45-59 (1968)).

Las manifestaciones clínicas de edema en cerdos, entre otros, disfunción neurológica, son el resultado de microangiopatía y necrosis vasculares producidas por una variante específica de la toxina similar a Shiga Stx2e (Nielsen, N. O., *Edema Disease*, p. 528-540 (1986) en A. D. Lehman, Straw, B., Glock R.D. y col. (ed.), *Diseases of swine*, 6ª ed. Iowa State University Press, Ames, USA), (Gannon, V.P.J. y col., *Can. J. Vet. Res.* 53: 306-312 (1989), Kurtz, H.J. y col., *Am. J. Vet. Res.* 30: 791-806 (1969) y Marques, L. R. M., y col., *FEMS Microbiol. Letters* 44: 33-38 (1987)). Esta variante Stx2e, también conocida en la técnica como SLT-IIe, SLT-IIv, verocitotoxina 2e y VT2e, produce una enfermedad que golpea aproximadamente una semana después del destete. La enfermedad, que se caracteriza por el edema y las posteriores alteraciones neurológicas específicas que causa, generalmente se conoce como edema posdestete (PWE) o enfermedad de edema.

La toxina Shiga y todas las toxinas similares a Shiga comparten la misma estructura general. Consisten en una única subunidad A unida a múltiples copias de una subunidad B. Normalmente, una única subunidad A está unida a un pentámero de subunidades B. La subunidad A es la parte de la toxina real: desempeña un papel en la inhibición de la síntesis de proteínas del huésped. La subunidad B, más específicamente cuando está en su forma de pentámero, está asociada con la unión al receptor. Una única subunidad B tiene un tamaño de aproximadamente 7,5 kDa, mientras que la subunidad A tiene un tamaño de aproximadamente 32 kDa.

La secuencia de ADN de la parte A1 (véase más adelante) de la variante de toxina similar a Shiga Stx2e se proporciona en la SEC ID N°: 1. La secuencia completa de muchas otras variantes de toxina similar a Shiga se puede encontrar con facilidad en el sitio web del National Center for Biotechnology Information, www.NCBI.NLM.NIH.GOV. El experto conocerá la estrategia de búsqueda, pero, simplemente como ejemplo, en el banco de nucleótidos basta con rellenar "toxina similar a Shiga" como términos de búsqueda para encontrar todas las variantes conocidas y su descripción. Como alternativa, es posible simplemente usar la secuencia de la parte A1 de la toxina similar a Shiga de la SEC ID N° 1 y volcarla contra el banco de genes bacterianos del sitio web del National Center for Biotechnology Information. Esto proporcionará igualmente otras variantes de toxina similar a Shiga.

Figura 1: Muestra una figura esquemática de una toxina similar a Shiga típica; su estructura global, la localización de las partes A1/2 (véase más adelante) de la subunidad A y la localización de las subunidades B.

Por tanto, toda la toxina se describe mejor como una toxina bipartita (es decir, una toxina que consta de dos partes), que comprende una única subunidad A y un pentámero sencillo formado por 5 subunidades B. La subunidad A como tal puede, posteriormente, estar dividida funcionalmente en una parte A1, que es la parte enzimática real, y una parte A2, que es la parte de la subunidad A que está implicada en la unión al pentámero de subunidades B. La unión de la subunidad A, a través de la parte A2 de la subunidad A, a la subunidad B sigue el principio de llave-cerradura: la parte A2 de la subunidad A de la toxina similar a Shiga sólo cabe en la subunidad B de la toxina similar a Shiga, y de ninguna otra subunidad B, aunque esté estrechamente relacionada, tal como, por ejemplo, la subunidad B de la

enterotoxina termolábil (LT) de *Escherichia coli*.

Se sabe que la vacunación con toxinas inactivadas se puede usar para prevenir enfermedades causadas por cepas de *E. coli* productoras de toxina similar a Shiga. (Awad-Masalmeh, M., en Proc of the 10th Int. Pig Vet. Soc. Congress, Río de Janeiro, Brasil (1988), Awad-Masalmeh, M., Dtsch. Tierärztl. Wochenschr. 96: 419-421 (1989), Howard, J.G., Br. J. Exp. Pathol. 36: 439-4476 (1955), Islam, M.S., y Stimson, W.H., J. Clin. Lab. Immunol. 33: 11-16 (1990), MacLeod, D.L y Gyles, D.L., Vet. Microbiol. 29: 309-318 (1991), Wadolkowsky, E.A. y col., Infect. & Immun. 58: 3959-3965 (1990), Bosworth, B.T. Infect. & Immun. 64: 55-60 (1996)). Sheoran Abhineet y col., en "Infection and Immunity" June 2003, Vol. 71, N° 6, pág. 3125-3130 y Mukherjee y col. en "Infection and Immunity", Feb. 2002 Vol. 70, N° 2, pág. 612-619 desvelan la producción y formulación en tampón de anticuerpos monoclonales específicos de Stx2.

Se conoce a organización genómica, además de la localización y la secuencia de los genes que codifican las subunidades A y B para las toxinas similares a Shiga (Spicer E.K. y col., J. Biol. Chem., 257:5716-5721 (1982), Calderwood, S.B. y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 4364-4368 (1987), Dallas W.S. y Falkow S., Nature 288: 499-501 (1980), Leong J. y col., Infect. Immun. 48: 73-77 (1985)).

Por tanto, en principio, teniendo a mano la información genética necesaria y conociendo que la vacunación con toxinas inactivadas se puede usar para prevenir enfermedades causadas por cepas de *E. coli* productoras de toxina similar a Shiga, la expresión in vitro a gran escala de los genes que codifican las subunidades A y B parece un buen punto de partida para la producción de vacunas. No obstante, contra las expectativas, aunque es muy eficiente para la producción y posterior purificación de las subunidades A y B de la enterotoxina termolábil (LT) comparable de *Escherichia coli* (véase más adelante), la expresión/purificación de la toxina Shiga y toxinas similares a Shiga resultó ser muy difícil.

En primer lugar, aunque la expresión de la subunidad B de la toxina similar a Shiga en un sistema de expresión bacteriana no es un problema (Acheson y col., Infect. & Immun. 63: 301-308 (1995)), la subunidad A de la toxina similar a Shiga no puede expresarse, o sólo en cantidades mínimas, en sistemas de expresión bacterianos.

Además, la purificación de la toxina bipartita Shiga y similar a Shiga (al contrario que la purificación de la LT) es difícil y cara. La solicitud de patente PCT WO 98/54215 proporciona modos de superar las dificultades experimentadas con la purificación, aunque depende del uso de columnas de afinidad que usan ligandos de afinidad caros que comprenden disacáridos. Para la preparación de una vacuna basada en la toxina Shiga o la toxina similar a Shiga, este procedimiento de purificación es, desde un punto de vista económico, menos deseable.

Por tanto, tanto la expresión como la purificación de una toxina Shiga o la toxina similar a Shiga siguen suponiendo un problema.

Es un objetivo de la presente invención proporcionar nuevas toxinas híbridas Shiga y similar a Shiga que no sufran los problemas identificados anteriormente.

Dichas nuevas toxinas híbridas Shiga y similar a Shiga difieren de las toxinas similares a Shiga conocidas en que comprenden la parte A 1 de la toxina similar a Shiga que está condensada a la parte A2 de la enterotoxina termolábil (LT) de *Escherichia coli*. En la situación silvestre, la parte A1 de la toxina similar a Shiga está condensada a la parte A2 de la toxina similar a Shiga.

Actualmente se ha encontrado, sorprendentemente, que esta subunidad A híbrida de Shiga o similar a Shiga, al contrario que su homólogo natural, puede expresarse de forma eficiente en sistemas de expresión bacterianos. Asimismo, puede purificarse fácilmente y mediante procedimientos baratos. Además, esta subunidad híbrida de Shiga o similar a Shiga, que comprende la parte A2 de la toxina Shiga o similar a Shiga, pero ahora condensada a la parte A2 de la LT, es, incluso más sorprendentemente, completamente capaz de inducir protección contra la toxina Shiga o similar a Shiga silvestre.

La enterotoxina termolábil (LT) de *Escherichia coli*, como la toxina similar a Shiga de *Escherichia coli*, es una toxina proteica bacteriana con una estructura multimérica AB₅, en la que el pentámero B tiene una función de unión a membrana y la subunidad A es necesaria para la actividad enzimática (Fukuta, S. y col. & Immun. 56: 1748-1753 (1988), Pickett, C.L. y col., J. Bacteriol. 165: 348-352 (1986), Okamoto, K. y col., J. Bacteriol. 180: 1368-1374 (1998) y Lea, N. y col., Microbiology 145: 999-004 (1999)).

La expresión "condensada a" significa que la secuencia de aminoácidos que constituye la parte A1 está unida covalentemente a la secuencia de aminoácidos que constituye la parte A2. Esto significa que la subunidad final forma una única proteína, como es el caso en la situación silvestre.

Por tanto, una forma de realización de la presente invención se refiere a una subunidad A híbrida-toxina bacteriana que comprende una parte A1 de la toxina similar a Shiga condensada a una parte A2 de la enterotoxina termolábil (LT) de *Escherichia coli*.

Los límites de la parte A 1 y de la parte A2 de la subunidad A pueden delinearse de un modo bastante preciso tanto para la toxina similar a Shiga como para la LT. Las partes A1 y A2 están unidas entre sí a través de un bucle corto entre dos cisteínas unidas por puentes disulfuro. Este bucle conecta la parte A1 y la parte A2. Después de la entrada de la LT o la toxina similar a Shiga en la célula de mamífero, se produce una escisión en este bucle, durante la cual la parte A1 (en el caso de la toxina similar a Shiga de 27,5 kDa) y la parte A2 (en el caso de la toxina similar a Shiga de 4,5 Kda) se separan (Okamoto, K. y col., J. Bacteriol, 180: 1368-1374 (1998) y Lea, N. y col., Microbiology 145: 999-004 (1999)).

En la secuencia como se representa en la SEC ID N° 1 se muestra un ejemplo de la secuencia de ácido nucleico de una subunidad A híbrida de acuerdo con la invención, que comprende la parte A2 de Stx2e y la parte A2 de LT. La secuencia de aminoácidos de la toxina bacteriana híbrida codificada por esta secuencia se representa en la SEC ID N° 2.

La secuencia de ácido nucleico que codifica la subunidad A híbrida comienza en la posición 1 y termina en la posición 951. En este ejemplo, la parte A1 de Stx2e de la subunidad A comienza en la posición 1 del ácido nucleico y termina en la posición 789 y justo por encima de la primera de las cisteínas unidas por puentes disulfuro. La parte A2 de LT de la subunidad A comienza en la posición 790 del ácido nucleico y termina en la posición 951.

Los residuos de cisteína unidas por puentes disulfuro están codificados en, respectivamente, las posiciones 790-792 y 826-828.

Por tanto, la parte A1 puede también denominarse la parte que está localizada en el lado del extremo N del bucle, mientras que a la parte A2 se puede hacer referencia como la parte que está localizada en el lado del extremo C del bucle.

Está claro que, en principio, el punto de transición entre la parte A1 y la parte A2 no es crítico. En el ejemplo proporcionado anteriormente, el punto de transición se localiza justo encima de la primera de las cisteínas unidas por puentes disulfuro. No obstante, podría estar igualmente bien localizado en algún punto entre los dos residuos de cisteína o justo por debajo de la segunda cisteínas unidas por puentes disulfuro en la posición 826-828, sólo hay un requisito previo; La parte A2 debe ser capaz de proporcionar inmunidad contra la toxina similar a Shiga y la parte A2 debe ser capaz de unirse al pentámero de LT. Todavía más, no hay necesidad de mantener, en la subunidad A híbrida de acuerdo con la invención, el sitio de escisión proteolítica en la subunidad A, ya que no desempeña ningún papel en la inducción de inmunidad.

Adicionalmente, se muestra en la SEC ID N° 3 en la que se localiza la subunidad LT-B. La secuencia de nucleótidos que codifica esta subunidad comienza en la posición 951 y termina en la posición 1322. Por supuesto, es beneficioso tener las secuencias nucleotídicas que codifican la subunidad a híbrida de acuerdo con la invención y la subunidad B-LT en uno y el mismo plásmido, como es el caso en este ejemplo. Dicho plásmido proporciona al mismo tiempo la información genética para las subunidades A y B de la toxina bacteriana bipartita de acuerdo con la invención. Las secuencias de codificación se pueden llevar bajo el control de uno y el mismo promotor, como es el caso en la SEC ID N° 1. Pero, si se requiere un ajuste fino de la proporción entre la subunidad A híbrida y la subunidad B-LT, podría ser beneficioso llevar la expresión de ambas bajo el control de dos promotores diferentes.

La invención es aplicable a la toxina Shiga y a todas las variantes de toxina similar a Shiga. Estas variantes incluyen las que se ha encontrado que producen enfermedades en seres humanos, así como las causantes de enfermedades en animales como se ha descrito anteriormente. Dado que se sabe que la variante de toxina similar a Shiga Stx2e produce la enfermedad posdestete en cerdos, esta variante es, claramente, un candidato atractivo para usar en vacunas en la industria porcina. Por tanto, una forma preferida de esta realización se refiere a subunidades A híbridas en las que la parte A2 de la subunidad a es una parte A2 de Stx2e.

Especialmente beneficiosa es la expresión de la subunidad A híbrida de la toxina de acuerdo con la invención en presencia del gen codificador de la subunidad B de la enterotoxina termolábil. Esto ya se ha mencionado con anterioridad. La expresión de la subunidad A híbrida de la toxina híbrida similar a Shiga de acuerdo con la invención y de la enterotoxina termolábil en la misma célula conduce a la formación espontánea de la toxina bacteriana bipartita híbrida, es decir una toxina que tiene la parte A1 de la toxina similar a Shiga condensada con la parte A2 de la LT, y unida a la subunidad B de LT.

La toxina bipartita híbrida fabricada de este modo puede, en primer lugar, expresarse con facilidad, en segundo lugar tiene las propiedades inmunogénicas de la toxina similar a Shiga, en el sentido de que puede usarse para la inducción de protección contra la toxina similar a Shiga, y en tercer lugar tiene la ventaja de que fácilmente se puede purificar de acuerdo con procedimientos conocidos para la purificación de LT (Uesaka, Y., y col., Microb. Pathog. 16: 71-76 (1994)).

Por tanto, una forma más preferida de esta realización se refiere a una toxina bacteriana bipartita híbrida que comprende cinco subunidades B de la enterotoxina termolábil de Escherichia coli (LT) y la subunidad de la toxina A

bacteriana híbrida de acuerdo con la invención.

Está claro que, dado que se conocen las secuencias nucleotídicas de los genes que codifican las subunidades A y las subunidades B de la toxina similar a Shiga y la LT, las técnicas estándar de ingeniería genética bastan para construir una secuencia de nucleótidos que codifica la subunidad A de la toxina híbrida de acuerdo con la invención. Un modo de ingeniería tal como una secuencia nucleotídica se muestra en los Ejemplos. El experto en la técnica encontrará guías suficientes, si es necesario, en este Ejemplo para fabricar secuencias nucleotídicas comparables que codifican otras variantes de toxina similar a Shiga de acuerdo con la invención.

Por tanto, otra realización de la presente invención se refiere a una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una subunidad de toxina bacteriana híbrida de acuerdo con la invención.

Sería incluso más beneficioso añadir además a dicha secuencia de nucleótidos la secuencia de nucleótidos que codifica la subunidad B de LT. La expresión de dicha secuencia de nucleótidos combinada en una célula conduciría a la producción simultánea de la subunidad A de la toxina híbrida de acuerdo con la invención y de la subunidad B de la LT. Esto, a su vez, conduce a la autoformación de la toxina bacteriana bipartita híbrida de acuerdo con la invención. Más adelante se indica cómo puede efectuarse en la práctica la expresión de las proteínas codificadas.

No obstante, aunque eficiente, no es necesario que la información genética que codifica la subunidad A híbrida y la subunidad B esté en la misma secuencia de nucleótidos. Simplemente como ejemplo, la información genética para cada una de las dos subunidades podría localizarse en su propio plásmido. Una célula huésped que comprende ambos plásmidos sería capaz de formar la proteína bacteriana bipartita híbrida de acuerdo con la invención. Es incluso posible sintetizar ambas subunidades en diferentes bacterias, para aislarlas y juntarlas en condiciones de renaturalización tras su aislamiento.

La expresión de la subunidad de la toxina bacteriana híbrida puede realizarse usando, por ejemplo, sistemas de expresión disponibles comercialmente. Por tanto, en una forma más preferida de la presente realización, la invención se refiere a fragmentos de ADN que comprenden una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una subunidad de toxina bacteriana híbrida de acuerdo con la invención. Un fragmento de ADN es una tira de nucleótidos que funciona como vehículo para una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos de acuerdo con la invención. Dichos fragmentos de ADN pueden ser, por ejemplo, plásmidos en los que se clona una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una subunidad de una toxina bacteriana híbrida de acuerdo con la invención. Dichos fragmentos de ADN son, por ejemplo, útiles para potenciar la cantidad de ADN y para la expresión de una molécula de secuencia de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una subunidad de una toxina bacteriana híbrida de acuerdo con la invención, como se describe más adelante.

Un requisito esencial para la expresión de la molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una subunidad de una toxina bacteriana híbrida es un promotor adecuado unido funcionalmente a la molécula de ácido nucleico que comprende dicha secuencia de nucleótidos, de forma que dicha molécula de ácido nucleico que comprende secuencia de nucleótidos esté bajo el control del promotor. Para los expertos en la materia es evidente que la elección de un promotor se extiende a cualquier promotor eucariótico, procariótico o viral capaz de dirigir la transcripción génica en las células usadas como células huésped para la expresión proteica. Por tanto, una forma todavía más preferida de la presente realización se refiere a una molécula de ADN recombinante que comprende un fragmento de ADN y/o una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una subunidad de toxina bacteriana híbrida de acuerdo con la invención, en la que la molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una subunidad de toxina bacteriana híbrida de acuerdo con la invención está bajo el control de un promotor unido funcionalmente. Esto se puede obtener por medio de, por ejemplo, técnicas de biología molecular estándar. (Maniatis/Sambrook (Sambrook, J. Molecular cloning: a laboratory manual, 1989. ISBN 0-87969-309-6). Los promotores unidos funcionalmente son promotores que son capaces de controlar la transcripción de la molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos a las que están unidos. Dicho promotor puede ser el promotor nativo de la toxina similar a Shiga u otro promotor de *E. coli*, siempre que el promotor sea funcional en la célula usada para expresión. También puede ser un promotor heterólogo. Cuando las células huésped son bacterias, entre las secuencias de control de la expresión que se pueden usar se incluyen el promotor y el operador *Trp* (Goeddel, y col., Nucl. Acids Res., 8, 4057, 1980); el promotor y el operador *lac* (Chang, y col., Nature, 275, 615, 1978); el promotor de la proteína de membrana externa (Nakamura, K. e Inouge, M., EMBO J., 1, 771-775, 1982); los promotores y operadores del bacteriófago *lambda* (Remaut, E. y col., Nucl. Acids Res., 11, 4677-4688, 1983, 1983); el promotor y operador de la α -amilasa (*B. subtilis*), las secuencias de terminación y otras secuencias control y de potenciación compatibles con la célula huésped seleccionada. Cuando la célula huésped es una levadura, las secuencias de control de la expresión útiles incluyen, por ejemplo, el factor α de apareamiento. Para células de insectos se pueden usar los promotores de polihedrina o p10 de baculovirus (Smith, G. E. y col., Mol. Cell. Biol. 3, 2156-65, 1983). Cuando la célula huésped es de origen vertebrado, las secuencias de control de la expresión útiles ilustrativas incluyen el promotor temprano inmediato del citomegalovirus (humano) Seed, B. y col., Nature 329, 840-842, 1987; Fynan, E. F. y col., PNAS 90, 11478-11482, 1993; Ulmer, J.B. y col., Science 259, 1745-1748, 1993), el virus del sarcoma de Rous LTR (RSV, Gorman, C.M. y col., PNAS 79, 6777-6781, 1982; Fynan y col., ant.; Ulmer y col., ant.),

el LTR del MPSV (Stacey y col., J. Virology 50,725-732, 1984), el promotor temprano inmediato de SV40 (Sprague J. y col., J. Virology 45,773, 1983), el promotor de SV-40 (Berman, PW. y col., Science, 222, 524-527, 1983), el promotor de la metalotioneína (Brinster, R.L. y col., Nature 296, 39-42, 1982), el promotor del shock térmico (Voellmy y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 4949-53, 1985), el principal promotor tardío de Ad2 y el promotor de la β -actina (Tang y col., Nature 356, 152-154, 1992). Las secuencias reguladoras pueden también incluir secuencias de terminación y de poliadenilación. Entre las secuencias que se pueden usar están la bien conocida secuencia de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina, la secuencia de poliadenilación de SV40, las secuencias de terminación y de de poliadenilación del citomegalovirus humano (hCMV).

Los sistemas de expresión en células bacterianas, levaduras, fúngicas, de insectos y de vertebrado son sistemas de uso muy frecuente. Dichos sistemas son bien conocidos en la técnica y en general están disponibles, por ejemplo comercialmente, a través de Clontech Laboratories, Inc. 4030 Fabian Way, Palo Alto, California 94303-4607, EE.UU. Además de estos sistemas de expresión, los sistemas de expresión basados en parásitos son sistemas de expresión atractivos. Estos sistemas se describen en, por ejemplo, la solicitud de patente francesa con número de publicación 2 714 074 y en la publicación US NTIS nº US 08/043109 (Hoffman, S. y Rogers, W.: Public. de fecha 1 de diciembre de 1993).

Una forma de esta realización todavía más preferida de la invención se refiere a vehículos recombinantes vivos (VRV) que comprenden una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la subunidad de la toxina bacteriana híbrida de acuerdo con la invención, un fragmento de ADN de acuerdo con la invención o una molécula de ADN recombinante de acuerdo con la invención. Estos VRV son microorganismos o virus en los que se ha clonado información genérica adicional, en este caso una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la subunidad híbrida de acuerdo con la invención. Los cerdos infectados con estos VRV producirán una respuesta inmunogénica no sólo contra los inmunógenos del vehículo, sino también contra las partes inmunogénicas de la(s) proteína(s) para la(s) cual(es) se ha clonado adicionalmente el código genético en el VRV, por ejemplo la subunidad de la toxina bacteriana híbrida nueva es de acuerdo con la invención.

Como ejemplo de VRV bacterianos, de forma muy atractiva se pueden usar cepas atenuadas de Salmonella conocidas en la técnica. Asimismo, entre otros, los parásitos vehículos recombinantes vivos han sido descritos por Vermeulen, A. N. (Int. Journ. Parasitol. 28: 1121-1130 (1998)). Asimismo, se pueden usar virus como VRV como modo de transporte de la molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos en una célula diana. Los virus que son vehículos recombinantes vivos también se denominan virus vector. Los virus que con frecuencia se usan como vectores son los virus Vaccinia (Panicali y col; Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79: 4927 (1982), herpesvirus (E.P.A. 0473210A2) y retrovirus (Valerio, D. y col; en Baum, S.J., Dicke, K.A., Lotzova, E. y Pluznik, D.H. (Eds.), Experimental Haematology today -1988. Springer Verlag, New York: pág. 92-99 (1989)).

La técnica de recombinación homóloga *in vivo*, bien conocida en la materia, se puede usar para introducir una molécula de ácido nucleico recombinante en el genoma de una bacteria, un parásito o un virus de elección capaz de inducir la expresión de la secuencia de nucleótidos insertada de acuerdo con la invención en el animal huésped.

Por último, otra forma de la presente realización de la invención se refiere a una célula huésped que comprende una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una subunidad de toxina bacteriana híbrida de acuerdo con la invención, un fragmento de ADN que comprende dicha molécula de ácido nucleico o una molécula de ADN recombinante que comprende dicha molécula de ácido nucleico bajo el control de un promotor unido funcionalmente. Esta forma también se refiere a una célula huésped que contiene un vehículo recombinante vivo que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica una secuencia de nucleótidos que codifica una subunidad de toxina bacteriana de acuerdo con la invención. Una célula huésped, quizá una célula de origen bacteriano, por ejemplo *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* y especies de *Lactobacillus*, en combinación con plásmidos basados en bacterias como pBR322, o vectores de expresión bacteriana tales como pGEX, o con bacteriófagos. La célula huésped también puede ser de origen eucariótico, por ejemplo células de levaduras en combinación con moléculas vector específicas de levaduras o células eucarióticas superiores como células de insecto (Luckow y col.; Bio-technology 6: 47-55 (1988)) en combinación con vectores o baculovirus recombinantes, células vegetales en combinación con, por ejemplo vectores basados en el plásmido Ti o vectores virales vegetales (Barton, K.A. y col.; Cell 32: 1033 (1983), células de mamífero como células Hela, células de ovario de hámster chino (CHO) o células de riñón felino Crandell, también con vectores adecuados o virus recombinantes.

Dado que ahora es posible por primera vez fabricar, en sistemas de expresión *in vitro*, cantidades suficientes de la subunidad A de la toxina híbrida y la toxina bipartita híbrida de acuerdo con la invención, se convierte en viable la fabricación de vacunas basadas en estas toxinas híbridas. Las vacunas basadas en los productos de expresión de estos genes pueden prepararse fácilmente mezclando las toxinas de acuerdo con la invención con un vehículo farmacéuticamente aceptable como se describe a continuación.

En caso necesario, la toxina puede destoxificarse de acuerdo con técnicas conocidas en la materia, por ejemplo mediante tratamiento con formalina.

Por tanto, otra realización de la invención se refiere a vacunas que comprenden una toxina bacteriana híbrida de acuerdo con la invención o una toxina bacteriana bipartita híbrida de acuerdo con la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

- 5 Otra realización de la invención se refiere al uso de una subunidad de toxina bacteriana híbrida o una toxina bacteriana bipartita híbrida de acuerdo con la invención para la fabricación de una vacuna para combatir la infección producida por *Shigella* o *Escherichia coli*.

10 Como alternativa, una vacuna de acuerdo con la invención puede comprender vehículos recombinantes vivos como se ha descrito anteriormente, capaces de expresar la proteína de acuerdo con la invención. Dichas vacunas, por ejemplo, basadas en un vehículo de *Salmonella* o un vehículo viral, por ejemplo un vector de herpesvirus, tienen la ventaja sobre las vacunas de subunidad de que imitan mejor el modo natural de infección de *Shigella* o *Escherichia coli*. Además, su auto-propagación es una ventaja ya que sólo son necesarias cantidades bajas del vehículo recombinante para la inmunización.

15 Las vacunas también pueden basarse en las células huésped que se han descrito anteriormente, que comprenden una toxina bacteriana de acuerdo con la invención

20 Por tanto, otra forma de la realización de la vacuna se refiere a vacunas que comprenden un vehículo recombinante vivo de acuerdo con la invención o una célula huésped e acuerdo con la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

25 Otra realización más de la invención se refiere al uso de un vehículo recombinante vivo o una célula huésped de acuerdo con la invención para la fabricación de una vacuna para combatir la infección producida por *Shigella* o *Escherichia coli*.

Otra realización más de la presente invención se refiere a la subunidad A de la toxina bacteriana híbrida o la toxina bipartita híbrida de acuerdo con la invención para su uso en una vacuna.

30 Otra realización más de la presente invención se refiere al vehículo recombinante vivo o a una célula huésped de acuerdo con la invención para su uso en una vacuna.

35 Todas las vacunas descritas con anterioridad contribuyen a la vacunación activa, es decir desencadenan el sistema de defensa del huésped. Como alternativa, se pueden producir anticuerpos en, por ejemplo, conejos, o pueden obtenerse a partir de líneas celulares que producen anticuerpos como se describe a continuación. Dichos anticuerpos pueden administrarse después al ser humano o animal que se va a proteger. Este método de vacunación, inmunización pasiva, es la vacunación de elección cuando un animal ya está infectado, y no hay tiempo para permitir que desencadene la respuesta inmunitaria natural. También es el método preferido para vacunar animales que son propensos a presión alta de infección repentina. Los anticuerpos administrados contra la proteína de acuerdo con la invención, o fragmentos inmunogénicos de la misma, pueden, en estos casos, unirse directamente a la toxina similar a Shiga. Esto tiene la ventaja de que disminuye o detiene los efectos dañinos de la infección con *Shigella* o *E.coli* que fabrican toxinas similares a Shiga. Por tanto, otra forma de esta realización de de la invención se refiere a una vacuna para combatir la infección con *Shigella* o *E.coli* que comprende anticuerpos contra las toxinas bacterianas híbridas de acuerdo con la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

45 La presente invención también describe anticuerpos contra las toxinas híbridas de acuerdo con la invención.

50 Los procedimientos para la producción a gran escala de anticuerpos de acuerdo con la invención también son conocidos en la técnica. Dichos procedimientos dependen de la clonación de la información genética (fragmentos de ella) que codifica la proteína de acuerdo con la invención en un fago filamentoso para la expresión en fagos. Dichas técnicas se describen en, entre otros, la "Antibody Engineering Page" en la sección "filamentous phage display" en <http://aximtl.imt.unimarburg.de/-reklaeppha.html>, y en los artículos de revisión de Cortese, R. y col., (1994) en Trends Biotechn. 12: 262-267., de Clackson, T. & Wells, J.A. (1994) en Trends Biotechn. 12: 173-183, by Marks, J.D. y col., (1992) in J. Biol. Chem. 267: 16007-16010, de Winter, G. y col., (1994) in Annu. Rev. Immunol. 12: 433-455, y de Little, M. y col., (1994) Biotechn. Adv. 12: 539-555. Los fagos se usan después para realizar detección selectiva en bibliotecas de expresión en camélidos que expresan la cadena pesada de anticuerpos de camélidos. (Muyldermans, S. y Lauwereys, M., Journ. Molec. Recogn. 12: 131-140 (1999) y Ghahroudi, M.A. y col., FEBS Letters 414: 512-526 (1997)). Las células de la biblioteca que expresan los anticuerpos deseados se pueden replicar y, después, usar para la expresión a gran escala de anticuerpos.

60 Un modo alternativo y eficaz de vacunación es la vacunación directa con ADN que codifica el antígeno relevante. La vacunación directa con ADN que codifica proteínas ha tenido éxito para muchas proteínas diferentes. (Como se revisa en, por ejemplo, Donnelly y col., The Immunologist 2: 20-26 (1993)). Este modo de vacunación también es atractivo para la vacunación de seres humanos y animales contra la infección con una cepa de *Shigella* o *Escherichia coli* productora de una toxina similar a Shiga.

Por tanto, otras formas de esta realización de la invención se refiere a vacunas que comprenden una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una toxina híbrida de acuerdo con la invención, fragmentos de ADN de acuerdo con la invención o moléculas de ADN recombinantes de acuerdo con la invención, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Ejemplos de plásmidos de ADN que son adecuados para usar en una vacuna de ADN de acuerdo con la invención son plásmidos de clonación o de expresión convencionales para células huésped bacterianas, eucarióticas y levaduras, estando dichos plásmidos disponibles comercialmente. Ejemplos bien conocidos de dichos plásmidos son pBR322 y pcDNA3 (Invitrogen). Los fragmentos de ADN o moléculas de ADN recombinante de acuerdo con la invención deberán poder inducir la expresión de proteínas de la molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos. Los fragmentos de ADN o moléculas de ADN recombinante pueden comprender una o más secuencias nucleotídicas de acuerdo con la invención. Además, los fragmentos de ADN o moléculas de ADN recombinante pueden comprender otras moléculas de ácido nucleico que comprenden una secuencia de nucleótidos tal como los oligonucleótidos estimulantes inmunitarios que tienen dinucleótidos de CpG sin mutar o secuencias de nucleótidos que codifican otras proteínas antigénicas o citocinas adyuvantes.

La molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos de acuerdo con la presente invención o el plásmido de ADN que comprende una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos de acuerdo con la presente invención, unida preferentemente de forma operable a una secuencia reguladora de la transcripción, que se va a usar en la vacuna de acuerdo con la presente invención puede estar desnuda o empaquetada en un sistema de liberación. Sistemas de liberación adecuados son vesículas lipídicas, CEI, dendrímeros, niosomas, matrices polisacáridas y similares (véase más adelante), todos bien conocidos en la técnica. También muy adecuado como sistema de liberación son las bacterias vivas atenuadas, tal como especies de *Salmonella*, y virus vivos atenuados, tales como vectores herpesvirus, como se ha mencionado anteriormente.

Las vacunas de ADN pueden administrarse fácilmente, por ejemplo, a través de aplicación intradérmica, por ejemplo, usando un inyector sin aguja. Este modo de administración libera el ADN directamente en las células del animal que se va a vacunar. Las cantidades de ADN en el intervalo entre 10 pg y 1000 µg proporcionan resultados buenos. Preferentemente, se usan cantidades en el intervalo de microgramos entre 1 y 100 µg.

Otra realización de la presente invención se refiere a una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos de acuerdo con la invención, fragmentos de ADN de acuerdo con la invención o moléculas de ADN recombinantes de acuerdo con la invención, para uso en una vacuna.

Otra realización más de la presente invención se refiere al uso de una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos, un fragmento de ADN o una molécula de ADN recombinante de acuerdo con la invención para la fabricación de una vacuna para combatir la infección producida por *Shigella* o *Escherichia coli*.

En otra realización adicional, la vacuna de acuerdo con la presente invención comprende adicionalmente uno o más antígenos derivados de otros organismos y virus patogénicos, anticuerpos contra dichos antígenos o información genética que codifica dichos antígenos.

Por supuesto, dichos antígenos pueden ser, por ejemplo, otros antígenos de *Shigella* o *Escherichia*. También puede ser un antígeno seleccionado de otro organismo o virus patogénico del cerdo. En los casos en los que la vacuna se usa para vacunar cerdos, dichos organismos y virus se seleccionan preferentemente del grupo de virus de la pseudorabia, virus de la gripe porcina, parvovirus porcino, virus de la gastroenteritis transmisible, rotavirus, *Escherichia coli*, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Bordetella bronchiseptica*, *Brachyspira hyodysenteriae*, *Shigella* sp., *Salmonella choleraesuis*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enteritidis*, *Haemophilus parasuis*, *Pasteurella multocida*, *Streptococcus suis*, *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Staphylococcus hyicus* y *Clostridium perfringens*.

Todas las vacunas de acuerdo con la presente invención comprenden un vehículo farmacéuticamente aceptable. Un vehículo farmacéuticamente aceptable puede ser, por ejemplo, agua estéril o una solución salina fisiológica estéril. En una forma más compleja, el vehículo puede, por ejemplo, ser un tampón.

Procedimientos para la preparación de una vacuna comprenden la mezcla de una proteína de acuerdo con la invención o de un fragmento inmunogénico del mismo y/o una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos y/o un fragmento de ADN, una molécula de ADN recombinante, un vehículo recombinante vivo o una célula huésped de acuerdo con la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Las vacunas de acuerdo con la presente invención pueden, en una presentación preferida, contener también una sustancia inmunoestimuladora, un denominado adyuvante. Los adyuvantes, en general, comprenden sustancias que refuerzan la respuesta inmunitaria del huésped de un modo inespecífico. En la técnica se conocen diferentes adyuvantes. Ejemplos de adyuvantes usados con frecuencia en vacunas para cerdos son dipéptidos de muramilo, lipopolisacáridos, varios glucanos y glicanos y Carbopol(R) (un homopolímero). La vacuna también puede comprender un llamado "vehículo". Un vehículo es un compuesto al que se adhiere la proteína, sin estar unida

covalentemente a él. Dichos vehículos son, entre otros, biomicrocápsulas, microalginatos, liposomas y macrosoles, todos conocidos en la técnica. Una forma especial de dicho vehículo, en el que el antígeno está parcialmente incluido en el vehículo, el denominado ISLAM (documentos EP 109.942, EP 180.564, EP 242.380).

5 Además, la vacuna puede comprender uno o más compuestos tensioactivos o emulsionantes adecuados, por ejemplo, Span o Tween.

10 A menudo, la vacuna se mezcla con estabilizadores, para, por ejemplo, proteger de la degradación a las proteínas propensas a la degradación, para potenciar el periodo de validez de la vacuna o para mejorar la eficacia de la liofilización. Estabilizantes útiles son, entre otros, SPGA (Bovamix y col.; J. Bacteriology 59: Hidratos de carbono, por ejemplo, sorbitol, manitol, trehalosa, almidón, sacarosa, dextrano o glucosa, proteínas tales como albúmina o caseína, o productos de degradación de los mimos, y tampones, tales como fosfatos de metales alcalinos.

15 Además, la vacuna puede suspenderse en un diluyente fisiológicamente aceptable. Ni que decir tiene, que también se incluyen en la presente invención otros medios para potenciar con adyuvante, añadir compuestos, vehículos o diluyentes, emulsionar o estabilizar una proteína.

20 Las vacunas basadas en las toxinas y/o subunidades bacterianas de acuerdo con la invención pueden administrarse de un modo muy adecuado en cantidades que varían entre 1 y 100 microgramos de proteína por animal, aunque en principio pueden usarse cantidades más pequeñas. Una dosis superior a 100 microgramos será, aunque inmunológicamente muy adecuada, menos atractiva por razones comerciales

25 Las vacunas basadas en vehículos recombinantes atenuados vivos, tales como los virus y bacterias VRV descritos anteriormente, pueden administrarse en dosis mucho más bajas, porque se multiplican por sí mismos durante la infección. Por lo tanto, cantidades muy adecuadas variarán entre 10^3 y 10^9 UFC/UFP para bacterias y virus respectivamente.

30 Las vacunas de acuerdo con la invención se pueden administrar por vía, por ejemplo, intradérmica, subcutánea, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, o en superficies mucosas tales como oralmente o intranasalmente.

Otra realización más de la invención se refiere al procedimiento para la preparación de una vacuna de acuerdo con la invención, en el que el procedimiento comprende la mezcla de una subunidad de toxina bacteriana híbrida o una toxina bipartita híbrida de acuerdo con la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

35 Otra realización más de la invención se refiere al procedimiento para la preparación de una vacuna de acuerdo con la invención, en el que el procedimiento comprende la mezcla de una secuencia de ácido nucleico, un fragmento de ADN o una molécula de ADN recombinante de acuerdo con la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

40 Por último, otra realización de la invención se refiere al procedimiento para la preparación de una vacuna de acuerdo con la invención, en el que el procedimiento comprende la mezcla de un vehículo recombinante vivo o una célula huésped de acuerdo con la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Ejemplos

45 Ejemplo 1

Construcción de un plásmido de expresión

Cepas bacterianas y plásmidos

50 La cepa huésped de *E. coli* BL21 (DE3)star, HMS174(DE3) y codón BL21+RIL(DE3) se adquirieron en Novagen (Madison, Wisconsin, EE.UU.). Cepa TOPIOF' de *E. coli* y plásmido pCR2. I-TOPO TA y pCR-bluntII-TOPO se adquirieron en Invitrogen (Groningen, Países Bajos).

55 Furste, J.P. y col., en Gene 48 119-131 (1986) han descrito el plásmido pMMB66HE.

Amplificación por PCR y clonación de los productos de PCR

60 La PCR del ADN cromosómico de *E. coli* se realizó con Supertaq más ADN polimerasa. La mezcla de PCR contenía 20 U/ml de Supertaq plus (HT Biotechnology Ltd, Cambridge, UK), tampón Supertaq que contiene (HT Biotechnology Ltd, Cambridge, UK), dNTO 8 mM (Promega, Wisconsin, EE.UU.), 10 pmoles de cebadores y 15 ng de ADN cromosómico de *E. coli* como molde de ADN. Las secuencias oligonucleotídicas de todos los cebadores usados para la amplificación de ADN se enumeran en la tabla 1. Los productos de PCR se separaron en gel de agarosa y se purificaron en gel usando el kit de purificación Qiagen PCR (Qiagen Inc., California, EE.UU.). La PCR de extensión con solapamiento se realizó tal como se ha descrito en Sambrook y col. (Maniatis/Sambrook (Sambrook, J. Molecular cloning: a laboratory manual, 1989. ISBN 0-87969-309-6)). Los productos de la PCR se clonaron en pCR-bluntII-topo usando el kit de clonación TOPO (Invitrogen., Groningen, Países Bajos). Las reacciones de clonación se

realizaron de acuerdo con las instrucciones de los fabricantes.

Construcción de pMMB Stx2eA₁LTA₂B

La Stx2eA se amplificó mediante PCR usando los cebadores 1832 y 1833 (véase la tabla 1) con ADN cromosómico EDNL50 como molde usando polimerasa de alta fidelidad. Se aisló EDNL50 de un cerdo con diagnóstico de enfermedad de edema posdestete. Cualquier otra cepa productora de toxina similar a Shiga podría haberse usado para ello igualmente bien. LTA2LTB que incluye el puente disulfuro se amplificó usando los cebadores 1834 y 1835 (véase la tabla 1) con el plásmido pMMB66-LT como molde usando polimerasa de alta fidelidad. De nuevo, cualquier otra cepa productora de LT podría haberse usado para ello igualmente bien. Se usó un microlitro de cada PCR en el producto de PCR con extensión por solapamiento, la PCR se realizó usando los cebadores 1832 y 1835. El producto obtenido de la PCR y el pMMB66HE se digirieron con PstI y BamHI, y después se unieron, lo que dio como resultado pMMB Stx2eA1LTA2B. El plásmido se comprobó mediante análisis de la secuencia de nucleótidos y no se encontraron artefactos. La Figura 2 muestra el esquema de construcción de pMMB Stx2eA1LTA2B.

Tabla 1

1832	AAAACTGCAGATGATGAAGTGTATATTGTAAAGTG
1833	GTTCTTGATGAATTTCCACAATTCAGTATAACGGCCACAG
1834	CTGTGGCCGTTATACTGAATTGTGGAAATTCATCAAGAAC
1835	TCATAATTCATCCCGAATTCTGTTATATATGTC

Ejemplo 2

Expresión y purificación de Sh2eA₁LTA₂B

Expresión de la proteína recombinante

Las cepas de expresión de *E. coli* que contenía un vector de expresión basado en el promotor tac se cultivaron durante la noche a 37°C a 200 rpm en 5 ml de TB con los antibióticos adecuados y MgSO₄ 10 mM. A la mañana siguiente, los cultivos de la noche se diluyeron a 1:100 en 5 ml de TB con los antibióticos adecuados. Estos cultivos se cultivaron en las mismas condiciones hasta alcanzar una DO₆₀₀ de 0,5, medida en un espectrofotómetro NovaspecII Pharmacia, Woerden, Países Bajos). En este punto, se indujeron los cultivos mediante la adición de IPTG hasta una concentración final de 1 mM y seguido de una incubación adicional a 37°C durante 3 horas. Se tomaron muestras de 100 µl para analizar al comienzo y al final de la última incubación y de los controles adecuados. Las muestras se analizaron mediante SDS-PAGE, seguido de tinción con azul de Coomassie brillante. El cultivo restante se centrifugó a 5000 rpm y el sedimento se almacenó a -20°C hasta su uso posterior.

Electroforesis en gel de poliacrilamida y transferencia de tipo western

Se realizó SDS-PAGE usando geles de 4-12% de Bis-Tris del sistema de electroforesis NuPAGE (Novex, San Diego, EE.UU.). Antes de la separación, las muestras se llevaron a ebullición durante 5 minutos con tampón de muestra (muestra:tampón= 2:1) en presencia de β-mercaptoetanol con el fin de obtener un perfil de proteína desnaturalizada. Para la separación de la proteína no desnaturalizada, el tampón de muestra sin de β-mercaptoetanol se añadió a las muestras. Estas muestras se cargaron en el gel sin calentar. Los geles se tiñeron con azul de Coomassie brillante o se transfirieron a una membrana Immobulon-P (Millipore, Bedford, EE.UU.) mediante procedimientos de transferencia de tipo western semiseca estándar.

Se produjeron anticuerpos policlonales anti-LT de conejo α0508/09HRP y anticuerpos policlonales anti-LT de conejo α0506/07 contra LT inactivada con formalina. El suero monoclonal anti-LT-A se adquirió en Biotrend (Köln, Alemania). La LT(K8425) usada como control positivo procedía de un lote de producción.

La LT se purificó en galactosa-sílice del sobrenadante del cultivo y la galactosa usada para la elución se eliminó mediante diálisis. El producto final contenía 156 mg/l de LT.

Purificación con galactosa de las proteínas expresadas

5 ml del cultivo inducido se sometieron a sonicación (Branson sonifier, Ginebra, Suiza) en un ciclo frecuente de 50% y microtip para completar la lisis. El lisado se centrifugó durante 5 minutos a 6.000 rpm para eliminar la proteína insoluble. El sobrenadante aclarado se aplicó a una columna de 1 ml de galactosa-sílice. El material de la columna fue suministrado por Organon (Oss, Países Bajos). Esta columna se pre-equilibró con 10 volúmenes de tampón TEAN (Tris 50 mM, EDTA 1 mM, azida sódica 3 mM, NaCl 200 mM, Ph 7,5). Después de la unión del sobrenadante, la columna se lavó con 5 volúmenes de tampón TEAN. La proteína purificada se eluyó con galactosa 0,5 M y se almacenó a 4°C hasta su uso posterior.

Resultados

Expresión de la proteína de fusión Stx2eA₁LTA₂B

- 5 La expresión de la proteína de fusión se analizó en tres cepas de expresión de *E. coli*. La construcción MMBStx2eA₁LTA₂B se introdujo en B121 star(DE3), HMS174(DE3) y JA221 y se indujo como se ha descrito. La cepa de expresión B121 star(DE3) dio el nivel de expresión más elevado (datos no mostrados).

Identificación de Stx2eA₁LTA₂ usando transferencia de tipo western

- 10 Los geles de SDS-PAGE descritos anteriormente se transfirieron a una membrana Immobulon-P (Millipore, Bedford, EE.UU.) mediante procedimientos de transferencia de tipo western semiseca estándar. Se produjeron anticuerpos policlonales anti-LT de conejo α 0506/07 contra LT inactivada con formalina para desarrollar la transferencia. La LT usada como control positivo se purificó del sobrenadante del cultivo usando cromatografía de afinidad (galactosa-sílice).
- 15 Como se puede observar en la figura 3, carril 2, ambas subunidades de LT reaccionaron con el antisero policlonal. LTA (26 kDa) y LTB (14,1 kDa). Esta última banda también se ve, como cabe esperar, en el carril 1 que contiene los productos de expresión de pMMB Stx2eA₁LTA₂B. La presencia del fragmento LTA₂ en Stx2eA₁LTA₂ fue suficiente para obtener una banda de Stx2cA₁LTA₂ claramente visible en el carril 1 del tamaño esperado (35,1 kDa).

Purificación con galactosa de Stx2eA₁LTA₂B

- 20 PMMB Stx2eA₁LTA₂B se indujo como se ha descrito y la proteína de fusión Stx2eA₁LTA₂B se purificó del sedimento bacteriano mediante purificación en galactosa. Los resultados se muestran en la figura 4. Esta figura muestra la cantidad y la pureza de los productos de expresión de Stx2eA₁LTA₂B en las diversas fracciones de la columna de galactosa-sílice; carril 1: marcador previamente teñido; carril 2: todo el cultivo pMMB3 Stx2eA₁LTA₂B tras inducción; carril 3: fracción no unida; carril 4: volumen de lavado 2; carril 5: volumen de lavado 5; carril 6: eluato Stx2eA₁LTA₂B purificado 1; carril 7: eluato Stx2eA₁LTA₂B purificado 2; carril 8: eluato Stx2eA₁LTA₂B purificado 3; carril 9: eluato Stx2eA₁LTA₂B 4; carril 10: eluato Stx2eA₁LTA₂B purificado 5; carril 11: eluato Stx2eA₁LTA₂B purificado 6; carril 12: eluato Stx2eA₁LTA₂B purificado 7; carril 13: eluato Stx2eA₁LTA₂B purificado 8.

Leyendas de las figuras.

- 35 Figura 1: Figura esquemática de una toxina similar a Shiga típica; se muestran su estructura global, la localización de las partes A1/2 (véase más adelante) de la subunidad A y la localización de las subunidades B.

Figura 2: Construcción de pMMB Stx2eA₁LTA₂B

- 40 Figura 3: Transferencia de tipo western desarrollada con antisero anti-LT
Carril 1: Stx2eA₁LTA₂B; carril 2: LTAIB; carril 3: Marcador previamente teñido

- Figura 4: Purificación en galactosa-sílice Gel PAAGE, teñido con azul de Coomassie
Carril 1: Marcador previamente teñido; carril 2: pMMB Stx2eA₁LTA₂B todo el cultivo tras la inducción; carril 3: Fracción no unida; carril 4: volumen de lavado 1; carril 5: volumen de lavado 5; carril 6: Eluato Stx2eA₁LTA₂B purificado 1; carril 7: eluato Stx2eA₁LTA₂B purificado 2; carril 8: eluato Stx2eA₁LTA₂B purificado 3; carril 9: eluato Stx2eA₁LTA₂B purificado 4; carril 10: eluato Stx2eA₁LTA₂B purificado 5; carril 11: eluato Stx2eA₁LTA₂B purificado 6; carril 12: eluato Stx2eA₁LTA₂B purificado 7; carril 13: eluato Stx2eA₁LTA₂B purificado 8

LISTADO DE SECUENCIAS

- 50 <110> AKZO Nobel N.V.
- <120> Vacuna de toxina similar a Shiga
- 55 <130> 2003.006
- <160> 4
- <170> PatentIn versión 3.2
- 60 <210> 1
- <211> 1325
- <212> ADN
- <213> Escherichia coli
- 65 <220>

<221> CDS

<222> (1).. (954)

<400> 1

5

atg atg aag tgt ata ttg tta aag tgg ata ctg tgt ctg tta ctg ggt	48
Met Met Lys Cys Ile Leu Leu Lys Trp Ile Leu Cys Leu Leu Gly	
1 5 10 15	
ttt tct tcg gta tcc tat tcc cag gag ttt acg ata gac ttt tcg act	96
Phe Ser Ser Val Ser Tyr Ser Gln Glu Phe Thr Ile Asp Phe Ser Thr	
20 25 30	
caa caa agt tat gta tct tcg tta aat agt ata cgg aca gtg ata tcg	144
Gln Gln Ser Tyr Val Ser Ser Leu Asn Ser Ile Arg Thr Val Ile Ser	
35 40 45	
acc cct ctt gaa cat ata tct cag gga gct aca tcg gta tcc gtt att	192
Thr Pro Leu Glu His Ile Ser Gln Gly Ala Thr Ser Val Ser Val Ile	
50 55 60	
aat cat aca cca cca gga agt tat att tcc gta ggt ata cga ggg ctt	240
Asn His Thr Pro Pro Gly Ser Tyr Ile Ser Val Gly Ile Arg Gly Leu	
65 70 75 80	
gat gtt tat cag gag cgt ttt gac cat ctt cgt ctg att att gaa cga	288
Asp Val Tyr Gln Glu Arg Phe Asp His Leu Arg Leu Ile Ile Glu Arg	
85 90 95	
aat aat tta tat gtg gct gga ttt gtt aat acg aca aca aat act ttc	336
Asn Asn Leu Tyr Val Ala Gly Phe Val Asn Thr Thr Thr Asn Thr Phe	
100 105 110	
tac aga ttt tca gat ttt gca cat ata tca ttg ccc ggt gtg aca act	384
Tyr Arg Phe Ser Asp Phe Ala His Ile Ser Leu Pro Gly Val Thr Thr	
115 120 125	
att tcc atg aca acg gac agc agt tat acc act ctg caa cgt gtc gca	432
Ile Ser Met Thr Thr Asp Ser Ser Tyr Thr Thr Leu Gln Arg Val Ala	
130 135 140	
gcg ctg gaa cgt tcc gga atg caa atc agt cgt cac tca ctg gtt tca	480
Ala Leu Glu Arg Ser Gly Met Gln Ile Ser Arg His Ser Leu Val Ser	
145 150 155 160	
tca tat ctg gcg tta atg gag ttc agt ggt aat aca atg acc aga gat	528
Ser Tyr Leu Ala Leu Met Glu Phe Ser Gly Asn Thr Met Thr Arg Asp	
165 170 175	
gca tca aga gca gtt ctg cgt ttt gtc act gtc aca gca gaa gcc tta	576

Ala Ser Arg	Ala Val Leu Arg Phe	Val Thr Val Thr Ala	Glu Ala Leu			
	180	185	190			
cgg ttc agg	caa ata cag aga	gaa ttt cgt ctg	gca ctg tct gaa act	624		
Arg Phe Arg	Gln Ile Gln Arg	Glu Phe Arg	Leu Ala Leu Ser Glu Thr			
	195	200	205			
gct cct gtt	tat acg atg acg	ccg gaa gac	gtg gac ctc act ctg aac	672		
Ala Pro Val	Tyr Thr Met Thr	Pro Glu Asp	Val Asp Leu Thr Leu Asn			
	210	215	220			
tgg ggg aga	atc agc aat gtg	ctt ccg gag	tat cgg gga gag gct ggt	720		
Trp Gly Arg	Ile Ser Asn Val	Leu Pro Glu	Tyr Arg Gly Glu Ala Gly			
	225	230	235	240		
gtc aga gtg	ggg aga ata tcc	ttt aat aat	ata tca gcg ata ctt ggt	768		
Val Arg Val	Gly Arg Ile Ser	Phe Asn Asn	Ile Ser Ala Ile Leu Gly			
	245	250	255			
act gtg gcc	gtt ata ctg aat	tgt gga aat	tca tca aga aca atc aca	816		
Thr Val Ala	Val Ile Leu Asn	Cys Gly Asn	Ser Ser Arg Thr Ile Thr			
	260	265	270			
ggt gat act	tgt aat gag gag	acc cag aat	ctg agc aca ata tat ctc	864		
Gly Asp Thr	Cys Asn Glu Glu	Thr Gln Asn	Leu Ser Thr Ile Tyr Leu			
	275	280	285			
agg gaa tat	caa tca aaa gtt	aag agg cag	ata ttt tca gac tat cag	912		
Arg Glu Tyr	Gln Ser Lys Val	Lys Arg Gln	Ile Phe Ser Asp Tyr Gln			
	290	295	300			
tca gag gtt	gac ata tat aac	aga att cgg	gat gaa tta tga	954		
Ser Glu Val	Asp Ile Tyr Asn	Arg Ile Arg	Asp Glu Leu			
	305	310	315			
ataaaagtaaa	atggttatggt	ttattttacgg	cggttactatc	ctctctatat	gcacacggag	1014
ctccccagac	tattacagaa	ctatgttcgg	aatatcgcaa	cacacaaata	tatacgataa	1074
atgacaagat	actatcatat	acggaatcga	tggcaggcaa	aagagaaatg	gttatcatta	1134
catttaagag	cggcgaaaca	tttcaggtcg	aagtcccggg	cagtcaacat	atagactccc	1194
agaaaaaagc	cattgaaagg	atgaaggaca	cattaagaat	cacatatctg	accgagacca	1254
aaattgataa	attatgtgta	tggaataata	aaacccccaa	ttcaattgcg	gcaatcagta	1314
tgaaaaacta	g					1325

<210> 2

<211> 317

5 <212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 2

Met Met Lys	Cys Ile Leu Leu	Lys Trp Ile Leu	Cys Leu Leu Leu	Gly
1	5	10	15	
Phe Ser Ser	Val Ser Tyr Ser	Gln Glu Phe Thr	Ile Asp Phe Ser	Thr
	20	25	30	
Gln Gln Ser	Tyr Val Ser Ser	Leu Asn Ser Ile	Arg Thr Val Ile	Ser
	35	40	45	

Thr Pro Leu Glu His Ile Ser Gln Gly Ala Thr Ser Val Ser Val Ile
50 55 60

Asn His Thr Pro Pro Gly Ser Tyr Ile Ser Val Gly Ile Arg Gly Leu
65 70 75 80

Asp Val Tyr Gln Glu Arg Phe Asp His Leu Arg Leu Ile Ile Glu Arg
85 90 95

Asn Asn Leu Tyr Val Ala Gly Phe Val Asn Thr Thr Thr Asn Thr Phe
100 105 110

Tyr Arg Phe Ser Asp Phe Ala His Ile Ser Leu Pro Gly Val Thr Thr
115 120 125

Ile Ser Met Thr Thr Asp Ser Ser Tyr Thr Thr Leu Gln Arg Val Ala
130 135 140

Ala Leu Glu Arg Ser Gly Met Gln Ile Ser Arg His Ser Leu Val Ser
145 150 155 160

Ser Tyr Leu Ala Leu Met Glu Phe Ser Gly Asn Thr Met Thr Arg Asp
165 170 175

Ala Ser Arg Ala Val Leu Arg Phe Val Thr Val Thr Ala Glu Ala Leu
180 185 190

Arg Phe Arg Gln Ile Gln Arg Glu Phe Arg Leu Ala Leu Ser Glu Thr
195 200 205

Ala Pro Val Tyr Thr Met Thr Pro Glu Asp Val Asp Leu Thr Leu Asn
210 215 220

Trp Gly Arg Ile Ser Asn Val Leu Pro Glu Tyr Arg Gly Glu Ala Gly
225 230 235 240

Val Arg Val Gly Arg Ile Ser Phe Asn Asn Ile Ser Ala Ile Leu Gly
245 250 255

Thr Val Ala Val Ile Leu Asn Cys Gly Asn Ser Ser Arg Thr Ile Thr
260 265 270

Gly Asp Thr Cys Asn Glu Glu Thr Gln Asn Leu Ser Thr Ile Tyr Leu
275 280 285

Arg Glu Tyr Gln Ser Lys Val Lys Arg Gln Ile Phe Ser Asp Tyr Gln
290 295 300

Ser Glu Val Asp Ile Tyr Asn Arg Ile Arg Asp Glu Leu
305 310 315

<210> 3

<211> 1325

<212> ADN

<213> Escherichia coli

<220>
 <221> CDS
 <222> (951).. (1322)

5 <400> 3

```

atgatgaagt gtatattggt aaagtggata ctgtgtctgt tactgggttt ttcttcggtg      60
tcctattccc aggagtttac gatagacttt tcgactcaac aaagttatgt atcttcggtta      120
aatagtatac ggacagtgat atcgaccctt cttgaacata tatctcaggg agctacatcg      180
gtatccgtta ttaatcatat accaccagga agttatatat ccgtaggtat acgaggggctt      240
gatgtttatc aggagcgttt tgaccatctt cgtctgatta ttgaacgaaa taatttatat      300
gtggctggat ttgttaatac gacaacaaat accttctaca gattttcaga ttttgccat      360
atatcattgc ccggtgtgac aactatttcc atgacaacgg acagcagtta taccactctg      420
caacgtgtcg cagcgtgga acgttccgga atgcaaatca gtcgtcactc actggtttca      480
tcatatctgg cggttaatga gttcagtggt aatacaatga ccagagatgc atcaagagca      540
gttctgcgtt ttgtcactgt cacagcagaa gccttacggt tcaggcaaat acagagagaa      600
tttcgtctgg cactgtctga aactgctcct gtttatacga tgacgccgga agacgtggac      660
ctcactctga actgggggag aatcagcaat gtgcttccgg agtatcgggg agaggtcgtt      720
gtcagagtgg ggagaatatc ctttaataat atatcagcga tacttggtac tgtggccgtt      780
atactgaatt gtggaaattc atcaagaaca atcacaggtg atacttgtaa tgaggagacc      840
cagaatctga gcacaatata tctcagggaa tatcaatcaa aagttaagag gcagatattt      900
tcagactatc agtcagaggt tgacatatat aacagaattc gggatgaatt atg aat      956
                                     Met Asn
                                     1

aaa gta aaa tgt tat gtt tta ttt acg gcg tta cta tcc tct cta tat      1004
Lys Val Lys Cys Tyr Val Leu Phe Thr Ala Leu Leu Ser Ser Leu Tyr
      5                      10                      15

gca cac gga gct ccc cag act att aca gaa cta tgt tcg gaa tat cgc      1052
Ala His Gly Ala Pro Gln Thr Ile Thr Glu Leu Cys Ser Glu Tyr Arg
      20                      25                      30

aac aca caa ata tat acg ata aat gac aag ata cta tca tat acg gaa      1100
Asn Thr Gln Ile Tyr Thr Ile Asn Asp Lys Ile Leu Ser Tyr Thr Glu
      35                      40                      45                      50

tcg atg gca ggc aaa aga gaa atg gtt atc att aca ttt aag agc ggc      1148
Ser Met Ala Gly Lys Arg Glu Met Val Ile Ile Thr Phe Lys Ser Gly
      55                      60                      65

gaa aca ttt cag gtc gaa gtc ccg ggc agt caa cat ata gac tcc cag      1196
Glu Thr Phe Gln Val Glu Val Pro Gly Ser Gln His Ile Asp Ser Gln
      70                      75                      80

aaa aaa gcc att gaa agg atg aag gac aca tta aga atc aca tat ctg      1244
Lys Lys Ala Ile Glu Arg Met Lys Asp Thr Leu Arg Ile Thr Tyr Leu

      85                      90                      95

acc gag acc aaa att gat aaa tta tgt gta tgg aat aat aaa acc ccc      1292
Thr Glu Thr Lys Ile Asp Lys Leu Cys Val Trp Asn Asn Lys Thr Pro
      100 .                      105                      110

aat tca att gcg gca atc agt atg aaa aac tag      1325
Asn Ser Ile Ala Ala Ile Ser Met Lys Asn
      115                      120

```

<210> 4
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Escherichia coli

5

<400> 4

```

Met Asn Lys Val Lys Cys Tyr Val Leu Phe Thr Ala Leu Leu Ser Ser
 1           5           10           15

Leu Tyr Ala His Gly Ala Pro Gln Thr Ile Thr Glu Leu Cys Ser Glu
          20           25           30

Tyr Arg Asn Thr Gln Ile Tyr Thr Ile Asn Asp Lys Ile Leu Ser Tyr
          35           40           45

Thr Glu Ser Met Ala Gly Lys Arg Glu Met Val Ile Ile Thr Phe Lys
 50           55           60

Ser Gly Glu Thr Phe Gln Val Glu Val Pro Gly Ser Gln His Ile Asp
65           70           75           80

Ser Gln Lys Lys Ala Ile Glu Arg Met Lys Asp Thr Leu Arg Ile Thr
          85           90           95

Tyr Leu Thr Glu Thr Lys Ile Asp Lys Leu Cys Val Trp Asn Asn Lys
          100          105          110

Thr Pro Asn Ser Ile Ala Ala Ile Ser Met Lys Asn
          115          120
    
```


REIVINDICACIONES

1. Subunidad de la toxina bacteriana híbrida que comprende una parte A1 de la toxina Shiga o toxina similar a Shiga condensada a una parte A2 de la enterotoxina termolábil de *Escherichia coli*.
2. Subunidad de la toxina bacteriana híbrida de acuerdo con la reivindicación 1, **que se caracteriza por que** la parte A1 es una parte A2 de Stx2e.
3. Toxina bacteriana bipartita híbrida que comprende cinco subunidades B de la enterotoxina termolábil de *Escherichia coli* y la subunidad de la toxina bacteriana híbrida de acuerdo con la reivindicación 1 o 2.
4. Una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia nucleotídica que codifica una subunidad de toxina bacteriana híbrida de acuerdo con la reivindicación 1 o 2.
5. Un fragmento de ADN que comprende una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 4.
6. Molécula de ADN recombinante que comprende una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 4 o un fragmento de ADN de acuerdo con la reivindicación 5, bajo el control de un promotor funcionalmente unido.
7. Un vehículo recombinante vivo que comprende una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 5 o una molécula de ADN recombinante de acuerdo con la reivindicación 6.
8. Célula huésped que comprende una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 4, un fragmento de ADN de acuerdo con la reivindicación 5, una molécula de ADN recombinante de acuerdo con la reivindicación 6 o un vehículo recombinante vivo de acuerdo con la reivindicación 7.
9. Subunidad de toxina bacteriana híbrida de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, una toxina bacteriana bipartita híbrida de acuerdo con la reivindicación 3, una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 4, un fragmento de ADN de acuerdo con la reivindicación 5, una molécula de ADN recombinante de acuerdo con la reivindicación 6, un vehículo recombinante vivo de acuerdo con la reivindicación 7 o una célula huésped de acuerdo con la reivindicación 8 para uso en una vacuna.
10. Vacuna que comprende una subunidad de toxina bacteriana híbrida de acuerdo con reivindicación 1 o 2 o una toxina bacteriana bipartita híbrida de acuerdo con la reivindicación 3 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
11. Vacuna que comprende una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 4, un fragmento de ADN de acuerdo con la reivindicación 5 o una molécula de ADN recombinante de acuerdo con la reivindicación 6 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
12. Vacuna que comprende un vehículo recombinante vivo de acuerdo con la reivindicación 7 o una célula huésped de acuerdo con la reivindicación 8 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
13. Vacuna de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 10-12, **caracterizada por que** dicha vacuna comprende un antígeno adicional derivado de un virus o microorganismo patógeno para seres humanos o animales, un anticuerpo contra dicho antígeno o información genética que codifica dicho antígeno.
14. Vacuna de acuerdo con la reivindicación 13, **caracterizada por que** dicho virus o microorganismo patógeno para los cerdos se selecciona del grupo de virus de la pseudorrabia, virus de la gripe porcina, parvovirus porcino, virus de la gastroenteritis transmisible, rotavirus, *Brachyspira hyodysenteriae*, *Escherichia coli*, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Bordetella bronchiseptica*, *Brachyspira hyodysenteriae*, *Shigella* sp, *Salmonella choleraesuis*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enteritidis*, *Haemophilus parasuis*, *Pasteurella multocida*, *Streptococcus suis*, *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Staphylococcus hyicus* y *Clostridium perfringens*.
15. Uso de una subunidad de toxina bacteriana híbrida de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, una toxina bacteriana bipartita híbrida de acuerdo con la reivindicación 3, una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 4, un fragmento de ADN de acuerdo con la reivindicación 5, una molécula de ADN recombinante de acuerdo con la reivindicación 6, un vehículo recombinante vivo de acuerdo con la reivindicación 7 o una célula huésped de acuerdo con la reivindicación 8 para la fabricación de una vacuna para combatir la infección por *Shigella* o *Escherichia coli*.
16. Procedimiento para la preparación de una vacuna de acuerdo con las reivindicaciones 10-14, comprendiendo dicho procedimiento la mezcla de una subunidad de toxina bacteriana híbrida de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, una toxina bacteriana bipartita híbrida de acuerdo con la reivindicación 3, una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 4, un fragmento de ADN de acuerdo con la reivindicación 5, una molécula de ADN recombinante de acuerdo con la reivindicación 6, un vehículo recombinante vivo de acuerdo con la reivindicación 7 o una célula huésped de acuerdo con la reivindicación 8 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

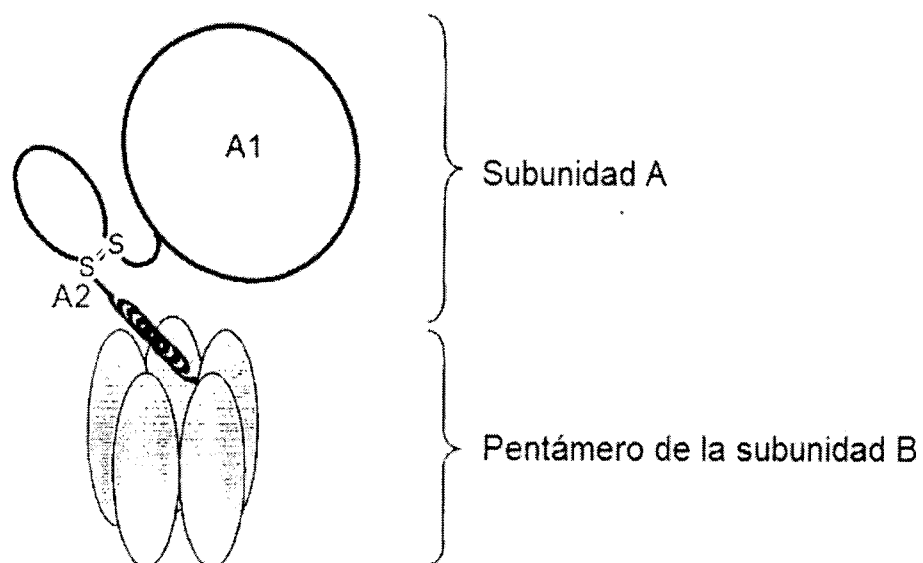


Figura 1

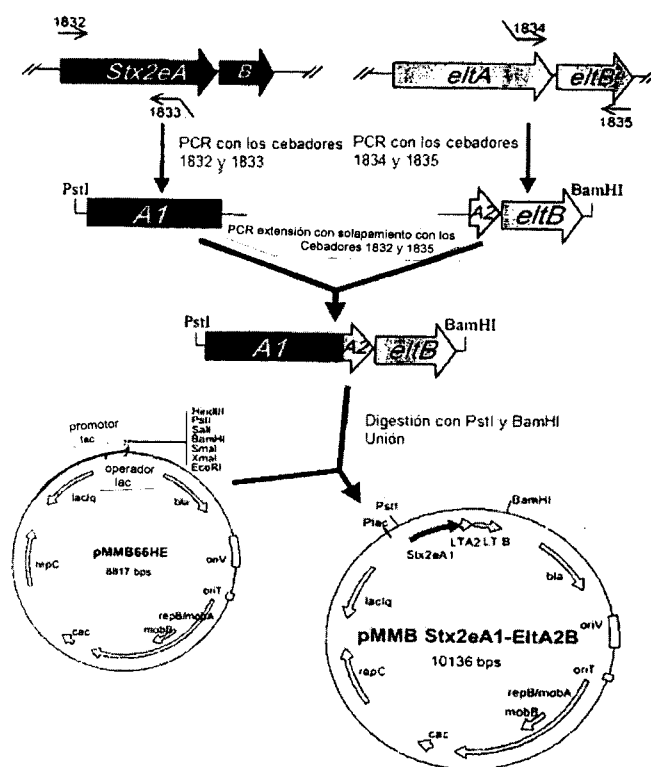


Figura 2

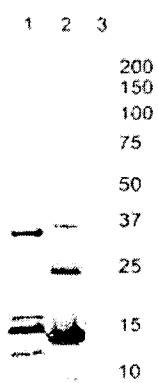


Figura 3

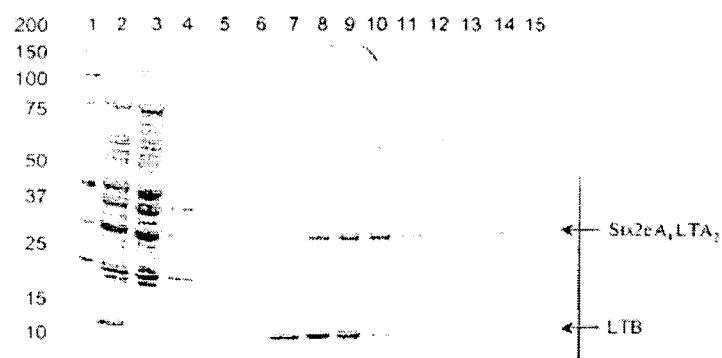


Figura 4