



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 349 114**

51 Int. Cl.:
C12N 15/62 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **01273749 .0**

96 Fecha de presentación : **23.11.2001**

97 Número de publicación de la solicitud: **1412502**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **28.04.2004**

54 Título: **Uso de hemolisina ClyA para la excreción de proteínas de fusión.**

30 Prioridad: **22.11.2000 US 252516 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
28.12.2010

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
28.12.2010

73 Titular/es: **University of Maryland
620 West Lexington Street, 4th Floor
Baltimore, Maryland 21201, US**

72 Inventor/es: **Galen, James, E.**

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 349 114 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

Apoyo gubernamental

El sistema de exportación de proteínas aquí definido fue desarrollado a través del apoyo de los proyectos 5 RO1 A129471, RO1 A140297, y Research Contract NO1 A145251 (M. M. Levine, investigador principal), del Instituto Nacional de Salud estadounidense (NIH).

Aplicaciones relacionadas

Esta aplicación reivindica prioridad a la solicitud de patente provisional No. 60/252,51B, presentada el 22 de Noviembre del 2000.

Antecedentes del invento

La descripción a continuación se refiere al uso de un sistema de exportación de proteínas. El sistema descrito proporciona métodos eficaces y composiciones útiles para la producción de proteínas recombinantes.

Descripción de la técnica relacionada

Los sistemas de expresión de proteínas han usado durante mucho tiempo plásmidos de expresión o vectores de expresión de alto número de copia en un intento de aumentar los rendimientos de proteínas recombinantes de interés. Los plásmidos de expresión de alto número de copia y las proteínas de interés que codifican pueden ejercer un efecto negativo en la idoneidad de un hospedante que contiene un plásmido de expresión. La carga notable colocada en las células hospedantes procariontas que llevan plásmidos multicopia es el resultado acumulativo de una cascada metabólica desencadenada por dos procesos: 1) la replicación y el mantenimiento de los plásmidos de expresión y 2) transcripción y traducción de las diversas funciones codificadas por los plásmidos incluyendo el gen de interés. Tales mecanismos podrían explicar la observación de que las bacterias que llevan plásmidos crecen más lento que las bacterias sin plásmidos. Esta carga puede también explicar la observación de que la tasa de crecimiento disminuye según el número de copia aumenta.

Según se expresa el gen de interés, la tasa de crecimiento de las células hospedantes recombinantes disminuye. La disminución de la tasa de crecimiento puede desencadenar la inducción de diversas proteasas celulares que pueden degradar la proteína producida de modo recombinante presente en el citoplasma de la célula hospedante. La tasa de crecimiento reducida es por tanto la inevitable consecuencia de una carga metabólica, que a su vez es el resultado acumulativo de un número de perturbaciones fisiológicas. Debido a que esta reducción en la tasa de crecimiento crea una presión selectiva para la pérdida de los plásmidos residentes en ausencia de selección, la pérdida significativa de los plásmidos de expresión a partir de la célula hospedante que lleva un vector de expresión puede tener lugar tras la transformación de la célula hospedante.

Lás células hospedantes con tasa de crecimiento reducidas pueden despojarse de modo espontáneo de un plásmido de expresión para eliminar de la célula hospedante una carga metabólica innecesaria y permitir a las células hospedantes sin plásmido crecer más rápidamente que la población de células hospedantes que llevan plásmido. Tal cambio en la expresión de proteínas dentro de una población de células hospedantes se esperaría que redujera la producción proteica.

Por consiguiente, sería deseable preparar un sistema de expresión de proteínas que optimizaría la expresión de proteínas a partir del vector de expresión mientras que minimiza la carga metabólica en la célula hospedante generada por el vector de expresión.

Sumario del invento

El material descrito se refiere al uso de una proteína de exportación para facilitar la exportación de una proteína de fusión fuera de la célula hospedante. Una realización descrita proporciona un método para expresar un gen en una célula bacteriana que comprende proporcionar un vector de expresión en una población de células hospedantes bacterianas, en la que el vector de expresión comprende un casete de expresión que comprende una secuencia que codifica una proteína de exportación genéticamente fusionada a una secuencia codificante para una proteína de interés, que expresa el casete de expresión tal que una proteína de fusión proteína de exportación–proteína de interés es producida y exportada o transportada al medio de cultivo, en el que la secuencia codificante para la proteína de exportación es seleccionada a partir del grupo que consiste en *Salmonella enterica serovar Typhi* (*S. Typhi*), el gen *cytolisina A (clyA)*, gen de *Salmonella paratyphi* (*S. paratyphi*) *clyA* o el gen de hemolisina (*hly E*) de *Escherichia coli* (*E. coli*).

Otra realización descrita se refiere al uso de una población de células hospedantes bacterianas transformadas con un vector de expresión que comprende un casete de expresión que comprende una secuencia codificante de proteína de exportación genéticamente fusionada a una secuencia que codifica una proteína de interés en la fabricación de un medicamento para obtener una respuesta inmune de un animal en el que la secuencia codificante de una proteína de exportación es seleccionada del grupo que consiste en el gen de *cytolisina A (clyA)* de *Salmonella enterica serovar Typhi* (*S. Typhi*), el gen *cly A* de *salmonella paratyphi* (*S. paratyphi*) o el gen de hemolisina E (*hly E*) de *Escherichia coli* (*E. coli*).

Otra realización descrita se refiere a un sistema para expresar una proteína de interés que comprende: un vector de expresión que comprende un casete de expresión, en el que el casete de expresión comprende una secuencia codificante de la proteína de exportación genéticamente fusionada a una secuencia codificante de una proteína de interés, una célula hospedante transformada con el vector de

expresión, y un medio de cultivo para la célula hospedante transformada, en el que el casete de expresión expresa una proteína de fusión proteína de expresión-proteína de interés, que es exportada hacia fuera de la célula hospedante transformada en el que la secuencia codificante de una proteína de exportación es seleccionada del grupo que
5 consiste en el gen de citolisina A (*clyA*) de *Salmonella enterica serovar Typhi* (*S. Typhi*), el gen *cly A* de *Salmonella paratyphi* (*S. paratyphi*) o el gen de hemolisina E (*hly E*) de *Escherichia coli* (*E. coli*).

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 proporciona ejemplos del vector de expresión de este invento. La
10 Figura 1A ilustra el vector de expresión pSEC84. La Figura 1B ilustra el vector de expresión pSEC84*bla*. La figura 1C ilustra pSEC84*sacB* (SEQ. ID N°: 18). La Figura 1D ilustra pSEC84*gfpuv*.

La Figura 2 ilustra la exportación de la proteína de fusión Cly-SacB que da como resultado la metabolización de la sacarosa en medio de crecimiento sólido. Las
15 cepas fueron hechas crecer en medio que contiene bien 8% de sacarosa (2A y 2B), 16% de sacarosa (2C y 2D), u 8% de sacarosa + 8% L-arabinosa (2E y 2F). Las Figuras 2A, 2C y 2E demuestran el crecimiento de CVD 908-*htrA* que expresa ClgA-SacB.

La Figura 3 ilustra el crecimiento de DVD 908-*htrA* que expresa bien ClgA
20 (pSEC84) o ClgA-SacB (pSEC84*sacB*), hecho crecer en caldo de cultivo 2XLB50 suplementado con DHB y bien 10% de sacarosa ó 10% de glucosa.

La Figura 4 ilustra análisis de inmunotransferencia Western de fracciones
celulares bacterianas de bien CVD 908-*htrA* (carriles 1-3) o CVD 908-*htrA*
(pSEC84*gfpuv*) (carriles 4-8). Las fracciones celulares son cargadas como sigue:
25 sobrenadantes, carriles 1 y 4; citoplásmicas, carriles 2 y 6; periplásmicas, carril 5; insoluble, carril 7; lisado celular total, carriles 3 y 8; y 50 ng GFPuv, carril 9. Las membranas con muestras idénticas fueron incubadas con anticuerpos específicos para GFPuv (panel A) o *E. coli* GroEL (panel B).

Descripción detallada de la realización preferida

30 La descripción a continuación proporciona un sistema de exportación proteica para producir eficientemente proteínas recombinantes a partir de un hospedante bacteriano. En una realización preferida, el sistema de exportación proteica utiliza la maquinaria endógena de exportación proteica a la bacteria hospedante en la que el vector del sistema de exportación proteica es introducido.

35 El sistema de exportación de proteínas tiene un número de aplicaciones útiles. El sistema puede ser usado para producir de modo eficiente proteínas recombinantes de interés dentro de una célula hospedante bacteriana y exportar la proteína recombinante de interés de la célula hospedante bacteriana. Por ejemplo, el sistema

descrito puede ser usado para producir de modo eficiente proteínas recombinantes de interés en un bioreactor.

El sistema de exportación de proteínas puede también ser usado para proporcionar a un animal material antigénico frente al cual una respuesta inmune puede ser montada. Por ejemplo en una realización una bacteria atenuada, tal como Salmonella, es transformada con los componentes del sistema de exportación de proteínas. La salmonela recombinante puede entonces ser usada como una composición inmunogénica de vector vivo capaz de facilitar la generación de una respuesta inmune en un animal. El sistema de exportación de proteínas puede ser usado con una variedad de antígenos de interés. Las composiciones inmunogénicas dirigidas frente a la fiebre tifoidea y otras enfermedades puede ser producida. Las composiciones inmunogénicas que expresan antígenos que son exportados de la bacteria recombinantes con un mínimo de lisis bacteriana son también descritas.

A. Sistemas de exportación de familias de proteínas HlyE

La descripción a continuación se refiere al uso de los miembros de la familia HlyE en un sistema de exportación de proteínas para facilitar la expresión de proteínas. Los miembros de la familia HlyE pueden ser usados para facilitar la exportación de proteínas producidas de modo recombinante a partir de los hospedantes bacterianos. Los sistemas de expresión que exportan proteínas producidas de modo recombinantes se cree que facilitan la producción aumentada de proteínas. El sistema de exportación de proteínas descrito puede también ser usado para preparar las composiciones inmunogénicas con las cuales vacunar a los animales.

Se ha observado que las tasas de crecimiento de los organismos recombinantes que contiene vectores de expresión disminuyen según el nivel de expresión de un gen de interés aumenta. La disminución en el crecimiento puede desencadenar la inducción de diversas proteasas celulares que pueden degradar la proteína recombinante expresada. La tasa de crecimiento reducida es por lo tanto la consecuencia inevitable de la carga metabólica, que a su vez, es el resultado acumulativo de un número de perturbaciones fisiológicas. Por ejemplo, las perturbaciones fisiológicas son el resultado de la expresión y acumulación de la proteína de interés dentro de la bacteria hospedante. Esta acumulación puede ser dañina para la viabilidad de la bacteria hospedante y así una presión de selección negativa.

Debido a que las cargas metabólicas tales como las descritas anteriormente crean una presión selectiva para la pérdida del vector de expresión residente en ausencia de selección, una pérdida significativa del vector de expresión a partir de la bacteria hospedante puede tener lugar una vez que la bacteria hospedante ha sido

transformada con el vector de expresión que contiene el gen de interés. La pérdida espontánea del plásmido elimina cualquier carga metabólica de la bacteria hospedante y permite a las bacterias sin plásmido crecer más rápidamente que la población de bacterias que llevan plásmido. El sobrecrecimiento de células bacterianas que no contienen el vector de expresión y por tanto no expresan la proteína de interés reduce los niveles generales de producción de proteína. Por lo tanto, las bacterias hospedantes que no están obligadas genéticamente a mantener los vectores de expresión que dirigen la síntesis de altos niveles de una proteína de interés dada pueden producir significativamente menos proteína.

Una realización preferida para exportar la proteína de interés expresada de modo recombinante comprende hacer uso de un sistema de exportación endógeno en la bacteria hospedante que contiene el vector de expresión. El uso de un sistema de exportación endógeno es ventajoso en parte debido a que evita la necesidad de grandes cantidades de ADN heterólogo que codifica proteínas exóticas para suplir un sistema de exportación exógeno. Sin embargo, los sistemas de exportación de proteínas que utilizan los sistemas de exportación exógenos están también abarcados por la presente descripción.

Un sistema candidato atractivo de exportación endógena es la hemolisina críptica codificada por Cytolisina A (*clyA*) dentro del cromosoma de la *Salmonella enterica serovar Typhi* (de aquí en adelante "*S. Typhi*"), un miembro de la familia de proteínas HlyE. La familia de HlyE consiste en una proteína única, HlyE, y sus homólogo cercano de *E. coli*, *Shigella flexneri* y *S. Typhi*, y otras bacterias. La proteína de *E. coli* es una proteína funcionalmente bien caracterizada, que forma poros, hemolisina codificada en el cromosoma también llamada ClyA, HlyE, y hemolisina A silenciosa (*SheA*). Consiste en 303 residuos de aminoácidos (34 Kda). Su transcripción está positivamente controlada por SlyA, un regulador encontrado en varias bacterias entéricas. HlyE forma poros transmembrana estables, moderadamente selectivos de cationes con un diámetro de 2,5-3,0 nm en bicapas lipídicas. La proteína se une al colesterol, y la formación de poros en una membrana es estimulada si la membrana contiene colesterol. La estructura cristalina de *E. coli* HlyE ha sido resuelta a una resolución de 2,0 Å, y la visualización de la forma asociada a lípidos de la toxina a baja resolución ha sido lograda mediante microscopía electrónica. La estructura exhibe un huso de hélice elaborado de unos 100 Å de largo. Oligomeriza en presencia de lípidos para formar poros transmembrana.

B. Sistema de exportación de proteínas de Cytolisina A (ClyA)

Una realización preferida de la presente descripción se refiere al uso de la proteína ClyA, un miembro de la familia HlyE, en un sistema de exportación de proteínas. Un gen *clyA* de aproximadamente 1 kb fue clonado a partir de CVD 908-

htrA de *S. Typhi* para su uso en un sistema de exportación de proteínas. La proteína ClyA es exportada tanto de *E. coli* como de *S. Typhi* y es capaz de exportar proteínas pasajeras que han sido genéticamente fusionadas al extremo 3' terminal del marco de lectura abierto de *clyA*. La proteína pasajera a la que se hace referencia aquí es también referida como proteína de interés. Se demuestra que el plegamiento apropiado de estas proteínas de fusión tiene lugar de tal modo que la actividad biológica inherente de los dominios implicados es observada.

Citolisina A (ClyA) de *S. Typhi* fue primero descrita por Wallace y otros, que también documentaron la estructura cristalina para la hemolisina homóloga de *E. coli* (Wallace, A.J., T. J. Stillman, A. Atkins, S.J. Jamieson, P. A. Bullough, J. Green, y P. J. Artymiuk. 2000. *E. coli* hemolysine E (HlyE, Clga, SheA): X-ray crystal structure of the toxin and observation of membrane pores by electron microscopy. *Cell* 100: 265-276). Esta hemolisina ha sido descrita previamente y referida de modo variado como *ClyA*, *HlyE*, o *SheA*. Para evitar confusiones, la hemolisina de *E. coli* es hecha aquí referencia como HlyE y es codificada por *hlyE*. También por claridad, la hemolisina de *S. Typhi* es referida aquí como ClyA, que está codificada por *clyA*.

A modo ilustrativo, la estructura proteica de los miembros de la familia HlyE es tratada mediante referencia a la proteína HlyE de *E. coli*. Hly es una molécula en forma de bastón curvo con una región transmembrana de 27 residuos hidrofóbicos. Esta región comprende un extremo terminal de la molécula plegada y se propone que forma un poro dentro de la membrana diana. La formación del poro lleva finalmente a la lisis de la célula diana. En estudios de microscopía electrónica elegantes, Wallace y otros, mostraron que HlyE se inserta en vesículas lipídicas para formar poros comprendidos de 8 monómeros de HlyE.

Aunque la formación de poros facilitada por HlyE ha sido elucidada, el mecanismo por el cual HlyE y homólogos de HlyE son exportados fuera de una bacteria aún están poco claros. Por otro lado, la manera por la cual la hemolisina se inserta en membranas diana para su ensamblaje en poros tampoco está bien comprendida. Del Castillo y otros, describieron la secreción dependiente de la fase de crecimiento de la actividad hemolítica que tiene su máximo durante la fase media-logarítmica y se desvanece durante el inicio de la fase estacionaria. (del Castillo, F. J., S. C. Leal, F. Moreno, e I. del Castillo. 1997. The *Escherichia coli* K-12 *sheA* gene encodes a 34-kDa secreted hemolysin. *Mol. Microbiol.* 25: 107-115). Ludwig y colegas han documentado que la secreción de esta hemolisina críptica está acompañada por la fuga de proteínas confinadas en el periplasma, pero no está acompañada por la pérdida de proteínas citoplasmáticas, argumentando de modo indiscutible en contra de que la lisis celular libere HlyE (Ludwig. A., S. Bauer, R. Benz, B. Bergmann, y W. Goebel. 1999. Analysis of the *sklyA*-controlled expression, subcellular localization and

pore-forming activity of a 34 kDa Haemolysin (ClyA) de *Escherichia coli* K-12. *Mol. Microbiol.* 31:557-567).

Además, cuando se compara con la secuencia codificada por hlyE, la secuenciación del extremo N-terminal de la HlyE secretada reveló que HlyE no está procesada en el extremo N-terminal durante el transporte. Oscarsson y otros, documentaron que HlyE se une al colesterol y que la presencia del colesterol en membranas diana estimula la formación de poros y la lisis. (Oscarsson, J., Y. Mizunoe, L. Li, X. Lai, A. Wieslander, y B. E. Uhlin. 1999. Molecular analysis of the cytolytic protein ClyA (SheA) from *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 32:1226-1238.) Se estima que $\sim 10^3$ moléculas de HlyE son requeridas para la lisis de un eritrocito diana sugiriendo una acumulación significativa de HlyE previamente a la detección de la lisis celular. HlyE es notablemente estable dentro de un intervalo de valores de pH entre 3,0 y 9,0 y es resistente al corte por proteasas incluyendo tripsina y pepsina. (Atkins, A., N. R. Wyborn, A. J. Wallace, T. J. Stillman, L.K. Black, A. B. Fielding, M. Hisakado, P. J. Artymiuk, y J. Green. 2000. Structure-function relationships of a novel bacterial toxin, Hemolysin E. The role of α_G . *J. Biol. Chem.* 275:41150-41155).

El nucleótido y la secuencia aminoacídica para el gen *clyA* aislado y la proteína ClyA usada en el trabajo descrito son proporcionados como los nucleótidos 516-1436 de la SEQ ID N° 1 y SEQ ID N° 2, respectivamente. Otros miembros de la familia HlyE están también disponibles y son conocidos por aquellos con conocimiento común en la técnica. Por ejemplo, otro gen *clyA* de *S. Typhi* para la citolisina A está disponible con el número de acceso al GENBANK N° AJ313034; la secuencia del gen *clyA* de *Salmonella paratyphi* para la citolisina A está disponible con el número de acceso del GENBANK N° AJ313033; la secuencia codificante del gen completo (hlyE) de la proteína HlyE truncada de *Shigella flexneri* está disponible con el número de acceso del GENBANK N° AF200955; y la secuencia del gen hlyE de *Escherichia coli* está disponible con el número de acceso del GENBANK n° AJ001829.

La familia de proteínas HlyE típicamente causa hemólisis en células diana. Los miembros de la familia HlyE hemolíticamente activa o inactiva pueden ambos ser usados con las enseñanzas descritas. Por ejemplo, se conoce que la mutación del gen hlyE puede reducir o eliminar la actividad hemolítica. Por ejemplo, la pérdida de actividad hemolítica ha sido documentada cuando hlyE es mutada tal que las sustituciones aminoacídicas tienen lugar en las posiciones 180, 185, 187, y 193. Específicamente, G180V, V185S, A187S, e I193S tienen como resultado una pérdida de actividad homolítica de la proteína HlyE expresada a partir del gen *hlyE* mutado.

La presente descripción utiliza las características de exportación de la familia HlyE de proteínas para producir un sistema de exportación de proteínas. Por ejemplo, la fusión de proteínas que comprende cualquier miembro de la familia HlyE y una

proteína de interés están descritas. Más específicamente, las proteínas de fusión que comprenden ClyA y una proteína de interés están descritas. Como se describe a continuación, las proteínas de fusión que contienen ClyA son exportadas de la célula hospedante bacteriana y en el medio circundante. Esta característica del sistema de expresión que comprende un componente de una proteína de fusión proteína de exportación:proteína de interés que facilita la producción de la proteína de interés y la exportación de la proteína de fusión proteína de exportación:proteína de interés.

Vectores de expresión de la proteína de exportación

El sistema de exportación de proteínas descrito aquí puede ser usado para expresar y exportar una amplia variedad de proteínas de fusión que comprenden una proteína de expresión y una proteína de interés. La proteína de exportación es seleccionada de la familia de proteínas HlyE. En una realización, la proteína de interés es codificada por un gen de interés. El gen de interés puede ser extraño a la bacteria que contiene el sistema de exportación de proteínas o puede ser un gen que es endógeno para la bacteria. Típicamente, una construcción de una proteína de fusión proteína de exportación:proteína de interés está presente en un casete de expresión, que a su vez está presente en un vector de expresión. Cada una de estas unidades son tratadas a continuación.

Los vectores de expresión.

El sistema de exportación de proteínas utiliza un vector de expresión para facilitar la producción recombinante de la proteína de interés. Típicamente, el vector de expresión comprenderá un origen de replicación y otras características estructurales que controlan y regulan el mantenimiento del vector de expresión en la célula hospedante. Por definición, el término "vector de expresión" se refiere a un plásmido, virus y otros vehículos conocidos en la técnica que ha sido manipulado por la inserción o incorporación del casete de expresión que comprende el casete de expresión de la proteína de fusión proteína de exportación:proteína de interés. Un ejemplo de un sistema vector de expresión que muestra los vectores de expresión que confieren estabilidad plasmídica a dos niveles independientes como se describen en Galen, y otros, Immun. 67:6424-6433 (1999) y en las solicitudes de patentes norteamericanas N°s 09/204,117, presentada el 2 de Diciembre de 1998 y 09/453.313, presentada el 2 de Diciembre de 1999.

Casetes de expresión de proteína de fusión-proteína de exportación

El sistema de exportación de proteínas descrito aquí puede ser usado para expresar y exportar una amplia variedad de proteínas de fusión que comprenden una proteína de exportación y una proteína de interés. La proteína de interés está codificada por la secuencia que codifica la proteína de interés que es también el gen de interés. El gen de interés puede ser extraño a la bacteria que contiene el sistema

de exportación de proteína o puede ser un gen que es endógeno de la bacteria. La proteína de interés puede oscilar desde un aminoácido único a proteínas varias veces el tamaño de la molécula de proteína de exportación. Más preferiblemente, la proteína de interés puede oscilar desde diez aminoácidos hasta dos veces el tamaño de la proteína de exportación. Es preferible que el tamaño de la proteína de interés sea tal que no interfiera con la capacidad de la proteína de exportación a ser exportada completamente fuera de la bacteria. De modo ejemplar las proteínas de interés van desde 0 KDa hasta al menos 50 kDa en masa. Masas mayores, y por lo tanto proteínas más largas pueden también ser usadas como proteínas de interés. Por ejemplo, las proteínas de interés pueden tener una masa de 55 KDa, 60 KDa, 65 KDa, 70 KDa, 75 KDa, 80 KDa, 85 KDa, 90 KDa, 95 KDa, 100 KDa, o más largas.

Alternativamente, la proteína de interés puede consistir en 1 a 1000 aminoácidos o más. Por ejemplo, la proteína de interés puede tener 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, 1000 aminoácidos, o más.

Típicamente, el gen de interés a ser expresado está presente en un casete de expresión. Un casete de expresión contendrá típicamente caacterísticas estructurales adecuadas, tal como un promotor, terminador, etc., para permitir la transcripción del gen de interés.

Las secuencias polinucleotídicas que codifican una proteína de fusión proteína de exportación:proteína de interés (también conocida como “secuencias codificante de proteínas de fusión proteína de exportación:proteína de interés”) pueden estar operativamente unidas a las secuencias de expresión testigo para formar un casete de expresión. El término “operativamente unido” se refiere a la yuxtaposición en la que los componentes así descritos están en una relación que les permite funcionar en la manera intencionada. Una secuencia testigo de expresión unida operativamente a una secuencia codificante es ligada de tal modo que la expresión de la secuencia codificante es lograda en condiciones compatibles con las secuencias testigo de expresión. Como se usa aquí, el término “secuencias testigo de expresión” se refiere a secuencias de ácidos nucleidos que regulan la expresión de una secuencia de ácidos nucleicos a la cual está operativamente unida. Las secuencias de expresión testigo están operativamente unidas a la secuencia de ácidos nucleicos cuando las secuencias de expresión testigo controlan y regulan la transcripción y, según es apropiado, la traducción de la secuencia de ácidos nucléicos. Así, las secuencias de expresión testigo pueden incluir promotores apropiados, terminadores de transcripción, secuencias de unión a ribosomas optimizadas, un codon de inicio (es decir, ATG) enfrente del gen que codifica la proteína, el marco de lectura abierto correcto del gen que permitirá la traducción apropiada de mRNA, y códones stop. El término

“secuencias testigo” pretenden incluir, un mínimo de componentes cuya presencia puede influenciar la expresión, y puede también incluir componentes adicionales cuya presencia es ventajosa, por ejemplo, secuencias líderes. Las secuencias de expresión testigo pueden incluir un promotor.

5 Un “promotor” es la secuencia mínima suficiente para la transcripción directa. También incluidos en el invento están los elementos promotores que son suficientes para hacer que la expresión génica dependiente de promotor sea controlable por señales específicas de célula, específica de tejido, o inducible por señales o agentes externos: tales elementos pueden estar situados en las regiones 5’ o 3’ de la
10 secuencia codificante para la proteína de fusión proteína de exportación:proteína de interés. Ambos promotores constitutivos e inducibles son útiles en los métodos descritos. La expresión de las secuencias codificantes de la proteína de fusión proteína de exportación:proteína de interés puede ser conducida por un número de promotores. Aunque el promotor endógeno de una proteína de exportación puede ser
15 utilizado para la regulación de la transcripción del casete de expresión, preferiblemente, el promotor es una secuencia reguladora extraña. Un ejemplo del promotor endógeno inducible es el promotor *ompC* que puede ser usado para dirigir la transcripción del casete de expresión.

Los promotores útiles en el invento incluyen tanto promotores constitutivos
20 como inducibles naturales así como promotores diseñados mediante ingeniería genética. Un promotor inducible preferido debería 1) proporcionar una expresión baja en ausencia del inductor, 2) proporcionar elevada expresión en presencia del inductor; 3) usar un esquema de inducción que no interfiera con la fisiología normal de la célula hospedante; y 4) que tenga poco o ningún efecto en la expresión de otros genes.
25 Ejemplos de promotores inducibles incluyen aquellos inducidos por medios químicos. Aquellos con experiencia en la técnica conocerán otros promotores, tanto constitutivos como inducibles.

El promotor particular seleccionado debería ser capaz de causar una expresión suficiente para resultar en la producción de una cantidad eficaz de la
30 proteína de fusión proteína de exportación:proteína de interés. La cantidad eficaz de la proteína de fusión proteína de exportación:proteína de interés puede variar dependiendo del objetivo de la expresión. Los promotores usados en las construcciones vectores de la presente descripción pueden ser modificadas, si se desea, para afectar sus características de control.

35 La proteína de fusión proteína de exportación:proteína de interés que comprende la proteína de exportación y la proteína de interés puede comprender además los marcajes de purificación insertados mediante ingeniería en casetes de expresión para ser expresadas como una parte de la proteína de fusión proteína de

exportación:proteína de interés. El marcaje es elegido para facilitar la purificación de la proteína de fusión proteína de exportación:proteína de interés y/o la proteína de interés producida por los métodos descritos. Por ejemplo, una pluralidad de residuos de histidina pueden ser incorporados mediante ingeniería en la porción C terminal o
5 porción N-terminal de la proteína de interés par facilitar la purificación de proteínas. Es preferible que la introducción del marcaje minimice el plegamiento inadecuado de la proteína de interés.

Además de el marcaje de polihistidina, hay un número de otros marcajes proteicos que pueden ser usados para facilitar la purificación proteica. Por ejemplo, los
10 marcajes antigénicos tales como el marcaje de proteína de unión a maltosa, un marcaje del epítipo c-myc, un marcaje de proteína verde fluorescente, un marcaje de luciferasa, un marcaje de beta galactosidasa, un marcaje de polihistidina, o cualquier otra marca de proteína de expresión que puede ser usada con el sistema descrito.

La proteína de fusión proteína de exportación:proteína de interés que
15 comprende la proteína de exportación y la proteína de interés puede comprender además características adicionales para facilitar el uso de la proteína expresada y exportada. Por ejemplo, los sitios de reconocimiento de proteasas pueden ser hechos mediante ingeniería entre diversos componentes de la proteína de fusión proteína de exportación: proteína de interés, incluyendo, si es aplicable, los marcajes descritos
20 anteriormente, para promover la separación de los componentes de la proteína de fusión proteína de exportación:proteína de interés. Por ejemplo un sitio de reconocimiento de proteasas puede ser introducido entre las secuencias de proteína de exportación y la proteína de interés en el casete de expresión. Estos sitios de reconocimiento de proteasas facilitan la separación de la proteína de exportación a
25 partir de la proteína de interés.

Opcionalmente, un marcador seleccionable puede ser asociado con el casete de expresión. Como se usa aquí, el término “marcador” se refiere a un gen que codifica un rasgo o un fenotipo que permite la selección de, o el cribado para, una célula hospedante que contiene el marcador. El gen marcador puede ser un gen de
30 resistencia a antibiótico mediante el cual el antibiótico apropiado puede ser usado para seleccionar células hospedantes transformadas de entre células que no están transformadas o el gen marcador puede ser cualquier otro gen de resistencia a fármacos. Ejemplos de marcadores seleccionables adecuados incluyen adenosina desaminasa, dihidrofolato reductasa higromicina B-fosfotransferasa, timidina quinasa,
35 xantina-guanina fosforibosiltransferasa, resistencia a glicofosfato y glufosinato y aminoglicósido 3'-0-fosfotransferasa II (resistencia a kanamicina, neomicina y G418). Aquellos con experiencia en la técnica conocerán otros marcadores adecuados pueden ser empleados con las enseñanzas descritas.

Un ejemplo de un vector de expresión es mostrado en la Figura 1. En la Figura 1A, el vector de expresión pSEC84 mostrado. La secuencia nucleotídica del vector pSEC84 puede ser encontrado en la SEQ ID N°:1. La secuencia aminoácidica de ClyA codificada por el gen *clyA* se encuentra en la SEQ ID N°:2.

5 Cada vector mostrado en las Figuras 1A-D comprende un promotor {P_{ampC}- un promotor *ompC* controlado osmóticamente modificado de *E. coli*}, una proteína de exportación (*clyA*), un origen de replicación, un terminador transcripcional (T1), una función de partición pasiva (*part*), resistencia a kanamicina (*aph*), un sistema de muerte post segregacional (*hok-sok*), y un sistema de partición activa (*parA*). Debería
10 observarse que estos componentes del vector son meramente a nivel de ejemplo de una realización única del sistema descrito.

La Figura B ilustra el vector de expresión pSEC84*bla*. Este vector de expresión contiene las mismas características como el vector pSEC84 y comprende además una construcción de proteína de fusión proteína de exportación:proteína de interés.
15 Específicamente, el gen *bla* que codifica b-lactamasa fue clonado en el vector pSEC84 en el sitio NheI en la posición 1426 de el vector parental. Otras construcciones de fusión son mostradas en la Figura 1C (pSEC84*sacB*) y la Figura 1D (pSEC84*gfpuv*).

Genes de Interés

El sistema de exportación de proteínas descrito aquí puede ser usado con una
20 variedad de genes de interés. En una realización, el gen de interés codifica una proteína deseada. Cualquier proteína susceptible de expresión recombinante bacteriana puede ser usada con el sistema de exportación descrito. El gen de interés puede codificar cualquier polipéptido tal como, por ejemplo, un polipéptido mamífero tal como una enzima, un inhibidor de enzima, una hormona, una linfoquina, un
25 activador de plasminógeno, o cualquier otra proteína de interés. El gen de interés puede codificar un gen eucariota, un gen procariota, un gen de planta o un gen viral de interés.

Una ventaja del sistema descrito es que proporciona un método por el cual las proteínas que fueron tóxicas para una bacteria hospedante pueden ahora expresarse.
30 Por ejemplo, la expresión recombinante de ciertas proteínas es complicada o imposible cuando la proteína expresada no es exportada de la célula bacteriana hospedante. Con los métodos descritos aquí, un profesional con conocimientos comunes de la técnica podría expresar una proteína anteriormente inexpressable o subexpressable para producir la proteína deseada en cantidades usables.

35 En otra realización, el gen de interés es un gen que codifica antígenos inmunogénicos, y la proteína de interés es un antígeno que puede ser una proteína o un fragmento antigénico del mismo a partir de cualquier patógeno, tal como patógenos virales, patógenos bacterianos y patógenos parásitos. Alternativamente, el gen de

interés puede ser un gen sintético, construido usando métodos de ADN recombinantes, que codifican antígenos o partes del mismo a partir de los patógenos parásitos, bacterianos, virales u otros antígenos de interés. Estos patógenos pueden ser infecciosos en hospedantes humanos, animales domésticos o animales salvajes.

5 Ejemplos de patógenos virales particulares, a partir de los cuales los antígenos virales son derivados, incluyen, pero no están limitados a, Ortomixovirus, tales como el virus influenza; Retrovirus, tales como el virus de sarcoma Rous (RSV) y virus de inmunodeficiencia de simios (SIV), virus del Herpes, tal como el virus Barr Epstein (EBV); citomegalovirus (CMV) o el virus del herpes simplex; Lentivirus, tal como un
10 virus de inmunodeficiencia humano; Rhabdovirus, tal como las rabias; Picornovirus, tal como el virus de la polio; Poxvirus, tal como las vacunas; Rotavirus; y Parvovirus.

Ejemplos de antígenos inmunogénicos a partir de los patógenos virales incluyen los antígenos del virus de inmunodeficiencia humana Nef, p24, gp120, gp41, Tat, Rev, y Pol. Ejemplos adicionales de los antígenos incluyen epitopos del gp120 de
15 células T y células B, el antígeno de superficie de la hepatitis B, antígenos de rotavirus, tales como VP4, VP6, y VP7, antígenos del virus influenza tal como hemaglutinina o nucleoproteína, y la timidina quinasa del virus de herpes simplex. El ácido nucleico y las secuencias de aminoácidos para cada uno de estos antígenos virales son bien conocidos en la técnica y disponibles fácilmente.

20 Los patógenos bacterianos, a partir de los cuales los antígenos bacterianos pueden ser derivados, incluyen, pero no están limitados a, *Mycobacterium spp.*, *Helicobacter pylori*, *Salmonella spp.*, *Shigella spp.*, *E. coli*, *Rickettsia spp.*, *Listeria spp.*, *Legionella pneumoniae*, *Pseudomonas spp.*, *Vibrio spp.*, y *Borellia burgdorferi*.

Ejemplos de antígenos inmunogénicos de patógenos bacterianos incluyen,
25 pero no están limitados a, el antígeno de forma 1 de *Shigella sonnei*, el antígeno O de la cepa Inaba de *V. cholerae* 569B, antígenos inmunogénicos de *E. coli* enterotoxigénicas, tal como el antígeno fimbrial CFA/I, y la subunidad B no tóxica de la toxina termolábil, pertactina de *Bordetella pertussis*, adenilato ciclasa-hemolisina de *B. pertussis*, y el fragmento C de la toxina del tétano del *Clostridium tetani*.

30 Ejemplos de antígenos inmunogénicos de los patógenos parásitos, a partir de los cuales los antígenos parásitos pueden ser derivados, incluyen, pero no están limitados a, *Plasmodium spp.*, *Trypanosome spp.*, *Giardia spp.*, *Boophilus spp.*, *Babesia spp.*, *Entamoeba spp.*, *Eimeria spp.*, *Leishmania spp.*, *Schistosoma spp.*, *Brugia spp.*, *Fasciola spp.*, *Dirofilaria spp.*, *Wuchereria spp.*, y *Onchocerca spp.* Los
35 ejemplos de los antígenos inmunogénicos de los patógenos parásitos incluyen, pero no están limitados a, los antígenos circunsporozoite del *Plasmodium spp.*, tal como el antígeno circunsporozoite del *P. bergerei* o el antígeno circunsporozoite del *P. falciparum*; el antígeno de superficie merozoite del *Plasmodium spp.*, la lectina

específica de galactosa de *Entamoeba histolytica*, gp63 del *Leishmania spp.*, paramiosina de *Brugia malayi*, la triosafosfato isomerasa de *Schistosoma mansoni*; la proteína de tipo globina secretada del *Trichostrongylus colubriformis*; la glutathione S-transferasa de *Frasciola hepatica*, *Schistosoma bovis* y *S. japonicum*, y KLH del

5 *Schistosoma bovis* y *S. japonicum*.

En otra realización, el gen de interés puede codificar un agente terapéutico, tal como, pero no limitado a, uno específico de tumor, de trasplante o antígenos autoinmunes o partes del mismo. Alternativamente, el gen de interés puede codificar los genes sintéticos, los cuales codifican para específicos de tumor, de trasplante o

10 antígenos autoinmunes o partes del mismo.

Ejemplos de los antígenos específicos de tumor incluyen antígenos específicos de la próstata, TAG-72 y CEA, MAGE-1 y tirosinasa. Recientemente se ha demostrado en ratones que la inmunización con células no malignas que expresan un antígeno de tumor proporciona un efecto de tipo vacuna, y también ayuda al animal a generar una

15 respuesta inmune para eliminar células tumorales malignas que muestran el mismo antígeno.

Ejemplos de antígenos de trasplante incluyen el receptor CD3 en las células T. El tratamiento con un anticuerpo al receptor CD3 ha sido mostrado para eliminar rápidamente las células T que circulan e invierten la mayoría de los episodios de

20 rechazo.

Ejemplos de antígenos autoinmunes incluyen la cadena β de IAS. La vacunación de los ratones con un péptido aminoacídico de 18 de la cadena β de IAS ha sido demostrada que proporciona protección y sirve de tratamiento en ratones con encefalomiелitis autoinmune experimental.

Alternativamente, el gen de interés puede codificar moléculas inmunoreguladoras. Estas moléculas inmuno-reguladoras incluyen, pero no están limitadas a, factores de crecimiento, tales como M-CSF, GM-CSF; y citoquinas tales como IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12 o IFN gamma. Recientemente, el suministro localizado de citoquinas al tejido tumoral ha sido mostrado que estimula potentemente

25 la inmunidad sistémica y la presentación del antígeno tumoral mejorado sin producir una toxicidad por citoquinas sistémica.

30

Sistemas de expresión basados en plásmidos estabilizados

Los sistemas de expresión bacterianos, por diseño, utilizan típicamente vectores de expresión para aprovechar y explotar la maquinaria de síntesis de la

35 proteína de una célula hospedante bacteriana para producir una proteína de interés. Los niveles de expresión de la proteína pueden ser frecuentemente aumentados por el uso de plásmidos de alto número de copia, o vectores de expresión de alto número de copia, con las células hospedantes. Como se discute anteriormente, la introducción de

un vector de expresión de alto número de copia en una célula hospedante bacteriana, sin embargo, coloca ciertas tensiones metabólicas en la célula hospedante que puede causar que la célula hospedante expulse el vector de expresión y reducir así los niveles de expresión de proteína.

5 A menudo se pasa por alto en la ingeniería del vector de expresión el efecto de los vectores de expresión de alto número de copia que ejercen con frecuencia en la salud de la célula hospedante en la que el vector de expresión es introducido. La carga colocada sobre las células bacterianas hospedantes que llevan los plásmidos multicopia es el resultado acumulativo de una cascada metabólica. La cascada es
10 provocada por la duplicación y el mantenimiento de los vectores de expresión (véase Bailey, J.E., Host-vector interactions in *Escherichia coli*, p. 29-77. In A. Fiechter (ed.), Advances in Biochemical Engineering. Biotechnology. Springer-Verlag, Berlin (1993), Glick, B. R., Biotechnol. Adv. 13:247-261 (1995), and Smith & Bidochka. Can. J. Microbiol. 44:351-355 (1998)). La cascada es también provocada por la transcripción y
15 la traducción de diversas funciones que codifican al vector de expresión, incluyendo la proteína de interés. Los mecanismos, tal como esos descritos anteriormente, explican la observación de que las bacterias que portan plásmidos crecen más lentamente que las bacterias sin plásmidos. Estos mecanismos pueden explicar también la observación de que la velocidad de crecimiento disminuye cuando el número de copia
20 aumenta.

Se ha observado que las velocidades de crecimiento de los organismos recombinantes que contienen los vectores de expresión disminuyen según aumenta la expresión del gen de interés. La disminución en el crecimiento puede provocar la inducción de diversas proteasas celulares que pueden degradar la proteína recombinante de interés expresada. La velocidad de crecimiento reducida es por tanto
25 la consecuencia inevitable de la carga metabólica, que a su vez es el resultado acumulativo de un número de perturbaciones fisiológicas. Por ejemplo, las perturbaciones fisiológicas resultan de la expresión y la acumulación de la proteína de interés dentro de la bacteria hospedante. Esta acumulación puede ser dañina para la
30 viabilidad del organismo hospedante y así una presión de selección negativa.

Debido a que las cargas metabólicas tal como se discute anteriormente crean una presión selectiva para la pérdida de los vectores de expresión residentes en ausencia de selección, la pérdida significativa de los vectores de expresión de la célula hospedante pueden ocurrir después de que la célula hospedante haya sido
35 transformada con el vector de expresión que contiene el gen de interés. La pérdida espontánea del plásmido elimina cualquier carga metabólica de la célula hospedante y permite a la célula hospedante sin plásmido disminuir rápidamente la población de célula hospedante que porta el plásmido. El sobrecrecimiento de las células

hospedantes que no contienen y, por tanto, no expresan la proteína de interés reducen los niveles de producción de proteína total. Por tanto, las células hospedantes que no son obligadas genéticamente a mantener los vectores de expresión que dirigen la síntesis de niveles altos de una proteína dada de interés, pueden producir significativamente menos proteína.

Hay un número de medios por los cuales este estrés metabólico puede ser reducido. La expresión controlada de una proteína de interés de los vectores de expresión multicopia representan una solución para la síntesis de niveles altos de la proteína de interés sin células hospedantes. Esta solución es una realización con la cual practicar los métodos descritos. La utilización de promotores inducibles, por ejemplo, es un método por el que la expresión de un vector de expresión puede ser controlada. Dichos promotores inducibles son descritos en la sección de casete de expresión de esta descripción.

Otra realización de los métodos aquí descritos se refiere a un sistema de expresión basado en el plásmido construido para permitir la expresión estable de niveles altos de una o más proteínas a través del crecimiento de la población de las células. Preferentemente, un vector de expresión estable es uno que perpetua el vector de expresión según la célula hospedante se duplica. Los vectores de expresión que confieren estabilidad al plásmido en dos niveles independientes han sido descritos recientemente en Galen, *y otros.*, Immun. 67:6424-6433 (1999) y en el documento de patente Norteamericano Nos. 09/204, 117, publicado el 2 de Diciembre de 1998 y 09/453, 313, publicado el 2 de Diciembre de 1999.

En esta realización, las funciones de partición pueden ser incorporadas en un vector de expresión para mejorar la herencia del plásmido a una bacteria dada o la célula hospedante crece y se divide subsiguientemente. En casos raros donde una célula hija no hereda al menos una copia del vector de expresión, un sistema de muerte post segregacional latente se activa y se elimina de esta bacteria o de la célula hospedante de la población de crecimiento a través de la lisis celular.

C. Células hospedantes bacterianas

Un número de especies bacterianas son adecuadas para el uso con las enseñanzas descritas aquí. Preferente-mente, una especie bacteriana adecuada será capaz de exportar una proteína tal que el gen de interés pueda ser transcrito adecuadamente tal que la proteína de interés sea traducida y exportada fuera de la bacteria. En una realización del invento, la bacteria es administrada a un animal, y así la proteína de interés debe ser exportada fuera de la bacteria en el animal. Pueden ser usadas bacterias invasivas y no invasivas. Ejemplos de algunas bacterias invasivas incluyen, *Shigella spp.*, *Listeria spp.*, *Rickettsia spp.*, a la más invasiva *Escherichia coli*. Una realización preferida utiliza especies de *Salmonella*.

La cepa de *Salmonella* particular empleada con la descripción a continuación no es crítica. Ejemplos de cepas de *Salmonella* que pueden ser empleadas en el presente invento incluyen *S. Typhi* (ATCC No. 7251) y *S. Typhimurium* (ATCC No. 13311). Las cepas de *Salmonella* atenuadas son usadas preferentemente en el presente invento e incluyen *S. Typhi aroAaroD* (Hone y otros, Vacc., 9:810-816 (1991)) y *S. Typhimurium aroA* mutante (Mastroeni y otros, Micro. Pathol., 13:477-491 (1992)). Alternativamente, nuevas cepas de *Salmonella* atenuadas pueden ser construidas por introducir una o más mutaciones de atenuación como se describe para la *Salmonella* spp. anteriormente.

10 D. Bioreactores

El sistema de exportación de proteína aquí descrito es adecuado para el uso con bioreactores y dispositivos similares para facilitar el crecimiento de la bacteria y la recogida o el uso de un producto deseado o la proteína de interés. Tradicionalmente hay cinco niveles para la recuperación de biomoléculas de los bioreactores de la técnica anterior: pre tratamiento, separación sólido/líquido, 15 concentración, purificación y formulación. Puede haber un intervalo amplio de operaciones disponibles en cada nivel. Estos intervalos de operaciones para cada nivel son como siguen: pretratamiento: interrupción celular, estabilización, esterilización, pasteurización y floculación; separación sólido/líquido: filtración, 20 sedimentación y centrifugación; Concentración: membranas, precipitación, evaporación, extracción y concentraciones congeladas; Purificación: precipitación, extracción, diafiltración, adsorción, y cromatografía; y Formulación: secado, encapsulación, extrusión, granulación y formación de tabletas.

En los bioreactores en los que las bacterias no exportan el producto deseado fuera de la bacteria, hay que amplificar las bacterias, inducir a las bacterias a producir 25 el producto deseado y después lisar la bacteria para liberar los contenidos. Típicamente esta interrupción es realizada en el mismo medio en el que las bacterias han crecido. Se puede usar un homogeneizador o un molino de microesferas para interrumpir mecánicamente a las bacterias. Para la interrupción no mecánica, se 30 puede usar el choque de calor (que puede destruir las proteínas), los detergentes, los disolventes, los sequestrantes, y las enzimas (Krijgsman, "Releases of Intracellular Components", pp. 27-42, in Product Recovery in Bioprocess Technology, Publisher Butterworth-Heinemann Ltd, Oxford, England 1992).

Después de que se rompen las bacterias se separan las partículas sólidas de los fluidos (separación sólido/líquido). El producto deseado está habitualmente en la fase líquida, el que se tiene que concentrar después. Después se extrae el producto deseado del líquido concentrado.

Los factores que afectan la separación del producto deseado de o bien los sólidos indeseados o de los líquidos, son el tamaño, la difusividad, la carga iónica, la solubilidad y la densidad. Para la separación dependiente del tamaño, se pueden usar microfiltros, filtros de tela y de fibra, ultra filtración, pantallas/coladores, y gel cromatográfico. Para la separación dependiente de la difusividad, se puede usar la osmosis inversa y la diálisis. El ion de intercambio cromatográfico es usado para la separación dependiente de la carga iónica. Para separar el producto deseado basado en su solubilidad, se pueden usar extracciones con disolventes. Para la separación dependiente de la densidad, se pueden usar ultracentrífugas, centrífugas y sedimentaciones de gravedad. (Krijgsman, "Downstream Processing in Biotechnology", pp. 2-12, in Product Recovery in Bioprocess Technology, Publisher Butterworth-Heinemann Ltd, Oxford, England 1992).

Una ventaja de usar el sistema descrito es que una población de células hospedantes bacterianas recombinante puede ser transformada con un vector de expresión que comprende el sistema de exportación de la proteína descrita y esa población de las células hospedantes bacterianas puede ser mantenida en cultivo y usada para producir la proteína sin tener que recoger y lisar las células hospedantes bacterianas. El cultivo de las células hospedantes bacterianas y la recogida del medio de cultivo que contiene la proteína expresada recombinante de interés pueden ser realizados en cualquier tipo de bioreactor.

Hay diversos tipos de bioreactores pero la familia de equipos puede ser dividida en dos grandes categorías, bioreactores "de flotación libre" y "de lecho". En los bioreactores "de flotación libre", las bacterias están flotando libremente dentro del medio. Ejemplos de bioreactores "de flotación libre" son los bioreactores de tanque agitados convencionalmente, de columna de burbuja, bucle de columna aireada, bioreactores de torre multi propósito, bioreactores de bucle impulsado por líquido y bioreactores de bucle de torre bombeada. Un ejemplo de los bioreactores de tipo "lecho" es el bioreactor de lecho empaquetado. En un bioreactor de "lecho", las bacterias están unidas a las cabezas, a la membrana u otros soportes sólidos. Un tipo híbrido de bioreactor puede ser producido usando un bioreactor de lecho fluidizado donde las bacterias están unidas a esferas u otros soportes pero pueden flotar en el medio. (Mijnbeek, "The Conventional Stirrer Tank Reactor" pp. 39-74; Mijnbeek, "Bubble Column, Airlift Reactors, and Other Reactor Designs" pp. 75-114; Geraats, "An Introduction to Immobilized Systems" pp 115-124; todas en "Operational Modes of Bioreactors", publisher Butterworth-Heinemann Ltd, Oxford, England 1992).

Usando el sistema que exporta la proteína, descrito aquí, con un bioreactor "de lecho" se evita la etapa de tratamiento y la separación sólido/líquido debido a que la proteína de interés es exportada fuera de las bacterias en el medio. Sólo se tiene que

eliminar el medio del lecho antes de intentar aislar el producto deseado. Para los bioreactores de “columna libre”, se puede centrifugar la mezcla líquido/bacteria para precipitar las bacterias. Después se aísla la proteína deseada de interés del medio. Un beneficio adicional del sistema descrito es que el medio contendrá menos proteínas indeseadas que las que están presentes en el medio en el que las bacterias fueron interrumpidas; todos los componentes intracelulares de las bacterias interrumpidas están ausentes del medio en el presente invento. Así pues la purificación de la proteína deseada de interés es más fácil. Así mismo, teniendo etiquetas y sitios de corte de proteasa presentes dentro de la proteína de exportación de la proteína de interés, la proteína de fusión facilita además el aislamiento y la purificación de la proteína de interés.

Un ejemplo de un bioreactor es el aparato mencionado en el documento de patente norteamericana No. 5.635.368, “Bioreactor with immobilized tactic acid bacteria and the use thereof” to Lommi *y otros*, 3 de Junio, 1997, que está incorporada por la presente en referencia en su totalidad. El aparato Lommi se refiere a un bioreactor con bacterias inmovilizadas, que se caracteriza por que las bacterias están fijadas a la superficie de un excipiente no comprimible sustancialmente. Otro ejemplo de un bioreactor se encuentra en el documento de patente norteamericana No.4.910.139, “Method for continuously producing citric acid by dual hollow fiber membrane bioreactor” to Change *y otros*, 20 de Marzo, 1990.

Este invento se refiere al crecimiento de las bacterias inmovilizadas para producir ácido cítrico de modo continuo.

Un aparato bioreactor adicional está descrito en el documento de patente norteamericana No. 5.585.266, “Immobilized cell bioreactor” por Plitt *y otros*, 17 de Diciembre, 1996, que está incorporado por la presente en referencia a su totalidad. El dispositivo Plitt descrito se refiere a un bioreactor de células inmovilizada en el que las células son albergadas dentro o sobre una matriz de inmovilización que incluye hojas de soporte de células de un tejido textil común. Los documentos de patentes norteamericanas No. 4.665.027 *y* 5.512.480, describen otras realizaciones de bioreactores.

Vacunas

El sistema de exportación de proteína descrito aquí tiene utilidad en la producción de vacunas. Por ejemplo, la producción de subunidad de vacunas puede ser lograda usando el sistema de exportación de la proteína ya que el sistema facilita la recogida de la proteína recombinante *y* reduce la presencia de las proteínas que contaminan el medio de crecimiento en el que las células hospedantes recombinantes son propagadas. Las células hospedantes recombinantes pueden ser también usadas para generar las composiciones inmunogénicas en las que la célula hospedante

recombinante es proporcionada a un sujeto y el sistema inmune del sujeto genera una respuesta inmune contra las proteínas exportadas de la célula hospedante recombinante.

5 El sistema de exportación de proteínas descrito aquí puede ser usado con cualquier antígeno para preparar una vacuna del mismo, en el que el antígeno es la proteína de interés como se describe anteriormente. La preparación de la vacuna está descrita generalmente en *New Trends and Developments in Vaccines*, editado por Voller y *otros*, University Park Press, Baltimore, Md, USA, 1978. La encapsulación dentro de los liposomas está descrita, por ejemplo, por Fullerton, en el documento de patente norteamericana No.4.235.877. La conjugación de las proteínas a macromoléculas está descrita, por ejemplo, por Likhite, en el documento de patente norteamericana No. 4.372.945 y por Armor y *otros* en el documento de patente norteamericana No. 4.474.757.

15 La cantidad de antígeno en cada dosis de vacuna es seleccionada como una cantidad que induce una respuesta inmunoprotectora sin los efectos secundarios adversos significativos de las vacunas típicas. Tal cantidad variará dependiendo de que antígenos específicos sean empleados y de la tecnología de suministro usada (por medio del ejemplo solamente, proteínas purificadas o bacterias vivas). Generalmente se espera que las dosis que comprenden las proteínas purificadas comprendan 1-1000 μg del antígeno total, preferiblemente 2-200 μg . Generalmente se espera que la dosis que comprenden las bacterias vivas que suministran las proteínas de interés comprendan 1-1000 ng del antígeno total de interés. Una cantidad óptima para una vacuna particular puede ser establecida por estudios estándar que implican la observación de concentraciones de anticuerpos y otras respuestas en los sujetos. Siguiendo una vacunación inicial, los sujetos (animales o humanos) pueden recibir una o más dosis de refuerzo, por ejemplo después de 1 y 6 meses.

25 El sistema de exportación de proteína puede ser usado también con una vacuna de vector bacteriana viva para aumentar la eficacia de la preparación. Por ejemplo, el documento de patente norteamericana No. 5.387.744, por Curtiss y *otros*, titulado "A virulent microbes and uses therefor: *Salmonella typhi*", que es incorporado aquí por referencia, proporciona una vacuna de vector bacteriana viva contra *S. Typhi*. Más específicamente, la patente de Curtiss proporciona composiciones inmunogénicas para la inmunización de un vertebrado o invertebrado que comprende un derivado virulento de *S. Typhi*. Los derivados que tienen una mutación de los genes *cya* y/o *crp* y/o *cdt*.

35 Los derivados virulentos mostrados por Curtiss y *otros*, pueden ser transformados con el sistema de exportación de proteína descrito aquí para permitir que el organismo recombinante resultante actúe como una composición inmunogénica

contra *S. Typhi*, así como cualquier frente a otro antígeno o antígenos que estén unidos a la proteína de exportación de proteína del sistema descrito.

Utilidad adicional

En adición a las proteínas terapéuticas y los antígenos que son útiles para la industria farmacéutica, el gen de interés puede codificar las enzimas, los polipéptidos, las proteínas o los aminoácidos que pueden ser útiles para, a modo sólo de ejemplo, la industria alimenticia, la industria de suplementos nutricionales, la industria de alimentos animales, la industria biomédica, la industria de eliminación de residuos y la industria de tratamiento de residuos. Para estas industrias, la proteína de interés codificada por el gen de interés puede no necesitar ser aislada del medio de un bioreactor para que la proteína de interés sirva a sus funciones. La proteína de interés puede ser un catalizador para una reacción deseada o puede actuar como un componente precursor para una reacción deseada.

Los ejemplos siguientes son proporcionados para propósitos ilustrativos solamente, y no se pretende de ninguna manera limitar el alcance del presente invento.

EJEMPLOS

Ejemplo 1

Clonaje y mutagenesis de *S. Typhi clyA*

La identificación del *clyA* fue completada por el análisis BLASTN de la secuencia del genoma *S. Typhi* completada recientemente disponible del Sanger Centre (Wellcome Trust Genome Campus, Hinxton, Cambridge, CB10 1SA, UK)(Véase http://www.sanger.ac.uk/Projects/S_typhilblast_server.shtml) usando la secuencia de ADN del *E. coli hlyE* (GenBank número de acceso U57430).

El marco de lectura abierto *clyA* fue identificado como una secuencia de 912 pb predicha que codifica una proteína residuo 304 con una masa molecular de 33,8 kDa que es 89,4% idéntica al *HlyE* de *E. coli*. Aunque el *clyA* es 85,3% idéntica al marco de lectura abierto *hlyE* de 915 pb de *E.coli*, la región transcripcional testigo aguas arriba está poco relacionada con sólo 33,6% de bases idénticas dentro de una región 250 pb.

Basado en este análisis, los cebadores fueron diseñados para la amplificación por PCR de un casete genético sin promotor que codifica el *ClyA* en el que un sitio de unión ribosomal optimizado fue fabricado 5' próximo al codón de inicio ATG.

Las secuencias del cebador se muestran en la Tabla 1.

TABLA 1

Cebadores usados en la construcción y el análisis de secuencias de los casetes plasmídicos

5

Número de cebador	Secuencia ^a	Casete creado	Plantilla
1	5' GGATCC AAAATAAGGAGGAAAAAAAAATGACTAGTATTTTTGCAGAACAACTGTAGAGGTAGTTAAAAGCGCGATCGAAACCGCAGATGGGGCATTAGATC-3' (SEQ ID NO: 3)	<i>chyA-tetA</i>	CVD 908- <i>htrA</i>
2	5' CCTAGG TTATCAGCTAGCGACGTCAGGAACCTCGAAAAGCGTCTTCTTACCATGACGTTGTTGGTATTCATTACAGGTGTTAATCATTTCTTTGCAGCTC-3' (SEQ ID NO: 4)	"	"
3	5'CACGGTAAGAAGACGCTTTTCGAGGTTCTGACGTC CGTAGC TGATA ACCTAGG TCATGTTAGACAGCTTATCATCGATAAGCTTTAATGCGGTAGT-3' (SEQ ID NO: 5)	"	pBR322
4	5' AGATCTACTAGT GTGCGACGCTAGCTATCAGGTCGAGGTGGCCGGCTCCATGCACC6CGACGCAAC6CG-3' (SEQ ID NO: 6)	"	"
5	5' ACTAGT CACCCAGAAACGCTGGTGAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGA-3' (SEQ ID NO: 7)	<i>bla-tetA</i>	pGEM-T
6	5'CATTAAAGGTTATCGATGATAAGCTGTCAAACATGAGCTAGC CTAGG TCATTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTG-3' (SEQ ID NO: 8)	"	"
7	5'CGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAATGAC CTAGG CTAGCTCATGTTTGACAGCTTATCATCGATAACCTTTAATG-3' (SEQ ID NO: 9)	"	pBR322
8	5' GCGCACTAGT AAAGAAACGAACCAAAAGCCATATAAGGAAACATACGGCATTCCCATATTACACGCCATG-3' (SEQ ID NO: 10)	<i>sacB-tetA</i>	pIB279
9	5'TAAACTACCGCATTAAAGCTTATCGATGATAAGCTGTCAAACATGAC CCGGG CTCACTATTTGTTAACTGTTAATTGTCTTGTTC AAGGATGCTGTCTTTGAC-3' (SEQ ID NO: 11)	"	"
10	5'TCATGTTTGACAGCTTATCATCGATAAGCTTTAATGCGGTAGTTTA-3' (SEQ ID NO: 12)	"	pBR322
11	5' GCGCAGATCT TAAATCATCCACAGGAGGC CTAGC ATGAGTA AAGGAGAAGAAGCTTTTCACTGGAGTTGTCCCAATTCTTG-3' (SEQ ID NO: 13)	<i>gfpuv-tetA</i>	pGEN84
12	5'GTGATAAACTACCGCATTAAAGCTTATCGATGATAAGCTGTCAAACATGAGCG CTAGAACTAGT TCATTATTTGTAGAGCTCATCCATGCCATGTGTAATCCCA6CAG-3' (SEQ ID NO: 14)	"	"

Los sitios de restricción relevantes están marcados en negrita, subrayados; los sitios de unión al ribosoma y los codones de inicio están marcados en cursiva.

Para facilitar la recuperación, las técnicas de PCR de solapamiento fueron usadas para crear un casete génico sin promotor *clyA-tetA* de 2252 pares de bases sintetizado por PCR de solapamiento como se describe anteriormente usando los cebadores 1 y 2 con el ADN de plantilla cromosómica del CVD 908-*htrA*, y los cebadores 3 y 4 con la plantilla derivada del pBR322 y recuperada en pGEM-T (Promega, Madison W) transformada en *E. coli* DH5 α .

Los clones recombinantes fueron seleccionados en un medio agar sólido que contenía glóbulos rojos de oveja. Específicamente, la selección para la actividad hemolítica fue realizada en un medio agar 1XLB preparado en fresco que contenía una selección de antibióticos apropiada y 5% de sangre de oveja. Las placas fueron incubadas después a 37°C durante 24 horas para detectar zonas de hemolisis de glóbulos rojos (RBC). Varias colonias fueron identificadas inmediatamente con halos claros producidos de la hemolisis. Esta observación sugirió que si el *clyA* necesita proteínas auxiliares para la traslocación fuera de la bacteria, estas proteínas son aparentemente comunes a ambos *S. Typhi* y *E. coli*. Un aislamiento positivo marcado como pGEM-T*clyA*, fue elegido para usos adicionales.

Los roles funcionales de diversas regiones del ClyA fueron examinados para proporcionar información para la correcta ingeniería de las proteínas de fusión recombinante que codifican un antígeno fusionado con ClyA. Específicamente, fue examinado el rol jugado por el amino terminal, el carboxilo terminal, o ambos, en la exportación de la hemolisina fuera de a bacteria.

Para conseguir esto, el *clyA* fue mutagenizado ocasionalmente usando el transposón Tn*phoA*. El "phoA" del "Tn*phoA*" codifica la fosfatasa alcalina (Véase Manoil y Bechwith, PNAS Vol 82, pp 8129-8133, 1985). La transposición del Tn*phoA* permite la formación ocasional de fusiones en marco del terminal N del PhoA en una proteína diana dada. La mutagenesis Tn*phoA* fue llevada a cabo después de la electroporación del pGEM-T*clyA*, que expresa la hemolisina *S. Typhi* ClyA funcional en DH5 α para producir DH5 α (pGEM-T*clyA*). Una unión entrecruzada de cepas "cross-streak" fue realizada después entre DH5 α (pGEM-T*clyA*) y la cepa del donante Tn*phoA* SM10 (pRT733) y se seleccionaron los transconjugantes en el 2XLB50 complementado con tetraciclina, carbenicilina y canamicina a 10 μ g/ml, 50 μ g/ml, y 10 μ g/ml respectivamente (2XLB50 + T10C50K10). Las bacterias fueron reunidas después y hechas crecidas en caldos de cultivo para la purificación del plásmido y los plásmidos purificados retransformados en la cepa CC118 de *E. coli* mutante *phoA* Δ 20 para la selección de los transformantes Pho⁺ en 2XLB50 + T10C50K10

complementado con 200 µg/ml del sustrato fosfatasa alcalino 5-Bromo-4-Cloro-3-indolil-Fosfato (BCIP; Sigma, St. Louis, MO). Las fusiones de la proteína diana que son secretadas por su extremo N terminal al periplasma, la superficie expuesta o exportada completamente fuera de la bacteria, pueden ser mostradas fácilmente usando el sustrato cromogénico BCIP para detectar los halos azul profundo de la hidrólisis; las proteínas que son segregadas por su extremo C terminal no serán detectadas usando este método.

Usando la mutagenesis *TnphoA*, 4 a 621 *PhoA*⁺ colonias fueron identificadas que ya no mostraban actividad hemolítica. Secuenciando un aislamiento se confirmó la inserción en marco del *PhoA* después del residuo 179 (Ala) de *ClyA*. Esta inserción truncó la *ClyA* en la región hidrofóbica transmembrana propuesta y elimina los 125 residuos carboxilo terminal restantes. Se concluyó por tanto que el extremo carboxilo terminal del *S. Typhi* *ClyA* no es necesario para transportar el citoplasma del *E. coli* (y se supone también del *S. Typhi*), y que la fusión genética de los genes heterólogos que codifican potencialmente las fusiones de las proteínas exportadas deberían llevarse a cabo en el extremo 3' terminal del *clyA*.

Ejemplo 2

Construcción de las fusiones carboxilo terminal de los antígenos de ensayo al *ClyA*.

Para ensayar la capacidad para exportar las proteínas pasajeras fusionadas al extremo carboxilo terminal de *ClyA*, el gen *bla* que codifica la proteína β-lactamasa RTEM-1 que confiere resistencia a ambas ampicilina y carbenicilina, fue elegido para la experimentación.

Esta fusión de proteína fue fabricada como una fusión genética de un casete *SpeI* insertado en marco en el sitio *NheI* adyacente a los codones tándem stop en el extremo 3' terminal de *clyA* del pSEC84. Inicialmente, un fragmento *SpeI-NheI* de 807pb que codifica la β-lactamasa madura de 268 aminoácidos sin la secuencia señal de 23 residuos, fue sintetizado a partir del pBR322 derivado mediante PCR. El fragmento purificado fue insertado después en marco en el sitio *NheI* carboxilo terminal fabricado del *clyA* para crear una fusión genética *clyA-bla* de 1742 pb que codifica una proteína de fusión de 62,9 kDa predicha. La construcción del plásmido deseada fue recuperada fácilmente en colonias aisladas de los cultivos crecidos en presencia de 5 µg/ml de carbenicilina, pero los plásmidos recuperados después de la selección con 50 µg/ml de carbenicilina parecieron ser inestables y reordenados genéticamente.

Fusión *bla-tetA*

Debido al problema con la estabilidad del plásmido y al reordenamiento genético de la construcción *clyA-bla* descrita anteriormente, la fusión *bla-tetA* fue sintetizada como un casete *SpeI* de 2111 pb por PCR de solapamiento usando los cebadores 5 y 6 con la plantilla pGEM-T y los cebadores 7 y 4 con la plantilla derivada

del pBR322; la inserción de este casete en el pSEC84 cortado con *NheI* generó el pSEC84*bla* (Véase la Figura 1B).

Después de la introducción en el CVD 908-*htrA*, las colonias fueron cribadas para detectar la retención de la actividad hemolítica, y cribadas después para determinar la actividad β -lactamasa usando el sustrato cromogénico nitrocelin a una concentración de 100 $\mu\text{g/ml}$ en 2XLA50+DHB+T10; las placas fueron incubadas a 30°C durante al menos 16 horas y examinadas en lo que se refiere a la presencia de halos rojos alrededor de las colonias que indican el corte del nitrocelin. Los halos rojos fueron observados alrededor del CVD 908-*htrA* (pSEC84*bla*), indicando el corte del nitrocelin, confirmando la presencia de β -lactamasa enzimáticamente activa. Se concluyó que una duplicación aproximada de la masa molecular del ClyA de 34 kDa a 63 kDa dió como resultado una proteína de fusión de 2 dominios en el que ambos dominios aparentemente plegados correctamente mantenían la actividad biológica esperada de cada dominio.

15 Fusión sacB-tetA

Para investigar la versatilidad del ClyA como un compañero de fusión para exportar antígenos heterólogos fuera del *S. Typhi*, se examinó la eficacia del ClyA para exportar la levasacarosa potencialmente letal codificada por *sacB* del *Bacillus subtilis*. La expresión del gen *sacB* es letal cuando se expresa dentro del citoplasma de las bacterias enteras, incluyendo *S. Typhi*, que crece en presencia de sacarosa. La construcción de una fusión de proteína ClyA-SacB con una masa molecular predicha de 83,9 kDa, por introducción en el CVD 908-*htrA*, fue intentada. Esta fusión fue fabricada como un casete *sacB-tetA SpeI* que codifica la levasacarosa madura de 445 residuo de 50,0 kDa, sin la secuencia señal de 29 aminoácidos e insertada en marco en el sitio *NheI* carboxilo terminal fabricado del ClyA en pSEC84. El CVD 908-*htrA* que transporta la construcción deseada fue seleccionada usando tetraciclina y cribado en presencia de sacarosa para sobrevivir. Si el ClyA-SacB falla en ser exportado del citoplasma, ningún aislado será recuperado, pero para las fusiones o bien expresadas en superficie o exportadas completamente de la bacteria en el medio circundante, un resto SacB enzimáticamente activo se espera que corte la sacarosa para liberar glucosa, que será transportada inmediatamente en la bacteria y metabolizada.

El casete *sacB-tetA* fue sintetizado usando los cebadores 8 y 9 con la plantilla pIB279 y los cebadores 10 y 4 como antes para crear un casete *SpeI* de 2653 pb insertado en pSEC84 generando la fusión *clyA:sacB* del pSEC84*sacB* (véase la Figura 1C). Después de la introducción en el CVD 908-*htrA*, las colonias fueron cribadas otra vez para determinar la retención de la actividad hemolítica y examinadas después para determinar la actividad levasacarosa por cultivo en placas en un medio base agar MacConkey (Difco) complementada con DHB y o bien sacarosa (8% ó 16% w/v) u 8%

de sacarosa + 8% de arabinosa como fuente única de carbohidrato. Las placas fueron incubadas a 30°C durante 16-24 horas para recuperar el unidades formadoras de colonias (cfus) aisladas y se determinó la fermentación del carbohidrato; la incubación adicional a temperatura ambiente durante varios días más fue requerida para observar la formación de montículos de tipo polisacárido, sobre las colonias.

Como se muestra en las Figuras 2B y 2D, el crecimiento del CVD 908-*htrA* (pSEC84*sacB*) fue excelente cuando creció en un medio indicador que contenía 8% de sacarosa ó 16% de sacarosa como fuente única de carbohidrato (cuando creció en un medio base agar MacConkey). Ciertamente, en un polímero como el polisacárido se observó que se formaban colonias por encima del CVD 908-*htrA* (pSEC84*sacB*) aislado, que no fue observado por CVD 908-*htrA* (Figuras 2A y 2C), e intensificado con un aumento de la concentración de sacarosa. Planteando la hipótesis de que el material semejante al polisacárido era levan, formado por la polimeración de levansacarosa catalizado de la fructosa liberada de la hidrólisis de la sacarosa, se intentó bloquear esta polimerización por la introducción de 8% de L-arabinosa que e conoce que inhibe la levansacarasa. Como se muestra en la Figura 2F, los montículos no se observaron por más tiempo, pareciendo ahora las colonias CVD 908-*htrA* y CVD 908-*htrA* (pSEC84*sacB*) similares.

Si las fusiones de la proteína ClyA-SacB son ciertamente exportadas fuera del CVD 908-*htrA* (pSEC84*sacB*), entonces el corte de sacarosa por el dominio SacB para liberar glucosa libre debería proporcionar una ventaja metabólica comparada con CVD 908-*htrA* cuando estas cepas crecen como cultivo en caldos en presencia de sacarosa. Para ensayar esta hipótesis, 100 ml de caldos de cultivo de o bien CVD 908-*htrA* (pSEC84) o CVD 908-*htrA* (pSEC84*sacB*) fueron metidos en 1 litro de frascos indentados que contienen 2XLB50+DHB+K10 mas 10% de sacarosa y el crecimiento fue comparado con los cultivos CVD 908-*htrA* (pSEC84) que crecen en presencia del 10% de glucosa como un testigo positivo. Como se muestra en la Figura 3, se observó que el CVD 908-*htrA* (pSEC84*sacB*) crece más rápido en presencia de la sacarosa que o bien el CVD 908-*htrA* (pSEC84) creciendo con glucosa o sacarosa, una observación confirmada con recuentos de células viables. Cuando se toman juntos con resultados observados anteriormente para el ClyA-Bla, los datos sugieren totalmente que el ClyA es un compañero de fusión versátil para exportar fuera de las bacterias las proteínas de fusión plegadas correctamente en las que la actividad biológica de los dominios fusionados está conservada.

35 La fusión clyA:gfpuv

Para definir adicionalmente las propiedades de exportación del ClyA y verificar específicamente la presencia de los productos de fusión ClyA en el sobrenadante del CVD 908-*htrA* creciendo exponencialmente, fue construida una fusión genética del

clyA donde el *clyA* fue fusionado a la proteína fluorescente verde del indicador fluorescente (GFPuv) creando el casete *clyA:gfpuv* del pSEC84*gfpuv* (véase la Figura 10), e isogenico para ambos pSEC84*bla* y pSEC84*sacB*. De nuevo, el CVD 908-*htrA* (pSEC84*gfpuv*) permaneció hemolítico pero con fluorescencia reducida cuando se comparó con el GFPuv expresado citoplásmicamente. Usando el anticuerpo policlonal GFP (BD Biosciences Clontech, Palo Alto, CA), la exportación del ClyA-GFPuv en el sobrenadante de cultivo fue examinada usando el análisis de inmunotransferencia Western, como se muestra en la Figura 4. La Figura 4 ilustra un set de inmunotransferencias Western que analizan las fracciones de célula bacteriana de o bien CVD 908-*htrA* (carriles 1-3) o CVD 908-*htrA* (pSEC84*gfpuv*) (carriles 4-8). Las fracciones de célula se cargan como sigue: los sobrenadantes, carriles 1 y 4; citoplasma, carriles 2 y 6; periplasma, carril 5; insoluble, carril 7; célula entera, carriles 3 y 8; y GFPuv 50 ng, carril 9. Las membranas con muestras idénticas fueron probadas con los anticuerpos específicos para el GFPuv (panel A) o el *E. coli* GroEL (panel B). Como se puede ver en esta figura, una cantidad significativa de la fusión de proteína 61 kDa esperada es detectada en 0,5 ml del sobrenadante TCA precipitado del CVD 908-*htrA* (pSEC84*gfpuv*) (carril 4); una especie con reacción entrecruzada irrelevante de aproximadamente 45 kDa es detectada también en el citoplasma del CVD 908-*htrA* (carril 2) y en las fracciones citoplasma, insoluble y de célula entera del CVD 908-*htrA* (pSEC84*gfpuv*); de modo interesante, el carril 5 sugiere que muy poco Cly-GFPuv es recuperado del espacio periplásmico.

Conclusión

Los resultados de este trabajo apoyan claramente la conclusión de que la hemolisina críptica ClyA del *S. Typhi* puede ser usada para facilitar la exportación de los dominios del antígeno heterólogos fuera de la cepa vacuna atenuada CVD 908-*htrA* y al medio circundante. Además, este trabajo demuestra que el ClyA puede ser usado para facilitar la exportación de una proteína de fusión fuera de las bacterias en el medio circundante. Como se ilustra anteriormente, la capacidad de exportar las proteínas de interés plegadas correctamente fusionadas con el extremo carboxilo del ClyA fue mostrada usando el gen *bla* que codifica la proteína de β -lactamasa RTEM-1 que confiere resistencia a ambos ampicilina y carbenicilina. El gen *bla* del pBR322 es de 861 pb de largo y codifica una proteína de 31,5 kDa con una secuencia de señal de 23 aminoácidos que dirige la secreción del extremo N terminal de la β -lactamasa al espacio periplásmico. El trabajo anterior indica la fabricación exitosa de una fusión génica que codifica una fusión de proteína β -lactamasa ClyA funcional que retiene tanto la actividad hemolítica como la capacidad para cortar el sustrato cromogénico de la β -lactamasa nitrocefina para producir halos rojos frente a un fondo amarillo de nitrocefina sin cortar.

De modo interesante, los intentos para seleccionar tales vectores de expresión, cuando crecen los transformantes en un medio rico complementado con 50 µg/ml de o bien carbenicilina o ampicilina, fueron exitosos y sólo los plásmidos reordenados extensamente fueron recuperados como se juzga por el cribado de restricción. Se ha
5 demostrado de forma definitiva que la β-lactamasa expresada citoplásmicamente confiere resistencia a ~5 µg/ml de ampicilina, mientras que la beta-lactamasa periplásmica expresada apropiadamente confiere resistencia > 4000 µg/ml a ampicilina. Sin embargo, la muestra de superficie de las fusiones de proteína β-lactamasa se ha demostrado que confiere resistencia a ~100 µg/ml de ampicilina.
10 Ciertamente, Chervaux y *otros* han informado que la secreción mediada por HlyA de las fusiones beta-lactamasa fuera del *E. coli* confieren de nuevo resistencia a nivel bajo a ~ 5 µg/ml de ampicilina. Demostraron que aunque la actividad específica del dominio de β-lactamasa intacto de la fusión de superficie permanece similar al de la beta-lactamasa sin modificar, no se observó resistencia a niveles altos de ampicilina, y
15 se concluyó que la resistencia bacteriana a los antibióticos beta-lactámicos requieren concentraciones significantes de beta-lactamasa dentro del espacio periplásmico cerca de las dianas de muerte. Basado en tales observaciones, se concluyó que las fusiones de proteína ClyA-beta-lactamasa plegadas correctamente fueron sintetizadas dentro del CVD 908-*htrA* (pSEC84*bla*) y se exportaron para conferir un fenotipo hemolítico,
20 así como hidrólisis mediada por beta-lactamasa del nitrocefin cefalosporin cromogénico, sin conferir resistencia a la ampicilina o la carbenicilina.

Para definir más claramente la naturaleza de la exportación del ClyA mediado de los dominios del antígeno heterólogo fuera del CVD 908-*htrA*, y tal vez excluir el desarrollo de los intermediarios periplásmicos, fueron estudiadas las fusiones del
25 *sacB*, que codifican la levansacarasa potencialmente letal del *B. subtilis*. La levansacarasa es una exoenzima polipeptídica única de 50 kDa que cataliza la hidrólisis de la sacarosa para rendir glucosa libre y fructosa, y a su vez cataliza la polimerización de la fructosa en polímeros largos llamados levan. La secreción de la levansacarasa del *B. subtilis* que crece en un medio que contiene sacarosa da como
30 resultado el crecimiento de colonias aisladas cubiertas por un montículo impresionante de polímero de levan viscoso después de una incubación ampliada a temperatura ambiente.

Está bien establecido que la expresión citoplasmática y periplasmática de levansacarasa codificada por *sacB* es letal para una variedad de bacterias que crece
35 en presencia de la sacarosa. Se ha demostrado recientemente que usando mutaciones del péptido de señal la levansacarasa se vuelve letal dentro del citoplasma de *B. subtilis* que crece en presencia de sacarosa, y que la inactivación de la actividad polimerasa de fructosa fue esencial para eliminar la letalidad inducida por sacarosa.

Se argumentó, por tanto, que el fallo de las fusiones ClyA-SacB para ser exportadas fuera de ambos espacios citoplasmático y el periplasmático del CVD 908-*htrA* debería dar como resultado una acumulación intracelular significativa de la proteína de fusión que resulta en la letalidad para el CVD 908-*htrA* (pSEC84*sacB*) que crece en presencia de la sacarosa.

Como se muestra en la Figura 2B, sin embargo, el CVD 908-*htrA* (pSEC84*sacB*) fue observado no solamente que crecía en presencia de 8% de sacarosa sino que fermentaba el azúcar, un fenotipo no observado para el CVD 908-*htrA* (pSEC84) crecido en idénticas condiciones. Como la concentración de sacarosa aumentó del 8% al 16% de sacarosa, la fermentación de sacarosa también aumentó con la acumulación impresionante de polímeros del material semejante al leván que desaparecieron en presencia del inhibidor de levansacarasa arabinosa. Observaciones similares de la actividad levansacarasa fueron documentadas por Jung y otros para un dominio levansacarasa expresado en superficie fusionado al extremo carboxilo de la proteína de nucleación de hielo de *Pseudomonas syringae* y expresado dentro del *E. coli*. En vista de estos resultados, se concluyó que el CVD 908-*htrA* (pSEC84*sacB*) fabricado tuvo la capacidad de utilizar sacarosa como una fuente de carbono en experimentos de caldo de cultivo en el que el CVD 908-*htrA* (pSEC84*sacB*) se observó que crecía más rápido que el CVD 908-*htrA* (pSEC84) que crece en presencia o bien de la sacarosa o bien en glucosa pura. Se concluyó de nuevo que, como con las fusiones de proteína ClyA-beta-lactamasa descritas anteriormente, que las fusiones de proteína ClyA-SacB correctamente plegadas fueron sintetizadas dentro del CVD 908-*htrA*, y exportadas para conferir ambos el fenotipo hemolítico esperado, así como la actividad levansacarasa que permite el catabolismo extracelular de una fuente carbohidrato alternativo no utilizado por la cepa hospedante sin plásmido.

Ejemplo 3

Expresión de proteína en bioreactor de una fusión ClyA-SacB

Un bioreactor es preparado según las enseñanzas del documento de patente norteamericana No. 5.635.368, que es incorporado por la presente mediante referencia en su totalidad. En resumen, la celulosa derivatizada granular es fabricada según el documento de patente norteamericano No. 4.355.117 como sigue: 25 partes de celulosa fibrosa es mezclada con 25 partes de dióxido de titanio y la mezcla es compuesta con 50 partes de polietileno de alto impacto usando una extrusora de doble tornillo. La extrusora es enfriada en agua, y tamizada con un tamaño de partícula de 0,35-0,85 mm. Las partículas de celulosa aglomerada granular tamizadas fueron derivadas para formar celulosa DEAE como se describe en el documento de patente norteamericana anterior.

A continuación, diez (10) gramos de la celulosa DEAE granular son reducidos en una suspensión en agua destilada y remojados durante 5 horas con agitación ocasional. El excipiente hidratado es decantado después con el agua destilada y transferido a una columna de vidrio con un diámetro interno de 15 mm donde forma un lecho con un peso de 145 mm.

Las bacterias transformadas con pSEC84*sacB* (véase el Ejemplo 2) son cultivados durante 48 horas a 30°C. Cincuenta (50) mililitros de la suspensión celular son bombeados a través del lecho del excipiente a una velocidad de flujo de 25 ml/hora. Subsiguientemente, cantidades adicionales del medio de cultivo son bombeados a través del lecho del excipiente. El flujo de la columna es recogido y la proteína de fusión ClyA-SacB expresada recombinantemente (codificada por SEQ ID No: 19) es aislada y purificada del flujo. El corte del SacB proporcionará cantidades comerciales amplias de levansacarosa para la generación del levan.

Ejemplo 4

Purificación de proteína His-tag en condiciones des-naturalizantes

Un cultivo bacteriano es transformado con un vector de expresión que contiene un casete de expresión que comprende la secuencia de codificación para una proteína ClyA atenuada fusionada al gen *sacB*, que es fusionada a una secuencia de codificación que codifica un sitio de reconocimiento de proteasa, que es fusionado a una secuencia que codifica la etiqueta polihistidina. El cultivo bacteriano es introducido en un bioreactor tal como el descrito en el Ejemplo 3.

El cultivo es colocado en condiciones que promueven la expresión de la proteína de fusión recombinante, que es exportada al medio de cultivo. El medio de cultivo es recogido y aplicado a una columna Ni (HISTRAP; Pharmacia) equilibrada con un tampón que contiene urea a una concentración suficientemente alta para desnaturalizar la proteína. La columna es lavada después y eluida. El eluido es analizado mediante gel de electroforesis para determinar la presencia de la proteína purificada.

Las fracciones que contienen proteínas purificadas son dializadas frente a un tampón de digestión de enzimas. Las muestras dializadas son reunidas después y sometidas a catálisis proteolítica por la enzima apropiada. La muestra proteolizada es purificada para eliminar el marcaje de polihistidina eliminada dejando la proteína aislada, purificada.

Ejemplo 5

Construcción de CVD 908-*htrA* atenuado que expresa Frag C y genera una respuesta inmune frente al mismo.

Una proteína de fusión ClyA-FragC es generada en CVD 908-*htrA* según las etapas tratadas en el Ejemplo 1. La propuesta de los autores es expresar un codón

*tox*C optimizado de marco de lectura abierto que codifica el fragmento C de la toxina del tétanos insertado en el ClyA expresado a partir del vector de expresión descrito aquí. La exportación del fragmento C es completada a través de una fusión genética en marco del *tox*C al extremo 3' del *clyA* y portado en el replicón *oriE1* pSEC84 como un casete $P_{\alpha opC}$ -*clyA* *EcoRI-NheI* de 1426 pb. El *tox*C que codifica el fragmento C es refabricado a partir de las construcciones de la técnica anterior usando el cebador directo 5'- GCGCACTAGTAAAAACCTTGATTGTTGGGTCGACAACGAAGAAGACAT-CGATGTTATCCTGAAAAAGTCTACCATTCTGAACTTGGACATCAAC- 3' (SEQ ID No: 15) y el cebador inverso 5'-AACTACCGCATTAAAGCTTATCGATGATAAGC-TGTCAAACATGAGCTAGCCTAGGTCATTAGTCGTTGGTCCAACCTTCATCGGTTCG-GAACGAAGTA- 3' (SEQ ID No: 16) para generar el producto PCR deseado (1424 pb). El casete *tox*C es subclonado después en el pSEC84 digerido con *NheI* para construir pSEC84*tox*C. La secuencia de ADN de la unión de fusión *clyA* -*tox*C pretendida es confirmada usando el secuenciamiento del cebador 5' - CGATGCGGCAAA-ATTGAAATTAGCCACTGA- 3' (SEQ ID No: 17) que hibrida 172 bases aguas arriba del sitio *NheI* fabricado en el extremo 3' del *clyA*. Las construcciones son cribadas para la retención de la actividad hemolítica y confirmada para exportar el ClyA-Frag C en el sobrenadante por su análisis por inmunotransferencia Western.

Grupos de diez ratones Balb/c de 6 semanas de edad son inmunizados intranasalmente con $1,0 \times 10^{10}$ cfu de la cepa CVD 908-*htrA* que expresa la proteína de fusión ClyA-Frag C. Los ratones son sangrados antes y 30 días después de su inmunización, y su suero es almacenado a -20°C hasta su uso. Los anticuerpos presentes en el suero frente a los antígenos ClyA y Frag C son determinados por ELISA. Los resultados indican que la inmunización con la cepa CVD 908-*htrA* que expresa la proteína de fusión ClyA-Frag C provoca niveles de anticuerpos frente al antígeno Frag C que son significativamente altos que esos obtenidos con la cepa 908-*htrA* que no expresa la proteína de fusión ClyA-Frag C. Los resultados demuestran que la expresión del antígeno Frag C como una proteína de fusión con ClyA mejora la respuesta inmune frente a este antígeno. La inmunidad protectora frente a la toxina del tétano es confirmada mediante la inoculación de los ratones inmunizados con dosis que serían letales de la toxina del tétano natural.

REFERENCIAS

Atkins, A., N. R. Wyborn, A. J. Wallace, T. J. Stillman, L K. Black, A. B. Fielding, M. Hisakado, P. J. Artymiuk, y J. Green. 2000. Structure-function relationships of a novel bacterial toxin, hemolysin E. The role of $\alpha 6$. J. Biol. Chem. 275:41150-41155.

Bailey, J. E., Host-vector interactions in *Escherichia coli*, p. 29-77. In A. Fiechter (ed.), *Advances in Biochemical Engineering. Biotechnology*. Springer-Verlag, Berlin (1993).

Balbas, P., X. Soberon, E. Merino, M. Zurita, H. Lomeli, F. Valle, N. Flores, y F. Bolivar. 1986. Plasmid vector pBR322 and its special-purpose derivatives - a review. *Gene* 50:3-40.

Blomfield, I. C., V. Vaughn, R. F. Rest, y B. I. Eisenstein. 1991. Allelic exchange in *Escherichia coli* using the *Bacillus subtilis* *sacB* gene and a temperature-sensitive pSC101 replicon. *Mol. Microbiol.* 5:1447-1457.

Boe, L., K. Gerdes, y S. Molin. 1987. Effects of genes exerting growth inhibition and plasmid stability on plasmid maintenance. *J. Bacteriol.* 169:4646-4650.

Borchert, T. V. y V. Nagarajan. 1991. Effect of signal sequence alterations on the export of levansucrase in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 173:276-282.

Bramucci, M. G. y V. Nagarajan. 1996. Direct selection of cloned ADN in *Bacillus subtilis* based on sucrose-induced lethality. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:3948-3953.

Chervaux, C., N. Sauvonnet, A. Le Clainche, B. Kenny, A. L. Hunt, J. K. Broome-Smith, y I. B. Holland. 1995. Secretion of active β -lactamase to the medium mediated by the *Escherichia coli* haemolysin transport pathway. *Mol. Gen. Genet.* 249:237-245.

Corehero, J. L. y A. Villaverde. 1998. Plasmid maintenance in *Escherichia coli* recombinant cultures is dramatically, steadily, and specifically influenced by features of the encoded proteins. *Biotechnol. Bioeng.* 58:625-632.

Cserjan-Puschmann, M., W. Kramer, E. Duerschmid, G. Streidner, y K. Bayer. 1999. Metabolic approaches for the optimisation of recombinant fermentation processes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 53:43-50.

Datta, N. y P. Kontomichalou. 1965. Penicillinase synthesis controlled by infectious R factors in *Enterobacteriaceae*. *Nature* 208:239-241.

Dedonder, R. 1966. Levansucrase from *Bacillus subtilis*, p. 500-505. In E. F. Neufeld y V. Ginsburg (eds.), *Methods in Enzymology*. Academic Press, New York.

del Castillo, F. J., S. C. Leal, F. Moreno, y I. del Castillo. 1997. The *Escherichia coli* K-12 *sheA* gene encodes a 34-kDa secreted haemolysin. *Mol. Microbiol.* 25:107-115.

Fouet, A., M. Arnaud, A. Klier, y G. Rapoport. 1984. Characterization of the precursor form of the exocellular levansucrase from *Bacillus subtilis*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 119:795-800.

- 5 Galen, J. E., O. G. Gomez-Duarte, G. Losonsky, J. L. Halpern, C. S. Lauderhaugh, S. Kaintuck, M. K. Reymann, y M. M. Levine. 1997. A murine model of intranasal immunization to assess the immunogenicity of attenuated *Salmonella typhi* live vector vaccines in stimulating serum antibody responses to expressed foreign antigens. *Vaccine* 15:700-708.
- Galen, J. E. y M. M. Levine. 2001. Can a 'flawless' the vector vaccine strain be engineered? *Trends in Microbiology* 9:372-376.
- 10 Galen, J. E., J. Nair, J. Y. Wang, S. S. Wasserman, M. K. Tanner, M. Sztein, y M. M. Levine. 1999. Optimization of plasmid maintenance in the attenuated live vector vaccine strain *Salmonella typhi* CVD 908-htrA. *Infect. Immun.* 87:6424-6433.
- Gay, P., D. Le Coq, M. Steinmetz, T. Berkelman, y C.I. Kado. 1985. Positive selection procedure for entrapment of insertion sequence elements in Gram-negative bacteria. *J. Bacteriol.* 164:918-921.
- 15 Gay, P., D. Le Coq, M. Steinmetz, E. Ferrari, y J. A. Hoch. 1983. Cloning structural gene *sacB*, which codes for exoenzyme levansucrase of *Bacillus subtilis*: expression of the gene in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 153:1424-1431.
- Glick, B. R., *Biotechnol. Adv.*13:247-261 (1995).
- Han, Y. W.1990. Microbial levan. *Advances in Applied Microbiology* 35:171-194.
- Harcum y Bentley. 1993. *Biotechnol. Bioeng.* 42:675-685.
- 20 Hone, D. M., A. M. Harris, S. Chatfield, G. Dougan, y M. M. Levine. 1991. Construction of genetically defined double *aro* mutants of *Salmonella typhi*. *Vaccine* 9:810-816.
- Jung, H., J. Lebeault, y J. Pan. 1998. Surface display of *Zymomonas mobilis* levansucrase by using the ice-nucleation protein of *Pseudomonas syringae*. *Nat. Biotechnol.*16:576-580.
- 25 Lattemann, C. T., J. Maurer, E. Gerland, y T. F. Meyer. 2000. Autodisplay: functional display of active β -lactamase on the surface of *Escherichia coli* by the AIDA-I autotransporter. *J. Bacteriol.* 182:3726-3733.
- 30 Le Coq, D., P. Ratet, M. Steinmetz, y P. Gay. 1984. A genetic approach to levansucrase secretion in *Bacillus subtilis*, p.141-152. In A. T. Ganesan y J. A. Hoch (eds.), *Genetics and biotechnology of bacilli*. Academic Press, New York.
- LeBrun, E. y R. van Rappenbusch. 1980. The structure of *Bacillus subtilis* levansucrase at 3.8 Å resolution. *J. Biol. Chem.* 255:12034-12036.

Ludwig, A., S. Bauer, R. Benz, B. Bergmann, y W. Goebel. 1999. Analysis of the SlyA-controlled expression, subcellular localization and pore-forming activity of a 34 kDa haemolysin (ClyA) from *Escherichia coli* K-12. *Mol. Microbiol.* 31:557-567.

Matthew, M. y R. W. Hedges. 1976. Analytical isoelectric focusing of R factor-determined β -lactamases: correlation with plasmid compatibility. *J. Bacteriol.* 125:713-718.

McDermott, P. J., P. Gowland, y P. C. Gowland. 1993. Adaptation of *Escherichia coli* growth rates to the presence of pBR322. *Lett. Appl. Microbiol.* 17:139-143.

Orr, N., J. E. Galen, y M. M. Levine, 1999. Expression and immunogenicity of a mutant diphtheria toxin molecule, CRM197, and its fragments in *Salmonella typhi* vaccine strain CVD 908-htrA. *Infect. Immun.* 67:4290-4294.

Oscarsson, J., Y. Mizunoe, L. Li, X. Lai, A. Wieslander, y B. E. Uhlin. 1999. Molecular analysis of the cytolytic protein ClyA (SheA) from *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 32:1226-1238.

Oscarsson, J., Y. Mizunoe, B. E. Uhlin, y D. J. Haydon. 1996. Induction of haemolytic activity in *Escherichia coli* by the slyA gene product. *Mol. Microbiol.* 20:191-199.

Pecota, D. C., C. S. Kim, K. Wu, K. Gerdes, y T. K. Wood. 1997. Combining the hok/sok, parDE, and pnd postsegregational killer loci to enhance plasmid stability. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:1917-1924.

Pluckthun, A. y J. R. Knowles. 1987. The consequences of stepwise deletions from the signal-processing site of β -lactamase. *J. Biol. Chem.* 262:3951-3957.

Ried, J. y A. Collmer. 1987. An npl-sacB-sacR cartridge for constructing directed, unmarked mutations in Gram-negative bacteria by marker exchange-eviction mutagenesis. *Gene* 57:239-246.

Sambrook, J., E. F. Fritsch, y T. Maniatis. 1989. *Anonymous Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.

Sambrook, J. y D. W. Russell. 2001. *Expression of cloned genes in Escherichia coli*, p. 15. *Anonymous Molecular cloning. A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.

Shaw, K. J., P. N. Rather, R. S. Hare, y G. H. Miller. 1993. Molecular genetics of aminoglycoside resistance genes and familial relationships of the aminoglycoside-modifying enzymes. *Microbiol. Rev.* 57:38-163.

Smith & Bidochka. *Can. J. Microbiol.* 44:351-355 (1998).

Steinmetz, M., D. Le Coq, H. B. Djemia, y P. Gay. 1983. Genetic analysis of *sacB*, the structural gene of a secreted enzyme, levansucrase of *Bacillus subtilis* Marburg. *Mol. Gen. Genet.* 191:138-144.

Summers, D. K. 1998. Timing, self-control and sense of direction are the secrets of multicopy plasmid stability. *Mol. Microbiol.* 29:1137-1145.

Sutcliffe, J. G. 1978. Nucleotide sequence of the ampicillin resistance gene of *Escherichia coli* plasmid pBR322. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 75:3737-3741.

Tacket, C. O., M. Sztein, G. Losonsky, S. S. Wasserman, J. P. Nataro, R. Edelman, D. Pickard, G. Dougan, S. Chatfield, y M. M. Levine. 1997. Safety of live oral *Salmonella typhi* vaccine strains with deletions in *htrA* and *aroC aroD* and immune responses in humans. *Infect. Immun.* 65:452-456.

Wallace, A. J., T. J. Stillman, A. Atkins, S. J. Jamieson, P. A. Bullough, J. Green, y P. J. Artymiuk. 2000. *E. coli* hemolysin E (HlyE, ClyA, SheA): X-ray crystal structure of the toxin and observation of membrane pores by electron microscopy. *Cell* 100:265-276.

Wang, J. Y., F. Noriega. J. E. Galen, E. M. Barry, y M. M. Levine. 2000. Constitutive expression of the Vi polysaccharide capsular antigen in attenuated *Salmonella enterica* serovar Typhi oral vaccine strain CVD 909. *Infect. Immun.* 68:4647-4652.

Wang, J. Y., M. F. Pasetti, F. Noriega, R. J. Anderson, S. S. Wasserman, J. E. Galen, M. Sztein, y M. M. Levine. 2001. Construction, genotypic and phenotypic characterization, and immunogenicity of attenuated DguaBA *Salmonella enterica* serovar Typhi strain CVD 915. *Infect. Immun.* 69:4734-4741.

Wu, K. y T. K. Wood. 1994. Evaluation of the *hok/sot* killer locus for enhanced plasmid stability. *Biotechnol. Bioeng.* 44:912-921.

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> James E. Galen
 Universidad de Maryland
- 5 <120> USO DE HEMOLISINA CLYA PARA LA EXCRECIÓN DE PROTEÍNAS
 <130> UOFMD.007VPC
 <150> 60/252.516
 <151> 2000-11-22
 <160> 19
- 10 <170> FastSEQ para Windows Versión 4.0
 <210> 1
 <211> 6271
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
- 15 <220>
 <223> Plásmido de expresión pSEC84
- <400> 1
- | | | | | | | |
|------------|-------------|------------|-------------|-------------|-------------|------|
| gaattctgtg | gtagcacaga | ataatgaaaa | gtgtgtaaag | aagggtaaaa | aaaaccgaat | 60 |
| gcgaggcatc | cggttgaaat | aggggtaaac | agacattcag | aatgaatga | cggtaataaa | 120 |
| taaagttaat | gatgatagcg | ggagttattc | tagttgcgag | tgaaggtttt | gttttgacat | 180 |
| tcagtgtctg | caaatactta | agaataagtt | attgatttta | acctgaatt | attattgctt | 240 |
| gatgttaggt | gcttatttcg | ccattccgca | ataatcttaa | aaagttccct | tgcatttaca | 300 |
| ttttgaaaca | tctatagcga | taaatagaac | atcttaaaag | ttttagatc | atattcgtgt | 360 |
| tggattattc | tgcatttttg | gggagaatgg | acttgccgac | tgattaatga | gggttaatca | 420 |
| gtatgcagtg | gcataaaaaa | gcaataaaag | gcatataaca | gatcgatcct | aaacatccac | 480 |
| aggaggatgg | gatccaaaat | aaggaggaaa | aaaaaatgac | tagtattttt | gcagaacaaa | 540 |
| ctgtagaggt | agttaaaagc | gcgatcgaaa | ccgcagatgg | ggcattagat | ctttataaca | 600 |
| aatacctcga | ccaggtcatc | ccctggaaga | cttttgatga | aaccataaaa | gagttaagcc | 660 |
| gttttaaacg | ggagtactcg | caggaagctt | ctgttttagt | tgggtgatatt | aaagttttgc | 720 |
| ttatggacag | ccaggacaag | tattttgaag | cgacacaaac | tgtttatgaa | tgggtgtggtg | 780 |
| tcgtgacgca | attactctca | gcgtatattt | tactatttga | tgaatataat | gagaaaaaag | 840 |
| catcagccca | gaaagacatt | ctcattagga | tattagatga | tgggtgtcaag | aaactgaatg | 900 |
| aagcgcaaaa | atctctcctg | acaagttcac | aaagtttcaa | caacgcttcc | ggaaaactgc | 960 |
| tggcattaga | tagccagtta | actaatgatt | tttcggaaaa | aagtagttat | ttccagtcac | 1020 |
| aggtggatag | aattcgtaag | gaagcttatg | ccggtgctgc | agccggcata | gtcgccggtc | 1080 |
| cgtttgatt | aattatttcc | tattctattg | ctgcggcgct | gattgaaggg | aaattgattc | 1140 |
| cagaattgaa | taacaggcta | aaaacagtgc | aaaatttctt | tactagctta | tcagctacag | 1200 |
| tgaacaagc | gaataaagat | atcgatgctg | caaaattgaa | attagccact | gaaatagcag | 1260 |
| caattgggga | gataaaaaacg | gaaaccgaaa | caaccagatt | ctacgttgat | tatgatgatt | 1320 |
| taatgctttc | tttattaaaa | ggagctgcaa | agaaaaatgat | taacacctag | aatgaatacc | 1380 |
| aaacaagcga | tgtaagaag | acgcttttcg | aggttcctga | cgtcgctagc | tgataaccta | 1440 |
| gggcccagca | aaggccagga | accgtaaaaa | ggccgctgtg | ctggcgtttt | tccataggct | 1500 |
| ccgccccct | gacgagcatc | acaaaaatcg | acgctcaagt | cagaggtggc | gaaaccgac | 1560 |
| aggactataa | agataccagg | cgtttcccc | tggaaagctcc | ctcgtgcgct | ctcctgttcc | 1620 |
| gaccctgccg | cttaccggat | acctgtccgc | ctttctccct | tcgggaagcg | tggcgctttc | 1680 |
| tcatagctca | cgctgtaggt | atctcagttc | gggtgtaggtc | gttcgctcca | agctgggctg | 1740 |
| tgtgcacgaa | cccccgttc | agcccagacc | ctgcgcctta | tccggttaact | atcgtcttga | 1800 |

gtccaacccg gtaagacacg acttatcgcc actggcagca gccactggta acaggattag 1860
 cagagcgagg tatgtaggcg gtgctacaga gttccttgaag tggtaggcta actacggcta 1920
 cactagaagg acagtatttg gtatctgccc tctgctgaag ccagttacct tcggaaaaag 1980
 agttggtagc tcttgatccg gcaaaacaaac caccgctggg agcgggtggt tttttgtttg 2040
 caagcagcag attacgcgca gaaaaaaagg atctcaagaa gatcctttga tcttttctac 2100
 ggggtctgac gctcagtaga tctaaaacac taggcccacg agttttaga aacgcaaaaa 2160
 ggccatccgt caggatggcc ttctgcttaa ttgatgcct ggcagtttat ggcgggcgct 2220
 ctgcccgcca cctccgggc cgttgcttcg caacgttcaa atccgctccc ggcgatttg 2280
 tctactcag gagagcgttc accgacaaac aacagataaa acgaaaggcc cagtctttcg 2340
 actgagcctt tgcgtttatt tgatgcctgg cagttcccta ctctcgcatg gggagacccc 2400
 aactacat cggcgctacg gcgtttcact tctgagttcg gcatggggtc aggtgggacc 2460
 accgcgctac tgcgcacag caaattctgt tttatcagac cgcttctgcg ttctgattta 2520
 atctgtatca ggctgaaaat cttctctcat ccgcaaaaac agccaagctg gatctggcaa 2580
 atcgctgaat attccttttg tctccgacca tcaggcacct gagtcgctgt ctttttctgtg 2640
 acattcagtt cgctgcgctc acggctctgg cagtgaatgg gggtaaatgg cactacaggc 2700
 gctttttatg gattcatgca aggaaactac ccataataca agaaaagccc gtcacgggct 2760
 tctcagggcg ttttatggcg gctctgctat gtggtgctat ctgacttttt gctgttcagc 2820
 agttcctgce ctctgatttt ccagctgac cacttcggat tatcccgtga caggtcattc 2880
 agactggcta atgcaccag taaggcagcg gtatcatcaa caggcttacc cgtcttactg 2940
 tcaaccggat ctaaaacact agcccaacct ttcatagaag gcggcggtgg aatcgaaatc 3000
 tctgatggc aggttgggcg tcgcttggtc ggtcatttcg aaccccagag tcccgtcag 3060
 aagaactcgt caagaaggcg atagaaggcg atgcgctgcg aatcgggagc ggcgataaccg 3120
 taagcagca ggaagcggtc agcccattcg ccgccaagct cttcagcaat atcacgggta 3180
 gccaacgcta tgcctgata gcggtccgcc acacccagcc ggccacagtc gatgaatcca 3240
 gaaaagcggc cttttccac catgatattc ggcaagcagg catcgccatg ggtcacgagc 3300
 agatcctcgc cgtcgggcat gcgcgcttga agcattcggc acagttcggc tggcgcgagc 3360
 cctctgctct cttcglccag atcatcctga tcgacaagac cggcttccat ccgagtacgt 3420
 gctcgtcctg tggatgltt cgcttgggtg tcgaatgggc aggtagccgg atcaagcgt 3480
 tgcagccgce gatttgcac agccatgatg gatactttct cggcaggagc aaggtgagat 3540
 gacaggagat cctgcccgg cacttcgccc aatagcagcc agtcccttcc cgctcagtg 3600
 acaacgctga gcacagctgc gcaaggaaag cccgctcgtg ccagccacga tagccgct 3660
 gctcgtcctc gacttccatt cagggcaccg gacaggtcgg tcttgacaaa aagaaccggg 3720
 cgcccctgcg ctgacagccg gaacacggcg gcatcagagc agccgattgt ctgttgtgcc 3780
 cagtcatagc cqaatagcct ctccacccaa gcggccggag aacctgcgt caatccatct 3840
 tgttcaatca tgcgaaacga tctctatctc gtctcttga cagatcttga tcccctgcgc 3900
 catcagatcc ttggcgcaaa gaaagccatc cagtttactt tgcaggcct cccaacctta 3960
 ccagaggcg cccagctgg caattccggt tcgctgctag acaacatcag caaggagaaa 4020
 ggggtaccg gcgaaccagc agccccttta taaaggcgt tcagtagtca gaccagcatc 4080
 agtctgaaa aggcgggct gcgcccgtt ccaggttgct acttaccgga ttcgtaagcc 4140
 atgaaagccg ccacctccct gtgtccgtct ctgtaacgaa tctcgcacag cgattttcgt 4200
 gtcagataag tgaatatcaa cagtgtgaga cacacgatca acacacacca gacaagggaa 4260
 ctctgtggta gtttcatggc cttcttctcc ttgcgcaaag cgcgtaaga ggctatcctg 4320
 atgtggacta gacatagggg tgctcgtgg tggttaatga aaattaact actacggggc 4380
 tatcttcttt ctgccacaca acacggcaac aaaccacct cacgctatga ggcagaaagc 4440
 ctcaagcggc gggcacatca tagcccatat acctgcagc tgaccacact cacttccct 4500
 gaaaataatc cgctcattca gaccgttcac gggaaatccg tgtgattgtt gccgcatcac 4560
 gctgcctccc ggagtttgtc tcgagcactt ttgttaccg ccaaacaaaa ccaaaaaaca 4620
 acccataccc aacccaataa aacacaaaa caagacaaat aatcattgat tgatggttga 4680
 aatggggtaa acttgacaaa caaacccact taaacccaa aacataccca aacacacacc 4740
 aaaaaaacac cataaggagt tttataaatg ttggtattca ttgatgacgg ttcaacaaac 4800
 atcaaaactac agtggcagga aagcgacgga acaattaaac agcacattag cccgaacagc 4860
 ttcaaacgcg agtgggcagt ctcttttggg gataaaaagg tctttaacta cacactgaac 4920
 ggcgaacagt attcatttga tccaatcagc ccggtatcgt tagtcacaac caatcgcga 4980
 tggcaataca gcgacgttaa tgcggttgc gtgctcacg ccttactgac cagtgytctg 5040
 ccggtaaagc aagtggatat tgtttgcaca cttcctctga cagagtatta cgacagaaat 5100
 aaccaaccca atacggaaaa tattgagcgt aagaaagcaa acttccggaa aaaaattaca 5160
 traaatggcg gggatacatt cacaataaaa gatgtaaaag tcatgctgta atctataaccg 5220

```

gcagggttatg aagttctaca agaactggat gagttagatt ctttattaat tatagatctc 5280
gggggacac ctagatgat ttctcaggta atggggaaat tatcggggat cagtaaaata 5340
tacggagact catctcttgg tgtctctctg gttacatctg cagtaaaaga tgccttttct 5400
cttgcgagaa caaaaggaag tagctatctt gctgacgata taatcattca cagaaaagat 5460
aataactatc tgaagcaacg aattaatgat gagaacaaaa tatcaatagt caccgaagca 5520
atgaatgaag cacttcgtaa acttgagcaa cgtgtattaa atacgctcaa tgaattttct 5580
ggttatactc atggtatggt tataggcggg ggcgcagaat taatatgcca tgcagtaaaa 5640
aaacacacac agattcgtga tgaacgtttt ttcaaaacca ataactctca atatgattta 5700
gttaacggta tgtatctcat aggtaattaa tgatggacaa gcgcagaacc attgccttca 5760
aactaaatcc agatgtaaata caaacagata aaattgtttg tgatacactg gacagtatcc 5820
cgcaagggga acgaagccgc cttaaccggg ccgcactgac ggcaggctctg gccttatata 5880
gacaagatcc cggaccctt ttctttttat gtgagctgct gacgaaagaa accacatttt 5940
cagatatcgt gaatatattg agatcgcgat ttccaaaaga gatggccgat ttttaattctt 6000
caatagtcac tcaatcctct tcacaacaag agcaaaaaag tgatgaagag accaaaaaaa 6060
atgcgatgaa gctaataaat taattcaatt attattgagt tccctttatc cactatcagg 6120
ctggataaag ggaactcaat caagttattt tcttaccagt cattaataa tcggttattat 6180
gaaataatcg tttgcactgt ctctgttatt caggcaattt caataaaggg acttgctcac 6240
gctctgtcat tttctgaaac ttttcatgct g 6271

```

<210> 2

<211> 305

<212> PRT

5 <213> Salmonella Typhi

<400> 2

```

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

```

Thr Glu Thr Thr Arg Phe Tyr Val Asp Tyr Asp Asp Leu Met Leu Ser
 260 265 270
 Leu Leu Lys Gly Ala Ala Lys Lys Met Ile Asn Thr Cys Asn Glu Tyr
 275 280 285
 Gln Gln Arg His Gly Lys Lys Thr Leu Phe Glu Val Pro Asp Val Ala
 290 295 300
 Ser
 305

<210> 3

<211> 102

<212> ADN

5 <213> Secuencia Artifical

<220>

<223> Cebador de clonación

10 <400> 3

ggatccaaaa taaggaggaa aaaaaaatga ctagtatttt tgcagaacaa actgtagagg 60
 tagttaaag cgcgatcgaa accgcagatg gggcattaga tc 102

<210> 4

<211> 101

15 <212> ADN

<213> Secuencia Arificial

<220>

<223> Cebador de clonación

20

<400> 4

cctaggttat cagctagcga cgtcaggaac ctcgaaaagc gtcttcttac catgacgttg 60
 ttggtattca ttacaggtgt taatcatttt ctttgcagct c 101

<210> 5

<211> 97

25 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador de clonación

30

<400> 5

cacggtaaga agacgctttt cgaggttcct gacgtcgcta gctgataacc taggtcatgt 60
tagacagctt atcatcgata agctttaatg cggtagt 97

<210> 6

<211> 69

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador de clonación

10

<400> 6

agatctacta gtgtcgacgc tagctatcag gtcgagggtg cccggctcca tgcaccgcga 60
cgcaacgcg 69

<210> 7

<211> 60

15 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador de clonación

20

<400> 7

actagtcacc cagaaacgct ggtgaaagta aaagatgctg aagatcagtt ggggtgcacga 60

<210> 8

<211> 101

25 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador de clonación

30

<400> 8

cattaaaggt tatcgatgat aagctgtcaa acatgagcta gcctagggtca ttaccaatgc 60
ttaatcagtg aggcacctat ctcagcgatc tgtctatttc g 101

<210> 9

<211> 101

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

5 <400> 9

```
cgaaatagac agatcgctga gatagggtgcc tcaactgatta agcattggta atgacctagg 60
ctagctcatg ttgacagct tatcatcgaat aacctttaat g 101
```

<210> 10

<211> 71

<212> ADN

10 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador de clonación

<400> 10

```
gagcactagt aaagaaacga-accaaaagcc atataaggaa acatacggca tttcccatat 60
tacacgccat g 71
```

<210> 11

<211> 103

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

20

<220>

<223> Cebador de clonación

<400> 11

```
taaactaccg cattaagct tatcgatgat aagctgtcaa acatgaccgc ggtcactatt 60
tgtaactgt taattgtcct tgttcaagga tgctgtcttt gac 103
```

25

<210> 12

<211> 46

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

30

<220>

<223> Cebador de clonación

<400> 12

tcatgttga cagcttatca tcgataagct ttaatgcggt agttta

46

<210> 13

5 <211> 80

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

10 <223> Cebador de clonación

<400> 13

gcgcagatct taatcatcca caggagggcg tagcatgagt aaaggagaag aacttttcac 60
tggagttgtc ccaattcttg 80

<210> 14

<211> 110

15 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador de clonación

20

<400> 14

gtgataaact accgcattaa agcttatcga tgataagctg tcaaacatga gcgctctaga 60
actagttcat tatttgtaga gctcatccat gccatgtgta atcccagcag 110

<210> 15

<211> 94

25 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador de clonación

30

<400> 15

gcgcactagt aaaaaccttg attggtgggt cgacaacgaa gaagacatcg atgttatcct 60
gaaaaagtct accattctga acttgacat caac 94

<210> 16

<211> 97

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

5 <220>

<223> Cebador de clonación

<400> 16

```
aactaccgca ttaaagctta tcgatgataa gctgtcaaac atgagctagc ctaggtcatt 60
agtcgttggt ccaaccttca tcggtcggaa cgaagta 97
```

10 <210> 17

<211> 30

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

15 <220>

<223> Cebador de clonación

<400> 17

```
cgatgcgga aaattgaaat tagccactga 30
```

20

<210> 18

<211> 8908

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

25

<220>

<223> vector pSEC84sacB

<400> 18

gaattctgtg	gtagcacaga	ataatgaaaa	gtgtgtaaag	aagggtaaaa	aaaaccgaat	60
gcgaggcatc	cggttgaaat	aggggtaaac	agacattcag	aatgaatga	cggtaataaa	120
taaagttaat	gatgatagcg	ggagttattc	tagttgagag	tgaaggtttt	gttttgacat	180
tcagtgctgt	caaataactta	agaataagtt	attgatttta	accttgaatt	attattgctt	240
gatgttaggt	gcttatttcg	ccattccgca	ataatcttaa	aaagttccct	tgcatttaca	300
ttttgaaaca	tctatagcga	taaataaaac	atcttaaaaag	tttttagtacc	atattcgtgt	360
tggattattc	tgcatttttg	gggagaatgg	acttgccgac	tgattaatga	gggttaatca	420
gtatgcagtg	gcataaaaaa	gcaataaaag	gcatataaca	gatcgatcct	aaacatccac	480
aggaggatgg	gatccaaaat	aaggaggaag	aaaaaatgac	tagtattttt	gcagaacaaa	540
ctgtagaggt	agttaaaagc	gcgatcgaaa	ccgcagatgg	ggcattagat	ctttataaca	600
aataacctga	ccagtcctac	ccctggaaga	cctttgatga	aaccataaaa	gagttaaacc	660
gttttaacaa	ggagtactcg	caggaagcct	ctgttttagt	tggtgatatt	aaagttttgc	720
ttatggacag	ccaggacaag	tattttgaag	cgacacaaaac	tgtttatgaa	tggtgtggtg	780
tcgtgacgca	attactctca	gcgtatattt	tactatttga	tgaatataat	gagaaaaaag	840
catcagccca	gaaagacatt	ctcattagga	tattagatga	tggtgtcaag	aaactgaatg	900
aagcgcaaaa	atctctcctg	acaagttcac	aaagtttcaa	caacgcttcc	ggaaaactgc	960
tggcattaga	tagccagtta	actaatgatt	tttcggaaaa	aagtagttat	ttccagtcac	1020
aggtggatag	aattcgtaag	gaagcttatg	ccggtgctgc	agccggcata	gtcgcgggtc	1080
cgtttgattt	aattatttcc	tattctattg	ctgcgggctg	gattgaaggg	aaattgattc	1140
cagaattgaa	taacaggcta	aaaacagtgc	aaaatttctt	tactagctta	tcagctacag	1200
tgaacaagc	gaataaagat	atcgatgcgg	caaaaattgaa	attagccact	gaaatagcag	1260
caattgggga	gataaaaaacg	gaaaccgaaa	caaccagatt	ctacgttgat	tatgatgatt	1320
taatgctttc	tttattaaaa	ggagctgcaa	agaaaaatgat	taacacctgt	aatgaatacc	1380
aacaacgtca	tggtaaagaag	acgcttttcg	aggttcctga	cgtcgctagt	aaagaaacga	1440
acaaaagcc	atataaggaa	acatacggca	tttcccatat	tacacgccat	gatatgctgc	1500
aatccctga	acagcaaaaa	aatgaaaaat	atcaagttcc	tgaattcgat	tcgtccacaa	1560
ttaaaaatat	ctcttctgca	aaaggcctgg	acgtttggga	cagctggcca	ttacaaaacg	1620
ctgacggcac	tgctgcaaac	tatcacggct	accacatcgt	ctttgcatta	gccggagatc	1680
ctaaaaatgc	ggatgacaca	tcgatttaca	tgttctatca	aaaagtcggc	gaaacttcta	1740
ttgacagctg	gaaaaacgct	ggccgcgtct	ttaaagacag	cgacaaattc	gatgcaaatg	1800
attctatcct	aaaagaccaa	acacaagaat	ggtcaggttc	agccacattt	acatctgacg	1860
gaaaaatccg	tttattctac	actgatttct	ccggtaaaca	ttacggcaaa	caaacactga	1920
caactgcaca	agttaacgta	tcagcatcag	acagctcttt	gaacatcaac	ggtgtagagg	1980
attataaatc	aatctttgac	ggtgacggaa	aaacgtatca	aatgtacag	cagttcatcg	2040

atgaaggcaa	ctacagctca	ggcgacaacc	atacgctgag	agatcctcac	tacgtagaag	2100
ataaaggcca	caaatactta	gtattingaag	caaacactgg	aactgaagat	ggctaccaag	2160
gcgaagaatc	tttatttaac	aaagcatact	atggcaaaaag	cacatcattc	ttcogtcaag	2220
aaagtcaaaa	acttctgcaa	agcgataaaa	aacgcacggc	tgagttagca	aacggcgctc	2280
tcggtatgat	tgagctaaac	gatgattaca	cactgaaaaa	agtgatgaaa	ccgctgattg	2340
catctaacac	agtaacagat	gaaattgaac	gcgcgaacgt	ctttaaatag	aacggcaaat	2400
ggtacctggt	cactgactcc	cgcgatcaa	aaatgacgat	tgacggcatt	acgtctaacg	2460
atattttacat	gcttggttat	gttttctaatt	ctttaactgg	cccatacaag	ccgctgaaca	2520
aaactggcct	tgtgttaaaa	atggatcttg	atcctaacga	tgtaaccttt	acttactcac	2580
acttcgctgt	acctcaagcg	aaaggaaaaca	atgtcgtgat	tacaagctat	atgacaaaag	2640
gaggattcta	cgagacaaa	caatcaacgt	ttcgccaag	cttcctgctg	acatcaaaag	2700
gcaagaaaac	atctgttgtc	aaagacagca	tccctgaaca	aggacaatta	acagttaaca	2760
aatagtgacc	cgggtcatgt	ttgacagctt	atcatcgata	agctttaatg	cggtagttta	2820
tcacagttaa	attgctaacg	cagtcaggca	ccgtgatga	aatctaaca	tgcgctcadc	2880
gtcatcctcg	gcaccgtcac	cctggatgct	gtaggcatag	gcttggttat	ggcggctactg	2940
ccgggcctct	tgccggatat	cgtccattcc	gacagcatcg	ccagtcacta	tggcgtgctg	3000
ctagcgctat	atcggttgat	gcaatttcta	tgcgcacccg	ttctcggagc	actgtccgac	3060
cgctttggcc	gccgccaggt	cctgctcgct	tcgctacttg	gagccactat	cgactacgcg	3120
atcatggcga	ccacaccggt	cctgtggatc	ctctacgccg	gacgcactgt	ggcgggcatc	3180
accggcgcca	caggtgcggt	tgctggcgcc	tatatcgccg	acatcacoga	tggggaaagat	3240
cgggctcgcc	acttcgggct	catgagcgct	tgtttcggcg	tgggtatggt	ggcaggcccc	3300
gtggccgggg	gactgttggg	cgccatctcc	ttgcatgcac	cattccttgc	ggcggcggtg	3360
ctcaacggcc	tcaacctact	actgggctgc	ttcctaatgc	aggagtgcga	taaggagag	3420
cgctcgaccga	tgcccttgag	agccttcaac	ccagtcagct	ccttcgggtg	ggcgcggggc	3480
atgactatcg	tcgccgcact	tatgactgtc	ttctttatca	tgcaactcgt	aggacaggtg	3540
ccggcagcgc	tctgggtcat	tttcggcgag	gaccgcttcc	gctggagcgc	gacgatgatc	3600
ggcctgtcgc	ttgcggtatt	cggaatcttg	cacgcctcgc	ctcaagcctt	cgctactggt	3660
cccgcacca	aacgtttcgg	cgagaagcag	gccattatcg	ccggcatggc	ggccgacgcg	3720
ctgggctacg	tcttgctggc	gttcgcgacg	cgaggctgga	tggccttccc	cattatgatt	3780
cttctcgctt	ccggcggcat	cgggatgccc	gcgttgacag	ccatgctgtc	caggcaggta	3840
gatgacgacc	atcagggaca	gcttcaagga	tcgctcgcgg	ctcttaccag	cctaacttcg	3900
atcactggac	cgctgatcgt	cacggcgatt	tatgccgcct	cggcgagcac	atggaacggg	3960
ttggcatgga	ttgtaggcgc	cgccctatac	cttgtctgcc	tccccgcggt	gcgtcgcggt	4020
gcatggagcc	gggccacctc	gacctgatag	ctagcgtcga	cactagctga	taacctaggg	4080
ccagcaaaag	gccaggaacc	gtaaaaaggc	cgctgtgctg	gcgtttttcc	atagctccg	4140
ccccctagac	gagcatcaca	aaaatcgacg	ctcaagtca	aggtagcgaa	acccgacag	4200
actataaaga	taccaggcgt	ttccccctgg	aaagctccctc	gtgcgctctc	ctgttccgag	4260
cctgccgctt	accggatacc	tgtccgcctt	tctcccttcg	ggaagcgtgg	cgctttctca	4320
tagctcacgc	tgtaggtatc	tcagttcggg	gtaggtcgtt	cgctccaagc	tgggctgtgt	4380
gcacgaacc	cccgttcagc	ccgaccgctg	cgcttatcc	ggtaactatc	gtcttgagtc	4440
caaccgcgta	agacacgact	tatcgccact	ggcagcagcc	actggtaaca	ggattagcag	4500
agcgaggat	gtaggcgggtg	ctacagagtt	cttgaagtgg	tggcctaact	acggctacac	4560
tagaaggaca	gtattingta	tctgcgctct	gctgaagcca	gttaccttcg	gaaaaagagt	4620
tggtagctct	tgatccggca	aacaaccac	cgctggtagc	ggtgggtttt	ttgtttgcaa	4680
gcagcagatt	acgcgcagaa	aaaaaggatc	tcaagaagat	cctttgatct	tttctacggg	4740
gtctgacgct	cagtagatct	aaaacactag	gcccaagagt	ttgtagaaac	gcaaaaaggc	4800
catccgtcag	gatggccttc	tgcttaattt	gatgcctggc	agtttatggc	gggctcctg	4860
cccgccacc	tccgggcccgt	tgcttcgcaa	cgttcaaatc	cgctcccggc	ggatttgtcc	4920
tactcaggag	agcgttcacc	gacaaacaac	agataaaacg	aaaggcccag	tctttcgact	4980
gagcctttcg	ttttattinga	tgccctggcag	ttccctactc	tcgcatgggg	agacccca	5040
ctaccatcgg	cgctacggcg	tttactttct	gagttcggca	tggggtcagg	tgggaccacc	5100
gcgctactgc	cgccaggcaa	attctgtttt	atcagaccgc	ttctgcgttc	tgatttaac	5160
tgtatcaggc	tgaaaatctt	ctctcatccg	ccaaaacagc	caagctggat	ctggcaaatc	5220
gctgaatatt	ccttttgtct	ccgaccatca	ggcaacctgag	tcgctgtctt	tttctgaca	5280
ttcagttcgc	tgcgctcacg	gctctggcag	tgaatggggg	taaatggcac	tacaggcgcc	5340
ttttatggat	tcatgcaagg	aaactacca	taatacaaga	aaagcccgtc	acgggcttct	5400
cagggcgctt	tatggcgggt	ctgctatgtg	gtgctatctg	actttttgct	gttcagcagt	5460

tcttgcctc	tgattttcca	gtctgaccac	ttcggattat	cccgtgacag	gtcattcaga	5520
ctggctaag	caccagtaa	ggcagcgta	tcatcaacag	gcttaccctg	cttactgtca	5580
accggatcta	aaacactagc	ccaacctttc	atagaaggcg	gcggtggaat	cgaaatctcg	5640
tgatggcag	ttggcgctcg	cttggctcgg	catttcgaac	cccagagtcc	cgctcagaag	5700
aactcgtcaa	gaaggcgata	gaaggcgatg	cgctgcgaat	cgggagcggc	gataccgtaa	5760
agcacgagga	agcggtcagc	ccattcgccg	ccaagctctt	cagcaatatic	acgggtagcc	5820
aacgctatgt	cctgatagcg	gtccgccaca	cccagccggc	cacagtcgat	gaatccagaa	5880
aagcggccat	tttccaccat	gatattcggc	aagcaggcat	cgccatgggt	cacgacgaga	5940
tcttgcctc	cgggcatgcg	cgccttgagc	ctggcgaaca	gttcggctgg	cgcgagcccc	6000
tgatgctctt	cgtccagatc	atcctgatcg	acaagaccgg	cttccatccg	agtacgtgct	6060
cgctcgatgc	gatgtttcgc	ttggtggtcg	aatgggcagg	tagccggatc	aagcgtatgc	6120
agccgccgca	ttgcatcagc	catgatggat	actttctcgg	caggagcaag	gtgagatgac	6180
aggagatcct	gccccggcac	ttcgcccaat	agcagccagt	cccttcccgc	ttcagtgaca	6240
acgtcgagca	cagctgcgca	aggaacgccc	gtcgtggcca	gccacgatag	ccgcgagccc	6300
tcgtcctgca	gttcattcag	ggcacccggc	aggtcggctc	tgacaaaaag	aaccgggcgc	6360
ccctgcgctg	acagccggaa	cacggcggca	tcagagcagc	cgattgtctg	ttgtgccag	6420
tcatagccga	atagcctctc	cacccaagcg	gccggagaac	ctgcgtgcaa	tccatcttgt	6480
tcaatcatgc	gaaacgatcc	tcctcctgtc	tcttgatcag	atcttgatcc	cctgcgcat	6540
cagatccttg	gcggcaagaa	agccatccag	ttacttttgc	agggcttccc	aaccttacca	6600
gagggcgccc	cagctggcaa	ttccggttcg	ctgctagaca	acatcagcaa	ggagaaaggg	6660
gctaccggcg	aaccagcagc	ccctttataa	agggcgttca	gtagtacagc	cagcatcagt	6720
cctgaaaagg	cgggcctgcg	cccgcctcca	ggttgctact	taccggattc	gtaagccatg	6780
aaagccgcca	cctccctgtg	tccgtctctg	taacgaatct	cgcacagcga	ttttcgtgtc	6840
agataaagtga	atatcaacag	tgtgagacac	acgatcaaca	cacaccagac	aagggaaact	6900
cgtggtagtt	tcatggcctt	cttctccttg	cgcaaaagcg	ggtaagaggc	tatcctgatg	6960
tgactagac	atagggatgc	ctcgtgggtg	ttaatgaaaa	ttaacttact	acggggctat	7020
cttctttctg	ccacacaaca	cggcaacaaa	ccaccttcac	gtcatgaggc	agaaagcctc	7080
aagcgcgggg	cacatcatag	cccatatacc	tgacgcgtga	ccacactcac	tttccctgaa	7140
aataatccgc	tcatcagac	cgttcacggg	aaatccgtgt	gattgttgcc	gcatcacgct	7200
gcctcccgga	gtttgtctcg	agcacttttg	ttaccgcgca	aacaaaacc	aaaaacaacc	7260
catacccaac	ccaataacc	accaaaacaa	gacaaaataat	cattgattga	tggttgaaat	7320
ggggtaaaact	tgacaaaaca	accacttaa	aacccaaaac	atacccaaac	acacaccaa	7380
aaaacacccat	aaggagtttt	ataaatggtg	gtattcattg	atgacggttc	aacaaacatc	7440
aaactacagt	ggcaggaag	cgacggaaca	attnaacagc	acattagccc	gaacagcttc	7500
aaacgcgagt	ggcagctctc	ttttgggtgat	aaaaaggtct	ttaactacac	actgaacggc	7560
gaacagatgt	catttgatcc	aatcagccc	gatcctgtag	tcacaaccaa	tatcgtatgg	7620
caatacagcg	acgttaatgt	cgttgccagt	catcacgcct	tactgaccag	tggtctgccg	7680
gtaagcgaag	tggatattgt	ttgcacactt	cctctgacag	agtattacga	cagaaataac	7740
caacccaata	cggaaaatat	tgagcgtaag	aaagcaaact	tccggaaaaa	aattacatta	7800
aatggcgggg	atacattcac	aataaaagat	gtaaaagtca	tgctgaatc	tataccggca	7860
ggttatgaag	ttctacaaga	actggatgag	ttagattctt	tattaattat	agatctcggg	7920
ggcaccacat	tagatatttc	tcaggtaatg	gggaaattat	cggggatcag	taaaatatac	7980
ggagactcat	ctcttggtgt	ctctctggtt	acatctgcag	taaaagatgc	cctttctctt	8040
gcgagaacaa	aaggaagtag	ctatcttgct	gacgatataa	tcattcacag	aaaagataat	8100
aactatctga	agcaacgaat	taatgatgag	aacaaaatat	caatagtcac	cgaagcaatg	8160
aatgaagcac	ttcgtaaaact	tgagcaacgt	gtattaaata	cgctcaatga	attttctggt	8220
tatactcatg	ttatggttat	aggcggggc	gcagaattaa	tatgcgatgc	agtaaaaaaa	8280
cacacacaga	ttcgtgatga	acgttttttc	aaaaccaata	actctcaata	tgatttagtt	8340
aacggtatgt	atctcatagg	taattaatga	tggaacagcg	cagaaccatt	gccttcaaac	8400
taaaccaga	tgtaaatcaa	acagataaaa	ttgtttgtga	tacactggac	agtatcccgc	8460
aaggggaacg	aagccgcctt	aaccgggccc	cactgacggc	aggtctggcc	ttatacagac	8520
aagatccccg	gaccctttc	cttttatgtg	agctgctgac	gaaagaaacc	acattttcag	8580
atctcgtgaa	tatattgaga	tcgctatttc	caaaagagat	ggccgatttt	aattcttcaa	8640
tagtactca	atcctcttca	caacaagagc	aaaaaagtga	tgaagagacc	aaaaaaaaatg	8700
cgatgaagct	aataaattaa	ttcaattatt	attgagttcc	ctttatccac	tatcaggctg	8760
gataaagggg	actcaatcaa	gttattttct	taccagtcac	tacataatcg	ttattatgaa	8820
ataatcgttt	gcactgtctc	tgttattcag	gcaatttcaa	taaaggcact	tgctcacgct	8880

<210> 19

<211> 2253

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

5

<220>

<223> gen de fusión ClyA::SacB

<221> CDS

10 <222> (0)...(2253)

<400> 19

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

ES 2 349 114 T3

48

gct tat gcc ggt gct gca gcc ggc ata gtc gcc ggt ccg ttt gga tta	576
Ala Tyr Ala Gly Ala Ala Ala Gly Ile Val Ala Gly Pro Phe Gly Leu	
180 185 190	
att att tcc tat tct att gct gcg ggc gtg att gaa ggg aaa ttg att	624
Ile Ile Ser Tyr Ser Ile Ala Ala Gly Val Ile Glu Gly Lys Leu Ile	
195 200 205	
cca gaa ttg aat aac agg cta aaa aca gtg caa aat ttc ttt act agc	672
Pro Glu Leu Asn Asn Arg Leu Lys Thr Val Gln Asn Phe Phe Thr Ser	
210 215 220	
tta tca gct aca gtg aaa caa gcg aat aaa gat atc gat gcg gca aaa	720
Leu Ser Ala Thr Val Lys Gln Ala Asn Lys Asp Ile Asp Ala Ala Lys	
225 230 235 240	
ttg aaa tta gcc act gaa ata gca gca att ggg gag ata aaa acg gaa	768
Leu Lys Leu Ala Thr Glu Ile Ala Ala Ile Gly Glu Ile Lys Thr Glu	
245 250 255	
acc gaa aca acc aga ttc tac gtt gat tat gat gat tta atg ctt tct	816
Thr Glu Thr Thr Arg Phe Tyr Val Asp Tyr Asp Asp Leu Met Leu Ser	
260 265 270	
tta tta aaa gga gct gca aag aaa atg att aac acc tgt aat gaa tac	864
Leu Leu Lys Gly Ala Ala Lys Lys Met Ile Asn Thr Cys Asn Glu Tyr	
275 280 285	
caa caa cgt cat ggt aag aag acg ctt ttc gag gtt cct gac gtc gct	912
Gln Gln Arg His Gly Lys Lys Thr Leu Phe Glu Val Pro Asp Val Ala	
290 295 300	
agt aaa gaa acg aac caa aag cca tat aag gaa aca tac ggc att tcc	960
Ser Lys Glu Thr Asn Gln Lys Pro Tyr Lys Glu Thr Tyr Gly Ile Ser	
305 310 315 320	
cat att aca cgc cat gat atg ctg caa atc cct gaa cag caa aaa aat	1008
His Ile Thr Arg His Asp Met Leu Gln Ile Pro Glu Gln Gln Lys Asn	
325 330 335	
gaa aaa tat caa gtt cct gaa ttc gat tcg tcc aca att aaa aat atc	1056
Glu Lys Tyr Gln Val Pro Glu Phe Asp Ser Ser Thr Ile Lys Asn Ile	
340 345 350	
tct tct gca aaa ggc ctg gac gtt tgg gac agc tgg cca tta caa aac	1104
Ser Ser Ala Lys Gly Leu Asp Val Trp Asp Ser Trp Pro Leu Gln Asn	
355 360 365	
gct gac ggc act gtc gca aac tat cac ggc tac cac atc gtc ttt gca	1152
Ala Asp Gly Thr Val Ala Asn Tyr His Gly Tyr His Ile Val Phe Ala	
370 375 380	
tta gcc gga gat cct aaa aat gcg gat gac aca tcg att tac atg ttc	1200
Leu Ala Gly Asp Pro Lys Asn Ala Asp Asp Thr Ser Ile Tyr Met Phe	
385 390 395 400	

ES 2 349 114 T3

49

tat	caa	aaa	gtc	ggc	gaa	act	tct	att	gac	agc	tgg	aaa	aac	gct	ggc	1248
Tyr	Gln	Lys	Val	Gly	Glu	Thr	Ser	Ile	Asp	Ser	Trp	Lys	Asn	Ala	Gly	
				405					410					415		
cgc	gtc	ttt	aaa	gac	agc	gac	aaa	ttc	gat	gca	aat	gat	tct	atc	cta	1296
Arg	Val	Phe	Lys	Asp	Ser	Asp	Lys	Phe	Asp	Ala	Asn	Asp	Ser	Ile	Leu	
			420					425					430			
aaa	gac	caa	aca	caa	gaa	tgg	tca	ggg	tca	gcc	aca	ttt	aca	tct	gac	1344
Lys	Asp	Gln	Thr	Gln	Glu	Trp	Ser	Gly	Ser	Ala	Thr	Phe	Thr	Ser	Asp	
		435					440					445				
gga	aaa	atc	cgt	tta	ttc	tac	act	gat	ttc	tcc	ggg	aaa	cat	tac	ggc	1392
Gly	Lys	Ile	Arg	Leu	Phe	Tyr	Thr	Asp	Phe	Ser	Gly	Lys	His	Tyr	Gly	
	450					455					460					
aaa	caa	aca	ctg	aca	act	gca	caa	ggt	aac	gta	tca	gca	tca	gac	agc	1440
Lys	Gln	Thr	Leu	Thr	Thr	Ala	Gln	Val	Asn	Val	Ser	Ala	Ser	Asp	Ser	
	465				470					475				480		
tct	ttg	aac	atc	aac	ggg	gta	gag	gat	tat	aaa	tca	atc	ttt	gac	ggg	1488
Ser	Leu	Asn	Ile	Asn	Gly	Val	Glu	Asp	Tyr	Lys	Ser	Ile	Phe	Asp	Gly	
				485					490				495			
gac	gga	aaa	acg	tat	caa	aat	gta	cag	cag	ttc	atc	gat	gaa	ggc	aac	1536
Asp	Gly	Lys	Thr	Tyr	Gln	Asn	Val	Gln	Gln	Phe	Ile	Asp	Glu	Gly	Asn	
			500					505					510			
tac	agc	tca	ggc	gac	aac	cat	acg	ctg	aga	gat	cct	cac	tac	gta	gaa	1584
Tyr	Ser	Ser	Gly	Asp	Asn	His	Thr	Leu	Arg	Asp	Pro	His	Tyr	Val	Glu	
		515					520					525				
gat	aaa	ggc	cac	aaa	tac	tta	gta	ttt	gaa	gca	aac	act	gga	act	gaa	1632
Asp	Lys	Gly	His	Lys	Tyr	Leu	Val	Phe	Glu	Ala	Asn	Thr	Gly	Thr	Glu	
	530					535					540					
gat	ggc	tac	caa	ggc	gaa	gaa	tct	tta	ttt	aac	aaa	gca	tac	tat	ggc	1680
Asp	Gly	Tyr	Gln	Gly	Glu	Glu	Ser	Leu	Phe	Asn	Lys	Ala	Tyr	Tyr	Gly	
	545				550					555					560	
aaa	agc	aca	tca	ttc	ttc	cgt	caa	gaa	agt	caa	aaa	ctt	ctg	caa	agc	1728
Lys	Ser	Thr	Ser	Phe	Phe	Arg	Gln	Glu	Ser	Gln	Lys	Leu	Leu	Gln	Ser	
				565					570					575		
gat	aaa	aaa	cgc	acg	gct	gag	tta	gca	aac	ggc	gct	ctc	ggg	atg	att	1776
Asp	Lys	Lys	Arg	Thr	Ala	Glu	Leu	Ala	Asn	Gly	Ala	Leu	Gly	Met	Ile	
			580					585					590			
gag	cta	aac	gat	gat	tac	aca	ctg	aaa	aaa	gtg	atg	aaa	ccg	ctg	att	1824
Glu	Leu	Asn	Asp	Asp	Tyr	Thr	Leu	Lys	Lys	Val	Met	Lys	Pro	Leu	Ile	
		595					600					605				
gca	tct	aac	aca	gta	aca	gat	gaa	att	gaa	cgc	gcg	aac	gtc	ttt	aaa	1872
Ala	Ser	Asn	Thr	Val	Thr	Asp	Glu	Ile	Glu	Arg	Ala	Asn	Val	Phe	Lys	
	610					615					620					
atg	aac	ggc	aaa	tgg	tac	ctg	ttc	act	gac	tcc	cgc	gga	tca	aaa	atg	1920

ES 2 349 114 T3

50

Met	Asn	Gly	Lys	Trp	Tyr	Leu	Phe	Thr	Asp	Ser	Arg	Gly	Ser	Lys	Met	
625					630					635					640	
acg	att	gac	ggc	att	acg	tct	aac	gat	att	tac	atg	ctt	ggt	tat	gtt	1968
Thr	Ile	Asp	Gly	Ile	Thr	Ser	Asn	Asp	Ile	Tyr	Met	Leu	Gly	Tyr	Val	
			645						650					655		
tct	aat	tct	tta	act	ggc	cca	tac	aag	ccg	ctg	aac	aaa	act	ggc	ctt	2016
Ser	Asn	Ser	Leu	Thr	Gly	Pro	Tyr	Lys	Pro	Leu	Asn	Lys	Thr	Gly	Leu	
			660					665					670			
gtg	tta	aaa	atg	gat	ctt	gat	cct	aac	gat	gta	acc	ttt	act	tac	tca	2064
Val	Leu	Lys	Met	Asp	Leu	Asp	Pro	Asn	Asp	Val	Thr	Phe	Thr	Tyr	Ser	
		675					680					685				
cac	ttc	gct	gta	cct	caa	gcg	aaa	gga	aac	aat	gtc	gtg	att	aca	agc	2112
His	Phe	Ala	Val	Pro	Gln	Ala	Lys	Gly	Asn	Asn	Val	Val	Ile	Thr	Ser	
	690					695					700					
tat	atg	aca	aac	aga	gga	ttc	tac	gca	gac	aaa	caa	tca	acg	ttt	gcg	2160
Tyr	Met	Thr	Asn	Arg	Gly	Phe	Tyr	Ala	Asp	Lys	Gln	Ser	Thr	Phe	Ala	
705					710					715					720	
cca	agc	ttc	ctg	ctg	aac	atc	aaa	ggc	aag	aaa	aca	tct	gtt	gtc	aaa	2208
Pro	Ser	Phe	Leu	Leu	Asn	Ile	Lys	Gly	Lys	Lys	Thr	Ser	Val	Val	Lys	
			725						730					735		
gac	agc	atc	ctt	gaa	caa	gga	caa	tta	aca	ggt	aac	aaa	tag	tga		2253
Asp	Ser	Ile	Leu	Glu	Gln	Gly	Gln	Leu	Thr	Val	Asn	Lys	*	*		
			740					745								

Reivindicaciones

1. Un método para expresar un gen en una célula bacteriana que comprende:
5 proporcionar un vector de expresión para una población de células bacterianas sin transformar, en el que el vector de expresión comprende un casete de expresión que comprende una secuencia que codifica una proteína de exportación fusionada genéticamente a una secuencia que codifica una proteína de interés;
expresar el casete de expresión tal que una proteína de fusión proteína de exportación::proteína de interés es producida y exportada en el medio de cultivo, en el que la la secuencia que codifica una proteína de exportación es seleccionada del grupo que consiste en gen (*clyA*) citolisina A de *Salmonella* serovar entérica *Typhi* (*S. Typhi*), gen *clyA* (*S. paratyphi*) de *Salmonella paratyphi* o el gen hemolisina E (*hlyE*) de *Eschericia coli* (*E. coli*).
15
2. El método de la reivindicación 1, en el que dicha secuencia que codifica la proteína de exportación es seleccionada del grupo que consiste en la secuencia de nucleótidos 516-1436 de la SEQ ID No. 1 que codifica la proteína *clyA* de *S. Typhi* y la secuencia que codifica la secuencia aminoácida de la SEQ ID No:2.
20
3. El método de la reivindicación 1 ó 2, en el que dicha célula bacteriana es una célula *S. Typhi* o una célula *E. coli*.
4. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la
25 secuencia que codifica la proteína de exportación es la secuencia de nucleótidos 516-1436 de la SEQ ID No. 1 que codifica la proteína *clyA* de *S. Typhi*.
5. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la
30 secuencia que codifica la proteína de exportación es a) la secuencia de nucleótidos 516-1436 de la SEQ ID No. 1 que codifica la proteína *clyA* de *S. Typhi* o b) codifica la secuencia aminoácida de SEQ ID No: 2, con una o más mutaciones que dan como resultado sustituciones de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en sustituciones aminoácidos en las posiciones 180, 185, 187 y 193, que atenúan la
35 actividad hemolítica de la proteína de exportación.
6. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la proteína de interés es un antígeno.

7. Un método como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 6, en el que dicha proteína de fusión exportada es aislada.

5 8. El uso de una población de células bacterianas transformadas con un vector de expresión que comprende un casete de expresión que comprende una secuencia que codifica la proteína de exportación fusionada genéticamente a una secuencia que codifica una proteína de interés en la fabricación de un medicamento para obtener una respuesta inmune de un hospedante, en el que la secuencia que
10 codifica la proteína de exportación es seleccionada del grupo que consiste en gen citolisina A (*clyA*) de *Salmonella* serovar entérica *Typhi* (*S. Typhi*), gen *clyA* de *Salmonella paratyphi* (*S. paratyphi*) o el gen hemolisina E (*hlyE*) de (*E. coli*) *Escherichia coli*.

15 9. Un uso como se reivindica en la reivindicación 8, en el que dicha célula bacteriana, la secuencia que codifica la proteína de exportación y/o la proteína de interés es como se define en cualquiera de las reivindicaciones 2 a 6.

20 10. Un sistema para expresar una proteína de interés que comprende:
un vector de expresión que comprende un casete de expresión, en el que el casete de expresión comprende una secuencia que codifica la proteína de exportación fusionada genéticamente a una secuencia que codifica una proteína de interés;
una célula hospedante transformada con el vector de expresión; y
un entorno de cultivo para la célula hospedante transformada, en el que el casete de expresión cuando se expresa da como resultado una proteína de fusión
25 proteína de exportación::proteína de interés, que es exportada fuera de la célula hospedante transformada, en el que la proteína de exportación que codifica la secuencia es seleccionada del grupo que consiste en gen citolisina A(*clyA*) de *Salmonella* serovar entérica *Typhi* (*S. Typhi*), gen *clyA* de *Salmonella paratyphi* (*S. paratyphi*) o el gen hemolisina E (*hlyE*) de *Escherichia coli* (*E. coli*).

30 11. Un sistema como se reivindica en la reivindicación 10, en el que dicha célula bacteriana, la secuencia que codifica la proteína de exportación y/o la proteína de interés es como se define en cualquiera de las reivindicaciones 2 a 6.

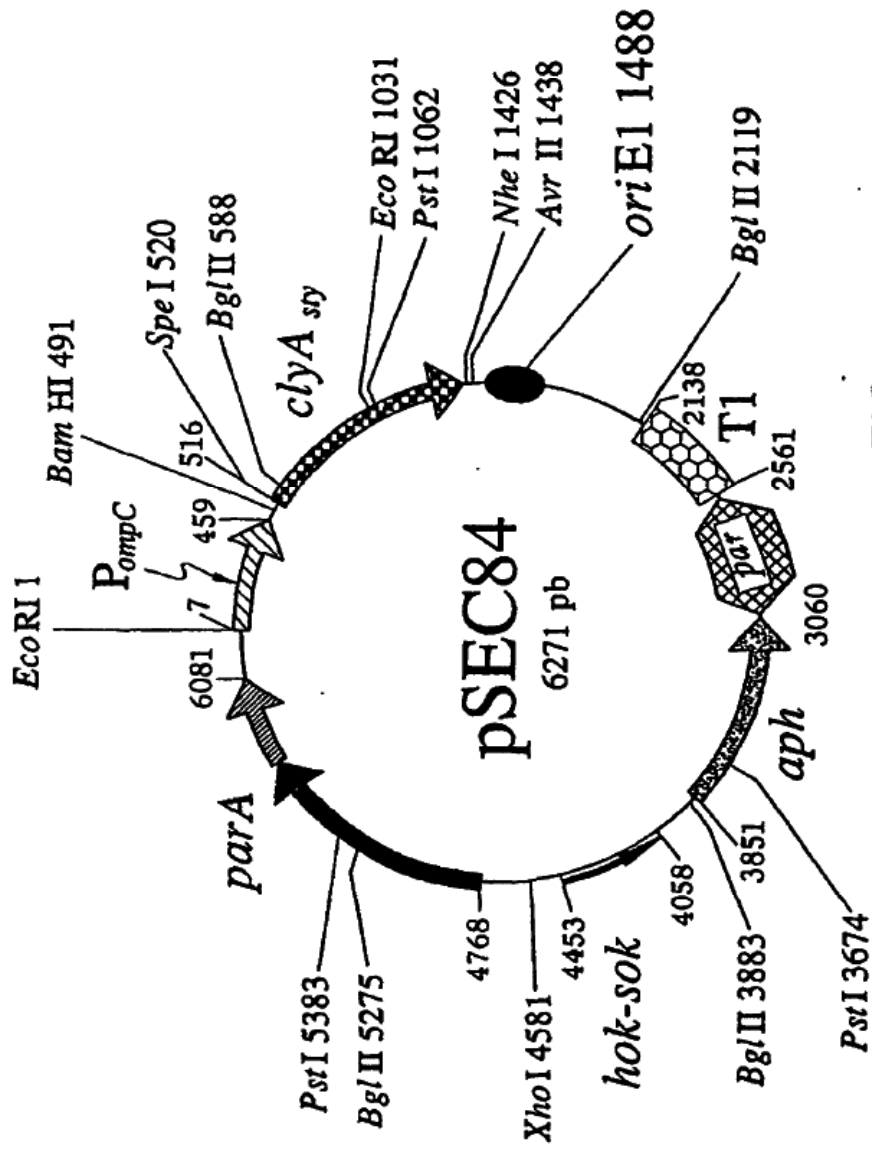


FIG. 1A

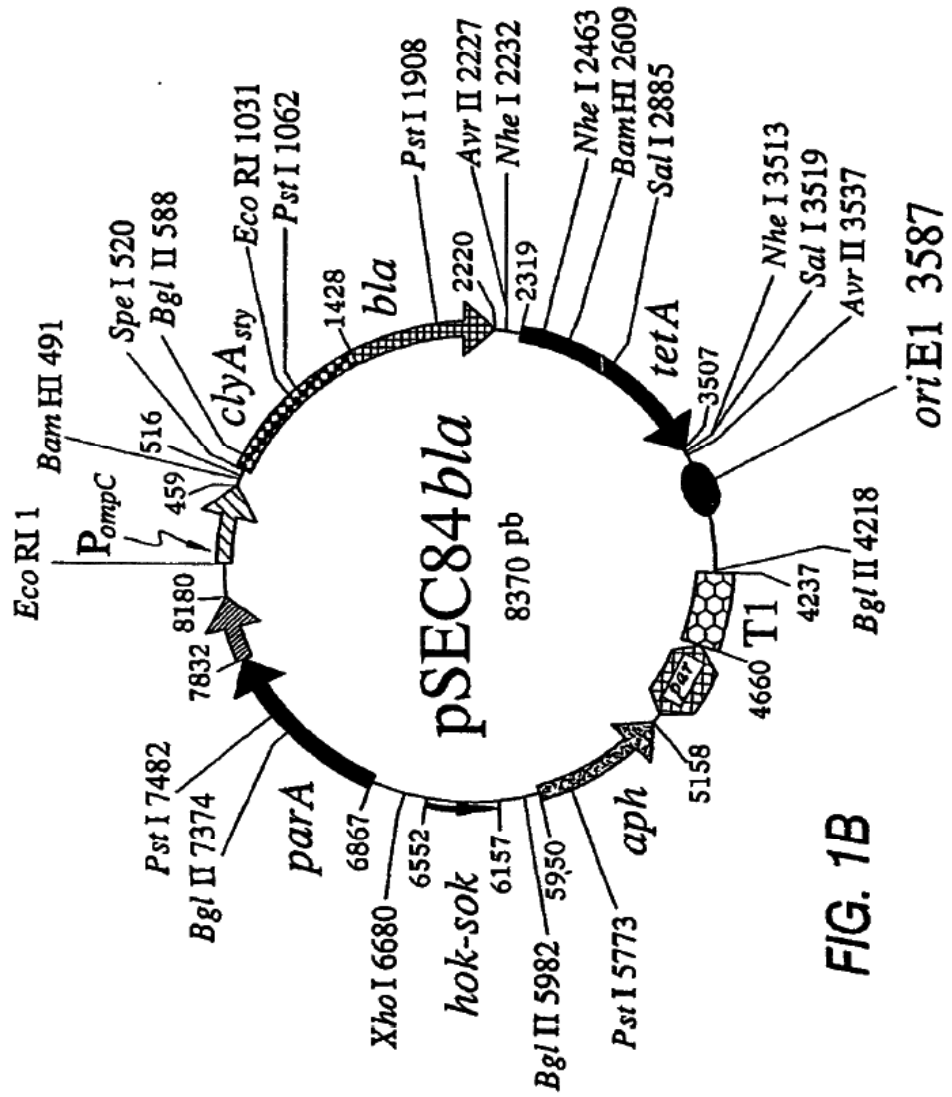


FIG. 1B

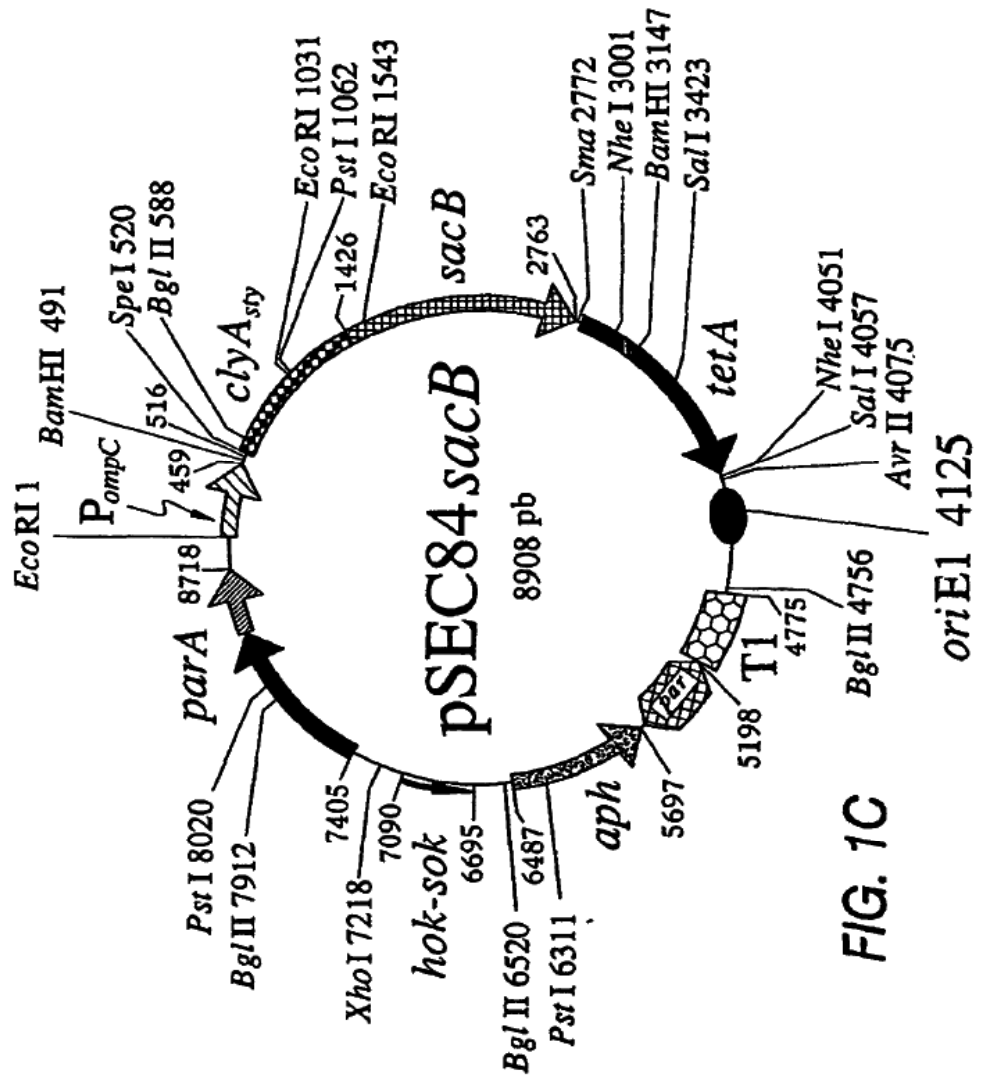


FIG. 1C

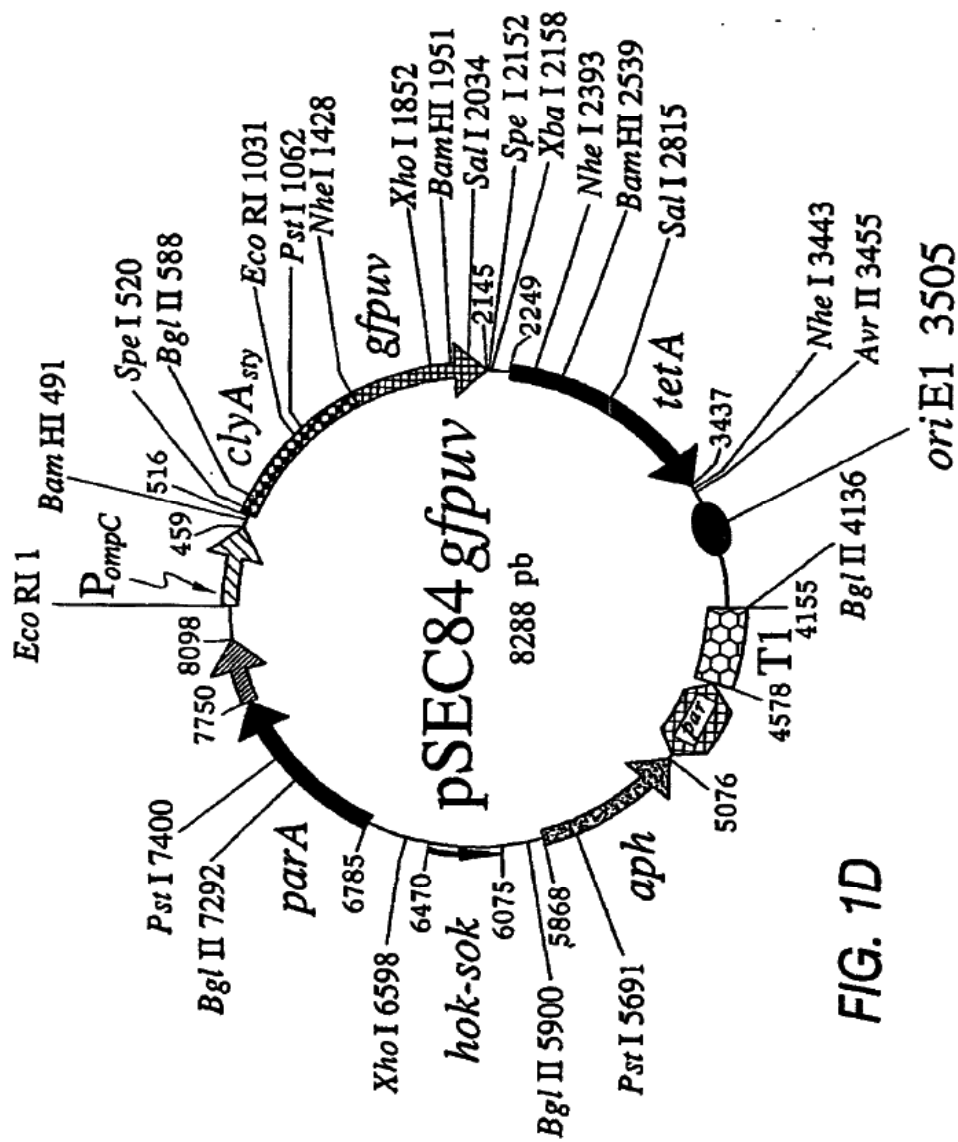


FIG. 1D

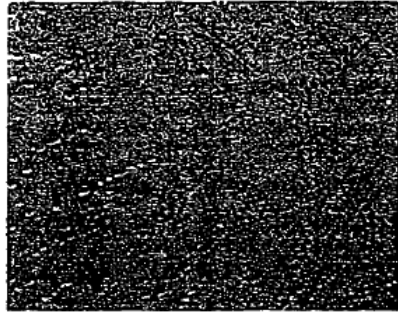


FIG. 2A



FIG. 2B

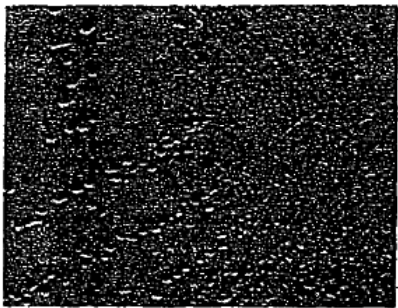


FIG. 2C

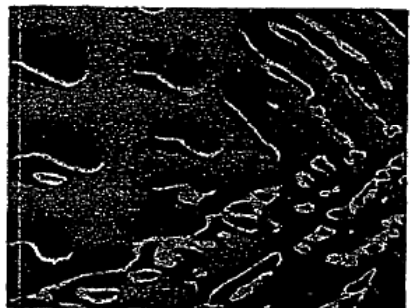


FIG. 2D

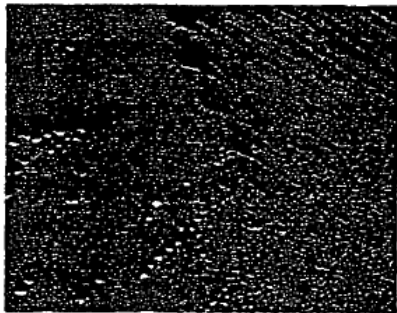


FIG. 2E

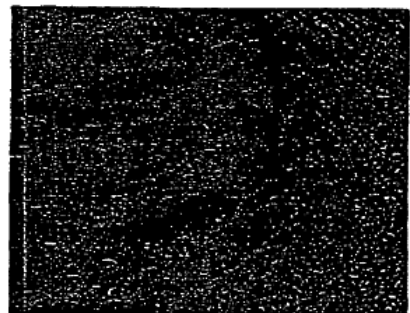


FIG. 2F

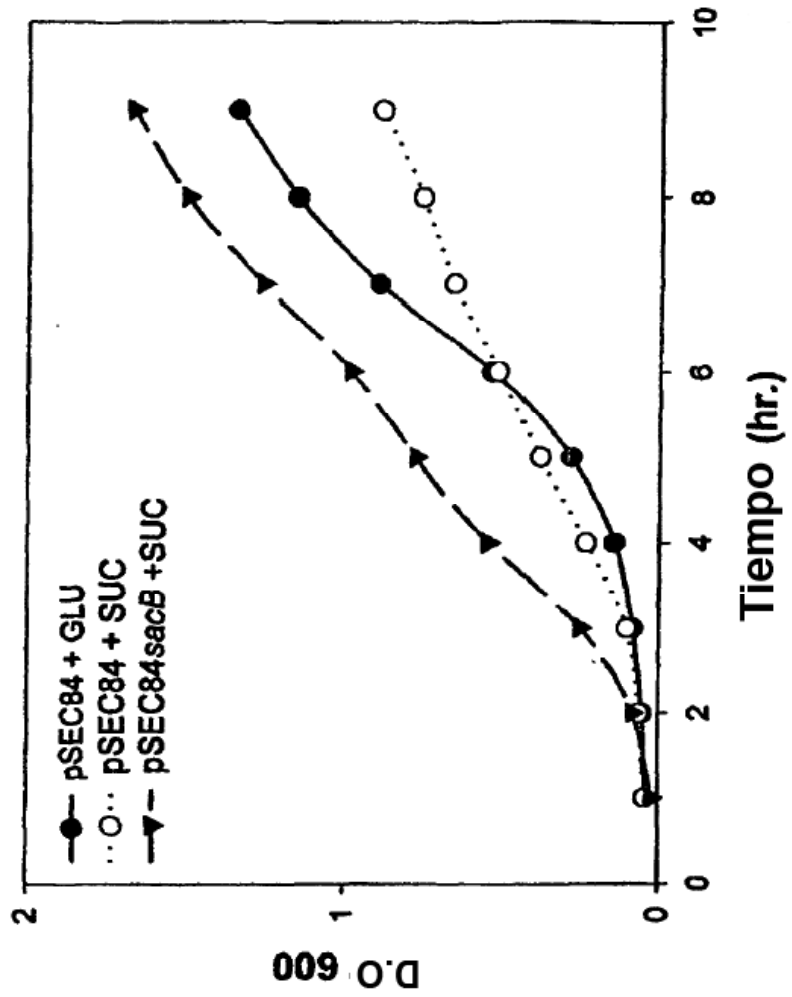


FIG. 3

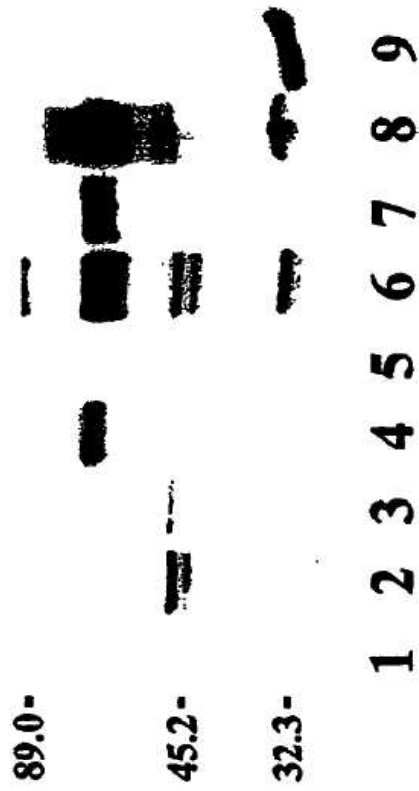


FIG. 4A



FIG. 4B