



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 347 019**

(51) Int. Cl.:

**C12N 15/62** (2006.01)

**A61K 39/385** (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Número de solicitud europea: **07822513 .3**

(96) Fecha de presentación : **13.11.2007**

(97) Número de publicación de la solicitud: **2092067**

(97) Fecha de publicación de la solicitud: **26.08.2009**

(54) Título: **Microorganismos como portadores de secuencias de nucleótidos que codifican antígenos y toxinas proteicas, procedimiento de preparación y sus usos.**

(30) Prioridad: **13.11.2006 EP 06123974**  
**13.11.2006 US 865484 P**  
**21.05.2007 US 939140 P**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**22.10.2010**

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**22.10.2010**

(73) Titular/es: **Æterna Zentaris GmbH**  
**Weismüllerstrasse 50**  
**60314 Frankfurt am Main, DE**

(72) Inventor/es: **Gentschev, Ivaylo;**  
**Fensterle, Joachim;**  
**Rapp, Ulf R. y**  
**Goebel, Werner**

(74) Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 347 019 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

Microorganismos como portadores de secuencias de nucleótidos que codifican antígenos y toxinas proteicas, procedimiento de preparación y sus usos.

### Campo técnico

La invención se refiere a microorganismos como portadores de secuencias de nucleótidos heterogéneas que codifican antígenos y toxinas proteicas, a un procedimiento para su fabricación así como a los correspondientes plásmidos o vectores de expresión. Estos microorganismos se pueden utilizar como medicamentos, en particular como vacunas para tumores para el tratamiento de diferentes tumores.

### Técnica anterior

La inmunoterapia del cáncer representa una opción prometedora del tratamiento tumoral. Una multiplicidad de pruebas clínicas que utilizan diferentes enfoques se concentran en su eficacia en los pacientes. En principio, se establece una distinción entre la inmunoterapia pasiva y activa.

La inmunoterapia activa apunta a la inducción de una respuesta inmunitaria específica de un tumor relacionada con una vacuna. Esta última se está poniendo a prueba clínicamente en la actualidad utilizando varios enfoques diferentes. Por ejemplo existen las denominadas vacunas con células completas, cuya materia prima son células tumorales que o bien se obtienen directamente del paciente (autólogas) o derivadas de líneas celulares apropiadas (heterólogas). Estas células normalmente son desactivadas después, manipuladas diferencialmente y re(aplicadas) al paciente.

En contraste, las vacunas de antígeno específico contienen uno (o más) antígenos específicos de tumores, porciones del antígeno o el ADN que codifica el antígeno específico como también las vacunas denominadas anti-idiotipo. Normalmente estas vacunas no son aisladas, si no inyectadas combinadas con un portador apropiado. Por consiguiente, por una parte se utilizan diferentes adyuvantes clásicos, pero también combinaciones con inmunoestimuladores biológicos tales como las citoquinas.

Para la inmunoestimulación, se están aplicando enfoques, que contienen antígenos asociados con inmunoestimuladores, tales como la toxina del tétanos. Además, existen intentos de aplicar antígenos combinados con células dendríticas. Y finalmente existen varios intentos con vacunas vivas recombinantes con portadores virales o bacterianos.

Se han utilizado proteínas de fusión de toxinas bacterianas, tales como la toxina del tétanos, la toxina shiga, la toxina letal o la toxina del cólera, como coadyuvantes con un antígeno como vacunas especialmente contra infecciones durante bastante tiempo (Freytag y Clements, 1999). Adicionalmente, también se utilizan toxinas nativas, a menudo combinadas con una molécula específica de una célula diana, tal como una molécula de la superficie celular de células tumorales, con el fin de destruir células diana.

En esto, las proteínas de fusión con la toxina nativa, que generalmente comprenden una unidad enzimática y un dominio de unión a la proteína, desarrollan su efecto óptimo en su uso como coadyuvantes (Freytag y Clements, 1999). Por medio de estas vacunas se obtiene una respuesta inmunitaria satisfactoria incluso después de la inmunización mucosal y particularmente después de la oral. El problema de estas proteínas de fusión es que las toxinas nativas son muy tóxicas y por lo tanto no pueden ser establecidas en seres humanos (Holmgren *et al.*, 2005).

Una línea completa de investigación esta por lo tanto ocupada con la destoxificación de toxinas que al mismo tiempo conservan el efecto coadyuvante. No obstante, puesto que en la mayoría de los casos el efecto coadyuvante coincide con la actividad enzimática, que es responsable del efecto tóxico (Lycke *et al.*, 1992), la destoxificación no se puede realizar de una manera directa, ni siquiera cuando parece que sea posible para algunas toxinas que no pierdan su actividad enzimática, actividad coadyuvante (Hormozi *et al.*, 1999; Lycke *et al.*, 1992).

En el caso de la toxina del cólera (CT) se han llevado a cabo numerosos intentos de destoxificación (Agren *et al.*, 1999; Byun *et al.*, 2001; Eriksson *et al.*, 2004; Kweon *et al.*, 2002; Sanchez *et al.*, 2002), para lo cual, no obstante, prevalece el uso de coadyuvantes mucosales (Freytag y Clements). Por lo tanto, por encima de todo, una inducción eficaz de una respuesta de anticuerpos (principalmente de IgA mucosal), que reciben una ayuda creciente de células T restringidas al MHC de clase II relacionado con toxinas, es el principal pre-requisito para un coadyuvante mucosal para una vacuna que consiste en un antígeno proteico y una toxina fusionada o aplicada simultáneamente (Freytag y Clements).

En cuanto a la toxina del cólera, especialmente su subunidad B (CtxB) se somete a ensayo como coadyuvante puesto que es responsable de la unión al receptor GM-1 y no muestra efectos tóxicos cuando se aísla (Holmgren *et al.*). Las proteínas que se fusionan con CtxB se caracterizan por una inducción primaria de las denominadas respuestas inmunitarias Th2. Estas son respuestas de las células T, que están caracterizadas principalmente por las citoquinas, tales como IL-4 o IL-6, y que principalmente ocasionan la inducción de los anticuerpos, pero que no inician en absoluto o a lo sumo inician restringidamente una respuesta inmunitaria celular, concretamente de las células T citotóxicas (CTL) (Holmgren *et al.*).

Además CtxB como coadyuvante mucosal induce una tolerancia generalizada al antígeno proteico. La tolerancia generalizada describe el agotamiento o inactivación de los linfocitos específicos del antígeno, en particular de las células T o las células B. Esta clase de enfoque no es aplicable por lo tanto a la inducción de una respuesta inmunitaria generalizada (Holmgren *et al.*).

Al contrario que la aplicación mucosal, la aplicación intraperitoneal o subcutánea de una proteína de fusión toxina-antígeno puede inducir respuestas generalizadas así como citotóxicas bajas. Por supuesto esto se ha utilizado para la vacunación de tumores en sistemas modelo (remitirse p. ej. a (Becerra *et al.*, 2003)). Sin embargo semejante respuesta también es obtenida con el propio antígeno purificado y depende principalmente del coadyuvante utilizado. Aparte del hecho de que las respuestas de los CTL medidas en el modelo son bastante bajas, no existe evidencia de que la protección sea dependiente de estos efectos. Por otra parte, el antígeno no se aplicó oralmente, si no solamente por medio de una inyección directa (s.c., i.d., i.m., i.p.) del antígeno.

Las proteínas antigénicas fusionadas a una toxina destoxificada son generalmente ineficaces si se aplican en forma de una vacuna para un tumor. Las razones principales son, si se encuentran presentes, solamente la baja inducción de una respuesta inmunitaria generalizada o incluso, en el caso de CtxB, la inducción de tolerancia generalizada así como la inducción de anticuerpos restringidos mucosalmente y de las respuestas inmunitarias de tipo Th2.

McSorley *et al.*, por ejemplo, demostraron que la inmunización nasal con una proteína de fusión CtxB (que para una vacuna contra un tumor representa el modo preferido de inducir una respuesta generalizada) preferiblemente tolera y por lo tanto inactiva las células Th1, mientras no influyen en las células Th2 (McSorley *et al.*, 1998). Las respuestas Th2 están caracterizadas por las células T coadyuvantes que producen predominantemente IL-4 o IL-6. Estas citoquinas son particularmente responsables del inicio de la producción de anticuerpos por las células B, que proporcionan protección en el caso de la mayor parte de las vacunas convencionales. Por el contrario, las células T Th1 secretan principalmente IL-2 e IFN-gamma, citoquinas por lo tanto, que juegan un papel en la respuesta inmunitaria celular. Dependiendo del objetivo de la estrategia de inmunización es de crucial importancia que se inicie una respuesta inmunitaria Th2 dominada por anticuerpos (denominada predisposición Th2) o Th1 dominada por células (denominada predisposición Th1).

En contraste, la inducción generalizada de una respuesta inmunitaria celular dominada por Th1 con células T coadyuvantes productoras de IFN-gamma y la inducción de las células T citotóxicas (CTL) es indispensable para la inmunoterapia tumoral.

La técnica anterior muestra que las toxinas pueden funcionar como coadyuvantes. Especialmente la toxina del cólera (CT, por sus siglas en Inglés) muestra un fuerte efecto coadyuvante. Sin embargo, este efecto es significativamente atenuado tan pronto como la toxina es destoxificada. Con respecto a su subunidad CtxB, la aplicación oral induce incluso tolerancia generalizada. Este problema puede ser parcialmente evitado mediante aplicación nasal. No obstante, si se aplica la administración nasal, surgen otros problemas, en particular aquellos asociados con la subunidad CtxB concerniente a la expresión del receptor GM-1 en el cerebro (van Ginkel *et al.*, 2000), que se reflejan en un riesgo creciente de efectos secundarios graves concretos (Mutsch *et al.*, 2004).

Para superar estos problemas, puede ser posible generar vacunas vivas recombinantes que expresen simultáneamente toxinas y antígenos (heterólogos). Esta opción ya ha sido perseguida con respecto a vacunas para infecciones, esto es vacunas que están dirigidas contra un patógeno específico, por ejemplo el patógeno de la tuberculosis, y están destinadas a inducir inmunidad contra ese patógeno.

En el desarrollo de tales vacunas para infecciones, ya se han generado toxinas recombinantes fusionadas con antígenos (heterólogos) apropiados, utilizando varias cepas bacterianas recombinantes que se administran oralmente, en forma de una vacuna viva o inactivada. En la mayoría de los casos, las cepas generadas solamente expresaron una toxina recombinante. Por lo tanto, estos enfoques están dirigidos principalmente a inmunizar solamente contra la propia toxina (inducción de una respuesta de anticuerpos) y, por consiguiente, la cepa que expresa la toxina (patógeno). Estas clases de vacunas no son adecuadas para su uso como vacunas para tumores potenciales en la terapia tumoral y, no sorprendentemente, las correspondientes pruebas no hacen mención de ninguna de tales posibles aplicaciones (Reveneau *et al.*, 2002) (Vertiev *et al.*, 2001) (Freytag y Clements, 1999; Jackson *et al.*, 1996).

Con respecto a tales vacunas para infecciones, en la inducción de una respuesta de anticuerpos la toxina no funciona como coadyuvante, es la inducción de una respuesta inmunitaria de anticuerpos mucosales la que prevalece. Estas pruebas de vacunas contra infecciones incluyen una respuesta inmunitaria generalizada nula o solo muy débil. Al contrario que las vacunas contra tumores, tales vacunas no persiguen una inducción de una respuesta inmunitaria celular, especialmente de células T citotóxicas. Los patógenos bacterianos que expresan las toxinas normalmente muestran un patrón vivo extracelular y por lo tanto no contribuyen a la activación de los CTL, esto es la protección conferida por tales vacunas contra infecciones es *independiente de los CTL*.

Las siguientes cepas bacterianas han sido utilizadas en las pruebas para vacunas contra infecciones mencionadas: Lactobacilli recombinantes (Reveneau *et al.*, 2002), Listeria (Vertiev *et al.*, 2001), Bacillus anthracis (Mendelson *et al.*, 2005; Mesnage *et al.*, 1999), Shigellae (Anderson *et al.*, 2000; Tzschaschel *et al.*, 1996b), *E. coli* (Walker *et al.*, 1992), Vibrio (Butterton *et al.*, 1995; Chen *et al.*, 1998; Thungapathra *et al.*, 1999) y Salmonella (Jackson *et al.*, 1996).

Además, se intentó intensificar las respuestas inmunitarias mucosales mediante presentación sobre la superficie (Konieczny *et al.*, 2000) o secreción de la toxina como antígeno heterólogo (Salmonella, Shigellae: (Garmory *et al.*, 2003; Orr *et al.*, 1999; Su *et al.*, 1992; Tzschaschel *et al.*, 1996a; Tzschaschel *et al.*, 1996b), Yersinia: (Sory y Cornelis, 1990), Vibrio (Ryan *et al.*, 1997a), *E. coli*: (Zhu *et al.*, 2006)). Sin embargo, en estos casos adicionales las propias  
5 toxinas representan los antígenos a los cuales está dirigida la respuesta inmunitaria.

De este modo, se debe observar que las toxinas no funcionan como adyuvantes ni los estudios descriptivos pretendían expresar las toxinas como proteínas de fusión con un antígeno (heterólogo) separado adicional. Por otra parte, las  
10 proteínas de fusión con CT o CtxB no fueron generadas con estos sistemas ni fueron sugeridas.

Por consiguiente, las proteínas de fusión mencionadas en los documentos citados antes son proteínas de fusión de una señal de secreción peptídica, tal como HlyA, y una proteína toxina, pero no proteínas de fusión, que consisten en una toxina y un antígeno (heterólogo).

El principal objetivo de estos estudios fue simplemente obtener una respuesta inmunitaria mucosal óptima (Tzschaschel *et al.*, 1996a). No se perseguía la inducción de una respuesta inmunitaria generalizada. Incluso si es que se medía, los análisis de las respuestas inmunitarias generalizadas estaban restringidos a los anticuerpos (concretamente IgA generalizada) solamente, puesto que la protección en estas clases de modelos está mediada principalmente por los anticuerpos (comparar p. ej. [31]). La inducción de una respuesta inmunitaria celular generalizada, en particular una  
20 respuesta de las células T citotóxicas, no ha sido descrita. La fusión con una señal de secreción se utilizó principalmente con el fin de incrementar la solubilidad de las toxinas y aumentar su estabilidad, respectivamente, puesto que una expresión fuerte, meramente citoplasmática a menudo da como resultado la formación de productos agregados insolubles (Gentshev *et al.*, 2002a).

Con respecto a esto, algunos autores observan que las proteínas de fusión con una señal de secreción ocasionan una rápida degradación citoplasmática (Tzschaschel *et al.*, 1996a), mientras otros observan una estabilización (Orr *et al.*, 1999). Aquí la técnica anterior, es contradictoria. Hasta ahora, los experimentos previos con toxinas secretadas (toxina + señal de secreción) están destinados por encima de todo a aumentar la estabilidad, que obviamente no se  
30 logró en todos los casos.

Una razón se encuentra ciertamente en la intensidad de la expresión variable y la estabilidad del plásmido. Tzschaschel *et al.* describen, que el sistema plasmídico utilizado, es altamente inestable y sobre todo, sin selección, se encuentra simplemente en unas pocas bacterias. Como posible solución los autores utilizan la integración cromosómica a través de un mini-transposón (Tzschaschel *et al.*, 1996a; Tzschaschel *et al.*, 1996b).  
35

No obstante, semejante sistema posee numerosas desventajas. Por un lado el punto de integración no está definido, lo que puede conducir a una alteración no deseada del fenotipo de la célula anfitriona (p. ej. aumento/disminución de la expresión de genes colindantes). Por otra parte el nivel de expresión esperado utilizando una única copia genómica solamente es bajo, lo que tiene un efecto negativo sobre la inmunogenicidad. Después de todo, la integración del  
40 transposón cromosómico es relativamente inestable, puesto que conduce frecuentemente a escisiones espontáneas a los lados de los elementos repetitivos.

Como se ha mencionado antes, la técnica anterior es contradictoria con respecto a la estabilidad de una toxina heteróloga secretada.  
45

Garmory *et al.* suponen incluso que la secreción de un antígeno heterólogo no tiene una ventaja especial con respecto a la inmunogenicidad (Garmory *et al.*, 2002; Roland *et al.*, 2005). En otros casos se ha observado efectivamente el aumento de la respuesta de anticuerpos generalizada a una toxina secretada después de la administración intravenosa, pero no después de la aplicación oral. Por el contrario, la aplicación oral es incluso puesta en cuestión indirectamente (Roland *et al.*, 2005).  
50

Finalmente, los estudios con una cepa gram-positiva (*Lactobacillus plantarum*) que produce la toxina del tétanos no muestran una diferencia significativa en la inducción de una respuesta de anticuerpos generalizada en comparación con las cepas que secretan la toxina, la presentan unida a su membrana o contienen la toxina citoplasmáticamente (Reveneau *et al.*, 2002).  
55

Las respuestas inmunitarias celulares generalizadas, en particular las respuestas de las células T citotóxicas, y la protección resultante, no se estudiaron ni se describieron.

La técnica anterior citada más arriba de las vacunas contra infecciones basadas en toxinas de este modo no puede establecer si la secreción de una toxina utilizada como coadyuvante representa una ventaja, con respecto a la inducción de una respuesta inmunitaria generalizada (celular). Todo lo contrario, los estudios citados más arriba apuntan más bien el problema de la estabilidad y mencionan la pérdida de las ventajas de una toxina heteróloga secretada. Las proteínas de fusión, que consisten en la señal de secreción, la toxina y el antígeno heterólogo, no son descritas o  
65 sugeridas en absoluto.

En los pasajes anteriores se presentó la técnica anterior, que describe portadores bacterianos que expresan toxinas heterológamente y pueden ser utilizados como vacunas contra infecciones. En los ejemplos citados los autores de la

presente invención llevaron a cabo principalmente modificaciones referentes a la expresión o estabilidad de las toxinas y su solubilidad, por ejemplo la inserción de un promotor fuerte de la expresión o la fusión de una toxina a una señal de secreción.

5 Otros autores también han estudiado fusiones genéticas a antígenos heterólogos en vacunas vivas. En estos casos la toxina se utilizó principalmente como coadyuvante. En algunos casos (p. ej. (Brossier *et al.*, 2000)) el antígeno heterólogo funcionó como coadyuvante y la toxina como verdadero antígeno.

10 Sin embargo, es importante observar, que en los casos mencionados, la expresión del constructo de fusión génica de toxina-antígeno tuvo lugar exclusivamente citoplásmicamente o periplásmicamente. El constructo toxina-antígeno ni se fusionó a una señal de secreción adicional (lo que hubiera conducido a su secreción completa) ni fue secretado directamente.

15 En estos constructos de fusión génica de toxina-antígeno, se utilizaron cepas de *E. coli* (Clemens *et al.*, 2004), *Bacillus anthracis* (Brossier *et al.*, 2000), *Shigella* (Koprowski *et al.*, 2000; Ranallo *et al.*, 2005; Zheng *et al.*, 2005) y *Vibrio* (Silva *et al.*, 2003) recombinantes. Para *Salmonella* (resumido en (Garmory *et al.*, 2002)), también se han descrito fusiones de variantes de CT con antígenos (Hajishengallis *et al.*, 1996; Huang *et al.*, 2000) u otras toxinas con antígenos (Barry *et al.*, 1996; Cardenas y Clements, 1993; Chabalgoity *et al.*, 1997; Chabalgoity *et al.*, 1996; Chabalgoity *et al.*, 2000; Chabalgoity *et al.*, 1995; Chacon *et al.*, 1996; Jagusztyn-Krynicka *et al.*, 1993; Khan *et al.*, 2000; Khan *et al.*, 1994b; Lee *et al.*, 2000; Pogonka *et al.*, 2003; Schodel *et al.*, 1990; Smerdou *et al.*, 1996; Ward *et al.*, 1999; Wu *et al.*, 2000).

20 En la mayoría de estos casos el foco principal estuvo en la inducción de una respuesta inmunitaria (de anticuerpos) mucosal y para la inducción de una respuesta inmunitaria generalizada, se eligió únicamente una aplicación subcutánea, pero no oral [36].

30 Ciertos trabajos con *Salmonella* como cepa de soporte están limitados a una mera caracterización de la cepa (Gomez-Duarte *et al.*, 1995; Jagusztyn-Krynicka *et al.*, 1993), otros analizan solamente la respuesta y/o protección de anticuerpos mucosal y/o generalizada (Barry *et al.*, 1996; Cardenas y Clements, 1993; Dunstan *et al.*, 2003; Hajishengallis *et al.*, 1996; Harokopakis *et al.*, 1997; Khan *et al.*, 1994a; Khan *et al.*, 1994b; Pogonka *et al.*, 2003; Smerdou *et al.*, 1996; Somner *et al.*, 1999). En todos estos casos, en los que se utilizó a propósito una fusión entre el antígeno y la toxina del tétanos y que son utilizados exclusivamente como vacunas contra infecciones, no se han estudiado las respuestas inmunitarias celulares generalizadas, concretamente las respuestas de las Células T citotóxicas.

35 Por lo tanto, desde un punto de vista inmunológico, no se pueden sacar conclusiones a partir de estos estudios sobre un uso potencial como vacunas contra tumores, puesto que sus enfoques se fijaban en los efectos mediados por los anticuerpos como vacunas contra infecciones.

40 Las investigaciones que incluyen un análisis de isotipos de la respuesta inmunitaria estudiada parecen ser más relevantes. De hecho, las respuestas inmunitarias celulares no son medidas directamente en estos casos, sino que el perfil de isotipo de la respuesta de anticuerpos permite una conclusión sobre la predisposición Th1/Th2 de la respuesta inmunitaria. Los isotipos de anticuerpos como IgG1 están asociados a respuestas de tipo Th2 y los isotipos como IgG2a están asociados a respuestas Th1. Como ya se ha mencionado, las respuestas Th1 son respuestas inmunitarias dominadas por células, mientras las respuestas Th2 representan principalmente respuestas dirigidas por anticuerpos humo-  
45 rales. Todavía, esos estudios no describen vacunas para tumores ni sugieren ningún uso como agente anti-tumoral.

50 Una vacuna para infecciones basada en *Salmonella* como portador, que expresa una proteína de fusión antigénica con toxina del tétanos ha sido realizada en perros. Las respuestas con bajo contenido de anticuerpos que fueron inducidas en los perros, muestran una predisposición Th1, con respecto al perfil de anticuerpos, por lo tanto, una respuesta que se corresponde más bien con una respuesta inmunitaria de tipo celular (Chabalgoity *et al.*, 2000). La verdad es que, la inmunología del perro apenas se ha investigado, y por lo tanto no está claro hasta qué punto el perfil de anticuerpos del perro puede proporcionar información acerca de la predisposición Th1.

55 Los estudios en ratones, realizados por el mismo grupo, utilizando constructos comparables, mostraron no obstante un perfil de anticuerpo con el mismo nivel para IgG1 que para IgG2a, lo que indicaría una respuesta Th1/Th2 mixta.

60 De manera interesante, una inmunidad existente contra la toxina del tétanos, como la que se encuentra en la mayor parte de los seres humanos debida a inmunizaciones previas, ocasiona otra inducción relativamente fuerte de IgG1 mientras IgG2a apenas es inducida. Esto indica claramente una clara predisposición Th2 (Chabalgoity *et al.*, 1995). Por esta razón, una vacuna viva basada en la toxina del tétanos como vacuna contra tumores es bastante perjudicial para su uso en seres humanos. Por ello cabe esperar que sea inducida una fuerte respuesta dominada por anticuerpos Th2 en la mayoría de estos pacientes, que muestran una respuesta específica para la toxina del tétanos.

65 Solamente unos pocos estudios también analizan la respuesta inmunitaria celular y comparan constructos genéticos con y sin fusiones con toxinas. En un caso, por ejemplo, se ha comparado una fusión de un antígeno con y sin toxina del tétanos en *Salmonella* (Lee *et al.*). Allí, el constructo de fusión con el antígeno de la toxina del tétanos aumentaba principalmente el nivel de anticuerpos total, mientras el perfil Th1/Th2 apenas era alterado. Incluso la secreción por las células T CD4+ específicas del antígeno de citoquinas Th1 típicas, tales como el IFN-gamma y la IL-

2, respectivamente, solamente mostraron una débil divergencia. En un estudio anterior por el mismo grupo, también se han medido los niveles de IFN-gamma. Sin embargo no se ha establecido comparación con los constructos sin toxina del tétanos (Chabalgoity *et al.*). Otros estudios con diferentes portadores bacterianos gram-negativos, como *Shigella* (Koprowski *et al.*, Ranallo *et al.*, Zheng *et al.*) o *Vibrio* (Campos *et al.*, Ryan *et al.*), no analizaron tampoco los isotipos y las respuestas inmunitarias celulares, respectivamente.

En resumen, se puede establecer, que los estudios mencionados se centran claramente en la inducción de una respuesta inmunitaria humoral conducida por anticuerpos. En efecto, se utilizan constructos de toxina-antígeno genéticos, pero estos no se suministran con una señal de secreción ni son secretados directamente. De ningún modo, sin embargo, se analizaron las respuestas inmunitarias celulares generalizadas, en particular las respuestas de las células T citotóxicas. Lo que es más, tales respuestas de las células T citotóxicas celulares no pueden ser concluidas a partir de la respuesta de anticuerpos humorales y no pueden ser detectadas si la respuesta de anticuerpos es compuesta - Th1/Th2.

No obstante, son exactamente estas respuestas inmunitarias de las células T citotóxicas celulares las que son cruciales para su uso en la terapia de vacunación contra tumores.

Por consiguiente, en términos de fusiones toxina-antígeno que están restringidas a vacunas contra infecciones mucosales únicamente, el estado de la técnica no permite ninguna afirmación sobre el posible uso de cualquiera de tales constructos como vacunas contra tumores.

Como ya se ha mencionado, la expresión de los constructos de fusión genéticos se realiza sin ayuda de un sistema de secreción. Las toxinas y los constructos de antígeno-toxina, respectivamente, se localizan normalmente citoplásmicamente así como periplásmicamente, esto es, entre las dos membranas. Con el fin de inducir una respuesta inmunitaria celular eficaz la toxina debe estar libremente accesible para la célula presentadora de antígenos (CPA). Normalmente, la toxina nativa se produce en el periplasma de la bacteria gram-negativa. Esto es suficiente para simples respuestas inmunitarias mucosales, debido a que las toxinas periplásmicas pueden escapar del periplasma en el colon y por consiguiente son accesibles, también (Hunt y Hardy, 1991). Esto no cuenta, sin embargo, si el portador elige como diana células presentadoras de antígenos de fuera del colon, tales como p. ej. Placas de Peyer u órganos linfáticos como los nódulos linfáticos o el bazo.

En principio, dos factores son cruciales para la eficacia de una vacuna contra tumores: la inducción de una respuesta inmunitaria celular del tipo Th1 y la participación de componentes del sistema inmunitario innato, tales como las células NK, las células NKT y las células T gamma-delta, que juegan un importante papel en la eficacia de la terapia contra los tumores (Dunn *et al.*, 2004).

La importancia de estos componentes de los sistemas inmunitarios innatos se encuentra en múltiples niveles. Las células T NK y gamma-delta activadas apropiadamente son capaces de producir localmente grandes cantidades de IFN-gamma. Este interferón, que también es producido por células T polarizadas Th1 específicas, tiene múltiples funciones, relevantes en la terapia tumoral. Una de estas funciones centrales es la inhibición de la angiogénesis, que interrumpe el suministro de oxígeno y nutrientes al tumor y de facto extenua el tumor. Además, las células NK poseen receptores, que reconocen las moléculas del MHC de clase I. Si estas moléculas están presentes en una célula, las células NK están inhibidas.

Como para una vacuna, que induce a las células T citotóxicas específicas, las células tumorales pueden ser eliminadas por estos CTL. Si la célula tumoral pierde su capacidad para expresar las moléculas del MHC de clase I, lo que ocurre bastante frecuentemente en tumores, las células T citotóxicas específicas son ineficaces. Por consiguiente, en este caso, la inhibición de las células NK se detiene, y éstas son capaces de eliminar las células tumorales directamente.

Por consiguiente, sería ideal que una vacuna contra tumores indujera ambos componentes eficazmente. Existen datos contradictorios concernientes a la predisposición a Th1-Th2 de un coadyuvante con toxina fusionada. Como se ha comentado antes, los constructos de fusión de toxina-antígeno aplicados de una manera aislada inducen obviamente una fuerte respuesta inmunitaria polarizada de Th2. Algunos autores todavía describen una baja predisposición a Th2 para los portadores vivos; otros autores ven una ligera predisposición a Th1.

No obstante, estos datos de nuevo se basan exclusivamente en constructos no secretados. La inducción de inmunidad innata por medio de tales clases de vacunas contra infecciones nunca se ha comparado ni contemplado.

Como ya se ha mencionado, la razón principal es que las vacunas existentes son vacunas contra infecciones mucosales, no vacunas contra tumores. Por lo tanto, la inducción de respuestas inmunitarias Th1, respuestas inmunitarias CTL y respuestas del sistema inmunitario innato no se encontraba en el enfoque. Por el contrario, con respecto a las vacunas contra tumores, la inducción de estas respuestas inmunitarias es indispensable.

De manera interesante, en la biología celular comúnmente se utilizan toxinas nativas como inhibidores de las rutas de señalización. Así que entre otros se ha demostrado, que la toxina pertussis nativa, pero no la toxina del cólera, es capaz de inhibir un patrón de apoptosis concreto de las células NK (Ramirez *et al.*, 1994). Un estudio de investigación diferente fue capaz de demostrar que la toxina del cólera, pero no su subunidad B, bloquea las funciones de las células NK específicas (Poggi *et al.*, 1996). La toxina pertussis nativa se utiliza para inhibir la quimiotaxis de los linfocitos

(Spangrude *et al.*, 1985). Incluso si estos estudios no trataran sobre la vacunación contra tumores, un experto en la técnica concluiría, que el uso de toxinas como vacunas contra tumores sería nocivo, puesto que la respuesta del sistema inmunitario innato, crucial para la terapia tumoral, es inhibida en lugar de inducida.

5 Otros estudios de investigación fueron capaces de demostrar que las toxinas como la toxina pertussis nativa (pero no la toxina pertussis inactiva) inducen eficazmente los componentes del sistema inmunitario innato. Con respecto a la inmunoterapia contra tumores, esto significaría que, si fuera necesario, se podría necesitar emplear toxinas nativas. Sin embargo, debido a razones de toxicidad esta clase de administración es inviable. Adicionalmente, semejante inducción conduciría inevitablemente a una respuesta inmunitaria secundaria dirigida por Th2, que a su vez sería deletérea para la terapia tumoral (Boyd *et al.*, 2005). Por consiguiente, respecto a la inducción de una respuesta inmunitaria innata, la técnica anterior no describe ni contempla la vacunación contra tumores. Por el contrario, el análisis crítico de la literatura incluso milita contra el uso de toxinas en la terapia tumoral.

15 Sin embargo, es interesante un análisis del efecto sinérgico de las toxinas o sus subunidades con otros estimulantes, tales como oligonucleótidos de ADN inmuno-estimuladores con motivos hipometilados CpG (CpG ODN) (Holmgren *et al.*, 2005) o liposacáridos (LPS). En el caso de los LPS fundamentalmente la inducción de los monocitos parece estar incrementada principalmente por medio de la subunidad B de las toxinas, a la vez que es inhibida por la toxina en su totalidad (holotoxina) (Hajishengallis *et al.*, 2004). No obstante, estos estudios cuentan exclusivamente con el uso de constructos de fusión de toxina purificada-antígeno, a los cuales se añaden sustancias como LPS o CpG como coadyuvantes. Además, el análisis solamente se lleva a cabo en macrófagos, que inducen una respuesta inmunitaria adaptativa, pero no atacan a los tumores directamente. Por consiguiente, estos estudios no tienen trascendencia con respecto a la inducción de componentes del sistema inmunitario innato, en particular células NK, que pueden atacar a los tumores directamente.

25 Otros estudio, no obstante, demuestran que las células NK pueden ser activadas y atraídas quimiotácticamente por toxinas como la Exotoxina A de *Pseudomonas aeruginosa* (Muhlen *et al.*, 2004). Dependiendo del sistema experimental, también se pueden inducir respuestas Th1, aunque de ese modo se produce normalmente una supresión de las respuestas de las células NK y Th1 (Michalkiewicz *et al.*, 1999). Sin embargo, estos análisis apuntan fundamentalmente al análisis de la hepatotoxicidad de la Enterotoxina A y no hacen referencia a la vacunación de tumores. De manera interesante, los efectos dependen mucho de la dosis, y solamente un ligero cambio de dosis puede invertir los efectos. Sin embargo, los autores no pudieron revelar qué respuesta se produce eficazmente *in vivo*. Como consecuencia, los datos no proporcionan una predicción de qué efectos se pueden producir si se utiliza como coadyuvante una toxina o incluso una toxina destoxificada.

35 En general, la respuesta inmunitaria depende fuertemente del sistema concreto aplicado. En la mayoría de los casos, una vacuna anti-infección mucosal pretende conseguir la manipulación local del sistema inmunitario en la mucosa, con el fin de inducir una respuesta inmunitaria mucosal eficaz (Lycke, 2005). Sin embargo, estos estudios no incluyen el desarrollo de una vacuna contra tumores. Además, esos estudios carecen de información sobre la inducción de respuestas inmunitarias celulares generalizadas, particularmente respuestas de células T citotóxicas, que son esenciales para la vacunación contra tumores.

40 Ya se ha demostrado, que la secreción de un antígeno heterólogo confiere ventajas para una respuesta inmunitaria generalizada (Hess *et al.*, 1996). Sin embargo, los antígenos secretados descritos no eran constructos toxina-antígeno secretados; las toxinas o sus subunidades no se utilizaron. Las respuestas inmunitarias obtenibles de ese modo en un modelo de tumor transgénico también estaban muy limitadas (Gentshev *et al.*, 2005). En efecto, en este caso pudieron ser inducidas respuestas de anticuerpos y células T citotóxicas débiles, que protegieron parcialmente del progreso del tumor. Sin embargo, no solamente las propias respuestas inmunitarias, si no la propia protección estuvieron limitadas. Del mismo modo, estos estudios de vacunación contra tumores carecen de una comparación con los constructos no secretados. Además, los estudios comparativos no se llevaron a cabo en el contexto de la vacunación contra tumores (Hess *et al.*, 1996) y contrastan con estudios adicionales, que no observan ninguna ventaja con respecto a la secreción (Garmoy *et al.*, 2002; Roland *et al.*, 2005).

55 En resumen y como se ha mencionado antes, la técnica anterior es muy contradictoria con respecto a la secreción y, en general, no proporciona ninguna pista sobre las potenciales ventajas de los constructos toxina-antígeno secretados en la terapia tumoral. Por el contrario, el análisis crítico de las publicaciones existentes más bien discrepa con semejante clase de uso.

60 Toxinas Bacterianas (Todar, 2002): A nivel químico, existen dos tipos de toxinas bacterianas, lipopolisacáridos, que están asociados con las paredes celulares de las bacterias gram-negativas, y proteínas, que son liberadas de las células bacterianas y pueden actuar en lugares de tejidos remotos con respecto al crecimiento bacteriano. Las toxinas lipopolisacáridas (LPS) asociadas a las células son referidas como endotoxinas y las toxinas difusibles extracelulares son referidas como exotoxinas.

65 Las exotoxinas son típicamente proteínas solubles secretadas por bacterias vivas durante el crecimiento exponencial pero en algunos casos son liberadas por la lisis de la célula bacteriana. La producción de la toxina es generalmente específica para una especie bacteriana concreta que produce la enfermedad asociada con la toxina (p. ej. solamente *Clostridium tetani* produce la toxina del tétanos; solamente *Corynebacterium diphtheriae* produce la toxina de la difteria). Las bacterias tanto gram-positivas como gram-negativas producen toxinas proteicas solubles.

En general existen tres clases de (exo-)toxinas proteicas: (i) toxina de tipo I (superantígenos), que se unen a la superficie de la célula anfitriona y modulan la respuesta inmunitaria pero no son translocadas al interior de la célula, (ii) toxinas de tipo II (toxinas formadoras de poros), que actúan sobre la membrana de la célula anfitriona y hacen que la célula tenga escapes y muera, y (iii) toxinas de tipo III (toxinas A-B), que se unen a la célula anfitriona por medio de un receptor específico, son translocadas al interior de la célula, se vuelven activas allí y modifiquen las proteínas u otros componentes de la célula anfitriona.

Como se ha indicado antes, las toxinas de tipo III, que actúan intracelularmente con respecto a las células anfitrionas, consisten en dos componentes: un componente (subunidad A) es responsable de la actividad enzimática de la toxina; el otro componente (subunidad B) está relacionado con la unión a un receptor específico sobre la membrana de la célula anfitriona y la transferencia de la enzima a través de la membrana. El componente enzimático no es activo hasta que es liberado de la toxina nativa (A+B). Las subunidades A aisladas son enzimáticamente activas pero carecen de capacidad de unión y entrada en la célula. Las subunidades B aisladas se pueden unir a células diana (e incluso bloquear la unión de la toxina nativa), pero no son tóxicas.

Existen una variedad de formas en las que pueden ser sintetizadas y reordenadas las subunidades de las toxinas: A + B indica que la toxina es sintetizada y secretada en forma de dos subunidades de proteína separadas que interaccionan en la superficie de la célula diana; A-B o A-5B o AB5 indica que las subunidades A y B son sintetizadas por separado, pero asociadas por enlaces no covalentes durante la secreción y la unión a su diana; 5B o B5 indica que el dominio de unión de la proteína está compuesto por 5 subunidades idénticas. AB o A/B indica una toxina sintetizada en forma de un único polipéptido, dividido en dominios A y B, que pueden ser separados por escisión proteolítica. Son ejemplos de toxinas AB o A/B la Toxina de la Difteria, la Exotoxina A, la toxina de Botulinum y la Toxina del Tétanos. Son ejemplo de toxinas A-5B o AB5 la Toxina del Cólera y la Toxina Shiga, mientras la Toxina LF del Ántrax y la Toxina EF del Ántrax son ejemplos de toxinas A-B.

Los documentos de la técnica anterior relevantes adicionales comprenden los siguientes:

Michl *et al.* describen el uso de bacterias y toxinas bacterianas como agentes terapéuticos para tumores sólidos. Se describen los constructos de fusión de Toxina-Antígeno así como el redireccionamiento bacteriano de semejante constructo. Se estudia el uso de la toxina de la difteria (TD), la exotoxina A de pseudomonas (EP) y la enterotoxina de *Clostridium perfringens* (ECP). Sin embargo, los autores no mencionan el uso de la toxina del cólera ni demuestran o hacen que resulte obvia la secreción de constructos de fusión de toxina-antígeno liberados por bacterias (Michl y Gress, 2004).

Lahiri proporciona una visión general acerca de las diferentes toxinas bacterianas y comenta sus múltiples usos. Aunque el autor menciona proteínas de fusión de toxina-antígeno guarda silencio acerca de la toxina del cólera y el redireccionamiento bacteriano de los constructos de fusión de toxina-antígeno secretados (Lahiri, 2000).

Lavelle *et al.* describen moléculas de agentes infecciosos como fármacos inmunomoduladores. Los autores también mencionan proteínas de fusión de toxina del cólera-antígeno, pero tales constructos solamente se aplican directamente como proteínas y no como medios para vacunas vivas modificadas genéticamente (Lavelle *et al.*, 2004).

El documento WO 01/74383 está dirigido a inmunógenos mucosales de antígeno-enterotoxina quiméricos y también menciona el uso de las subunidades A2 y B de la toxina del cólera. Tales inmunógenos quiméricos, no obstante, comprenden siempre las subunidades A2 y B al mismo tiempo y están destinados al uso en la inmunización mucosal pero no en la terapia tumoral.

El documento WO 02/077249 describe cepas mutantes enterocólicas de *Yersinia* no virulentas para la liberación de proteínas heterólogas en células diana mutadas específicas. También se menciona el uso de la subunidad A1 de la toxina del cólera pero el documento de patente guarda silencio acerca de la secreción y hace referencia solamente al tratamiento de infecciones y estados infecciosos.

El documento WO 2004/018630 describe fagos con ARN de doble hebra recombinantes que codifican una casete de expresión eucariótica de doble hebra. Aunque se menciona la subunidad A de la toxina del cólera, el documento no tiene mayor relevancia.

Holmgren *et al.* proporcionan una breve visión general sobre el campo de la inmunización mucosal y los coadyuvantes. Comentan, entre otros, los efectos de la toxina del cólera como coadyuvante mucosal pero no describen información sobre los sistemas de expresión genética o las vacunas vivas y también guardan silencio acerca de la terapia tumoral (Holmgren *et al.*, 2003).

Holmgren y Czerkinsky también proporcionan una visión general sobre inmunidad mucosal y vacunas. Sin embargo, este artículo está restringido a anti-infecciosos solamente y no comenta ni hace que resulten obvios posibles usos en el campo de la terapia tumoral (Holmgren y Czerkinsky, 2005).



Otra revisión de Freytag y Clements comenta los coadyuvantes mucosales para su aplicación en la inmunoterapia anti-infecciosa. Aunque se menciona la toxina del cólera como coadyuvante mucosal los autores guardan silencio acerca de los constructos de toxina-antígeno secretados y la terapia tumoral como posible campo de administración (Freytag y Clements, 2005).

Shaw y Starnbach describen el uso de toxinas bacterianas modificadas para liberar antígenos para vacunas. Sin embargo, el artículo no menciona la toxina del cólera y adicionalmente se limita a la aplicación directa de proteínas de fusión de toxina-antígeno para la vacunación (Shaw y Starnbach, 2003).

El documento WO 03/072789 está dirigido a microorganismos como portadores de secuencias de nucleótidos que codifican antígenos celulares utilizados para el tratamiento de tumores. Aunque el documento de patente menciona su secreción y uso en el campo de la terapia tumoral, guarda un silencio absoluto acerca de las toxinas bacterianas y las proteínas de fusión.

Gentshev, Dietrich y Goebel así como Gentshev *et al.* describen el redireccionamiento bacteriano y su uso en el desarrollo de vacunas contra tumores. No obstante, estos dos documentos no mencionan el uso de toxinas bacterianas y proteínas de fusión en la terapia tumoral (Gentshev *et al.*, 2002a; Gentshev *et al.*, 2002b).

El documento WO 98/23763 describe células de *Vibrio cholerae* que expresan las subunidades B y D de la hemolisina de *E. coli* junto con un polipéptido de fusión que incluye un antígeno heterólogo fusionado a hylA. Adicionalmente se describe una cepa de vacuna de *Vibrio cholerae* que expresa la subunidad B de la toxina del cólera y un polipéptido de fusión de una secuencia señal secretora, un antígeno heterólogo y la subunidad A2 de la toxina del cólera. Por último, se describe un polipéptido de fusión que incluye la subunidad B de la toxina del cólera fusionada a una porción antigénica de la subunidad de la toxina A o la toxina B de *C. difficile*. Sin embargo, la solicitud de patente no menciona el uso de una proteína de fusión de toxina proteica más un antígeno de toxina no proteica heterólogo en la terapia tumoral.

Dietrich y colaboradores comentan dos herramientas de liberación de vacunas - hemolisina A y listeriolisina -que se pueden utilizar para la inmunidad mediada por células. Sin embargo, no se menciona ninguna proteína de fusión de toxina proteica- antígeno heterólogo ni expresión simultánea (Dietrich *et al.*, 2003).

Gentshev *et al.* describen el uso del sistema de secreción de alfa-hemolisina de *Escherichia coli* para la liberación de antígenos en la cepa para vacuna de *Salmonella typhi* Ty21 a. No obstante, los autores no mencionan el uso de toxinas bacterianas ni proteínas de fusión en la terapia tumoral (Gentshev *et al.*, 2004).

El documento WO 02/47727 está dirigido a agentes terapéuticos que comprenden una toxina proteica. El documento solamente describe proteínas de fusión de CtxB y EtxB con antígeno viral. No se menciona la vacuna bacteriana ni la liberación de vacuna bacteriana.

Cheng-hua S y colaboradores describen una fusión génica de la subunidad B de la toxina del cólera y el epítipo PreS2 de VHB y la antigenicidad de la proteína de fusión en estudios de inmunización directa. Sin embargo, no se menciona la vacuna bacteriana ni la liberación de la vacuna bacteriana (Cheng-hua *et al.*, 1995).

Sanchez *et al.* describen que el gen de la subunidad B de la toxina del cólera intensifica las respuestas citotóxicas de la inmunoglobulina A mucosal, tipo Th1 y CD8<sup>+</sup> cuando se administra simultáneamente intradérmicamente con una vacuna de ADN (Sánchez *et al.*, 2004). Sin embargo, en este enfoque los autores utilizan ADN como portador que actúa como un coadyuvante promotor de Th1 por sí solo. Además, las proteínas son producidas por células anfitrionas y no liberadas directamente o por medio de un portador bacteriano y por lo tanto están directamente disponibles para las células eucarióticas.

El documento WO 01/29233 está dirigido a composiciones inmunogénicas quiméricas y a ácidos nucleicos que las codifican. Sin embargo, no se menciona la vacuna bacteriana o la liberación de la vacuna bacteriana.

El documento WO 2007/044406 hace referencia a métodos para estimular una respuesta inmunitaria utilizando un sistema de liberación de antígeno bacteriano que está basado en SopE que porta una señal de secreción de tipo III. Sin embargo, la solicitud de patente no menciona el uso de toxinas bacterianas ni proteínas de fusión en la terapia tumoral.

En resumen, se puede concluir a partir de la técnica anterior que las toxinas nativas no pueden ser establecidas para su uso en seres humanos debido a su fuerte toxicidad. Adicionalmente, su aplicación en la terapia tumoral sería perjudicial debido a que la respuesta del sistema inmunitario innato, en particular la de las células NK, resultaría inhibida. Sin embargo, es esta respuesta inmunitaria la que es crucial para una terapia tumoral satisfactoria puesto que las células tumorales muy frecuentemente pierden su capacidad para expresar las moléculas del MHC de clase I y por lo tanto son resistentes al reconocimiento y ataque por los CTL.

El uso de las subunidades de toxina destoxificadas, por otra parte, solas o fusionadas a proteínas antigénicas (heterólogas) da como resultado un efecto coadyuvante fuertemente atenuado y/o incluso una tolerancia generalizada inducida del sistema inmunitario así como respuestas inmunitarias de anticuerpos y de tipo Th2 mucosalmente restringidas.

Además, se dice que la secreción de proteínas de fusión de antígeno (heterólogo)-toxina, que solamente se describe en las vacunas anti-infección (esto es, dirigiendo el antígeno o incluso la propia toxina), no solamente no presenta ventajas sobre la expresión citoplásmica, si no que son generalmente bastante inadecuadas.

En general, ni se presenta un enfoque terapéutico tumoral ni se describieron o lograron la inducción generalizada de una respuesta inmunitaria celular dominada por Th1 con células T coadyuvantes productoras de IFN-gamma, la inducción de los CTL ni la activación del sistema inmunitario innato, todas las cuales son indispensables para la terapia tumoral.

## Descripción de la invención

La presente invención tiene el objeto de proporcionar vacunas contra tumores novedosas por medio de las cuales se induce una fuerte respuesta generalizada del sistema inmunitario celular y se puede lograr una terapia tumoral eficaz.

El objeto de la presente invención ha sido resuelto sorprendentemente en un aspecto proporcionando un microorganismo como portador de secuencias de nucleótidos que codifican antígenos y toxinas proteicas que comprenden los siguientes componentes:

(I) al menos una secuencia de nucleótidos que codifica al menos un antígeno completo o parcial de al menos una proteína de tipo salvaje o mutada; y

(II) al menos una secuencia de nucleótidos que codifica al menos una toxina proteica y/o al menos una subunidad de una toxina proteica; y

(III)

a) al menos una secuencia de nucleótidos que codifica al menos un sistema de transporte que permite la expresión de los productos de expresión del componente (I) y el componente (II) sobre la superficie más externa del microorganismo y/o permite la secreción de los productos de expresión del componente (I) y el componente (II); y/o que codifica al menos una secuencia señal que permite la secreción de los productos de expresión del componente (I) y el componente (II); y/o

b) opcionalmente, al menos una secuencia de nucleótidos que codifica al menos una proteína para lisar el microorganismo en el citosol de las células de mamífero y para liberar intracelularmente plásmidos o vectores de expresión, que están contenidos en el microorganismo lisado; y

(IV) al menos una secuencia de nucleótidos para al menos una secuencia de activación para la expresión de uno o más de los componentes (I) a (III), donde dicha secuencia de activación puede ser activada en el microorganismo y/o es específica de la célula tisular, específica de la célula tumoral, específica de macrófagos, específica de dendritas, específica de linfocitos, específica de la función o sin especificidad celular”;

donde cualquiera de los componentes (I) a (IV) puede estar presente una vez o varias veces y si un componente de los componentes (I) a (IV) está presente varias veces puede ser independientemente idéntico o diferente; y

donde el componente (I) y el componente (II) no son idénticos, esto es el componente (I) no codifica al menos una secuencia de nucleótidos que codifica al menos una toxina proteica y/o al menos una subunidad de una toxina proteica.

El término “específico de célula tisular” con respecto al componente (IV) en la presente invención hace referencia a una o varias secuencias de activación que son activadas específicamente en células tisulares diana, tales como promotores dependientes de hormonas en tejidos prostáticos por ejemplo.

El término “específico de célula tumoral” con respecto al componente (IV) en la presente invención hace referencia a una o varias secuencias de activación que son específicamente activadas en células tumorales, tales como elementos promotores activados por la acción de oncogenes específicos de tumores.

El término “específico de macrófagos” con respecto al componente (IV) en la presente invención hace referencia a una o varias secuencias de activación que son específicamente activadas en macrófagos, tales como elementos promotores que codifican genes específicos de macrófagos, por ejemplo el gen que codifica F4/80.

El término “específico de dendritas” con respecto al componente (IV) en la presente invención hace referencia a una o varias secuencias de activación que son activadas específicamente en células dendríticas, tales como los elementos promotores que controlan la expresión de B7.1. Los términos “específico de dendritas” y “específico de células dendríticas” son equivalentes, esto es tienen el mismo significado y ambos hacen referencia a células dendríticas.

El término “específico de linfocitos” con respecto al componente (IV) en la presente invención hace referencia a elementos que son activados específicamente en células de linaje linfocítico como elementos promotores que regulan la expresión de moléculas CD3 en células T o elementos promotores que regulan la expresión de CD20 en células B maduras.

El término “específico de la función” con respecto al componente (IV) en la presente invención hace referencia a una o varias secuencias de activación que son activadas específicamente en el contexto celular, p. ej., en células tumorales que han perdido la expresión de p53, o una o varias secuencias de activación que están activadas dentro de bacterias dependiendo del contexto, p. ej. localización celular o presión de oxígeno.

El término “sin especificidad celular” con respecto al componente (IV) en la presente invención hace referencia a una o varias secuencias de activación que son ubicuamente activas, tales como promotores bacterianos constitutivamente activos.

El término “secuencia de nucleótidos” en la presente invención hace referencia a ADNds, ADNss, ARNds, ARNss o híbridos de ADN/ARNds. Se prefiere el ADNds.

El término “antígeno” en la presente invención hace referencia a moléculas que reaccionan con anticuerpos, esto es, que son capaces de generar anticuerpos. Algunos antígenos no logran, por sí mismos, la producción de anticuerpos; solamente aquellos que pueden inducir la producción de anticuerpos son denominados inmunógenos. Para los fines de la presente invención, se pretende que estén incluidas todas las clases de antígenos conocidos. El experto en la técnica sabe la recabar información necesaria a cerca de antígenos potenciales por medio de bases de datos y/o escrutinio experimental sin molestias indebidas. Los ejemplos de los antígenos son entre otros los antígenos celulares, los antígenos específicos de células tisulares (p. ej. células tisulares de las cuales deriva un tumor), antígenos proteicos celulares, antígenos virales, antígenos proteicos virales y similares. Se prefieren los antígenos proteicos. Son adicionalmente preferidos los antígenos heterólogos o los antígenos foráneos, esto es los antígenos que no son endógenos con respecto al microorganismo respectivo de la invención o los antígenos que no son expresados por el organismo respectivo de la invención por naturaleza, pero son introducidos en él por medio de métodos biotecnológicos moleculares convencionales.

El término “antígeno completo” en la presente invención hace referencia a moléculas completas que reaccionan con anticuerpos de acuerdo con la definición anterior. Los ejemplos de los antígenos completos son por ejemplo las proteínas completas, que también son las preferidas.

El término “antígeno parcial” en la presente invención hace referencia a porciones específicas de moléculas que reaccionan con los anticuerpos de acuerdo con la definición anterior. Los antígenos parciales pueden ser por ejemplo motivos proteicos tales como bucles de aminoácidos dentro de las proteínas, dominios proteína quinasa, epítomos y similares. Son preferidos los dominios proteína quinasa y los epítomos, de los cuales los últimos son sitios específicos de un antígeno reconocido por un anticuerpo (también referidos como determinantes antigénicos).

Los términos “tipo salvaje” y “mutada” con respecto a una “proteína” en la presente invención hacen referencia a proteínas que consisten en su secuencia de aminoácidos dominante “natural” (codificada por la respectiva secuencia de nucleótidos) y proteínas que tienen una o más mutaciones en su secuencia de aminoácidos (codificada por la respectiva secuencia de nucleótidos) en comparación con la secuencia de tipo salvaje, respectivamente. Preferiblemente las proteínas de tipo salvaje y/o mutadas derivan de células tumorales. Como para los antígenos parciales se prefiere adicionalmente que la secuencia incluya mutaciones, esto es, se selecciona un epítomo que contiene preferiblemente una o más mutaciones, por ejemplo el epítomo V660E de B-Raf.

Los microorganismos en el sentido de la invención son bacterias, bacterias gram-positivas, bacterias gram-negativas y células eucarióticas, de las cuales las últimas comprenden parásitos unicelulares, levaduras, células tumorales y células de líneas celulares, tales como *Sacharomyces cerevisiae*, *Leishmania* spp., células tumorales y líneas de células tumorales autólogas derivadas de pacientes. Tales microorganismos se utilizan normalmente como portadores para la transferencia de secuencias de nucleótidos que son foráneas (heterólogas o heterogéneas) para el microorganismo. Preferiblemente, se utilizan bacterias, que tiene la virulencia atenuada, por ejemplo bacterias que portan un gen *aroA*, *aro*, *asd*, *gal*, *pur*, *cya*, *crp*, *phoP/Q*, *omp* suprimidos o inactivados o son mutantes sensibles a la temperatura o mutantes dependientes de antibióticos (Cardenas y Clements, 1992). Adicionalmente se prefiere como microorganismo que comprende los componentes (I) a (IV) anteriores una bacteria intracelular facultativa, atenuada, gram-negativa como portador, que sea capaz de superar la mucosa intestinal (p. ej. *Salmonella* spp. o *Shigella* spp.).

En una realización preferida, se proporciona un microorganismo que comprende los componentes (I) a (IV) anteriores, donde el microorganismo se selecciona del grupo que consiste en “una bacteria, una bacteria gram-positiva, una bacteria gram-negativa, una célula eucariótica” y preferiblemente se selecciona del grupo que consiste en “*Escherichia* spp., *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Salmonella typhi*, *Salmonella typhimurium*, *Yersinia* spp., *Yersinia enterocoli*”.

*litica*, *Vibrio* spp., *Vibrio cholerae*, *Listeria* spp., *Listeria monocytogenes*, *Shigella* spp., *Shigella flexneri*”, donde preferiblemente la virulencia del microorganismo está atenuada. Adicionalmente se prefiere excluir *Vibrio cholerae* de los microorganismos definidos antes.

Se pretende que el término “spp.” con respecto a cualquier microorganismo comprenda para los fines de la presente invención todos los miembros de un género dado, incluyendo especies, subespecies y otros. Se pretende que el término “*Salmonella* spp.” por ejemplo comprenda todos los miembros del género *Salmonella*, tales como *Salmonella typhi* y *Salmonella typhimurium*.

En otra realización preferida, se proporciona un microorganismo de acuerdo con las definiciones anteriores, donde el al menos un antígeno completo o parcial de al menos una proteína de tipo salvaje o mutada de acuerdo con el componente (I) se selecciona del grupo que consiste en las siguientes proteínas de tipo salvaje y sus mutantes conocidos: “receptor; porción extracelular, transmembrana o intracelular de un receptor; molécula de adherencia; porción extracelular, transmembrana o intracelular de una molécula de adherencia; proteína transductora de la señal; proteína del ciclo celular; factor de transcripción; proteína de diferenciación; proteína embrionaria; proteína viral; alérgeno; proteína de patógeno microbiano; proteína de patógeno eucariótico; proteína antigénica de cáncer de testículo; proteínas antigénicas de tumores; y/o proteínas específicas de células tisulares”,

donde la célula tisular se selecciona del grupo que consiste en “glándula tiroidea, glándula mamaria, glándula salivar, nódulo linfático, glándula mamaria, túnica de la mucosa gástrica, riñón, ovario, próstata, cérvix, túnica serosa de la vejiga urinaria y lunares”.

Como para la proteína mutada, la mutación ha podido ser oncogénica y puede haber causado una pérdida o una ganancia de sus funciones celulares originales.

Tales antígenos realizan en la célula el control del crecimiento celular y de la división celular y se presentan sobre la membrana celular de las células normales, por ejemplo por medio de la molécula del MHC de clase I. En las células tumorales, estos antígenos son frecuentemente expresados en exceso o mutados específicamente. Tales mutaciones pueden tener como consecuencia limitaciones de la función de los supresores oncogénicos o la activación de los proto-oncogenes a oncogenes y pueden estar implicadas solas o en común en las expresiones en exceso en el crecimiento tumoral. Tales antígenos celulares se presentan sobre la membrana de las células tumorales y de este modo representan antígenos sobre las células tumorales, sin causar no obstante una reacción inmunitaria que afecte a la enfermedad tumoral del paciente. Rapp (documento US 5.156.841) ya ha descrito el uso de oncoproteínas, esto es productos de expresión de los oncogenes, como inmunógeno para las vacunas contra tumores.

Los ejemplos de los antígenos y sus mutaciones (oncogénicas) de acuerdo con la invención son i) receptores, tales como Her-2/neu, receptores de andrógenos, receptores de estrógenos, receptores de lactoferrina, receptores de midquinas, receptor de EGF, ERBB2, ERBB4, receptor TRAIL, FAS, receptor de TNF $\alpha$ , receptor de TGF- $\beta$ ; ii) proteínas de transducción de la señal, tales como c-Raf (Raf-1), A-Raf, B-Raf, B-Raf V599E, B-Raf V600E, B-Raf KD, dominio quinasa B-Raf V600E, B-Raf V600E KD, dominio quinasa B-Raf V600E KD, dominio quinasa B-Raf KD, Ras, Bcl-2, Bcl-X, Bcl-W, Bfl-1, Brag-1, Mcl-1, A1, Bax, BAD, Bak, Bcl-Xs, Bid, Bik, Hrk, Bcr/abl, Myb, C-Met, IAP1, IAO2, XIAP, ML-IAP LIVIN, survivina, APAF-1; iii) proteínas de control del ciclo celular, tales como ciclina D(1-3), ciclina E, ciclina A, ciclina B, ciclina H, Cdk-1, Cdk-2, Cdk-4, Cdk-6, Cdk-7, Cdc25C, p16, p15, p21, p27, p18, pRb, p107, p130, E2F(1-5), GAAD45, MDM2, PCNA, ARF, PTEN, APC, BRCA, p53 y homólogos; iv) factores de transcripción, tales como C-Myc, NF $\kappa$ B, c-Jun, ATF-2, Spl; v) proteínas embrionarias, tales como antígeno carcinoembrionario, alfa-fetoproteína, MAGE, MAGE-1, MAGE-3, NY-ESO-1, PSCA; vi) antígenos de diferenciación, tales como MART, Gp100, tirosinasa, GRP, TCF-4, mielina básica, alfa-lactalbúmina, GFAP, antígeno específico de próstata (ASP), proteína ácida fibrilar, tirosinasa, EGR-1, MUC1; vii) antígenos virales, tales como los siguientes virus: HIV, HPV, HCV, HPV, VEB, CMV, VHS, virus de la influenza, virus de la influenza de tipo A, virus de la influenza de tipo A (H5N1) y (H3N2), virus de la influenza tipo B, virus de la influenza tipo C; hemaglutininas, hemaglutinina H1, hemaglutinina H5, hemaglutinina H7, hemaglutinina HA1 (preferiblemente del virus de la influenza A (A/Thailand/1 (KAN-1)2004(H5N1), hemaglutinina HA12 (preferiblemente del virus de la Influenza A (A/Thailand/1 (KAN-1)2004(H5N1), hemaglutinina HA12C (preferiblemente del virus de la Influenza A (A/Thailand/1 (KAN-1)2004(H5N1), neuramidasa, antígenos microbianos: p60, LLO, ureasa etc. Antígenos de patógenos eucarióticos: CSP (malaria), calflagina (tripanosoma), CPB (*Leishmania major*) etc.

En otra realización preferida más, se proporciona un microorganismo de acuerdo con las definiciones anteriores, donde el al menos un antígeno completo o parcial de al menos una proteína de tipo salvaje o mutada de acuerdo con el componente (I) se selecciona del grupo que consiste en las siguientes proteínas de tipo salvaje y sus mutantes conocidos: “Her-2/neu, receptor de andrógenos, receptor de estrógenos, receptor de midquina, receptor de EGF, ERBB2, ERBB4, receptor TRAIL, FAS, receptor de TNF $\alpha$ , receptor de TGF- $\beta$ , receptor de lactoferrina, mielina básica, alfa-lactalbúmina, GFAP, proteína ácida fibrilar, tirosinasa, EGR-1, MUC1, c-Raf (Raf-1), A-Raf, B-Raf, B-Raf V599E, B-Raf V600E, B-Raf KD, dominio quinasa B-Raf V600E, B-Raf V600E KD, dominio quinasa B-Raf V600E KD, dominio quinasa B-Raf, dominio quinasa B-Raf KD, N-Ras, K-Ras, H-Ras, Bcl-2, Bcl-X, Bcl-W, Bfl-1, Brag-1, Mcl-1, A1, Bax, BAD, Bak, Bcl-Xs, Bid, Bik, Hrk, Bcr/abl, Myb, C-Met, IAP1, IAO2, XIAP, ML-IAP LIVIN, survivina, APAF-1, ciclina D(1-3), ciclina E, ciclina A, ciclina B, ciclina H, Cdk-1, Cdk-2, Cdk-4, Cdk-6, Cdk-7, Cdc25C, p16, p15, p21, p27, p18, pRb, p107, p130, E2F(1-5), GAAD45, MDM2, PCNA, ARF, PTEN, APC, BRCA, Akt, PI3K, mTOR, p53 y homólogos, C-Myc, NF $\kappa$ B, c-Jun, ATF-2, Sp1, antígeno específico de próstata (ASP), an-

tígeno carcinoembrionario, alfa-fetoproteína, PAP; PSMA; STEAP; MAGE, MAGE-1, MAGE-3, NY-ESO-1, PSCA, MART, Gp100, tirosinasa, GRP, TCF-4, antígenos virales de los virus HIV, HPV, HCV, HPV, VEB, CMV, VES, virus de la influenza, virus de la influenza de tipo A, virus de la influenza de tipo A (H5N1) y (H3N2), virus de la influenza de tipo B, virus de la influenza de tipo C; hemagglutininas, hemagglutinina H1, hemagglutinina H5, hemagglutinina H7, hemagglutinina HA1 (preferiblemente del virus de la Influenza A (A/Thailand/1 (KAN-1)2004(H5N1), hemagglutinina HA12 (preferiblemente del virus de la Influenza A (A/Thailand/1 (KAN-1)2004(H5N1), hemagglutinina HA12C (preferiblemente del virus de la Influenza A (A/Thailand/1 (KAN-1)2004(H5N1), neuramidasa, p60, LLO, ureasa, CSP, calflagina y/o CPB”.

- En otra realización preferida más, se proporciona un microorganismo de acuerdo con las definiciones anteriores, donde el al menos un antígeno completo o parcial de al menos una proteína de tipo salvaje o mutada de acuerdo con el componente (I) se selecciona del grupo de quinasas que consiste en las siguientes proteínas de tipo salvaje y sus mutantes conocidos (números de acceso entre paréntesis): AAK1 (NM 014911), AATK (NM 004920), ABL1 (NM 005157), ABL2 (NM 005158), ACK1 (NM 005781), ACVR1 (NM 001105), ACVR1 B (NM 020328), ACVR2 (NM 001616), ACVR2B (NM 001106), ACVRL1 (NM 000020), ADCK1 (NM 020421), ADCK2 (NM 052853), ADCK4 (NM 024876), ADCK5 (NM 174922), ADRBK1 (NM 001619), ADRBK2 (NM 005160), AKT1 (NM 005163), AKT2 (NM 001626), AKT3 (NM 005465), ALK (NM 004304), ALK7 (NM 145259), ALS2CR2 (NM 018571), ALS2CR7 (NM 139158), AMHR2 (NM 020547), ANKK1 (NM 178510), ANKRD3 (NM 020639), APEG1 (NM 005876), ARAF (NM 001654), ARK5 (NM 014840), ATM (NM 000051), ATR (NM 001184), AURKA (NM 003600), AURKB (NM 004217), AURKC (NM 003160), AXL (NM 001699), BCKDK (NM 005881), BCR (NM 004327), BIKE (NM 017593), BLK (NM 001715), BMPR1 A (NM 004329), BMPR1 B (NM 001203), BMPR2 (NM 001204), BMX (NM 001721), BRAF (NM 004333), BRD2 (NM 005104), BRD3 (NM 007371), BRD4 (NM 014299), BRDT (NM 001726), BRSK1 (NM 032430), BRSK2 (NM 003957), BTK (NM 000061), BUB1 (NM 004336), BUB1 B (NM 001211), CABCI (NM 020247), CAMK1 (NM 003656), CaMKIb (NM 198452), CAMK1 D (NM 020397), CAMK1 G (NM 020439), CAMK2A (NM 015981), CAMK2B (NM 001220), CAMK2D (NM 001221), CAMK2G (NM 001222), CAMK4 (NM 001744), CAMKK1 (NM 032294), CAMKK2 (NM 006549), CASK (NM 003688), CCRK (NM 012119), CDC2 (NM 001786), CDC2L1 (NM 001787), CDC2L5 (NM 003718), CDC42BPA (NM 014826), CDC42BPB (NM 006035), CDC7L1 (NM 003503), CDK10 (NM 003674), CDK11 (NM 015076), CDK2 (NM 001798), CDK3 (NM 001258), CDK4 (NM 000075), CDK5 (NM 004935), CDK6 (NM 001259), CDK7 (NM 001799), CDK8 (NM 001260), CDK9 (NM 001261), CDKL1 (NM 004196), CDKL2 (NM 003948), CDKL3 (NM 016508), CDKL4 (NM 001009565), CDKL5 (NM 003159), CHEK1 (NM 001274), CHUK (NM 001278), CIT (NM 007174), CLK1 (NM 004071), CLK2 (NM 003993), CLK3 (NM 003992), CLK4 (NM 020666), CRK7 (NM 016507), CSF1 R (NM 005211), CSK (NM 004383), CSNK1A1 (NM 001892), CSNK1 D (NM 001893), CSNK1E (NM 001894), CSNK1G1 (NM 022048), CSNK1G2 (NM 001319), CSNK1G3 (NM 004384), CSNK2A1 (NM 001895), CSNK2A2 (NM 001896), DAPK1 (NM 004938), DAPK2 (NM 014326), DAPK3 (NM 001348), DCAMKL1 (NM 004734), DCAMKL2 (NM 152619), DCAMKL3 (XM 047355), DDR1 (NM 013993), DDR2 (NM 006182), DMPK (NM 004409), DMPK2 (NM 017525.1), DYRK1 A (NM 001396), DYRK1 B (NM 006484), DYRK2 (NM 006482), DYRK3 (NM 003582), DYRK4 (NM 003845), EEF2K (NM 013302), EGFR (NM 005228), EIF2AK3 (NM 004836), EIF2AK4 (NM\_001013703), EPHA1 (NM 005232), EPHA10 (NM 001004338), EPHA2 (NM 004431), EPHA3 (NM 005233), EPHA4 (NM 004438), EPHA5 (NM 004439), EPHA6 (XM 114973), EPHA7 (NM 004440), EPHA8 (NM 020526), EPHB1 (NM 004441), EPHB2 (NM 017449), EPHB3 (NM 004443), EPHB4 (NM 004444), EPHB6 (NM 004445), ERBB2 (NM 004448), ERBB3 (NM 001982), ERBB4 (NM 005235), ERK8 (NM 139021), ERN1 (NM 001433), ERN2 (NM 033266), FASTK (NM 025096), FER (NM 005246), FES (NM 002005), FGFR1 (NM 000604), FGFR2 (NM 022970), FGFR3 (NM 000142), FGFR4 (NM 022963), FGR (NM 005248), FLJ23074 (NM 025052), FLJ23119 (NM 024652), FLJ23356 (NM 032237), FLT1 (NM 002019), FLT3 (NM 004119), FLT4 (NM 002020), FRAP1 (NM 004958), FRK (NM 002031), FYN (NM 002037), GAK (NM 005255), GPRK5 (NM 005308), GPRK6 (NM 002082), GPRK7 (NM 139209), GRK4 (NM 005307), GSG2 (NM 031965), GSK3A (NM 019884), GSK3B (NM 002093), GUCY2C (NM 004963), GUCY2D (NM 000180), GUCY2F (NM 001522), H11 (NM 014365), HAK (NM 052947), HCK (NM 002110), HIPK1 (NM 152696), HIPK2 (NM 022740), HIPK3 (NM 005734), HIPK4 (NM 144685), HRI (NM 014413), HUNK (NM 014586), ICK (NM 016513), IGF1R (NM 000875), IKBKB (NM 001556), IKBKE (NM 014002), ILK (NM 004517), INSR (NM 000208), INSR (NM 014215), IRAK1 (NM 001569), IRAK2 (NM 001570), IRAK3 (NM 007199), IRAK4 (NM 016123), ITK (NM 005546), JAK1 (NM 002227), JAK2 (NM 004972), JAK3 (NM 000215), KDR (NM 002253), KIS (NM 144624), KIT (NM 000222), KSR (XM 290793), KSR2 (NM 173598), LAK (NM 025144), LATS1 (NM 004690), LATS2 (NM 014572), LCK (NM 005356), LIMK1 (NM 016735), LIMK2 (NM 005569), LMR3 (XM 055866), LMTK2 (NM 014916), LOC149420 (NM 152835), LOC51086 (NM 015978), LRRK2 (XM 058513), LTK (NM 002344), LYN (NM 002350), MAK (NM 005906), MAP2K1 (NM 002755), MAP2K2 (NM 030662), MAP2K3 (NM 002756), MAP2K4 (NM 003010), MAP2K5 (NM 002757), MAP2K6 (NM 002758), MAP2K7 (NM 005043), MAP3K1 (XM 042066), MAP3K10 (NM 002446), MAP3K11 (NM 002419), MAP3K12 (NM 006301), MAP3K13 (NM 004721), MAP3K14 (NM 003954), MAP3K2 (NM 006609), MAP3K3 (NM 002401), MAP3K4 (NM 005922), MAP3K5 (NM 005923), MAP3K6 (NM 004672), MAP3K7 (NM 003188), MAP3K8 (NM 005204), MAP3K9 (NM 033141), MAP4K1 (NM 007181), MAP4K2 (NM 004579), MAP4K3 (NM 003618), MAP4K4 (NM 145686), MAP4K5 (NM 006575), MAPK1 (NM 002745), MAPK10 (NM 002753), MAPK11 (NM 002751), MAPK12 (NM 002969), MAPK13 (NM 002754), MAPK14 (NM 001315), MAPK3 (NM 002746), MAPK4 (NM 002747), MAPK6 (NM 002748), MAPK7 (NM 002749), MAPK8 (NM 002750), MAPK9 (NM 002752), MAPKAPK2 (NM 032960), MAPKAPK3 (NM 004635), MAPKAPK5 (NM 003668), MARK (NM 018650), MARK2 (NM 017490), MARK3 (NM 002376), MARK4 (NM 031417), MAST1 (NM 014975), MAST205 (NM 015112), MAST3 (XM 038150), MAST4 (XM 291141), MASTL (NM 032844), MATK (NM 139355), MELK (NM 014791), MERTK (NM 006343), MET (NM

## ES 2 347 019 T3

000245), MGC33182 (NM 145203), MGC42105 (NM 153361), MGC43306 (C9orf96), MGC8407 (NM 024046), MIDORI (NM 020778), MINK (NM 015716), MKNK1 (NM 003684), MKNK2 (NM 017572), MLCK (NM 182493), MLK4 (NM 032435), MLKL (NM 152649), MOS (NM 005372), MST1 R (NM 002447), MST4 (NM 016542), MUSK (NM 005592), MYLK (NM 053025), MYLK2 (NM 033118), MYO3A (NM 017433), MYO3B (NM 138995),  
 5 NEK1 (NM 012224), NEK10 (NM 152534), NEK11 (NM 024800), NEK2 (NM 002497), NEK3 (NM 002498), NEK4 (NM 003157), NEK5 (MGC75495), NEK6 (NM 014397), NEK7 (NM 133494), NEK8 (NM 178170), NEK9 (NM 033116), NLK (NM 016231), NPR1 (NM 000906), NPR2 (NM 003995), NRBP (NM 013392), NRBP2 (NM 178564), NRK (NM 198465), NTRK1 (NM 002529), NTRK2 (NM 006180), NTRK3 (NM 002530), OBSCN (NM 052843), OSR1 (NM 005109), PACE-1 (NM 020423), PAK1 (NM 002576), PAK2 (NM 002577), PAK3 (NM 002578), PAK4  
 10 (NM 005884), PAK6 (NM 020168), PAK7 (NM 020341), PASK (NM 015148), PCTK1 (NM 006201), PCTK2 (NM 002595), PCTK3 (NM 212503), PDGFRA (NM 006206), PDGFRB (NM 002609), PDK1 (NM 002610), PDK2 (NM 002611), PDK3 (NM 005391), PDK4 (NM 002612), PDPK1 (NM 002613), PFTK1 (NM 012395), PHKG1 (NM 006213), PHKG2 (NM 000294), PIK3R4 (NM 014602), PIM1 (NM 002648), PIM2 (NM 006875), PIM3 (NM 001001852), PINK1 (NM 032409), PKE (NM 173575), PKMYT1 (NM 004203), pknbeta (NM 013355), PLK  
 15 (NM 005030), PLK3 (NM 004073), PRKAA1 (NM 006251), PRKAA2 (NM 006252), PRKACA (NM 002730), PRKACB (NM 002731), PRKACG (NM 002732), PRKCA (NM 002737), PRKCB1 (NM 002738), PRKCD (NM 006254), PRKCE (NM 005400), PRKCG (NM 002739), PRKCH (NM 006255), PRKCI (NM 002740), PRKCL1 (NM 002741), PRKCL2 (NM 006256), PRKCM (NM 002742), PRKCN (NM 005813), PRKCQ (NM 006257), PRKCZ (NM 002744), PRKD2 (NM 016457), PRKDC (NM 006904), PRKG1 (NM 006258), PRKG2 (NM 006259), PRKR  
 20 (NM 002759), PRKWNK1 (NM 018979), PRKWNK2 (NM 006648), PRKWNK3 (NM 020922), PRKWNK4 (NM 032387), PRKX (NM 005044), PRKY (NM 002760), PRPF4B (NM 003913), PSKH1 (NM 006742), PSKH2 (NM 033126), PTK2 (NM 005607), PTK2B (NM 004103), PTK6 (NM 005975), PTK7 (NM 002821), PTK9 (NM 002822), PTK9L (NM 007284), PXX (NM 017771), QSK (NM 025164), RAD53 (NM 007194), RAF1 (NM 002880), RAGE (NM 014226), RET (NM 020975), RHOK (NM 002929), RIOK1 (NM 031480), RIOK2 (NM 018343), RIPK1 (NM  
 25 003804), RIPK2 (NM 003821), RIPK3 (NM 006871), RIPK5 (NM 015375), RNASEL (NM 021133), ROCK1 (NM 005406), ROCK2 (NM 004850), ROR1 (NM 005012), ROR2 (NM 004560), ROS1 (NM 002944), RPS6KA1 (NM 002953), RPS6KA2 (NM 021135), RPS6KA3 (NM 004586), RPS6KA4 (NM 003942), RPS6KA5 (NM 004755), RPS6KA6 (NM 014496), RPS6KB1 (NM 003161), RPS6KB2 (NM 003952), RPS6KC1 (NM 012424), RPS6KL1  
 30 (NM 031464), RYK (NM 002958), SBK (XM 370948), SCYL1 (NM 020680), SCYL2 (NM 017988), SGK (NM 005627), SgK069 (SU SgK069), SgK085 (XM 373109), SgK110 (SU SgK110), SGK2 (NM 016276), SgK223 (XM 291277), SgK269 (XM 370878), SgK424 (CGP SgK424), SgK493 (SU SgK493), SgK494 (NM 144610), SgK495 (NM 032017), SGK1 (NM 013257), SK681 (NM 001001671), SLK (NM 014720), SMG1 (NM 015092), SNARK (NM 030952), SNF1 LK (NM 173354), SNF1 LK2 (NM 015191), SNK (NM 006622), SNRK (NM 017719), SRC (NM 005417), SRMS (NM 080823), SRPK1 (NM 003137), SRPK2 (NM 003138), SSTK (NM 032037), STK10 (NM  
 35 005990), STK11 (NM 000455), STK16 (NM 003691), STK17A (NM 004760), STK17B (NM 004226), STK18 (NM 014264), STK19 (NM 032454), STK22B (NM 053006), STK22C (NM 052841), STK22D (NM 032028), STK23 (NM 014370), STK24 (NM 003576), STK25 (NM 006374), STK3 (NM 006281), STK31 (NM 031414), STK32B (NM 018401), STK33 (NM 030906), STK35 (NM 080836), STK36 (NM 015690), STK38 (NM 007271), STK38L (NM 015000), STK39 (NM 013233), STK4 (NM 006282), STLK5 (NM 001003787), STYK1 (NM 018423), SUDD (NM 003831), SYK (NM 003177), TAF1 (NM 138923), TAF1 L (NM 153809), TAO1 (NM 004783), TAOK1 (NM  
 40 020791), TAOK3 (NM 016281), TBCK (NM 033115), TBK1 (NM 013254), TEC (NM 003215), TEK (NM 000459), TESK1 (NM 006285), TESK2 (NM 007170), TEX14 (NM 031272), TGFB1 (NM 004612), TGFB2 (NM 003242), TIE (NM 005424), TIF1 (NM 003852), TLK1 (NM 012290), TLK2 (NM 006852), TNIK (NM 015028), TNK1 (NM 003985), TOPK (NM 018492), TP53RK (NM 033550), TRAD (NM 007064), TRIB1 (NM 025195), TRIB2 (NM 021643), TRIB3 (NM 021158), TRIM28 (NM 005762), TRIM33 (NM 015906), TRIO (NM 007118), TRPM6 (NM 017662), TRPM7 (NM 017672), TRRAP (NM 003496), TSSK4 (NM 174944), TTBK1 (NM 032538), TTBK2 (NM 173500), TTK (NM 003318), TTN (NM 003319), TXK (NM 003328), TYK2 (NM 003331), TYRO3 (NM 006293), ULK1 (NM 003565), ULK2 (NM 014683), ULK3 (NM 015518), ULK4 (NM 017886), VRK1 (NM 003384), VRK2  
 45 (NM 006296), VRK3 (NM 016440), WEE1 (NM 003390), Wee1B (NM 173677), YANK1 (NM 145001), YES1 (NM 005433), ZAK (NM 016653), y/o ZAP70 (NM 001079)".

El término "alergeno" en la presente invención hace referencia a antígenos parciales o completos según se definen en la presente memoria que logran reacciones de hipersensibilidad y/o alérgicas. Los ejemplos son Der p 5 (ácaro), Bet v 1 (polen de abedul), Phl p 1 (polen de césped), Asp f I/a (Aspergillus), PLA 2 (abeja), Hev b (látex) (Schmid-Grendelmeier y Cramer, 2001).

Los antígenos de patógenos microbianos y eucarióticos y de antígenos de cáncer de testículo están incluidos en la lista anterior.

En la presente invención, las toxinas proteicas y/o sus subunidades de acuerdo con el componente (II) son preferiblemente toxinas proteicas bacterianas, más preferiblemente exotoxinas. Los ejemplos de las exotoxinas bacterianas son las toxinas de tipo I (superantígenos), toxinas de tipo II (toxinas formadoras de poros) y (iii) las toxinas de tipo III (toxinas A-B).

En una realización preferida, se proporciona un microorganismo de acuerdo con las definiciones anteriores, donde el componente (II) se selecciona del grupo que consiste en "toxina bacteriana, enterotoxina, exotoxina, toxina de tipo I, toxina de tipo II, toxina de tipo III, toxina de tipo IV, toxina de tipo V, toxina RTX, toxina AB, toxina A-B, toxina A/B, toxina A+B, toxina A-5B y/o toxina AB5.

En otra realización preferida más, se proporciona un microorganismo de acuerdo con las definiciones anteriores, donde el componente (II) se selecciona del grupo que consiste en “toxina Adenilato ciclasa, toxina de Ántrax, toxina de Ántrax (EF), toxina de Ántrax (LF), toxina de Botulinum, toxina de Cólera (CT, Ctx), subunidad B de la toxina de Cólera (CTB, CtxB), toxina de Difteria (DT, Dtx), toxina LT de *E. coli*, enterotoxina lábil al calor de *E. coli* (LT), subunidad B de la enterotoxina lábil al calor de *E. coli* (LTB), toxina ST de *E. coli*, enterotoxina estable al calor de *E. coli* (ST), toxina Eritrogénica, toxina Exfoliativa, Exotoxina A, enterotoxina de *Perfringens*, toxina de Pertussis (PT, Ptx), toxina Shiga (ST, Stx), subunidad B de la toxina Shiga (STB, StxB), toxina de tipo Shiga, enterotoxinas de *Staphylococcus*, toxina del Tétanos (TT), toxina del Síndrome de choque tóxico (TSST-1), toxina Vero (VT), Toxina A (AT) y Toxina B (BT) de *Clostridium difficile*, Toxina Letal (LT) y Toxina Hemorrágica (HT) de *Clostridium sordellii*, Toxina alfa (AT) de *Clostridium novyi*”.

Sin embargo, si se utilizan como toxinas la Toxina del Cólera o su subunidad CtxB de acuerdo con el componente (II) de la invención, se prefiere no emplear *Vibrio cholerae* como portador bacteriano (microorganismo).

En una realización preferida, se proporciona un microorganismo de acuerdo con las definiciones anteriores, donde el componente (I) y el componente (II) están unidos entre sí para permitir la expresión y/o secreción de una proteína de fusión codificada por ambos componentes. Más preferiblemente, esta proteína de fusión se selecciona del grupo que consiste en “CtxB-PSA, CtxB-B-Raf V600E KD (“muerte de quinasa”), dominio quinasa CtxB-B-Raf V600E, dominio quinasa (muerte de quinasa) CtxB-B-Raf V600E KD, CtxB-B-Raf, CtxB B-Raf KD (muerte de quinasa), dominio quinasa CtxB-B-Raf KD (muerte de quinasa), CtxB-HA1 (subunidad 1 una hemaglutinina un virus influenza), CtxB-HA12C”.

La secreción es el procedimiento de segregación, elaboración, y liberación de productos químicos a partir de una célula, o la sustancia química o la cantidad de sustancia secretada. La secreción no es única sólo para los eucariotas; también está presente en bacterias y arqueas. Los transportadores de tipo casete de unión a ATP (ABC) son comunes a los tres dominios de vida. El sistema Sec es otro sistema de secreción conservado que es homólogo al translocón del retículo endoplásmico eucariótico que consiste en el complejo del translocón Sec 61 en levaduras y el complejo Sec Y-E-G en bacterias. Las bacterias Gram-negativas tienen dos membranas, haciendo de ese modo la secreción topológicamente más compleja. De modo que hay cinco sistemas de secreción especializados en las bacterias Gram negativas:

- (1) sistema de secreción de Tipo I: Es el mismo que los transportadores de la casete de unión a ATP mencionados antes.
- (2) sistema de secreción de Tipo II: Depende del sistema SEC para que una proteína atraviese la membrana interna y de otro sistema especial para cruzar la membrana externa. Los pili bacterianos utilizan modificaciones del sistema sec, pero son diferentes del sistema de tipo I.
- (3) sistema de secreción de Tipo III (T3SS): Es homólogo al cuerpo basal flagelar bacteriano. Es como una jeringa molecular a través de la cual una bacteria (p. ej. *Shigella* o *Yersinia*) puede inyectar proteínas en células eucarióticas. La baja concentración de  $Ca^{2+}$  en el citosol abre la compuerta que regula T3SS. El sistema Hrp en patógenos vegetales inyecta horquillas a través de mecanismos similares en las plantas.
- (4) sistema de secreción de Tipo IV: Es homólogo a la maquinaria de conjugación de las bacterias (y flagelos arqueales). Es capaz de transportar tanto ADN como proteínas. Se descubrió en *Agrobacterium tumefaciens*, que utiliza este sistema para introducir el plásmido Ti y las proteínas en el anfitrión que desarrolla la agalla de corona (tumor). *Helicobacter pylori* utiliza un sistema de secreción de tipo IV para inyectar Cag A en células epiteliales gástricas. *Bordetella pertussis*, el agente causante de la tosferina, secreta la toxina pertussis parcialmente a través del sistema de tipo IV.
- (5) sistema de secreción de Tipo V, también denominado sistema auto-transportador: Este utiliza el sistema sec para cruzar la membrana interna. Las proteínas que utilizan esta ruta tienen la capacidad de formar un barril beta en su extremo C e insertarlo en la membrana externa para transportar el resto del péptido hacia fuera. Finalmente el barril beta puede ser escindido y dejado atrás en la membrana externa. Algunas personas piensan que estos remanentes de los auto-transportadores dan lugar a las porinas que son similares a los barriles beta.

Las bacterias así como las mitocondrias y los cloroplastos también utilizan muchos otros sistemas de transporte especiales tales como la ruta de translocación de la doble arginina (Tat) que, en contraste con la exportación dependiente de Sec, transporta la proteína completamente plegada a través de la membrana. El nombre del sistema viene del requerimiento de dos argininas consecutivas en la secuencia señal requerida para dirigirla a este sistema. La secreción en bacterias gram-negativas implica superar la membrana interna y externa por medio de un sistema de secreción adecuado, como p. ej. el sistema de secreción de tipo I Hly o de tipo II o el autotransportador AIDA. En las bacterias gram-positivas el sistema de secreción tiene que superar la membrana interna y la pared celular, lo que, en la mayoría de las cepas, se puede lograr mediante la fusión con una señal de secreción adecuada.

El componente (III) a) es al menos una secuencia de nucleótidos que codifica al menos un sistema de transporte que permite la expresión de los productos de expresión del componente (I), y el componente (II) sobre la superficie externa del microorganismo y/o permite la secreción de los productos de expresión del componente (I) y el componente (II). El respectivo componente puede, como opción, ser secretado o expresado sobre la membrana del microorganismo, esto es, unido a la membrana. Tales sistemas de transporte son por ejemplo i) el sistema de secreción de tipo I, el sistema de secreción de tipo II, el sistema de secreción de tipo III, el sistema de secreción de tipo IV, el sistema de secreción de tipo V, ii) el sistema de transporte de hemolisina (señal) de *E. coli* (secuencias de nucleótidos que contienen HlyA, HlyB y HlyD bajo el control del promotor específico de hly); se van a utilizar las siguientes señales de transporte: para la secreción - la señal de transporte de HlyA C-terminal, en presencia de las proteínas HlyB y HlyD; para la expresión unida a la membrana - la señal de transporte de HlyA C-terminal, en presencia de la proteína HlyB, iii) el sistema de transporte de la hemolisina (señal) de *E. coli* (secuencias de nucleótidos que contienen HlyA, HlyB y HlyD bajo el control de un promotor bacteriano no específico de hly), iv) la señal de transporte para la proteína de la capa S (Rsa A) de *Caulobacter crescentus*; se van a utilizar las siguientes señales de transporte: para la secreción y la expresión unida a la membrana - la señal de transporte RsaA C-terminal RsaA, v) la señal de transporte para la proteína TolC de *Escherichia coli*; se van a utilizar las siguientes señales de transporte: para la expresión unida a la membrana - la señal de transporte N-terminal de TolC (la proteína integrante de la membrana TolC de *E. coli* es una proteína formadora de poro multi-funcional de la membrana externa de *E. coli*, que sirve - además de para funciones tales como la recepción de colicina E1 (Morona *et al.*, 1983) y la secreción de colicina V (Fath *et al.*, 1991) también como receptor del fago U3 (Austin *et al.*, 1990); esta proteína no solo se encuentra en *E. coli*, también en una multitud de bacterias gram-negativas (Wiener, 2000); la localización en la membrana externa y la amplia incidencia hacen de TolC un candidato ideal para presentar antígenos heterólogos, con el fin p. ej. de ocasionar una reacción inmunitaria.

Las bacterias gram positivas no incluyen una membrana externa. La secreción en estos casos es más simple y normalmente no requiere una maquinaria de secreción dedicada al transporte a través de la membrana celular y la pared celular. En el caso de las bacterias gram positivas, las señales de secreción fusionadas N-terminalmente a la proteína heteróloga son normalmente necesarias y suficientes para la secreción. Las proteínas, para las cuales se han descrito estas secuencias señal, comprenden principalmente proteínas bacterianas secretadas. Los ejemplos para *Listeria* son las señales de secreción derivadas de Listeriolysina, p60 o ActA. En general, se aplica un enfoque similar para las células eucarióticas, donde es necesaria y suficiente para la secreción una secuencia señal (por ejemplo la señal de secreción ubicua Vtgss) que dirige la proteína al retículo endoplasmático en ausencia de una señal de retención.

El componente opcional (III) b) es al menos una secuencia de nucleótidos que codifica al menos una proteína para lisar el microorganismo en el citosol de las células de mamífero y para liberar intracelularmente plásmidos o vectores de expresión, que están contenidos en el microorganismo lisado. Tales proteínas líticas (endolisinas) son por ejemplo proteínas de lisis específica de *Listeria*, tales como PLY551 (Loessner *et al.*, 1995) y/o holina específica de *Listeria* bajo el control de un promotor listeriano. Una realización preferida de esta invención es la combinación de diferentes componentes (III) b), por ejemplo la combinación de una proteína de lisis y la holina.

Ambos componentes (III) a) y/o (III) b) pueden ser independientemente entre sí constitutivamente activos.

En una realización preferida, se proporciona un microorganismo de acuerdo con las definiciones anteriores, donde el componente (III) a) se selecciona del grupo que consiste en “el sistema de secreción de tipo I, el sistema de secreción de tipo II, el sistema de secreción de tipo III, el sistema de secreción de tipo IV, el sistema de secreción de tipo V, el sistema de transporte de hemolisina (señal) de *Escherichia coli* (secuencias de nucleótidos que contienen HlyA, HlyB y HlyD bajo el control del promotor específico de hly), el sistema de transporte de hemolisina (señal) de *Escherichia coli* (secuencias de nucleótidos que contienen HlyA, HlyB y HlyD bajo el control de un promotor bacteriano no específico de hly), la señal de transporte para la proteína la capa S (Rsa A) de *Caulobacter crescentus*, la señal de transporte para la proteína TolC de *Escherichia coli*, la señal de secreción Vtgss y/o las señales de secreción derivadas de listeriolisina, p60 y/o ActA” y donde el componente (III) b) se selecciona del grupo que consiste en “endolisinas, proteína lítica de bacterias gram positivas, proteína lítica de *Listeria monocytogenes*, PLY551 de *Listeria monocytogenes* y/o holina de *Listeria monocytogenes*”.

En una realización adicionalmente preferida, el mismo componente (III) a) permite la expresión de los productos de expresión del componente (I) y el componente (II) sobre la superficie externa del microorganismo y/o permite la secreción de los productos de expresión del componente (I) y el componente (II). Esto es, en esta realización preferida el componente (III) a) es al menos una secuencia de nucleótidos que codifica solamente un sistema de transporte, que permite la expresión concomitante de los productos de expresión del componente (I) y el componente (II) sobre la superficie externa del microorganismo y/o permite la secreción concomitante de los productos de expresión del componente (I) y el componente (II), donde semejante componente (III) a) preferido es al menos una secuencia de nucleótidos que codifica el sistema de transporte de la hemolisina (señal) de *Escherichia coli* (secuencias de nucleótidos que contienen HlyA, HlyB y HlyD bajo el control del promotor específico de hly) o el sistema de transporte de la hemolisina (señal) de *Escherichia coli* (secuencias de nucleótidos que contienen HlyA, HlyB y HlyD bajo el control de un promotor bacteriano no específico de hly).

En otra realización preferida más, se proporciona un microorganismo de acuerdo con las definiciones anteriores, donde de acuerdo con el componente (III) a) se secretan los productos de expresión de los componentes (I) y el componente (II). Más preferiblemente, el componente (I) y el componente (II) se conectan entre sí, se expresan juntos y se secretan como una proteína de fusión codificada por ambos componentes. Muy preferiblemente, esta proteína



de fusión se selecciona del grupo que consiste en “CtxB-PSA, CtxB-B-Raf V600E KD (muerte de quinasa), dominio quinasa CtxB-B-Raf V600E, dominio quinasa CtxB-B-Raf V600E KD (muerte de quinasa), CtxB-B-Raf, CtxB-B-Raf KD (muerte de quinasa), dominio quinasa CtxB B-Raf KD (muerte de quinasa), CtxB-HA1 (subunidad 1 de una hemaglutinina de un virus influenza), CtxB-HA12C”.

En la presente invención, el término “secreción” hace referencia a la secreción de un antígeno proteico, toxina proteica y/o proteína de fusión de toxina-antígeno a través de ambas membranas de una bacteria gram negativa o a través de la membrana interna y la pared celular de una bacteria gram positiva en el entorno circundante, por medio de un sistema de secreción apropiado, tal como los ilustrados más arriba.

Como se sabe que utilizando un sistema de secreción, tal como el sistema de secreción de tipo I de hemolisina de *E. coli*, el producto de secreción se encuentra normalmente en todas las fracciones celulares: citoplásmicamente, asociado a la membrana, localizado en las vesículas de la auto-membrana y completamente secretado en el entorno circundante (Balsalobre *et al.*, 2006), no se necesita que la secreción en la presente invención sea completa. No obstante, se desea y se prefiere una secreción completa o casi completa, esto es, una cantidad mayoritaria de producto de secreción completamente secretado.

El componente (IV) representa al menos una secuencia de nucleótidos para al menos una secuencia de activación para la expresión de uno o más componentes (I) a (III), donde dicha secuencia de activación puede ser activada en el microorganismo y/o es específica de la célula tisular, específica de la célula tumoral, específica de macrófagos, específica de dendritas, específica de linfocitos, específica de la función o sin especificidad celular.

Si la expresión está unida a la membrana sobre la superficie externa del microorganismo, la secuencia de activación tiene que ser seleccionada preferiblemente de manera que sea susceptible de ser activada en el microorganismo. Tales secuencias de activación son por ejemplo: i) las regiones promotoras constitutivamente activas, tales como la región promotora con el “sitio de unión al ribosoma” (RBS, por sus siglas en Inglés) del gen de la beta-lactamasa de *E. coli* o el gen tetA (Busby y Ebright, 1994), el promotor endógeno del locus hly de *E. coli*; ii) promotores, que son susceptibles de ser inducidos, preferiblemente promotores, que se vuelven activos después de la recepción en la célula. A estos pertenecen el promotor actA de *L. monocytogenes* (Dietrich *et al.*, 1998) o el promotor pagC de *S. typhimurium* (Bumann, 2001).

Si los plásmidos son liberados del microorganismo después de su lisis en el citosol de la célula de mamífero, la secuencia de activación no es específica de la célula, si no específica de la célula tisular, específica del ciclo celular o específica de la función. Preferiblemente, se seleccionan tales secuencias de activación, que son activadas concretamente en macrófagos, células dendríticas y linfocitos.

En una realización preferida adicional, se proporciona un microorganismo de acuerdo con las definiciones anteriores, donde el componente (I) se selecciona del grupo que consiste en B-Raf V600E, dominio quinasa B-Raf V600E, B-Raf V600E KD (muerte de quinasa), dominio quinasa B-Raf V600E KD (muerte de quinasa), B-Raf KD (muerte de quinasa), dominio quinasa B-Raf, dominio quinasa B-Raf KD (muerte de quinasa), antígeno específico de próstata (PSA), hemaglutinina HA1 (preferiblemente de virus Influenza A (A/Thailand/1 (KAN-1)2004(H5N1), hemaglutinina HA12 (preferiblemente de virus Influenza A (A/Thailand/1 (KAN-1)2004(H5N1), hemaglutinina HA12C (preferiblemente de virus Influenza A (A/Thailand/1 (KAN-1)2004(H5N1))”;

el componente (II) se selecciona del grupo que consiste en la “subunidad B de la toxina del Cólera (CTB, CtxB), subunidad B de enterotoxina lábil al calor de *E. coli* (LTB), toxina del tétanos (TT)”;

el componente (III) a) se selecciona del grupo que consiste en la “señal de transporte de hemolisina HlyA de *Escherichia coli* junto con componentes del sistema de secreción Hly (secuencias de nucleótidos que contienen HlyA, HlyB y HlyD bajo el control del promotor específico de hly)”;

el componente (IV) se selecciona del grupo que consiste en el “promotor endógeno del locus hly de *E. coli*”;

donde el componente (I) y el componente (II) están conectados entre sí para permitir la expresión de una proteína de fusión codificada por ambos componentes y donde la proteína de fusión es secretada.

Los microorganismos ilustrados antes de acuerdo con los componentes (I) a (IV) así como las realizaciones preferidas son referidos aquí más adelante como microorganismos de la invención.

Los microorganismos de la invención se adaptan ventajosamente para su uso en la terapia tumoral, como vacunas vivas en el redireccionamiento al tumor. Esto es, por medio de los microorganismos de la invención, que funcionan como portadores de información genética, los antígenos heterólogos junto con las toxinas proteicas son transportados al sitio del tumor, expresados como proteínas de fusión y secretados *in situ*.

Los microorganismos de la invención se caracterizan sorprendentemente y ventajosamente por una expresión y secreción eficaz y superior de las proteínas de fusión de toxina-antígeno transportadas, codificadas y expresadas, esto es no se producen agregados citoplásmicos y/o periplásmicos.

Por otra parte, mediante la administración de los microorganismos de la invención se logra sorprendentemente una respuesta generalizada del sistema inmunitario celular en comparación con las vacunas de proteínas administradas oralmente que en contraste inducen una tolerancia generalizada del sistema inmunitario.

5 Muy notablemente, además de la inducción de una respuesta generalizada del sistema inmunitario celular de tipo Th1, los microorganismos de la invención inducen la activación de las células T citotóxicas CD8<sup>+</sup> restringidas al MHC de clase I (CTL) e intensifican fuertemente esta respuesta inmunitaria de los CTL.

10 Adicionalmente, además de la inducción y/o potenciación de las respuestas generalizadas celulares fuertes del sistema inmunitario de Th1 y CTL, el sistema inmunitario innato, p. ej. las células NK, las células NKT y/o las células T gamma-delta, también son sorprendentemente activadas por los microorganismos de la invención de una manera sinérgica.

15 Si se utiliza la Toxina del Cólera como componente toxina, los microorganismos de la invención poseen la ventaja de que en seres humanos no hay normalmente una inmunidad pre-existente contra la toxina (en contraste con la toxina del tétanos por ejemplo debido a vacunaciones anti-tétanos durante la infancia). Por consiguiente se prefiere el uso de la Toxina del Cólera y/o sus subunidades, en particular CtxB.

20 Los microorganismos de la invención son particularmente adecuados para la administración oral en la terapia tumoral (inmunitaria) dirigida basada en vacunas vivas. De ese modo se puede lograr una mejor conformidad del paciente.

25 No obstante, los microorganismos de la invención no están limitados al uso en la terapia tumoral solamente. Principalmente, los microorganismos de la invención también son adecuados para el tratamiento y/o la profilaxis de todas estas enfermedades que requieren una terapia en la cual es obligatoria la inducción de una respuesta generalizada del sistema inmunitario Th1 celular. Los ejemplos de tales enfermedades infecciosas incluyen, pero no están limitadas a, HIV, influenza, HCV y otras enfermedades virales, *Mycobacterium tuberculosis*, *Listeria monocytogenes* y otras enfermedades bacterianas.

30 Los microorganismos de la invención están perfectamente adaptados para el tratamiento de enfermedades como la influenza, que requieren una protección óptima mediante la combinación de una respuesta del sistema inmunitario mucosal y una respuesta inmunitaria celular generalizada. Además, podrían ser útiles para la inducción específica de la inmunidad de tipo Th1 en enfermedades alérgicas, p. ej. rinitis alérgica. En tal caso, el antígeno sería un alérgeno que se fusionaría al componente toxina proteica y el principio de acción de la respectiva vacuna sería el cambio de la  
35 respuesta inmunitaria desde una respuesta inmunitaria dominada por Th2 contra el alérgeno en las reacciones alérgicas (enfermedades) hacia una respuesta inmunitaria Th1.

Un modo de aplicación preferido es la aplicación oral. En una realización preferida, una cepa de Salmonella de acuerdo con esta invención se hace fermentar en un medio apropiado, se cosecha y se lava mediante centrifugación y  
40 con posterioridad se formula y se estabiliza utilizando sustancias apropiadas y se liofiliza. La sustancia liofilizada se carga en cápsulas resistentes al estómago que contienen un número de células vivas preferiblemente entre 10<sup>9</sup> y 10<sup>10</sup> bacterias. Las cápsulas se consumen oralmente con líquido.

45 Alternativamente, las bacterias liofilizadas como se ha descrito antes se distribuyen junto con saquitos que contienen tampón que es capaz de neutralizar el ácido del estómago (kit farmacéutico). En una realización preferida, este tampón es un tampón carbonato. Inmediatamente antes de su uso, se prepara el tampón con agua y se recoge, inmediatamente después las bacterias liofilizadas se consumen mezcladas con agua.

Otra alternativa más es el uso de bacterias congeladas. En este caso, después del lavado las bacterias son estabiliza-  
50 das por medio de un estabilizador, preferiblemente sacarosa o glicerina, y con posterioridad congeladas y almacenadas a -80°C preferiblemente a concentraciones entre 10<sup>9</sup> y 10<sup>10</sup> bacterias por dosis. Esta preparación se utiliza preferiblemente en un kit farmacéutico como se ha descrito antes junto con tampón carbonato.

55 En una realización preferida, se proporciona una composición farmacéutica que comprende al menos un microorganismo de la invención, preferiblemente al menos un microorganismo liofilizado de la invención, y un portador farmacéuticamente aceptable, preferiblemente cápsulas.

Los componentes (I) a (IV) de acuerdo con la presente invención se introducen en los microorganismos de la invención mediante métodos bien conocidos por el experto en la técnica. Si los microorganismos representan bacterias, los  
60 componentes se insertan en plásmidos o vectores de expresión, y los plásmidos o vectores de expresión se transfieren a las bacterias. Las técnicas de clonación y transformación biológica molecular adecuadas para la fabricación de los plásmidos, vectores de expresión y microorganismos de la invención son bien conocidas por los expertos en la técnica y representan un trabajo experimental rutinario.

65 Otro tema de la invención es la administración de una preparación de medicamento que contiene los microorganismos de la invención. La administración se realiza localmente o de forma generalizada, por ejemplo oralmente peroralmente, rectalmente, en la epidermis, en el subcutis, en la musculatura, en una cavidad corporal, en un órgano, en el tumor o en la circulación sanguínea.

Tales preparaciones de medicamento son por ejemplo suspensiones de los microorganismos de la invención en soluciones familiares para el farmacéutico, adecuadas para inyectables.

Un tema concreto de esta invención es la administración peroral o rectal de un medicamento de acuerdo con la invención para el tratamiento y/o la profilaxis de enfermedades. La administración se puede realizar una vez o varias veces. En cada administración, se administran aproximadamente de  $10$  a  $10^{11}$  microorganismos de la invención. Si la administración de este número de microorganismos de la invención no produce una reacción inmunitaria suficiente, se debe incrementar el número a inyectar.

Después de la administración de los microorganismos de la invención, la tolerancia para un componente de presentación celular (I), por ejemplo una célula tumoral, o una célula tisular, a partir de la cual se origina el tumor, se interrumpe, y se desencadena una fuerte respuesta inmunitaria generalizada dirigida contra las células del tumor y/o sus células tisulares. Dependiendo de la selección del componente (I), esta reacción inmunitaria celular está dirigida o bien exclusivamente contra el tumor o bien también contra las células tumorales incluyendo las células tisulares, a partir de las cuales se originan las células tumorales.

En otro aspecto, el objeto de la presente invención ha sido resuelto proporcionando un medicamento que comprende al menos un microorganismo de la invención que comprende los componentes genéticos (I) a (IV) ilustrados antes o al menos una composición farmacéutica como se define en la presente memoria.

En una realización preferida, se pueden utilizar los microorganismos de la invención para la producción de un medicamento para el tratamiento y/o la profilaxis de las condiciones fisiológicas y/o patofisiológicas seleccionadas del grupo que consiste en "división celular incontrolada, tumores malignos, tumores benignos, tumores sólidos, sarcomas, carcinomas, trastornos hiperproliferativos, carcinoides, sarcomas de Ewing, sarcomas de Kaposi, tumores cerebrales, tumores que se originan en el cerebro y/o el sistema nervioso y/o las meninges, gliomas, neuroblastomas, cáncer de estómago, cáncer de riñón, carcinomas de células de riñón, cáncer de próstata, carcinomas de próstata, tumores de tejido conectivo, sarcomas de tejidos blandos, tumores de páncreas, tumores de hígado, tumores de cabeza, tumores de cuello, cáncer esofágico, cáncer de tiroides, osteosarcomas, retinoblastomas, timoma, cáncer testicular, cáncer de pulmón, carcinomas bronquiales, cáncer de mama, carcinomas de mama, cáncer intestinal, tumores colorrectales, carcinomas de colon, carcinomas de recto, tumores ginecológicos, tumores de ovario/tumores ováricos, cáncer uterino, cáncer cervical, carcinomas de cérvix, cáncer del corpus del útero, carcinomas del corpus, carcinomas endometriales, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de vejiga, cáncer de piel, basaliomas, espinaliomas, melanomas, melanomas intraoculares, leucemia, leucemia crónica, leucemia aguda, linfomas, infección, infección viral o bacteriana, influenza, inflamación crónica, rechazo de órganos y/o enfermedades autoinmunitarias".

Las infecciones bacterianas comprenden, pero no están limitadas a, ántrax, meningitis bacteriana, botulismo, brucelosis, campilobacteriosis, enfermedad por rasguño de gato, cólera, difteria, tífus epidémico, impétigo, legionelosis, lepra (enfermedad de Hansen), leptospirosis, listeriosis, enfermedad de Lyme, melioidosis, infección por MRSA, nocardiosis, pertusis (tosferina), peste, neumonía neumocócica, psitacosis, fiebre Q, Fiebre Manchada de las Montañas Rocosas (RMSF, por sus siglas en Inglés), salmonelosis, escarlatina, shigelosis, sífilis, tétanos, tracoma, tuberculosis, tularemia, fiebre tifoidea, tífus, infecciones del tracto urinario, enfermedades del corazón causadas por bacterias.

Las infecciones bacterianas comprenden, pero no están limitadas a, SIDA, complejo relacionado en el SIDA (ARC, por sus siglas en Inglés), viruela del pollo (varicela), catarro común, infección por citomegalovirus, fiebre de la garrapata de Colorado, fiebre Dengue, fiebre hemorrágica Ébola, enfermedad de manos, pies y boca, hepatitis, Herpes simplex, Herpes zoster, HPV, influenza (gripe), fiebre Lassa, sarampión, fiebre hemorrágica Marburg, mononucleosis infecciosa, paperas, poliomiелitis, leucoencefalopatía multifocal progresiva, rabia, rubeola, SRAS, viruela (variola), encefalitis viral, gastroenteritis viral, meningitis viral, pneumonia viral, enfermedad del Nilo Occidental, fiebre Amarilla.

Las inflamaciones crónicas o las enfermedades inflamatorias crónicas comprenden, pero no están limitadas a, colecistitis crónica, bronquiectasia, artritis reumatoide, tiroiditis de Hashimoto, enfermedad inflamatoria del intestino (colitis ulcerativa y enfermedad de Crohn), silicosis y otras pneumoconiosis.

Las enfermedades autoinmunitarias comprenden, pero no están limitadas a, síndromes generalizados tales como el SLE, síndrome de Sjögren, esclerodermia, artritis reumatoide y polimiositis así como síndromes locales, tales como IDDM, tiroiditis de Hashimoto, enfermedad de Addison, pénfigo vulgar, psoriasis, dermatitis atópica, síndrome atópico, asma, anemia hemolítica autoinmunitaria, esclerosis múltiple.

Los medicamentos correspondientes que comprenden al menos un microorganismo como se define en la presente memoria o al menos una composición farmacéutica como se define en la presente memoria de acuerdo con todas las realizaciones descritas en la presente memoria para su uso en el tratamiento y/o la profilaxis de las afecciones fisiológicas y/o patofisiológicas descritas y definidas en la presente memoria también están incluidos en la presente invención.

En otro aspecto, el objeto de la presente invención se ha resuelto proporcionando plásmidos o vectores de expresión que comprenden los componentes (I) a (IV) como se ilustra en la presente memoria. Se prefieren los microorganismos de la invención que portan al menos un plásmido o vector de expresión que comprende los componentes (I) a (IV) como se ilustra en la presente memoria.

En otro aspecto, el objeto de la presente invención se ha resuelto proporcionando un procedimiento para la producción de un microorganismo de la invención, donde se produce un plásmido o vector de expresión como se ilustra en la presente memoria, y se transforma un microorganismo con este plásmido o vector de expresión.

En otro aspecto, el objeto de la presente invención se ha resuelto proporcionando un kit farmacéutico que comprende al menos un microorganismo de la invención o una composición farmacéutica como se ha descrito antes o un medicamento como se ha descrito antes y un tampón farmacológicamente aceptable, preferiblemente un tampón carbonato.

## Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 representa la secuencia de nucleótidos (5'→3') de la señal de secreción de hemolisina A (hlyA) de *E. coli*. El sitio NsiI está subrayado.

La Figura 2 representa la secuencia de nucleótidos (5'→3') de hemolisina B de *E. coli* (hlyB) del sistema de transporte de tipo I de hemolisina de *E. coli*.

La Figura 3 representa la secuencia de nucleótidos (5'→3') de hemolisina D de *E. coli* (hlyD) del sistema de transporte de tipo I de hemolisina de *E. coli*.

La Figura 4 representa la secuencia de nucleótidos (5'-3') del antígeno específico de próstata humana (PSA) sin péptido señal, número de acceso M26663 (ARNm de antígeno específico de próstata de *Homo sapiens*, cds completa), región 100-807 (péptido correspondiente: AA 26-261).

La Figura 5 representa la secuencia de nucleótidos (5'→3') de la subunidad B de la Toxina de Cólera (CtxB) sin péptido señal que abarque la región 204-494, número de acceso K01170 (genes toxA y toxB de *Vibrio cholerae* para las subunidades A2 (gamma) de enterotoxina de cólera).

La Figura 6 representa la secuencia de nucleótidos (5'-3') del dominio quinasa B-Raf (B-Raf KD) de la proteína B-raf humana (BRAF), número de acceso M95712 (ARNm de proteína B-raf de *Homo sapiens* (BRAF), cds completa), región 1403-2359 sin la región 1448-1477 (péptido correspondiente: AA 448-766 sin AA 463-472) que contiene la mutación V600E.

La Figura 7 representa la secuencia de nucleótidos (5'→3') del epítipo B-raf V600E restringido a HLA B27 humano.

La Figura 8 representa la secuencia de nucleótidos (5'→3') del constructo de fusión genética de CtxB-PSA-HlyA.

La Figura 9 representa la secuencia de nucleótidos (5'→3') del constructo de fusión genética de Ctx-B-Raf V600E-HlyA.

La Figura 10 representa la secuencia de nucleótidos (5'→3') del constructo de fusión genética de CtxB-dominio quinasa B-Raf V600E KD-HlyA.

La Figura 11 representa la expresión funcional y la secreción de proteínas de fusión PSA-CtxB en diferentes especies bacterianas recombinantes para pMKhly-PSA-CtxB.

La Figura 12 representa esplenocitos secretores de IFN-gamma como medida para las respuestas de las células T CD8<sup>+</sup> y del sistema inmunitario innato (células NK) en ratones inmunizados con diferentes portadores para vacunas vivas.

La Figura 13 representa la reducción del volumen tumoral en respuesta a la inmunización con diferentes portadores de vacunas.

La Figura 14 representa esplenocitos secretores de IFN-gamma como medida de las respuestas de las células T CD8<sup>+</sup> y del sistema inmunitario innato (células NK) en ratones inmunizados con diferentes vacunas vivas que portan diferentes coadyuvantes inmunológicos con constructos de fusión CtxB-OVA.

La Figura 15 representa la expresión eficaz y la secreción funcional de proteínas de fusión de hemaglutinina H11 de influenza de pollo - CtxB en una cepa de vacuna veterinaria que incluye la secuencia completa de la hemaglutinina H5N1 (HA1+HA2, representada, HA12), sin la región transmembrana (HA12c). *Salmonella enterica* serovar Typhimurium vacT (*gyrA* D87G) atenuada viva y *Salmonella enterica* serovar Enteritidis vacE, (cepa Sm24/Rif12/Ssq) atenuada viva, ambas de LOHMANN ANIMAL HEALTH GMBH & CO KG.

La Figura 16 representa la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína de fusión CtxB-HA12c-HlyA.

La Figura 17 representa la expresión y la secreción de la proteína de fusión utilizando el vector pMBKDC electroporado en la cepa *Salmonella typhi* Ty21 a y otras cepas bacterianas:

A) calles A1-A3: Análisis de sobrenadante de acuerdo con TP StMoBKDC utilizando anticuerpo anti-B-Raf para la detección. Calle A1: *S. typhi* Ty21a pMoBKDC, A2: *S. typhi* Ty21a, A3: *S. typhimurium* aroA. La proteína de fusión BRaf-V600E KD-CtxB está marcada con la flecha superior y tiene el tamaño esperado de aprox. 48 kDa. Marcador de Proteína: Invitrogen BenchMark Pre-Stained Protein Ladder, núm. 10748-010.

B) análisis equivalente al del apartado A, utilizando anticuerpo anti-HlyA recién producido como anticuerpo de detección. Calle 1, 2: constructos StMoPC, calle 3: *S. typhi* Ty21 a MoBKDC; calle 4: *E. coli* MoBKDC, calle 5: *S. typhi* Ty21 a, calle 6: *S. typhimurium* aroA. Marcador de Proteína: Invitrogen BenchMark Pre-Stained Protein Ladder, Núm. 10748-010, Lot. 1315592.

La Figura 18 representa la secuencia de nucleótidos completa (5'→3') del vector vacío pMKhly1.

La invención se explica con más detalle por medio de los siguientes ejemplos.

## Ejemplos

### Ejemplo 1

#### *Construcción, expresión y secreción de proteínas de fusión PSA-CtxB en diferentes cepas de portadores bacterianos*

Para probar la viabilidad y demostrar la eficacia del sistema de secreción de hemolisina de tipo I de *E. coli* para secretar proteínas de fusión de antígeno tumoral, en la presente antígeno específico de próstata (PSA), y componentes de toxina proteica, en la presente CtxB, como coadyuvante, se construyó una proteína de fusión PSA-CtxB como se describe en la presente memoria. Se sometieron a ensayo la expresión y la secreción en diferentes cepas bacterianas gram-negativas, que son potencialmente útiles como cepas de vacuna vivas en la terapia tumoral. La clonación biológica molecular se basa en el plásmido/vector de expresión pMOhly1, que ha sido descrito previamente (Gentshev *et al.*, 2005; Gentshev *et al.*, 1996, documento WO 03/072789).

#### *1A Construcción de derivado del vector de expresión pMOhly1 resistente a kanamicina*

La sustitución de la casete de resistencia a ampicilina de pMOhly1 se realizó como se describe (Datsenko y Wanner, 2000).

En resumen, se utilizaron un cebador efector P1 (5'-GAGTATTCAACATTTCCGTGTCGCCCTTATTCCTTTT TGGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC-3') y un cebador antisentido P2 (5'-GCGATCTGTCTATTTTCGTTTCATCCATAG TTGCCTGACTCCCCATATGAATATCCTCCTTA-3') y el plásmido pKD4 como molde para la PCR para producir un fragmento que portaba el gen de resistencia a kanamicina (Kan<sup>R</sup>) flanqueado por regiones homólogas al gen de resistencia a ampicilina (subrayado).

Se hizo crecer la cepa BW25114 de *E. coli*, que albergaba el plásmido pKD46 y el plásmido diana pMOhly1 a 37°C en medio LB (Difco) con un suplemento de L-(+)-arabinosa al 0,2% durante 3-4 horas antes de la transformación del fragmento de la PCR.

Después de la transformación las células bacterianas se diseminaron sobre placas de agar LB que contenían 25 µg/mL de kanamicina y se incubaron a 37°C durante la noche.

Al día siguiente, se escogieron los clones de Kan<sup>R</sup> y se incubaron durante 48 horas más en medio LB que contenía 50 µg/mL de kanamicina para deshacerse de todos los plásmidos que conferían resistencia a ampicilina.

Finalmente, se seleccionaron los clones con un fenotipo sensible a Kan<sup>R</sup> y ampicilina. El remplazo del gen Ap<sup>R</sup> por la casete Kan<sup>R</sup> se confirmó mediante PCR y secuenciación. El plásmido resultante se denominó pMKhly1.

#### *1B Clonación del plásmido pMKhly-PSA*

Se utilizaron un cebador efector PSA-Nsi1 (5'-GATTGGTGATGCATCCCTCAT-3'; los sitios de restricción NsiI están subrayados) y un cebador anti-sentido PSA-Nsi2 (5'-GGTGCTCATGCATTGGCCACG-3') para amplificar un fragmento de ADN que codifica PSA mediante PCR. Las PCR se realizaron en un Ciclador Térmico 60 (Biometra, Göttingen, Alemania) durante 30 ciclos a 94°C durante 1 min, 54°C durante 1 min, y 72°C durante 2 min.

Tras la digestión con la enzima de restricción *NsiI*, el fragmento de ADN, que portaba el gen psa, se insertó en el único sitio *NsiI* del vector de exportación pMKhly1. El plásmido resultante pMKhly-PSA se aisló de *E. coli* DH5alfa (Invitrogene, Alemania), se analizó mediante análisis de restricción y se secuenció.

1C Clonación del plásmido pMKhly-PSA/CtxB

Se utilizaron el cebador efector Ptac-Sall (5'-AAAAAAGTCGACGGCTGTGCAGGTCGTAAATCACTGC-3') y el cebador anti-sentido Ptac-NotI (5'-AAAAAAGCGGCCGCGAAATTGTTATCCGCT CACAATTCC-3') para amplificar mediante PCR un Fragmento de ADN de 201 pb que codificaba el promotor Ptac del Plásmido pGEX-6p-1 (Amersham Bioscience, Alemania). La PCR se realizó en el ciclador térmico T3 (Biometra, Alemania): durante 30 ciclos a 95°C durante 30 s, 55°C durante 30 s, y 72°C durante 90 s. Se utilizaron el cebador efector Rbs-NotI-directo (5'-AAAAAAGCGGCC GCTAAGGATGAATTATGATTAAATTTGG-3') y el cebador anti-sentido ctb-Sall-inverso (5'-TTTATAGTCGACTTAATTTGCCATACT AATTGCGGCAATCGC-3') para amplificar mediante PCR el Fragmento de ADN de 413 pb que codifica el sitio de unión al ribosoma y la secuencia codificante completa de CtxB de *V. cholerae* El tor. La PCR se realizó en un Ciclador Térmico T3 (Biometra, Alemania): etapa1: 30 ciclos a 95°C durante 30 s, 50°C durante 30 s, y 72°C durante 2 min. Tras la purificación con el Kit de Purificación por PCR Qiaquick (Qiagen, Alemania) y la digestión de ambos fragmentos con la enzima de restricción *NotI*, se ligaron los dos fragmentos dando como resultado el fragmento Ptac-ctxB de 594 pb. El fragmento resultante también se purificó y después de la digestión con la enzima de restricción *Sall*, se insertó el Fragmento Ptac-ctxB en el único sitio *Sall* del vector de exportación pMKhly-PSA. El plásmido resultante pMKhly-PSA/CtxB se aisló de *E. coli* DH5alfa (Invitrogen, Alemania), se analizó y se secuenció.

1D Clonación del constructo de fusión PSA-CtxB-HlyAs

Se utilizaron el cebador efector 5' ctxB NsiI (5'-GCATATGCACA TGCATCACCTCAAAATATTACTGAT-3') y el cebador anti-sentido 3' ctxB SrfI NsiI (5'-GGCTTTTTTATATCTTATGCATGCCC GGGCATTGCGGCAATCGC-3') (el sitio *SrfI* está en negrita) para amplificar mediante PCR un fragmento de ADN ~300pb que representa el gen *ctxB* de *V. cholerae* El tor. Tras la purificación con el Kit de Purificación por PCR QIAquick (Qiagen, Alemania) y la digestión con la enzima de restricción *NsiI*, se insertó el fragmento de ADN, que portaba el gen *ctxB* completo sin la secuencia señal N-terminal, en el sitio *NsiI* del vector de exportación pMKhly1. El plásmido resultante pMKhly-CtxB se aisló de *E. coli* DH5alfa (Life Technologies), se analizó y se secuenció. El gen *psa* humano se amplificó del plásmido pCDNA3PSA mediante PCR con los cebadores 5-PSA-Blunt (5'-GTGGGAGGCTGGGAGTGC-3') y 3-PSA-Blunt (5'-GGGGTTGGCCACGATGGT-3'). La PCR se llevó a cabo en un Ciclador Térmico 60 (Biometra, Göttingen, Alemania) durante 30 ciclos a 94°C durante 1 min, 56°C durante 1 min, y 72°C durante 2 min. El ADN de 0,7 kb producto se clonó con posterioridad en el sitio *SrfI* de pMKhly-CtxB. El plásmido resultante pMKhly-CtxB-PSA se verificó mediante análisis de restricción y secuenciación.

1E Expresión y secreción de proteínas de fusión en diferentes especies bacterianas

Utilizando procedimientos de electroporación convencionales, se transformó el plásmido pMKhly-CtxB-PSA en diferentes cepas bacterianas electro-competentes. Se escogieron colonias individuales resistentes a kanamicina y se hicieron crecer en medio BHI (Beckton Dickinson, USA: Cerebros de Ternera, Infusión a partir de 200 g, 6,0 g/L; Corazón de Vaca, Infusión a partir de 250 g, 9,8 g/L; Proteosa Peptona 10,0 g/L; Cloruro de Sodio 5,0 g/L; Dextrosa 2,0 g/L; Fosfato Disódico 2,5 g/L) a una densidad de  $1 \times 10^9$  células por ml. Después del crecimiento se centrifugaron 20 ml de cultivo durante 30 min a 4000 rpm (3000 g) en una centrífuga Heraeus a 4°C. Se transfirieron 18 ml del sobrenadante a un tubo nuevo. Con posterioridad, se añadieron 1,8 ml de ATC (ácido tricloroacético, Applichem, Alemania), el líquido se mezcló y se incubó durante al menos 1 hora sobre hielo. Tras la incubación, la suspensión se centrifugó durante 30 minutos a 4000 rpm (3000 g) en una centrífuga Heraeus a 4°C. El sobrenadante se decantó y el sedimento se lavó con 1 ml de acetona p.a. (Applichem, Alemania). El producto precipitado se centrifugó durante 10 minutos a 4000 rpm (3000 g) en una centrífuga Heraeus a 4°C. El sedimento se secó al aire y se recogió en 150 µl 5x de tampón Laemmli (Tris-HCl 70 mM, pH 6,8, glicerol del 40% (v/v), dodecilsulfato de sodio al 3% (v/v), 2-mercaptoetanol al 5% (v/v) y azul bromofenol al 0,05% (p/v)) con o sin beta-mercaptoetanol (Laemmli, 1970). Se utilizaron 20 µl de solución para cada calle en SDS PAGE. Las proteínas separadas se transfirieron electroforéticamente (Transferencia Western) a una membrana de nitrocelulosa Hybond ECL (Amersham-Pharmacia, Little Chalfont, Reino Unido) y se bloquearon durante la noche con PBS (Cloruro de Potasio 0,20 g/l, Dihidrogenofosfato de Potasio 0,20 g/l, Cloruro de Sodio 8,00 g/l, Dihidrogenofosfato de disodio anhidro 1,15 g/l) que contiene BSA al 1%. La membrana se lavó en PBS-Tween al 0,05%, se incubó con anticuerpo anti-PSA de conejo policlonal (1:750, DAKO, Dinamarca), anticuerpo contra CtxB (1:1000, Zytomed, Berlin, Alemania) o anticuerpo contra HlyAs (Gentshev *et al.*, 1996)) y con posterioridad se incubó con anti-IgG de conejo acoplado a HRP (1/2.000; Dianova, Hamburg, Alemania) durante 1 h. La transferencia Western se desarrolló con el kit de aumento de la quimioluminiscencia (GE Healthcare Life Science, Alemania).

La Figura 11 representa la expresión funcional y la secreción de proteínas de fusión PSA-CtxB en una variedad de cepas bacterianas, incluyendo *Escherichia coli* spp., *Salmonella dublin*, *Citrobacter* spp, *Salmonella typhi* Ty21a, *Salmonella typhimurium* spp, *Erwinia* spp y *Shigella flexneri* spp.

La cepa de *Salmonella typhi* Ty21 a que expresaba y secretaba la proteína de fusión PSA-CtxB se depositó en la Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares (DSMZ) como DSM 19244.

## Ejemplo 2

*Respuesta inmunitaria y protección contra la sensibilización con células tumorales en ratones inmunizados con cepas de Salmonella que secretaban proteínas de fusión de antígenos tumorales y CtxB o CtxB sola*

Por medio de los siguientes experimentos se demostró la eficacia protectora superior de las proteínas de fusión secretadas de antígenos tumorales y toxinas proteicas en un modelo de tumor en animal. Para este modelo, se comparó la cepa *Salmonella typhimurium* aroA (SL7207) pMKhly-CtxB-PSA, que expresaba y secretaba la proteína de fusión de CtxB-PSA con otras cepas de control.

## 2A Procedimientos de Inmunización

Se inmunizaron ratones DBA/2 tres veces con un intervalo de 3 semanas. Para la inmunización con bacterias, los animales se pre-trataron aplicando 50  $\mu$ l de NaHCO<sub>3</sub> al 7% intragástricamente para incrementar el pH intragástrico. De 5 a 10 minutos después del pre-tratamiento, se aplicaron 5x10<sup>8</sup> bacterias insensibles a la kanamicina vivas en un volumen de 100  $\mu$ l de PBS intragástricamente. Como control, se inmunizaron ratones intramuscularmente con ADN plasmídico desnudo que codificaba PSA (pcDNA-PSA) como se describe (Fensterle *et al.*, 2005).

## 2B Respuestas de células T

Siete días después de la última inmunización, se prepararon los esplenocitos de los ratones inmunizados como se ha publicado previamente (Fensterle *et al.*, 1999) haciendo pasar el bazo a través de una malla seguido de lisis de los eritrocitos. Se realizó el análisis ELISPOT para la detección de células T CD8<sup>+</sup> específicas de PSA de acuerdo con un protocolo publicado por (Fensterle *et al.*, 1999).

En resumen, para el análisis *ex-vivo* de las células T CD8<sup>+</sup> específicas de PSA se recubrieron placas de nitrocelulosa de 96 pocillos (Millititer HA; Millipore, Bedford, MA) con 5  $\mu$ g/ml del anticuerpo monoclonal (mAb) anti-IFN-gamma de ratón R4 (PharMingen) en 100  $\mu$ l de tampón carbonato (Fensterle *et al.*, 1999), pH 9,6. Después de incubar durante la noche a 4°C y bloquear con BSA al 1% en PBS, se añadieron 1x10<sup>5</sup> esplenocitos de ratones vacunados en 100  $\mu$ l de RP10 (Fensterle *et al.*, 1999) por pocillo.

Para el análisis de la respuesta de las células T CD8<sup>+</sup> se utilizó el clon celular P815 que expresaba PSA, PPSA 24; en resumen, este clon expresa el PSA completo vía promotor de CMV codificado por el plásmido pCDNA3 (Fensterle *et al.*, 2005). Después de la incubación durante 20-22 h a 37°C, CO<sub>2</sub> al 5% en presencia de 30 U/ml de IL-2, se lavaron las placas y se incubaron durante 2 h más con 100  $\mu$ l de mAb anti-IFN-gamma de ratón XMB1.2 biotinilado (0,25  $\mu$ g/ml, PharMingen). Las placas se lavaron y se incubaron durante 1 hora a 37°C en presencia de 100  $\mu$ l de una dilución 1/20.000 de estreptavidina acoplada a fosfatasa alcalina (PharMingen). Las transferencias se visualizaron añadiendo 50  $\mu$ l de sustrato BCIP/NBT listo para su uso (Sigma, St. Louis, MO) disuelto en agua. Las transferencias se contaron en un microscopio de disección con 3 aumentos.

La frecuencia de las células T específicas del péptido (CTL) se expresa como el número de células secretoras de IFN-gamma por 10<sup>5</sup> esplenocitos. Para el análisis de las respuestas de las células T después de la re-estimulación, se re-estimularon 2,5 x 10<sup>7</sup> esplenocitos con PSA irradiado con 2x10<sup>6</sup> células P815 que expresaban PSA (Fensterle *et al.*, 2005) en medio RP10 (Fensterle *et al.*, 1999) en presencia de 60 U/ml de IL-2 recombinante durante 5 días. Se realizó el análisis ELISPOT como se ha descrito antes utilizando diferentes cantidades de células re-estimuladas (10<sup>5</sup>, 3x10<sup>4</sup>, 10<sup>4</sup> o 3x10<sup>3</sup> por pocillo) mezcladas con 4x10<sup>5</sup> células alimentadoras (= esplenocitos recién preparados a partir de ratones DBA/2 no sometidos a tratamiento previo) y 10<sup>5</sup> células PPSA24.

La inducción de una respuesta inmunitaria celular, especialmente de células T citotóxicas CD8<sup>+</sup>, juega un importante papel para la eficacia de la terapia tumoral (Boon *et al.*, 2006; Rosenberg, 2001). Por lo tanto, se sometió a ensayo primero la eficacia de la cepa bacteriana recombinante *Salmonella typhimurium* (SL7207) que porta un vector de expresión pMKhly-CtxB-PSA para inducir una respuesta inmunitaria de células T CD8<sup>+</sup> específicas de PSA.

Para este fin se inmunizaron 64 ratones DBA-2 hembra de 10-14 semanas de edad p.o. con SL7207/pMKhly-CtxB (n=10), SL7207/pMKhly-CtxB-PSA (n=10), SL7207/pMKhly-PSA (n=10), SL7207/pMKhly-PSA/CxtB (n=10), SL7207/pMKhly1 (n=7) recombinantes y pcDNA3-PSA desnudo (n=10) como control positivo como se describe en la presente memoria.

La Figura 12 muestra los datos del ELISPOT que revelan que los ratones inmunizados con ADN mostraron profundas respuestas de las células T CD8<sup>+</sup>. Después de la re-estimulación, se detectaron respuestas inmunitarias marcadas en los animales vacunados con *Salmonella* que secretaba proteína PSA fusionada a CtxB, pero no en las cepas que secretaban PSA solo o PSA y CtxB por separado. De manera interesante, los animales vacunados con *Salmonella* que secretaba la toxina CtxB sola también mostraron respuestas inmunitarias significativas después de la re-estimulación. Estas respuestas se deben muy probablemente a las células NK u otras células del sistema inmunitario innato, que no reconocen específicamente la línea celular diana. Por lo tanto, a partir de los datos para CtxB secretado solo se puede

concluir que la respuesta inmunitaria observada para la proteína de fusión CtxB-PSA secretada (esplenocitos secretores de IFN-gamma) está compuesta por una respuesta de las células T CD8<sup>+</sup> así como de una profunda respuesta del sistema inmunitario innato (muy probablemente células NK).

## 2C Protección contra la sensibilización con células tumorales

Para analizar la capacidad protectora de la inmunización, se inmunizaron 6-7 ratones por grupo de acuerdo con el programa anterior. Dos semanas después de la tercera inmunización, los ratones fueron sensibilizados con PPSA 24 (véase más arriba) por medio de dos inyecciones s.c. de  $1 \times 10^6$  células en cada flanco de piel abdominal afeitado. Los ratones fueron controlados a lo largo de un período de 14 días en busca de la aparición de tumores y el volumen del tumor fue evaluado midiendo el diámetro mayor (a) y menor (b) del tumor. El volumen del tumor se calculó como el elipsoide de rotación utilizando la siguiente fórmula:

$$V = \frac{\pi}{6} * a * b^2, \quad a > b.$$

Los resultados se analizaron en cuanto a la significación mediante un ANOVA de una vía y un post-ensayo de comparación múltiple de Dunnett utilizando el soporte lógico Graph Pad Prism. El post-ensayo se realizó solamente cuando el ANOVA reveló significación.

La Figura 13 presenta los resultados como las medias  $\pm$  DT. Los días 6, 9, 12 y 14 se observaron efectos protectores significativos. Como se esperaba, la vacunación con ADN desnudo incluyó como control ratones completamente protegidos frente al crecimiento tumoral. Sin embargo, la vacunación con ADN desnudo muestra a lo sumo una eficacia moderada en seres humanos. Con respecto a los constructos bacterianos, la cepa de vacuna SL7207/pMKhly-CtxB-PSA (que expresaba y secretaba la proteína de fusión CtxB-PSA) resultó ser la más eficaz. Ésta redujo significativamente el volumen tumoral el día 9, 12 y 14 después de la sensibilización tumoral. A destacar, también la cepa SL7207/pMKhly-CtxB redujo el crecimiento tumoral con valores comparables a SL7207/pMKhly-CtxB-PSA el día 14. Aunque no fue significativo, este efecto retardado es bastante compatible con la respuesta celular que se midió en el análisis ELISPOT. Además, también la cepa SL7207/pMKhly-PSA logró una protección significativa el día 14 lo que indica, que también esta cepa inducía una respuesta de las células T que estaba por debajo del umbral de detección. En contraste, la cepa SL7207/pMKhly-PSA/CxtB no indujo un efecto relevante y permaneció en el mismo intervalo que SL7207/pMKhly1 sola.

## Ejemplo 3

### *Expresión y secreción de una proteína de fusión de oncogén-toxina en S. typhi Ty21 a*

De un modo análogo al ejemplo 1, se utilizó otro antígeno tumoral, el dominio quinasa del oncogén B-Raf V600E con una delección de 10 aa en el dominio quinasa (dominio de muerte de quinasa (KD) de la quinasa BRaf V600E, o brevemente BRaf\* KD, más brevemente BKD). Se construyó una proteína de fusión BKD-CtxB de este oncogén y los componentes de toxina proteica, aquí CtxB, como coadyuvante, como se describe en la presente memoria. Se demostraron la expresión y secreción en la cepa de vacuna humana *S. typhi* Ty21 a. La clonación molecular se basa en el plásmido/vector de expresión pMOhly1, que ha sido descrito previamente (Gentshev *et al.*, 2005; Gentshev *et al.*, 1996) y el procedimiento de clonación es análogo al del ejemplo 1 de esta solicitud. El vector resultante se denomina pMBKDC. La secuencia de la proteína de fusión se proporciona en la Figura 10.

La Figura 17 representa la expresión y secreción de la proteína de fusión utilizando el vector pMBKDC electroporado en la cepa *Salmonella typhi* Ty21 a y otras cepas bacterianas.

La cepa *Salmonella typhi* Ty21 a que expresa y secreta la proteína de fusión BKD-CtxB fue depositada en la Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares (DSMZ) como DSM 19245.

## Ejemplo 4

### *Comparación de un constructo de fusión OVA-CtxB con diferentes coadyuvantes inmunológicos codificados genéticamente*

Para comparar la eficacia inmunológica de las proteínas de fusión de toxina-antígeno secretadas por vacunas vivas, se construyó una proteína de fusión que incluía un antígeno ampliamente utilizado para estudios inmunológicos, ovalbúmina (OVA) y CtxB.

Se utilizaron el cebador efector NsiI-OVA-directo 5'-CAT GTA TGC ATT AGC CAT GGT ATA CCT GG-3' y el cebador anti-sentido NsiI-OVA-inverso 5'-TTT TTT ATG CAT AAG GG AAA CAC CAC ATC TGC C-3' para amplificar mediante PCR un fragmento de ADN de 1033 pb que representaba el gen *ova* (NM205152). Tras la purificación con el Kit de Purificación por PCR QIAquick (Qiagen, Alemania) y la digestión con la enzima de



restricción *NsiI*, se insertó el fragmento de ADN, que portaba el gen *ova* completo sin la secuencia señal N-terminal, en el único sitio *NsiI* del vector de exportación pMKhly1. El plásmido resultante pMKhly-Ova se aisló a partir de *E. coli* DH5alpha (Life Technologies), se analizó y se secuenció.

Se utilizaron el cebador efector 5' *ctxB* *NsiI* (5'-GCATATGCACATGCATCACCTCAAAATATTACTGAT-3') y el cebador anti-sentido 3' *ctxB* *SrfI* *NsiI* (5'-GGCTTTTTTATATCTTATGCATGCC **GGGCATTGCGGCAATCGC**-3') (el sitio *SrfI* está en negrita) para amplificar mediante PCR un fragmento de ~300 pb que representaba el gen *ctxB* de *V. cholerae* El tor. Tras la purificación con el Kit de Purificación por PCR QIAquick (Qiagen, Alemania) y la digestión con la enzima de restricción *NsiI*, se insertó el fragmento de ADN, que portaba el gen *ctxB* completo sin la secuencia señal N-terminal, en el único sitio *NsiI* del vector de exportación pMKhly1. El plásmido resultante pMKhly-CtxB se aisló a partir de *E. coli* DH5alpha (Life Technologies), se analizó y se secuenció. Se amplificó el gen *ova* a partir del plásmido pCI-OVA mediante PCR utilizando los cebadores 5-OVA-*SrfI* GCC ATC ATG TCA GCT CTA y 3-OVA-*SrfI* AGG GGA AAC ACA TCT GCC. La PCR se llevó a cabo en un Ciclador Térmico 60 (Biometra, Göttingen, Alemania) durante 30 ciclos de 1 min a 94°C, de 1 min a 49°C, y de 2 min. 30 seg a 72°C. El producto de ADN de 1,1 kb se clonó con posterioridad en el sitio *SrfI* de pMKhly-CtxB. El plásmido pMKhly-CtxB-OVA resultante se examinó mediante análisis de restricción y secuenciación.

La capacidad de esta proteína de fusión para lograr las respuestas inmunitarias Th1 se comparó con las del vector pMKhly codificado que secretaba OVA sola combinado con plásmidos de liberación de ADN (que codificaban las proteínas bajo el control de un promotor eucariótico) que codificaba los interferones (IFN-gamma), las interleuquinas (IL-12) y las quimioquinas (IP-10).

Los procedimientos de inmunización y los análisis ELISPOT se realizaron como se ha descrito más arriba. En resumen, se inmunizaron oralmente ratones C57BU6 tres veces con las diferentes cepas. Siete días después de la inmunización final, los esplenocitos se separaron, se re-estimularon durante 5 días y se analizaron en un análisis ELISPOT. Para la estimulación de los esplenocitos, se utilizaron células pulsadas con el péptido SIINFELK (las letras representan los aminoácidos), el epítipo de la ovalbúmina del MHC-I restringido a H-2<sup>b</sup>.

La Figura 14 muestra la superior eficacia de la proteína de fusión que comprendía ovalbúmina de pollo (OVA) y CtxB en la inducción de respuestas de las células T CD8+ específicas de OVA y las respuestas del sistema inmunitario potencialmente innato en comparación con los constructos que liberaban simultáneamente IFN-gamma o IP-10. Ésta muestra una eficacia similar a la de la cepa con el constructo IL-12 liberado simultáneamente.

## Ejemplo 5

### Expresión y secreción de antígenos virales

La idoneidad de los microorganismos de la invención para la expresión y secreción de cualquier antígeno (no tumoral) se demostró por medio de la expresión de la proteína hemaglutinina H1 del virus de la influenza de pollo H5N1 fusionada a CtxB en una cepa de vacuna veterinaria, *Salmonella typhimurium* VacT.

Se utilizaron el cebador efector 5'-HA-G: 5'- ATC TGT CAA ATG GAG AAA -3' y el cebador anti-sentido 3-HA12C: 5'-TAC TCC ACT TAT TTC CTC TCT-3' en la PCR, amplificando un fragmento de ADN que codificaba la H5 sin el dominio de membrana C-terminal (H12C). El producto de la PCR se clonó con posterioridad en el sitio *SrfI* de pMKhly-CtxB. El plásmido pMKhly-CtxB-H12C resultante se examinó mediante análisis de restricción y secuenciación. La cepa *S. typhimurium* VacT/pMKhly-CtxB-H12C expresó y secretó eficazmente la proteína H5 híbrida, como se muestra mediante inmunotransferencia con anticuerpos policlonales originados contra CtxB y HlyA (Fig. 2). La cantidad de H5 secretada fue de 2-3 µg de proteína/ml de sobrenadante en las condiciones experimentales.

Las bacterias se hicieron crecer en medio BHI a una densidad de 1x10<sup>9</sup> células por ml. Se centrifugaron 20 ml del cultivo durante 30' a 4000 rpm (3000 g) y 4°C en una centrífuga Hereaus. Se transfirieron 18 ml del sobrenadante a un tubo nuevo. Con posterioridad, se añadieron 1,8 ml de TCA (ácido tricloroacético, Applichem, Alemania); el líquido se mezcló y se incubó sobre hielo durante al menos 1 hora. Tras la incubación, la suspensión se centrifugó durante 30' a 4000 rpm (3000 g) y 4°C en una centrífuga Hereaus. El sobrenadante se decantó y el sedimento se lavó con 1 ml de Acetón p.a. (Applichem, Alemania); el producto precipitado se centrifugó durante 10' a 4000 rpm (3000 g) y 4°C en una centrífuga Hereaus. El sedimento se secó al aire y se recogió en 150 µl 5x tampón de Laemmli. Se utilizaron 20 µl de la solución para cada calle de la SDS PAGE. Las proteínas separadas se transfirieron electroforéticamente a una membrana de nitrocelulosa Hybond ECL (Amersham-Pharmacia, Little Chalfont, Reino Unido) y se bloquearon durante la noche con PBS que contenía BSA al 1%. La membrana se lavó en PBS-Tween al 0,05%, se incubó con anticuerpo anti-CtxB de conejo policlonal (1:1000, Zytomed, Berlin, Alemania) o anticuerpo HlyAs (Gentshev *et al.*, 1996) y con posterioridad se incubó con anti-IgG de conejo acoplado a HRP (1/2.000; Dianova, Hamburgo, Alemania) durante 1 h. La transferencia Western se llevó a cabo utilizando el kit de aumento de la quimioluminiscencia (GE Healthcare Life Science, Alemania).

La Figura 15 representa la expresión eficaz y la secreción funcional de la proteína de fusión HA12C-CtxB en la cepa de vacuna veterinaria, *Salmonella typhimurium* VacT.

## Ejemplo 6

*Expresión y secreción de proteínas de fusión de coadyuvantes de toxina y antígenos tumorales por medio de sistemas de secreción de tipo III*

5 Numerosas bacterias Gram negativas portan sistemas de secreción de tipo III que pueden ser explotados para la secreción de antígenos. Normalmente, estos sistemas pueden ser explotados para inyectar directamente antígenos heterólogos en las células. En este ejemplo, un componente de toxina de *Yersinia* que sirve como señal de secreción (YopE) es fusionado genéticamente al fragmento de la subunidad B de la enterotoxina lábil al calor (LT-B) como  
10 coadyuvante y un antígeno tumoral, PSA. Este constructo va a ser expresado en cepas de *Yersinia* preferiblemente atenuadas, adecuadas, lo que conduce a la secreción de la proteína de fusión por la maquinaria de secreción de tipo III endógena por medio de la secuencia señal YopE.

15 En este ejemplo, se clona la fusión genética YopE18-LT-B-PSA en el sitio EcoRI del plásmido paCYC184, para utilizar el constructo con la misma orientación que se utiliza el gen cat proporcionando un producto expresado por el promotor cat codificado por el plásmido (<http://www.fermentas.com/techinfo/nucleicacids/mappacyc184.htm>). Para intensificar la expresión, se puede utilizar cualquier promotor adecuado.

20 A continuación, se ilustra un procedimiento de clonación. Se amplifica el ADN cromosómico de *E. coli* que incluye la subunidad B de la enterotoxina lábil al calor o un vector que incluye esta secuencia (número de acceso GenBank AF242418) utilizando los siguientes cebadores en una reacción de PCR: Eco-yope18-f (que incluye el sitio EcoRI + la secuencia señal YopE18):

25 5'-CTGAATTCATGAAAATATCATCATTTATTTCTACATCACTGCCCCTGCCGGCA TCAGTGTCAAATAAAA  
GTAAATGTTATGTTTTAT3'

(5' región en negro: sitio EcoRI + 3 bases 5', en rojo: secuencia que codifica la señal de secreción para la secreción de tipo III de la proteína YopE (aa 1-18), Acceso GenBank M92066; región en cursiva: región de homología del gen  
30 LT-B (acceso GB AF242418), bases 4-28). Cebador inverso fosforilado LT-B-r:

5' GTTTTCCATACTGATTGCCGCAATTGAATTGG-3' (hebra inversa 372-341 de GB AF242418).

35 Paralelamente, se amplifica la secuencia de PSA como se describe en esta solicitud a partir del vector pMK CtxB-PSA utilizando los siguientes cebadores:

cebador directo fosforilado psa-f: 5'-GTGGGAGGCTGGGAGTGCGAG-3'

40 cebador inverso psa-eco-r: 5' CCTGAATTCCTTAGACGTGATACCTTGAAGCAC

(5' en negro: sitio EcoRI + 3 bases 5', en azul: codón de terminación, en negro: región 3' de la secuencia PSA, esta solicitud).

45 Con posterioridad, los dos fragmentos se ligan con una ADN Ligasa en las condiciones apropiadas. Tras la ligación, el nuevo fragmento se amplifica en una segunda reacción de PCR utilizando los cebadores Eco-yope18-f y PSA-Eco-R descritos antes.

50 El fragmento resultante se purifica utilizando un kit de purificación por PCR adecuado para separar el tampón y los oligonucleótidos y con posterioridad se digiere con la enzima EcoRI en condiciones de reacción adecuadas. El fragmento de 1040 pb resultante se purifica utilizando la electroforesis en gel de agarosa y se liga en el vector paCYC184 digerido con EcoRI. Después de secuenciar los clones sensibles a cm, resistentes a tetraciclina, se selecciona un clon que tiene la secuencia correcta integrada en la misma orientación que el gen cm y se transforma en una cepa de *Yersinia* adecuada utilizando la electroporación. Esta cepa de vacuna secretará la fusión LT-B-PSA por medio de su sistema  
55 de secreción de tipo III endógeno.

## Ejemplo 7

60 *Expresión y secreción de fusiones de Toxina-Antígeno en bacterias Gram positivas*

Las bacterias Gram positivas y negativas tienen diferentes pre-requisitos para la secreción. Las bacterias Gram negativas poseen dos membranas y por lo tanto es obligatoria una maquinaria de secreción además de las señales de secreción para una secreción completa. En el caso de las bacterias Gram positivas, es suficiente una secuencia de una  
65 señal de secreción.

En este ejemplo se describe un sistema para la secreción de una fusión de Toxoide del Tétanos-PSA en *Listeria* utilizando la señal de secreción p60.

## ES 2 347 019 T3

En una primera etapa, se digiere el vector pUC18(PS)actAOVATinIA (Loeffler *et al.*, 2006) utilizando NsiI y con posterioridad se trata con Exonucleasa 3'-5' en las condiciones apropiadas. Finalmente, el fragmento se purifica mediante electroforesis en gel de agarosa.

- 5 Paralelamente, se amplifica el fragmento C del toxoide del tétanos (núm. de acceso GenBankM12739) a partir de una fuente adecuada, p. ej. ADN genómico de una cepa de *Clostridium tetanii* utilizando los siguientes cebadores fosforilados:

10 tetc directo: 5'-TAAAAATCTGGATTGTTGGGTTG-3', mientras la base adicional subrayada es para asegurar el correcto marco de la fusión.

tetc inverso: 5'-ATCATTTGTCCATCCTTCATCTG-3'.

- 15 El fragmento BRAF KD se amplifica a partir del plásmido pMO BKDC descrito en la solicitud utilizando los siguientes cebadores fosforilados:

br directo: 5'-GATTGGGAGATTCCTGATG-3'

20 br inverso: 5'-CCCGTGGACAGGAAACGCACC-3'.

- Ambos fragmentos se purifican utilizando un kit de purificación por PCR adecuado y con posterioridad se ligan con ADN ligasa en las condiciones adecuadas. Tras la ligación, el fragmento se purifica de nuevo utilizando un kit de purificación por PCR adecuado y se amplifica utilizando el cebador tetc directo y el br inverso. Tras la amplificación, el fragmento de 2280 pb resultante se purifica mediante electroforesis en gel de agarosa y se liga en el fragmento de pUC18(PS)actAOVATinIA obtenido con la exonucleasa 3'-5' NsiI. Después de la ligación y transformación en *E. coli*, se selecciona un clon que porta el fragmento en marco. Con posterioridad, el plásmido se corta utilizando PstI y SacI y el fragmento de 2837 pb se purifica utilizando la electroforesis en gel y se liga en el vector pSP118 digerido con PstI y SacI y purificado (Loeffler *et al.*, 2006). El vector resultante, pSP118-act-TetC-BRaf\*KD es transformado en una cepa de *Listeria* que porta una delección trpS p. ej. *Listeria monocytogenes* delta trps delta aroA/B (Loeffler *et al.*, 2006). En este entorno, el plásmido es estabilizado por medio del plásmido basado en trpS ("Sistema letal equilibrado") y el plásmido codifica una lisina de fago lo que conduce a la lisis intracelular de la cepa. La casete act-TetC-BRaf\*KD es expresada principalmente en células anfitrionas eucarióticas bajo el control del promotor actA, que tiene cierta pérdida extracelular (Loeffler *et al.*, 2006). La secuencia señal actA de la casete conduce a la secreción de la proteína de fusión TetC-BRaf\*KD.
- 25  
30  
35

### Ejemplo 8

40 *Células eucarióticas que secretan fusiones de toxina-antígeno*

- En este ejemplo, se construye una línea celular eucariótica, p. ej. una línea celular tumoral, que secreta una proteína de fusión CtxB-PSA. Para este fin, se emplea una señal de secreción universal (documento U.S. 6.733.997), que, en principio, permite la secreción de la correspondiente casete de expresión en células de diferente origen, incluyendo células de mamífero, levadura y células procarióticas.
- 45

En una primera etapa, se amplifica la fusión CtxB-BRaf\* KD a partir del plásmido pMO BKDC (esta solicitud) utilizando los siguientes cebadores:

50 CB-directo: 5'-atcGGATCCTCAAAATATTACTGATTTGTGTGC-3' (minúsculas: espaciador, subrayado: sitio BamHI, mayúsculas: CtxB 5')

55 CB-inverso: 5'-tagGGATCCTTAGTGGACAGGAAACGCACCATATCC-3' (minúsculas: espaciador, subrayado: sitio BamHI, cursiva: codón de terminación, mayúsculas: BRaf\* KD 3').

- Con posterioridad, el producto de la PCR se purifica utilizando un kit de purificación por PCR adecuado y con posterioridad se digiere parcialmente (el fragmento contiene un sitio BamHI interno) con BamHI. El fragmento de 1231 pb del producto digerido parcial se aísla por medio de electroforesis en gel de agarosa y con posterioridad se liga en el plásmido pVtgEGFP digerido con BamHI y purificado en gel (Solicitud de Patente de los Estados Unidos 6733997). Posteriormente, se selecciona un clon que porta la orientación en marco con Vtgss y se denomina pVtgCtxBRAf. Este plásmido se puede transformar por medio de electroporación en una línea celular eucariótica, que se puede seleccionar por medio de la casete de selección kan/neo. Las líneas celulares pueden ser líneas celulares establecidas como líneas de cáncer para su uso como vacunas para el cáncer heterólogas o células tumorales derivadas de pacientes para su uso como vacunas contra el cáncer autólogas.
- 60  
65

En cualquier caso, la señal de secreción Vtgss codificada por el vector pVtgEGFP fusionado genéticamente a CtxB-BRaf\* KD dará como resultado la secreción de la proteína de fusión.

Utilizando un enfoque similar, también se pueden expresar proteínas de fusión en levaduras. Como ejemplo, se demuestra una estrategia de clonación modificada como la representada en la fig. 11 del documento U.S. 6.733.997. En la primera etapa, se escinde la casete que contiene la fusión Vtgss-CtxB-BRaf\*KD del plásmido pVtgCtxBRAf descrito antes por medio de EagI y Eco47III y se inserta en el vector pBSPGK (documento U.S. 6.733.997, fig. 11). Posteriormente, el vector resultante se digiere con SacI y HindIII y el fragmento que incluye el elemento PGK y la fusión Vtgss-CtxB-BRaf\*KD se integra en la región correspondiente del vector pYEX-S1 análoga a la descripción del documento U.S. 6.733.997 (fig. 11). El plásmido resultante se puede transformar mediante electroporación en cepas de levadura como *Saccharomyces cerevisiae*. La levadura expresará y secretará la proteína de fusión y se puede utilizar para la vacunación.

## 15 Abreviaturas

15	ABC	casete de unión a ATP
	AIDA	adhesina implicada en la adherencia difusa
20	APC	célula presentadora de antígenos
	aroA	gen aroA
25	AT	Toxina alfa
	ATP	adenosina trifosfato
	B-Raf KD	dominio quinasa B-Raf
30	BSA	albúmina de suero bovino
	Cag A	proteína de virulencia asociada a la enfermedad principal de <i>Helicobacter pylori</i>
35	CPE	enterotoxina de <i>Clostridium perfringens</i>
	CpG	secuencias de ADN que contienen secuencias de ADN inmunoestimuladoras hipometiladas que incluyen motivos CpG
40	CT/Ctx	Toxina del Cólera
	CTB/CtxB	subunidad B de la Toxina del Cólera
	CTL	células T CD8 <sup>+</sup> citotóxicas (células T asesinas)
45	CMV	Citomegalovirus
	ADN	ácido desoxirribonucleico
50	ds	doble hebra
	DT/Dtx	Toxina de la Difteria
	<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
55	EBV	Virus de Epstein Barr
	Receptor GM-1	Receptor 1 de Monosialogangliósido
60	HA	hemaglutinina
	HCV	Virus de la Hepatitis C
	HIV	virus de la inmunodeficiencia humana
65	Hly	hemolisina

## ES 2 347 019 T3

	HPV	virus del Papiloma Humano
	HT	Toxina Hemorrágica
5	i.d.	intradérmicamente
	i.m.	intramuscularmente
	i.p.	intraperitonealmente
10	IFN	interferón
	IgA	Inmunoglobulina isotipo A
15	IgG	Inmunoglobulina isotipo G
	IL	interleuquina
	KD	dominio de muerte quinasa
20	LPS	lipopolisacárido
	LT	enterotoxina lábil al calor de <i>E. coli</i>
25	LT	toxina Letal
	LTB	subunidad B de la enterotoxina lábil al calor de <i>E. coli</i>
	mAb	anticuerpo monoclonal
30	MHC	complejo principal de histocompatibilidad
	célula NK	célula asesina natural
35	célula NKT	célula T asesina natural
	PAGE	electroforesis en gel de poliacrilamida
	PBS	solución salina tamponada con fosfato
40	PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
	PE	Exotoxina A de <i>Pseudomonas</i>
45	PSA	antígeno específico de próstata
	PT/Ptx	Toxina Pertussis
	ARN	ácido ribonucleico
50	s.c.	subcutáneamente
	SDS	dodecilsulfato de sodio
55	Sec	ruta secretora (Sec) general
	ss	hebra sencilla
	ST	enterotoxina estable al calor de <i>E. coli</i>
60	ST/Stx	Toxina Shiga
	STB/StxB	subunidad B de la Toxina Shiga
65	T3SS	sistema de secreción de tipo III
	Tat	translocación de la doble arginina

TCA	ácido tricloroacético
Th1 (célula)	células T CD4 <sup>+</sup> inflamatorias
5 Th2 (célula)	células T CD4 <sup>+</sup> coadyuvantes
TSST-1	Toxina de síndrome de choque tóxico
TT	Toxina del Tétanos
10 VT	Toxina Vero

## Literatura

- 15 **Agren, L. C., Ekman, L., Lowenadler, B., Nedrud, J. G., y Lycke, N. Y. (1999).** Adjuvanticity of the cholera toxin A1-based gene fusion protein, CTA1-DD, is critically dependent on the ADP-ribosyltransferase and Ig-binding activity. *J Immunol* 162, 2432-2440.
- 20 **Anderson, R. J., Pasetti, M. F., Sztein, M. B., Levine, M. M., y Noriega, F. R. (2000).** DeltaguaBA attenuated *Shigella flexneri* 2a strain CVD 1204 as a *Shigella* vaccine and as a live mucosal delivery system for fragment C of tetanus toxin. *Vaccine* 18, 2193-2202.
- 25 **Austin, E. A., Graves, J. F., Hite, L. A., Parker, C. T., y Schnaitman, C. A. (1990).** Genetic analysis of lipopolysaccharide core biosynthesis by *Escherichia coli* K-12: insertion mutagenesis of the *rfa* locus. *J Bacteriol* 172, 5312-5325.
- 30 **Balsalobre, C., Silvan, J. M., Berglund, S., Mizunoe, Y., Uhlin, B. E., Wai, S. N. (2006).** Release of the type I secreted alpha-haemolysin via outer membrane vesicles from *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 59, 99-112.
- Barry, E. M., Gomez-Duarte, O., Chatfield, S., Rappuoli, R., Pizza, M., Losonsky, G., Galen, J., y Levine, M. M. (1996).** Expression and immunogenicity of pertussis toxin S1 subunit-tetanus toxin fragment C fusions in *Salmonella typhi* vaccine strain CVD 908. *Infect Immun* 64, 4172-4181.
- 35 **Becerra, J. C., Arthur, J. F., Landucci, G. R., Forthal, D. N., y Theuer, C. P. (2003).** CD8<sup>+</sup> T-cell mediated tumor protection by *Pseudomonas* exotoxin fused to ovalbumin in C57BU6 mice. *Surgery* 133, 404-410.
- Boon, T., Coulie, P. G., Van den Eynde, B. J., y van der Bruggen, P. (2006).** Human T cell responses against melanoma. *Annu Rev Immunol* 24, 175-208.
- 40 **Boyd, A. P., Ross, P. J., Conroy, H., Mahon, N., Lavelle, E. C., y Mills, K. H. (2005).** Bordetella pertussis adenylate cyclase toxin modulates innate and adaptive immune responses: distinct roles for acylation and enzymatic activity in immunomodulation and cell death. *J Immunol* 175, 730-738.
- 45 **Brossier, F., Weber-Levy, M., Mock, M., y Sirard, J. C. (2000).** Protective antigen-mediated antibody response against a heterologous protein produced *in vivo* by *Bacillus anthracis*. *Infect Immun* 68, 5731-5734.
- Bumann, D. (2001).** Regulated antigen expression in live recombinant *Salmonella enterica* serovar Typhimurium strongly affects colonization capabilities and specific CD4(+)-T-cell responses. *Infect Immun* 69, 7493-7500.
- 50 **Busby, S., y Ebright, R. H. (1994).** Promoter structure, promoter recognition, and transcription activation in prokaryotes. *Cell* 79, 743-746.
- Butterton, J. R., Beattie, D. T., Gardel, C. L., Carroll, P. A., Hyman, T., Killeen, K. P., Mekalanos, J. J., y Calderwood, S. B. (1995).** Heterologous antigen expression in *Vibrio cholerae* vector strains. *Infect Immun* 63, 2689-2696.
- 55 **Byun, Y., Ohmura, M., Fujihashi, K., Yamamoto, S., McGhee, J. R., Udaka, S., Kiyono, H., Takeda, Y., Kohsaka, T., y Yuki, Y. (2001).** Nasal immunization with *E. coli* vero-toxin 1 (VT1)-B subunit and a nontoxic mutant of cholera toxin elicits serum neutralizing antibodies. *Vaccine* 19, 2061-2070.
- 60 **Campos, J., Martinez, E., Marrero, K., Silva, Y., Rodriguez, B. L., Suzarte, E., Ledon, T., y Fando, R. (2003).** Novel type of specialized transduction for CTX phi or its satellite phage RS1 mediated by filamentous phage VGJ phi in *Vibrio cholerae*. *J Bacteriol* 185, 7231-7240.
- 65 **Cardenas, L., y Clements, J. D. (1992).** Oral immunization using live attenuated *Salmonella* spp. as carriers of foreign antigens. *Clin Microbiol Rev* 5, 328-342.

**Cardenas, L., y Clements, J. D. (1993).** Development of mucosal protection against the heat-stable enterotoxin (ST) of *Escherichia coli* by oral immunization with a genetic fusion delivered by a bacterial vector. *Infect Immun* 61, 4629-4636.

5 **Chabalgoity, J. A., Harrison, J. A., Esteves, A., Demarco de Hormaeche, R., Ehrlich, R., Khan, C. M., y Hormaeche, C. E. (1997).** Expression and immunogenicity of an Echinococcus granulosus fatty acid-binding protein in live attenuated *Salmonella vaccine* strains. *Infect Immun* 65, 2402-2412.

10 **Chabalgoity, J. A., Khan, C. M., Nash, A. A., y Hormaeche, C. E. (1996).** A *Salmonella typhimurium* htrA live vaccine expressing multiple copies of a peptide comprising amino acids 8-23 of herpes simplex virus glycoprotein D as a genetic fusion to tetanus toxin fragment C protects mice from herpes simplex virus infection. *Mol Microbiol* 19, 791-801.

15 **Chabalgoity, J. A., Moreno, M., Carol, H., Dougan, G., y Hormaeche, C. E. (2000).** *Salmonella typhimurium* as a basis for a live oral Echinococcus granulosus vaccine. *Vaccine* 19, 460-469.

20 **Chabalgoity, J. A., Villareal-Ramos, B., Khan, C. M., Chatfield, S. N., de Hormaeche, R. D., y Hormaeche, C. E. (1995).** Influence of preimmunization with tetanus toxoid on immune responses to tetanus toxin fragment C-guest antigen fusions in a *Salmonella vaccine* carrier. *Infect Immun* 63, 2564-2569.

**Chacon, M. R., Londono, P., Dougan, G., y Selkirk, M. E. (1996).** Heterologous expression of the cuticular-glutathione peroxidase of lymphatic filariae in an attenuated vaccine strain of *Salmonella typhimurium* abrogates H-2 restriction of specific antibody responses. *Parasite Immunol* 18, 307-316.

25 **Chen, I., Finn, T. M., Yanqing, L., Guoming, Q., Rappuoli, R., y Pizza, M. (1998).** A recombinant live attenuated strain of *Vibrio cholerae* induces immunity against tetanus toxin and Bordetella pertussis tracheal colonization factor. *Infect Immun* 66, 1648-1653.

30 **Cheng-hua, S., Cheng, C., Jing-sheng, Z., Jiezh, L., y Qing-jun, M. (1995).** Gene fusion of cholera toxin B subunit and HBV PreS2 epitope and the antigenicity of fusion protein. *Vaccine* 13, 933-937.

35 **Clemens, J., Savarino, S., Abu-Elyazeed, R., Safwat, M., Rao, M., Wierzba, T., Sven-nerholm, A. M., Holmgren, J., Frenck, R., Park, E., y Naficy, A. (2004).** Development of pathogenicity-driven definitions of outcomes for a field trial of a killed oral vaccine against enterotoxigenic *Escherichia coli* in Egypt: application of an evidence-based method. *J Infect Dis* 189, 2299-2307.

**Datsenko, K. A., y Wanner, B. L. (2000).** One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci USA* 97, 6640-6645.

40 **Dietrich, G., Bubert, A., Gentschev, I., Sokolovic, Z., Simm, A., Catic, A., Kaufmann, S. H., Hess, J., Szalay, A. A., and Goebel, W. (1998).** Delivery of antigen-encoding plasmid DNA into the cytosol of macrophages by attenuated suicide *Listeria monocytogenes*. *Nat Biotechnol* 16, 181-185.

45 **Dietrich, G., Viret, JF, y Gentschev, I. (2003).** Haemolysin A and listeriolysin - two vaccine delivery tools for the induction of cell-mediated immunity. *Int. J. Parasitol* 33, 495-505

**Dunn, G. P., Old, L. J., y Schreiber, R. D. (2004).** The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoeediting. *Immunity* 21, 137-148.

50 **Dunstan, S. J., Simmons, C. P., y Strugnelli, R. A. (2003).** *In vitro* and *in vivo* stability of recombinant plasmids in a vaccine strain of *Salmonella enterica* var. Typhimurium. *FEMS Immunol Med Microbiol* 37, 111-119.

55 **Eriksson, A. M., Schon, K. M., y Lycke, N. Y. (2004).** The cholera toxin-derived CTA1-DD vaccine adjuvant administered intranasally does not cause inflammation or accumulate in the nervous tissues. *J Immunol* 173, 3310-3319.

**Fath, M. J., Skvirsky, R. C., y Kolter, R. (1991).** Functional complementation between bacterial MDR-like export systems: colicin V, alpha-hemolysin, and *Erwinia* protease. *J Bacteriol* 173, 7549-7556.

60 **Fensterle, J., Grode, L., Hess, J., y Kaufmann, S. H. E. (1999).** Effective DNA vaccination against listeriosis by prime/boost inoculation with the gene gun. *J Immunol* 163, 4510-4518.

**Fensterle, J., Schwartz, V., Riedmiller, H., y Rapp, U. R. (2005).** Animal models for DNA vaccination against prostate cancer using PSA encoding plasmids. *Onkologie* 28 (suppl 2), 52.

65 **Freytag, L. C., y Clements, J. D. (1999).** Bacterial toxins as mucosal adjuvants. *Curr Top Microbiol Immunol* 236, 215-236.

- Freytag, L. C., y Clements, J. D. (2005). Mucosal adjuvants. *Vaccine* 23, 1804-1813.
- Garmory, H. S., Brown, K. A., and Titball, R. W. (2002). *Salmonella* vaccines for use in humans: present and future perspectives. *FEMS Microbiol Rev* 26, 339-353.
- Garmory, H. S., Titball, R. W., Griffin, K. F., Hahn, U., Bohm, R., y Beyer, W. (2003). *Salmonella enterica* serovar typhimurium expressing a chromosomally integrated copy of the *Bacillus anthracis* protective antigen gene protects mice against an anthrax spore challenge. *Infect Immun* 71, 3831-3836.
- Gentschev, I., Dietrich, G., y Goebel, W. (2002a). The *E. coli* alpha-hemolysin secretion system and its use in vaccine development. *Trends Microbiol* 10, 39-45.
- Gentschev, I., Dietrich, G., Spreng, S., Pilgrim, S., Stritzker, J., Kolb-Maurer, A., and Goebel, W. (2002b). Delivery of protein antigens and DNA by attenuated intracellular bacteria. *Int J Med Microbiol* 291, 577-582.
- Gentschev, I., Fensterle, J., Schmidt, A., Potapenko, T., Troppmair, J., Goebel, W., y Rapp, U. R. (2005). Use of a recombinant *Salmonella enterica* serovar Typhimurium strain expressing C-Raf for protection against C-Raf induced lung adenoma in mice. *BMC Cancer* 5, 15.
- Gentschev, I., Mollenkopf, H., Sokolovic, Z., Hess, J., Kaufmann, S. H., y Goebel, W. (1996). Development of antigen-delivery systems, based on the *Escherichia coli* hemolysin secretion pathway. *Gene* 179, 133-140.
- Gentschev, I., Dietrich, G., Spreng, S., Neuhaus, B., Maier, E., Benz, R., Goebel, W., Fensterle, J., y Rapp, U. R. (2004). Use of the alpha-hemolysin secretion system of *Escherichia coli* for antigen delivery in the *Salmonella typhi* Ty21a vaccine strain. *Int J Med Microbiol* 294, 363-371.
- Gomez-Duarte, O. G., Galen, J., Chatfield, S. N., Rappuoli, R., Eidels, L., y Levine, M. M. (1995). Expression of fragment C of tetanus toxin fused to a carboxyl-terminal fragment of diphtheria toxin in *Salmonella typhi* CVD 908 vaccine strain. *Vaccine* 13, 1596-1602.
- Hajishengallis, G., Harokopakis, E., Hollingshead, S. K., Russell, M. W., y Michalek, S. M. (1996). Construction and oral immunogenicity of a *Salmonella typhimurium* strain expressing a streptococcal adhesin linked to the A2/B subunits of cholera toxin. *Vaccine* 14, 1545-1548.
- Hajishengallis, G., Nawar, H., Tapping, R. I., Russell, M. W., y Connell, T. D. (2004). The Type II heat-labile enterotoxins LT-IIa and LT-IIb and their respective B pentamers differentially induce and regulate cytokine production in human monocytic cells. *Infect Immun* 72, 6351-6358.
- Harokopakis, E., Hajishengallis, G., Greenway, T. E., Russell, M. W., y Michalek, S. M. (1997). Mucosal immunogenicity of a recombinant *Salmonella typhimurium*-cloned heterologous antigen in the absence or presence of coexpressed cholera toxin A2 and B subunits. *Infect Immun* 65, 1445-1454.
- Hess, J., Gentschev, I., Miko, D., Welzel, M., Ladel, C., Goebel, W., y Kaufmann, S. H. (1996). Superior efficacy of secreted over somatic antigen display in recombinant *Salmonella* vaccine induced protection against listeriosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 1458-1463.
- Holmgren, J., Adamsson, J., Anjuere, F., Clemens, J., Czerkinsky, C., Eriksson, K., Flach, C. F., George-Chandy, A., Harandi, A. M., Lebens, M., et al. (2005). Mucosal adjuvants and anti-infection and anti-immunopathology vaccines based on cholera toxin, cholera toxin B subunit and CpG DNA. *Immunol Lett* 97, 181-188.
- Holmgren, J., y Czerkinsky, C. (2005). Mucosal immunity and vaccines. *Nat Med* 11, S45-53.
- Holmgren, J., Czerkinsky, C., Eriksson, K., y Mharandi, A. (2003). Mucosal immunisation and adjuvants: a brief overview of recent advances and challenges. *Vaccine* 21 Suppl 2, S89-95.
- Hormozi, K., Parton, R., y Coote, J. (1999). Adjuvant and protective properties of native and recombinant Bordetella pertussis adenylate cyclase toxin preparations in mice. *FEMS Immunol Med Microbiol* 23, 273-282.
- Huang, Y., Hajishengallis, G., y Michalek, S. M. (2000). Construction and characterization of a *Salmonella enterica* serovar typhimurium clone expressing a salivary adhesin of *Streptococcus mutans* under control of the anaerobically inducible nirB promoter. *Infect Immun* 68, 1549-1556.
- Hunt, P. D., y Hardy, S. J. (1991). Heat-labile enterotoxin can be released from *Escherichia coli* cells by host intestinal factors. *Infect Immun* 59, 168-171.
- Jackson, R. J., Marinaro, M., VanCott, J. L., Yamamoto, M., Okahashi, N., Fujihashi, K., Kiyono, H., Chatfield, S. N., y McGhee, J. R. (1996). Mucosal immunity: regulation by helper T cells and a novel method for detection. *J Biotechnol* 44, 209-216.



**Jagusztyn-Krynicka, E. K., Clark-Curtiss, J. E., y Curtiss, R., 3rd (1993).** *Escherichia coli* heat-labile toxin subunit B fusions with Streptococcus sobrinus antigens expressed by *Salmonella typhimurium* oral vaccine strains: importance of the linker for antigenicity and biological activities of the hybrid proteins. *Infect Immun* 61, 1004-1015.

5 **Khan, C. M., Villarreal-Ramos, B., Pierce, R. J., Demarco de Hormaeche, R., McNeill, H., Ali, T., Chatfield, S., Capron, A., Dougan, G., y Hormaeche, C. E. (1994a).** Construction, expression, and immunogenicity of multiple tandem copies of the Schistosoma mansoni peptide 115-131 of the P28 glutathione S-transferase expressed as C-terminal fusions to tetanus toxin fragment C in a live aro-attenuated vaccine strain of Salmonella. *J Immunol* 153, 5634-5642.

10 **Khan, C. M., Villarreal-Ramos, B., Pierce, R. J., Riveau, G., Demarco de Hormaeche, R., McNeill, H., Ali, T., Fairweather, N., Chatfield, S., Capron, A., y et al. (1994b).** Construction, expression, and immunogenicity of the Schistosoma mansoni P28 glutathione S-transferase as a genetic fusion to tetanus toxin fragment C in a live Aro attenuated vaccine strain of Salmonella. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 11261-11265.

15 **Konieczny, M. P., Suhr, M., Noll, A., Autenrieth, I. B., y Alexander Schmidt, M. (2000).** Cell surface presentation of recombinant (poly-) peptides including functional T-cell epitopes by the AIDA autotransporter system. *FEMS Immunol Med Microbiol* 27, 321-332.

20 **Koprowski, H., 2nd, Levine, M. M., Anderson, R. J., Losonsky, G., Pizza, M., y Barry, E. M. (2000).** Attenuated Shigella flexneri 2a vaccine strain CVD 1204 expressing colonization factor antigen I and mutant heat-labile enterotoxin of enterotoxigenic Escherichia coli. *Infect Immun* 68, 4884-4892.

25 **Kweon, M. N., Yamamoto, M., Watanabe, F., Tamura, S., Van Ginkel, F. W., Miyauchi, A., Takagi, H., Takeda, Y., Hamabata, T., Fujihashi, K., et al. (2002).** A nontoxic chimeric enterotoxin adjuvant induces protective immunity in both mucosal and systemic compartments with reduced IgE antibodies. *J Infect Dis* 186, 1261-1269.

**Laemmli, U. K. (1970).** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.

30 **Lahiri, S. S. (2000).** Bacterial toxins-an overview. *J Nat Toxins* 9, 381-408.

**Lavelle, E. C., McGuirk, P., y Mills, K. H. (2004).** Molecules of infectious agents as immunomodulatory drugs. *Curr Top Med Chem* 4, 499-508.

35 **Lee, J. J., Sinha, K. A., Harrison, J. A., de Hormaeche, R. D., Riveau, G., Pierce, R. J., Capron, A., Wilson, R. A., y Khan, C. M. (2000).** Tetanus toxin fragment C expressed in live *Salmonella* vaccines enhances antibody responses to its fusion partner Schistosoma haematobium glutathione S-transferase. *Infect Immun* 68, 2503-2512.

40 **Loeffler, D. I., Schoen, C. U., Goebel, W., y Pilgrim, S. (2006).** Comparison of different live vaccine strategies in vivo for delivery of protein antigen or antigen-encoding DNA and mRNA by virulence-attenuated Listeria monocytogenes. *Infect Immun* 74, 3946-3957.

45 **Loessner, M. J., Wendlinger, G., y Scherer, S. (1995).** Heterogeneous endolysins in Listeria monocytogenes bacteriophages: a new class of enzymes and evidence for conserved holin genes within the siphoviral lysis cassettes. *Mol Microbiol* 16, 1231-1241.

**Lycke, N. (2005).** From toxin to adjuvant: basic mechanisms for the control of mucosal IgA immunity and tolerance. *Immunol Lett* 97, 193-198.

50 **Lycke, N., Tsuji, T., y Holmgren, J. (1992).** The adjuvant effect of *Vibrio cholerae* and *Escherichia coli* heat-labile enterotoxins is linked to their ADP-ribosyltransferase activity. *Eur J Immunol* 22, 2277-2281.

55 **McSorley, S. J., Rask, C., Pichot, R., Julia, V., Czerkinsky, C., y Glaichenhaus, N. (1998).** Selective tolerization of Th1-like cells after nasal administration of a cholera toxoid-LACK conjugate. *Eur J Immunol* 28, 424-432.

**Mendelson, I., Gat, O., Aloni-Grinstein, R., Altboum, Z., Inbar, I., Kronman, C., Bar-Haim, E., Cohen, S., Velan, B., y Shafferman, A. (2005).** Efficacious, nontoxic Bacillus anthracis spore vaccines based on strains expressing mutant variants of lethal toxin components. *Vaccine* 23, 5688-5697.

60 **Mesnage, S., Weber-Levy, M., Haustant, M., Mock, M., y Fouet, A. (1999).** Cell surface-exposed tetanus toxin fragment C produced by recombinant Bacillus anthracis protects against tetanus toxin. *Infect Immun* 67, 4847-4850.

65 **Michalkiewicz, J., Stachowski, J., Barth, C., Patzer, J., Dzierzanowska, D., y Madalinski, K. (1999).** Effect of Pseudomonas aeruginosa exotoxin A on IFN-gamma synthesis: expression of costimulatory molecules on monocytes and activity of NK cells. *Immunol Lett* 69, 359-366.

- 10 **Michl, P., y Gress, T. M. (2004).** Bacteria and bacterial toxins as therapeutic agents for solid tumors. *Curr Cancer Drug Targets* 4, 689-702.
- 5 **Morona, R., Manning, P. A., y Reeves, P. (1983).** Identification and characterization of the ToIC protein, an outer membrane protein from *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 153, 693-699.
- 10 **Muhlen, K. A., Schumann, J., Wittke, F., Stenger, S., Van Rooijen, N., Van Kaer, L., y Tiegs, G. (2004).** NK cells, but not NKT cells, are involved in *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A-induced hepatotoxicity in mice. *J Immunol* 172, 3034-3041.
- 10 **Mutsch, M., Zhou, W., Rhodes, P., Bopp, M., Chen, R. T., Linder, T., Spyr, C., y Steffen, R. (2004).** Use of the inactivated intranasal influenza vaccine and the risk of Bell's palsy in Switzerland. *N Engl J Med* 350, 896-903.
- 15 **Orr, N., Galen, J. E., y Levine, M. M. (1999).** Expression and immunogenicity of a mutant diphtheria toxin molecule, CRM(197), and its fragments in *Salmonella typhi* vaccine strain CVD 908-htrA. *Infect Immun* 67, 4290-4294.
- 20 **Poggi, A., Spada, F., Costa, P., Tomasello, E., Revello, V., Pella, N., Zocchi, M. R., y Moretta, L. (1996).** Dissection of lymphocyte function-associated antigen 1-dependent adhesion and signal transduction in human natural killer cells shown by the use of cholera or pertussis toxin. *Eur J Immunol* 26, 967-975.
- 25 **Pogonka, T., Klotz, C., Kovacs, F., and Lucius, R. (2003).** A single dose of recombinant *Salmonella typhimurium* induces specific humoral immune responses against heterologous *Eimeria tenella* antigens in chicken. *Int J Parasitol* 33, 81-88.
- 25 **Ramirez, R., Carracedo, J., Zamzami, N., Castedo, M., and Kroemer, G. (1994).** Pertussis toxin inhibits activation-induced cell death of human thymocytes, pre-B leukemia cells and monocytes. *J Exp Med* 180, 1147-1152.
- 30 **Ranallo, R. T., Fonseka, C. P., Cassels, F., Srinivasan, J., y Venkatesan, M. M. (2005).** Construction and characterization of bivalent *Shigella flexneri* 2a vaccine strains SC608(pCFAI) and SC608(pCFAI/LTB) that express antigens from enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* 73, 258-267.
- 35 **Reveneau, N., Geoffroy, M. C., Locht, C., Chagnaud, P., y Mercenier, A. (2002).** Comparison of the immune responses induced by local immunizations with recombinant *Lactobacillus plantarum* producing tetanus toxin fragment C in different cellular locations. *Vaccine* 20, 1769-1777.
- 40 **Roland, K. L., Tinge, S. A., Killeen, K. P., y Kochi, S. K. (2005).** Recent advances in the development of live, attenuated bacterial vectors. *Curr Opin Mol Ther* 7, 62-72.
- 40 **Rosenberg, S. A. (2001).** Progress in human tumour immunology and immunotherapy. *Nature* 411, 380-384.
- 45 **Ryan, E. T., Butters, J. R., Smith, R. N., Carroll, P. A., Crean, T. I., y Calderwood, S. B. (1997a).** Protective immunity against *Clostridium difficile* toxin A induced by oral immunization with a live, attenuated *Vibrio cholerae* vector strain. *Infect Immun* 65, 2941-2949.
- 45 **Ryan, E. T., Butters, J. R., Zhang, T., Baker, M. A., Stanley, S. L., Jr., y Calderwood, S. B. (1997b).** Oral immunization with attenuated vaccine strains of *Vibrio cholerae* expressing a dodecapeptide repeat of the serine-rich *Entamoeba histolytica* protein fused to the cholera toxin B subunit induces systemic and mucosal antiamebic and anti-*V. cholerae* antibody responses in mice. *Infect Immun* 65, 3118-3125.
- 50 **Sanchez, J., Wallerstrom, G., Fredriksson, M., Angstrom, J., y Holmgren, J. (2002).** Detoxification of cholera toxin without removal of its immunoadjuvanticity by the addition of (STa-related) peptides to the catalytic subunit. A potential new strategy to generate immunostimulants for vaccination. *J Biol Chem* 277, 33369-33377.
- 55 **Sanchez, AE., Aquino, G., Ostoa-Saloma, P., Laclette, JP., y Rocha-Zavaleta, L. (2004).** Cholera toxin B-subunit gene enhances mucosal Immunoglobulin A, Th1-type and CD8+ cytotoxic responses when co-administered intradermally with a DNA vaccine. *Clinic Diagnost Laborat Immun* 11, 711-719.
- 60 **Schmid-Grendelmeier, P., y Cramer, R. (2001).** Recombinant allergens for skin testing. *Int Arch Allergy Immunol* 125, 96-111.
- 65 **Schodel, F., Enders, G., Jung, M. C., y Will, H. (1990).** Recognition of a hepatitis B virus nucleocapsid T-cell epitope expressed as a fusion protein with the subunit B of *Escherichia coli* heat labile enterotoxin in attenuated salmonellae. *Vaccine* 8, 569-572.
- 65 **Shaw, C. A., and Starnbach, M. N. (2003).** Using Modified Bacterial Toxins to Deliver Vaccine Antigens. *ASM News* 69, 384-389.

**Silva, A. J., Mohan, A., y Benitez, J. A. (2003).** Cholera vaccine candidate 638: intranasal immunogenicity and expression of a foreign antigen from the pulmonary pathogen *Coccidioides immitis*. *Vaccine* 21, 4715-4721.

**Smerdou, C., Anton, I. M., Plana, J., Curtiss, R., 3rd, y Enjuanes, L. (1996).** A continuous epitope from transmissible gastroenteritis virus S protein fused to *E. coli* heat-labile toxin B subunit expressed by attenuated *Salmonella* induces serum and secretory immunity. *Virus Res* 41, 1-9.

**Somner, E. A., Ogun, S. A., Sinha, K. A., Spencer Valero, L. M., Lee, J. J., Harrison, J. A., Holder, A. A., Hormaeche, C. E., y Khan, C. M. (1999).** Expression of disulphide-bridge-dependent conformational epitopes and immunogenicity of the carboxy-terminal 19 kDa domain of *Plasmodium yoelii* merozoite surface protein-1 in live attenuated *Salmonella vaccine* strains. *Microbiology* 145 (Pt 1), 221-229.

**Sory, M. P., y Cornelis, G. R. (1990).** Delivery of the cholera toxin B subunit by using a recombinant *Yersinia enterocolitica* strain as a live oral carrier. *Res Microbiol* 141, 921-929.

**Spangrude, G. J., Sacchi, F., Hill, H. R., Van Epps, D. E., y Daynes, R. A. (1985).** Inhibition of lymphocyte and neutrophil chemotaxis by pertussis toxin. *J Immunol* 135, 4135-4143.

**Su, G. F., Brahmabhatt, H. N., de Lorenzo, V., Wehland, J., y Timmis, K. N. (1992).** Extracellular export of Shiga toxin B-subunit/haemolysin A (C-terminus) fusion protein expressed in *Salmonella typhimurium* aroA-mutant and stimulation of B-subunit specific antibody responses in mice. *Microb Pathog* 13, 465-476.

**Thungapathra, M., Sharma, C., Gupta, N., Ghosh, R. K., Mukhopadhyay, A., Koley, H., Nair, G. B., y Ghosh, A. (1999).** Construction of a recombinant live oral vaccine from a non-toxicogenic strain of *Vibrio cholerae* O1 serotype inaba biotype E1 Tor and assessment of its reactogenicity and immunogenicity in the rabbit model. *Immunol Lett* 68, 219-227.

**Todar, K. (2002).** Mechanism of bacterial pathogenicity: protein toxins. *Todar's Online Textbook of Bacteriology*: <http://textbookofbacteriology.net/proteintoxins.html>.

**Tzschaschel, B. D., Guzman, C. A., Timmis, K. N., y de Lorenzo, V. (1996a).** An *Escherichia coli* hemolysin sistema de transporte-based vector for the export of polypeptides: export of Shiga-like toxin IIeB subunit by *Salmonella typhimurium* aroA. *Nat Biotechnol* 14, 765-769.

**Tzschaschel, B. D., Klee, S. R., de Lorenzo, V., Timmis, K. N., y Guzman, C. A. (1996b).** Towards a vaccine candidate against *Shigella dysenteriae* 1: expression of the Shiga toxin B-subunit in an attenuated *Shigella flexneri* aroD carrier strain. *Microb Pathog* 21, 277-288.

**van Ginkel, F. W., Jackson, R. J., Yuki, Y., y McGhee, J. R. (2000).** Cutting edge: the mucosal adjuvant cholera toxin redirects vaccine proteins into olfactory tissues. *J Immunol* 165, 4778-4782.

**Vertiev, Y. V., Zdanovsky, A. G., Shevelev, A. B., Borinskaya, S. A., Gening, E. L., Martin, T., Ivanov, P. A., y Yankovsky, N. K. (2001).** Recombinant *Listeria* strains producing the nontoxic L-chain of botulinum neurotoxin A in a soluble form. *Res Microbiol* 152, 563-567.

**Walker, M. J., Rohde, M., Timmis, K. N., y Guzman, C. A. (1992).** Specific lung mucosal and systemic immune responses after oral immunization of mice with *Salmonella typhimurium* aroA, *Salmonella typhi* Ty21 a, and invasive *Escherichia coli* expressing recombinant pertussis toxin S1 subunit. *Infect Immun* 60, 4260-4268.

**Ward, S. J., Douce, G., Figueiredo, D., Dougan, G., y Wren, B. W. (1999).** Immunogenicity of a *Salmonella typhimurium* aroA aroD vaccine expressing a nontoxic domain of *Clostridium difficile* toxin A. *Infect Immun* 67, 2145-2152.

**Wiener, M. C. (2000).** Bacterial export takes its Tol. *Structure* 8, R171-175.

**Wu, S., Beier, M., Sztein, M. B., Galen, J., Pickett, T., Holder, A. A., Gomez-Duarte, O. G., and Levine, M. M. (2000).** Construction and immunogenicity in mice of attenuated *Salmonella typhi* expressing *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 1 (MSP-1) fused to tetanus toxin fragment C. *J Biotechnol* 83, 125-135.

**Zheng, J. P., Zhang, Z. S., Li, S. Q., Liu, X. X., Yuan, S. L., Wang, P., Zhan, D. W., Wang, L. C., y Huang, C. F. (2005).** Construction of a novel *Shigella* live-vector strain co-expressing CS3 and LTb/STm of enterotoxigenic *E. coli*. *World J Gastroenterol* 11, 3411-3418.

**Zhu, C., Ruiz-Perez, F., Yang, Z., Mao, Y., Hackethal, V. L., Greco, K. M., Choy, W., Davis, K., Butters, J. R., y Boedeker, E. C. (2006).** Delivery of heterologous protein antigens via hemolysin or autotransporter systems by an attenuated *ler* mutant of rabbit enteropathogenic *Escherichia coli*. *Vaccine* 24, 3821-3831.

## REIVINDICACIONES

1. Un microorganismo como portador de secuencias de nucleótidos para antígenos y toxinas proteicas que comprende los siguientes componentes:

(I) al menos una secuencia de nucleótidos que codifica al menos un antígeno completo o parcial de al menos una proteína de tipo salvaje o mutada; y

(II) al menos una secuencia de nucleótidos que codifica al menos una toxina proteica y/o al menos una subunidad de una toxina proteica; y

(III)

a) al menos una secuencia de nucleótidos que codifica al menos un sistema de transporte que permite la expresión de los productos de expresión del componente (I) y el componente (II) sobre la superficie externa del microorganismo y/o permite la secreción de los productos de expresión del componente (I) y el componente (II); y/o que codifica al menos una secuencia señal que permite la secreción de los productos de expresión del componente (I) y el componente (II); y/o

b) opcionalmente, al menos una secuencia de nucleótidos que codifica al menos una proteína para lisar el microorganismo en el citosol de las células de mamífero y para liberar intracelularmente plásmidos o vectores de expresión, que están contenidos en el microorganismo lisado; y

(IV) al menos una secuencia de nucleótidos para al menos una secuencia de activación para la expresión de uno o más de los componentes (I) a (III), donde dicha secuencia de activación puede ser activada en el microorganismo y/o es específica de la célula tisular, específica de la célula tumoral, específica de macrófagos, específica de dendritas, específica de linfocitos, específica de la función o sin especificidad celular;

donde cualquiera de los componentes (I) a (IV) puede estar presente una vez o varias veces y si un componente de los componentes (I) a (IV) está presente varias veces puede ser independientemente idéntico o diferente; y

donde el componente (I) y el componente (II) no son idénticos, esto es el componente (I) no codifica al menos una secuencia de nucleótidos que codifica al menos una toxina proteica y/o al menos una subunidad de una toxina proteica.

2. El microorganismo de acuerdo con la reivindicación 1, donde el microorganismo se selecciona del grupo que consiste en "bacterias, bacterias gram-positivas, bacterias gram-negativas, células eucarióticas" y preferiblemente se selecciona del grupo que consiste en "*Escherichia* spp., *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Salmonella typhi*, *Salmonella typhimurium*, *Yersinia* spp., *Yersinia enterocolitica*, *Vibrio* spp., *Vibrio cholerae*, *Listeria* spp., *Listeria monocytogenes*, *Shigella* spp., *Shigella flexneri*, *Yersinia* spp, *Pseudomonas* spp", donde preferiblemente la virulencia del microorganismo está atenuada.

3. El microorganismo de acuerdo con la reivindicación 2, donde *Vibrio cholerae* se excluye como microorganismo.

4. El microorganismo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde el al menos un antígeno completo o parcial de al menos una proteína de tipo salvaje o mutada de acuerdo con el componente (I) se selecciona del grupo que consiste en las siguientes proteínas de tipo salvaje y sus mutantes conocidos: "receptores; porción extracelular, transmembrana o intracelular de un receptor; molécula de adherencia; porción extracelular, transmembrana o intracelular de una molécula de adherencia; proteína transductora de la señal; proteína del ciclo celular; factor de transcripción; proteína de diferenciación; proteína embrionaria; proteína viral; alérgeno; proteína de patógeno microbiano; proteína de patógeno eucariótico; proteína antigénica de cáncer de testículo; proteína antigénica tumoral; y/o proteína específica de células tisulares",

donde la célula tisular se selecciona del grupo que consiste en "glándula tiroidea, glándula mamaria, glándula salivar, nódulo linfóide, glándula mamaria, mucosa de la túnica gástrica, riñón, ovario, próstata, cérvix, túnica serosa de la vesícula urinaria y lunares".

5. El microorganismo de acuerdo con la reivindicación 4, donde el al menos un antígeno completo o parcial de al menos una proteína de tipo salvaje o mutada de acuerdo con el componente (I) se selecciona del grupo que consiste en las siguientes proteínas de tipo salvaje y sus mutantes conocidos: "Her-2/neu, receptor de andrógenos, receptor de estrógenos, receptor de midquinas, receptor de EGF, ERBB2, ERBB4, receptor TRAIL, FAS, receptor de TNFalfa, receptor de TGF-beta, receptor de lactoferrina, mielina básica, alfa-lactalbúmina, GFAP, proteína ácida fibrilar, tirosinasa, EGR-1, MUC1, c-Raf (Raf-1), A-Raf, B-Raf, B-Raf V599E, B-Raf V600E, B-Raf KD, dominio quinasa B-Raf V600E, B-Raf V600E KD, dominio quinasa B-Raf V600E KD, dominio quinasa B-Raf, dominio quinasa B-Raf KD, N-Ras, K-Ras, H-Ras, Bcl-2, Bcl-X, Bcl-W, Bfl-1, Brag-1, Mcl-1, A1, Bax, BAD, Bak, Bcl-Xs, Bid, Bik, Hrk, Bcrabl, Myb, C-Met, IAP1, IAO2, XIAP, ML-IAP LIVIN, survivina, APAF-1, ciclina D(1-3), ciclina E, ciclina A,

ciclina B, ciclina H, Cdk-1, Cdk-2, Cdk-4, Cdk-6, Cdk-7, Cdc25C, p16, p15, p21, p27, p18, pRb, p107, p130, E2F (1-5), GAAD45, MDM2, PCNA, ARF, PTEN, APC, BRCA, Akt, P13K, mTOR, p53 y homólogos, C-Myc, NFkB, c-Jun, ATF-2, Sp1, antígeno específico de próstata (PSA), antígeno carcinoembrionario, alfa-fetoproteína, PAP; PSMA; STEAP; MAGE, MAGE-1, MAGE-3, NY-ESO-1, PSCA, MART, Gp100, tirosinasa, GRP, TCF-4, antígenos virales de los virus HIV, HPV, HCV, HPV, VEB, CMV, VES, virus influenza, virus influenza de tipo A, virus influenza de tipo A (H5N1) y (H3N2), virus influenza de tipo B, virus influenza de tipo C; hemagglutininas, hemagglutinina H1, hemagglutinina H5, hemagglutinina H7, hemagglutinina HA1 (preferiblemente de virus Influenza A (A/Thailand/1 (KAN-1)2004(H5N1), hemagglutinina HA12 (preferiblemente de virus Influenza A (A/Thailand/1 (KAN-1)2004(H5N1), hemagglutinina HA12C (preferiblemente de virus Influenza A (A/Thailand/1 (KAN-1)2004(H5N1), neuramidasa, p60, LLO, ureasa, CSP, calflagina y/o CPB” o donde el al menos un antígeno completo o parcial de al menos una proteína de tipo salvaje o mutada de acuerdo con el componente (I) se selecciona del grupo de quinasas que consisten en las siguientes proteínas de tipo salvaje y sus mutantes conocidos (números de acceso entre paréntesis): AAK1 (NM 014911), AATK (NM 004920), ABL1 (NM 005157), ABL2 (NM 005158), ACK1 (NM 005781), ACVR1 (NM 001105), ACVR1B (NM 020328), ACVR2 (NM 001616), ACVR2B (NM 001106), ACVRL1 (NM 000020), ADCK1 (NM 020421), ADCK2 (NM 052853), ADCK4 (NM 024876), ADCK5 (NM 174922), ADRBK1 (NM 001619), ADRBK2 (NM 005160), AKT1 (NM 005163), AKT2 (NM 001626), AKT3 (NM 005465), ALK (NM 004304), ALK7 (NM 145259), ALS2CR2 (NM 018571), ALS2CR7 (NM 139158), AMHR2 (NM 020547), ANKK1 (NM 178510), ANKRD3 (NM 020639), APEG1 (NM 005876), ARAF (NM 001654), ARK5 (NM 014840), ATM (NM 000051), ATR (NM 001184), AURKA (NM 003600), AURKB (NM 004217), AURKC (NM 003160), AXL (NM 001699), BCKDK (NM 005881), BCR (NM 004327), BIKE (NM 017593), BLK (NM 001715), BMPR1A (NM 004329), BMPR1B (NM 001203), BMPR2 (NM 001204), BMX (NM 001721), BRAF (NM 004333), BRD2 (NM 005104), BRD3 (NM 007371), BRD4 (NM 014299), BRDT (NM 001726), BRSK1 (NM 032430), BRSK2 (NM 003957), BTK (NM 000061), BUB1 (NM 004336), BUB1B (NM 001211), CABC1 (NM 020247), CAMK1 (NM 003656), CaMK1b (NM 198452), CAMK1D (NM 020397), CAMK1G (NM 020439), CAMK2A (NM 015981), CAMK2B (NM 001220), CAMK2D (NM 001221), CAMK2G (NM 001222), CAMK4 (NM 001744), CAMKK1 (NM 032294), CAMKK2 (NM 006549), CASK (NM 003688), CCRK (NM 012119), CDC2 (NM 001786), CDC2L1 (NM 001787), CDC2L5 (NM 003718), CDC42BPA (NM 014826), CDC42BPB (NM 006035), CDC7L1 (NM 003503), CDK10 (NM 003674), CDK11 (NM 015076), CDK2 (NM 001798), CDK3 (NM 001258), CDK4 (NM 000075), CDK5 (NM 004935), CDK6 (NM 001259), CDK7 (NM 001799), CDK8 (NM 001260), CDK9 (NM 001261), CDKL1 (NM 004196), CDKL2 (NM 003948), CDKL3 (NM 016508), CDKL4 (NM 001009565), CDKL5 (NM 003159), CHEK1 (NM 001274), CHUK (NM 001278), CIT (NM 007174), CLK1 (NM 004071), CLK2 (NM 003993), CLK3 (NM 003992), CLK4 (NM 020666), CRK7 (NM 016507), CSF1R (NM 005211), CSK (NM 004383), CSNK1A1 (NM 001892), CSNK1D (NM 001893), CSNK1E (NM 001894), CSNK1G1 (NM 022048), CSNK1G2 (NM 001319), CSNK1G3 (NM 004384), CSNK2A1 (NM 001895), CSNK2A2 (NM 001896), DAPK1 (NM 004938), DAPK2 (NM 014326), DAPK3 (NM 001348), DCAMKL1 (NM 004734), DCAMKL2 (NM 152619), DCAMKL3 (XM 047355), DDR1 (NM 013993), DDR2 (NM 006182), DMPK (NM 004409), DMPK2 (NM 017525.1), DYRK1A (NM 001396), DYRK1B (NM 006484), DYRK2 (NM 006482), DYRK3 (NM 003582), DYRK4 (NM 003845), EEF2K (NM 013302), EGFR (NM 005228), EIF2AK3 (NM 004836), EIF2AK4 (NM 001013703), EPHA1 (NM 005232), EPHA10 (NM 001004338), EPHA2 (NM 004431), EPHA3 (NM 005233), EPHA4 (NM 004438), EPHA5 (NM 004439), EPHA6 (XM 114973), EPHA7 (NM 004440), EPHA8 (NM 020526), EPHB1 (NM 004441), EPHB2 (NM 017449), EPHB3 (NM 004443), EPHB4 (NM 004444), EPHB6 (NM 004445), ERBB2 (NM 004448), ERBB3 (NM 001982), ERBB4 (NM 005235), ERK8 (NM 139021), ERN1 (NM 001433), ERN2 (NM 033266), FASTK (NM 025096), FER (NM 005246), FES (NM 002005), FGFR1 (NM 000604), FGFR2 (NM 022970), FGFR3 (NM 000142), FGFR4 (NM 022963), FGR (NM 005248), FLJ23074 (NM 025052), FLJ23119 (NM 024652), FLJ23356 (NM 032237), FLT1 (NM 002019), FLT3 (NM 004119), FLT4 (NM 002020), FRAP1 (NM 004958), FRK (NM 002031), FYN (NM 002037), GAK (NM 005255), GPRK5 (NM 005308), GPRK6 (NM 002082), GPRK7 (NM 139209), GRK4 (NM 005307), GSG2 (NM 031965), GSK3A (NM 019884), GSK3B (NM 002093), GUCY2C (NM 004963), GUCY2D (NM 000180), GUCY2F (NM 001522), H11 (NM 014365), HAK (NM 052947), HCK (NM 002110), HIPK1 (NM 152696), HIPK2 (NM 022740), HIPK3 (NM 005734), HIPK4 (NM 144685), HRI (NM 014413), HUNK (NM 014586), ICK (NM 016513), IGF1R (NM 000875), IKBKB (NM 001556), IKBKE (NM 014002), ILK (NM 004517), INSR (NM 000208), INSR (NM 014215), IRAK1 (NM 001569), IRAK2 (NM 001570), IRAK3 (NM 007199), IRAK4 (NM 016123), ITK (NM 005546), JAK1 (NM 002227), JAK2 (NM 004972), JAK3 (NM 000215), KDR (NM 002253), KIS (NM 144624), KIT (NM 000222), KSR (XM 290793), KSR2 (NM 173598), LAK (NM 025144), LATS1 (NM 004690), LATS2 (NM 014572), LCK (NM 005356), LIMK1 (NM 016735), LIMK2 (NM 005569), LMR3 (XM 055866), LMTK2 (NM 014916), LOC149420 (NM 152835), LOC51086 (NM 015978), LRRK2 (XM 058513), LTK (NM 002344), LYN (NM 002350), MAK (NM 005906), MAP2K1 (NM 002755), MAP2K2 (NM 030662), MAP2K3 (NM 002756), MAP2K4 (NM 003010), MAP2K5 (NM 002757), MAP2K6 (NM 002758), MAP2K7 (NM 005043), MAP3K1 (XM 042066), MAP3K10 (NM 002446), MAP3K11 (NM 002419), MAP3K12 (NM 006301), MAP3K13 (NM 004721), MAP3K14 (NM 003954), MAP3K2 (NM 006609), MAP3K3 (NM 002401), MAP3K4 (NM 005922), MAP3K5 (NM 005923), MAP3K6 (NM 004672), MAP3K7 (NM 003188), MAP3K8 (NM 005204), MAP3K9 (NM 033141), MAP4K1 (NM 007181), MAP4K2 (NM 004579), MAP4K3 (NM 003618), MAP4K4 (NM 145686), MAP4K5 (NM 006575), MAPK1 (NM 002745), MAPK10 (NM 002753), MAPK11 (NM 002751), MAPK12 (NM 002969), MAPK13 (NM 002754), MAPK14 (NM 001315), MAPK3 (NM 002746), MAPK4 (NM 002747), MAPK6 (NM 002748), MAPK7 (NM 002749), MAPK8 (NM 002750), MAPK9 (NM 002752), MAPKAPK2 (NM 032960), MAPKAPK3 (NM 004635), MAPKAPK5 (NM 003668), MARK (NM 018650), MARK2 (NM 017490), MARK3 (NM 002376), MARK4 (NM 031417), MAST1 (NM 014975), MAST205 (NM 015112), MAST3 (XM 038150), MAST4 (XM 291141), MASTL (NM 032844), MATK (NM 139355), MELK (NM 014791), MERTK (NM 006343), MET (NM 000245), MGC33182 (NM 145203), MGC42105 (NM 153361), MGC43306 (C9orf96), MGC8407 (NM 024046),

MIDORI (NM 020778), MINK (NM 015716), MKNK1 (NM 003684), MKNK2 (NM 017572), MLCK (NM 182493), MLK4 (NM 032435), MLKL (NM 152649), MOS (NM 005372), MST1R (NM 002447), MST4 (NM 016542), MUSK (NM 005592), MYLK (NM 053025), MYLK2 (NM 033118), MYO3A (NM 017433), MYO3B (NM 138995), NEK1 (NM 012224), NEK10 (NM 152534), NEK11 (NM 024800), NEK2 (NM 002497), NEK3 (NM 002498), NEK4 (NM 003157), NEK5 (MGC75495), NEK6 (NM 014397), NEK7 (NM 133494), NEK8 (NM 178170), NEK9 (NM 033116), NLK (NM 016231), NPR1 (NM 000906), NPR2 (NM 003995), NRBP (NM 013392), NRBP2 (NM 178564), NRR (NM 198465), NTRK1 (NM 002529), NTRK2 (NM 006180), NTRK3 (NM 002530), OBSCN (NM 052843), OSR1 (NM 005109), PACE-1 (NM 020423), PAK1 (NM 002576), PAK2 (NM 002577), PAK3 (NM 002578), PAK4 (NM 005884), PAK6 (NM 020168), PAK7 (NM 020341), PASK (NM 015148), PCTK1 (NM 006201), PCTK2 (NM 002595), PCTK3 (NM 212503), PDGFRA (NM 006206), PDGFRB (NM 002609), PDK1 (NM 002610), PDK2 (NM 002611), PDK3 (NM 005391), PDK4 (NM 002612), PDPK1 (NM 002613), PFTK1 (NM 012395), PHKG1 (NM 006213), PHKG2 (NM 000294), PIK3R4 (NM 014602), PIM1 (NM 002648), PIM2 (NM 006875), PIM3 (NM 001001852), PINK1 (NM 032409), PKE (NM 173575), PKMYT1 (NM 004203), pknbeta (NM 013355), PLK (NM 005030), PLK3 (NM 004073), PRKAA1 (NM 006251), PRKAA2 (NM 006252), PRKACA (NM 002730), PRKACB (NM 002731), PRKACG (NM 002732), PRKCA (NM 002737), PRKCB1 (NM 002738), PRKCD (NM 006254), PRKCE (NM 005400), PRKCG (NM 002739), PRKCH (NM 006255), PRKCI (NM 002740), PRKCL1 (NM 002741), PRKCL2 (NM 006256), PRKCM (NM 002742), PRKCN (NM 005813), PRKCQ (NM 006257), PRKCZ (NM 002744), PRKD2 (NM 016457), PRKDC (NM 006904), PRKG1 (NM 006258), PRKG2 (NM 006259), PRKR (NM 002759), PRKWNK1 (NM 018979), PRKWNK2 (NM 006648), PRKWNK3 (NM 020922), PRKWNK4 (NM 032387), PRKX (NM 005044), PRKY (NM 002760), PRPF4B (NM 003913), PSKH1 (NM 006742), PSKH2 (NM 033126), PTK2 (NM 005607), PTK2B (NM 004103), PTK6 (NM 005975), PTK7 (NM 002821), PTK9 (NM 002822), PTK9L (NM 007284), PTK (NM 017771), QSK (NM 025164), RAD53 (NM 007194), RAF1 (NM 002880), RAGE (NM 014226), RET (NM 020975), RHOK (NM 002929), RIOK1 (NM 031480), RIOK2 (NM 018343), RIPK1 (NM 003804), RIPK2 (NM 003821), RIPK3 (NM 006871), RIPK5 (NM 015375), RNASEL (NM 021133), ROCK1 (NM 005406), ROCK2 (NM 004850), ROR1 (NM 005012), ROR2 (NM 004560), ROS1 (NM 002944), RPS6KA1 (NM 002953), RPS6KA2 (NM 021135), RPS6KA3 (NM 004586), RPS6KA4 (NM 003942), RPS6KA5 (NM 004755), RPS6KA6 (NM 014496), RPS6KB1 (NM 003161), RPS6KB2 (NM 003952), RPS6KC1 (NM 012424), RPS6KL1 (NM 031464), RYK (NM 002958), SBK (XM 370948), SCYL1 (NM 020680), SCYL2 (NM 017988), SGK (NM 005627), SgK069 (SU SgK069), SgK085 (XM 373109), SgK110 (SU SgK110), SGK2 (NM 016276), SgK223 (XM 291277), SgK269 (XM 370878), SgK424 (CGP SgK424), SgK493 (SU SgK493), SgK494 (NM 144610), SgK495 (NM 032017), SGKL (NM 013257), SK681 (NM 001001671), SLK (NM 014720), SMG1 (NM 015092), SNARK (NM 030952), SNF1 LK (NM 173354), SNF1 LK2 (NM 015191), SNK (NM 006622), SNRK (NM 017719), SRC (NM 005417), SRMS (NM 080823), SRPK1 (NM 003137), SRPK2 (NM 003138), SSTK (NM 032037), STK10 (NM 005990), STK11 (NM 000455), STK16 (NM 003691), STK17A (NM 004760), STK17B (NM 004226), STK18 (NM 014264), STK19 (NM 032454), STK22B (NM 053006), STK22C (NM 052841), STK22D (NM 032028), STK23 (NM 014370), STK24 (NM 003576), STK25 (NM 006374), STK3 (NM 006281), STK31 (NM 031414), STK32B (NM 018401), STK33 (NM 030906), STK35 (NM 080836), STK36 (NM 015690), STK38 (NM 007271), STK38L (NM 015000), STK39 (NM 013233), STK4 (NM 006282), STLK5 (NM 001003787), STYK1 (NM 018423), SUDD (NM 003831), SYK (NM 003177), TAF1 (NM 138923), TAF1L (NM 153809), TAO1 (NM 004783), TAOK1 (NM 020791), TAOK3 (NM 016281), TBCK (NM 033115), TBK1 (NM 013254), TEC (NM 003215), TEK (NM 000459), TESK1 (NM 006285), TESK2 (NM 007170), TEX14 (NM 031272), TGFB1 (NM 004612), TGFB2 (NM 003242), TIE (NM 005424), TIF1 (NM 003852), TLK1 (NM 012290), TLK2 (NM 006852), TNIK (NM 015028), TNK1 (NM 003985), TOPK (NM 018492), TP53RK (NM 033550), TRAD (NM 007064), TRIB1 (NM 025195), TRIB2 (NM 021643), TRIB3 (NM 021158), TRIM28 (NM 005762), TRIM33 (NM 015906), TRIO (NM 007118), TRPM6 (NM 017662), TRPM7 (NM 017672), TRRAP (NM 003496), TSSK4 (NM 174944), TTBK1 (NM 032538), TTBK2 (NM 173500), TTK (NM 003318), TTN (NM 003319), TXK (NM 003328), TYK2 (NM 003331), TYRO3 (NM 006293), ULK1 (NM 003565), ULK2 (NM 014683), ULK3 (NM 015518), ULK4 (NM 017886), VRK1 (NM 003384), VRK2 (NM 006296), VRK3 (NM 016440), WEE1 (NM 003390), Wee1B (NM 173677), YANK1 (NM 145001), YES1 (NM 005433), ZAK (NM 016653), y/o ZAP70 (NM 001079).

6. El microorganismo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde el componente (II) se selecciona del grupo que consiste en “toxina bacteriana, enterotoxina, exotoxina, toxina de tipo I, toxina de tipo II, toxina de tipo III, toxina de tipo IV, toxina de tipo V, toxina RTX, toxina AB, toxina A-B, toxina A/B, toxina A+B, toxina A-5B y/o toxina AB5”.

7. El microorganismo de acuerdo con la reivindicación 6, donde el componente (II) se selecciona del grupo que consiste en “toxina de Adenilato ciclasa, toxina de Ántrax, toxina de Ántrax (EF), toxina de Ántrax (LF), toxina Botulinum, toxina de Cólera (CT, Ctx), subunidad B de toxina de Cólera (CTB, CtxB), toxina de Difteria (DT, Dtx), toxina LT de *E. coli*, enterotoxina lábil al calor de *E. coli* (LT), subunidad B de la enterotoxina lábil al calor de *E. coli* (LTB), toxina ST de *E. coli*, enterotoxina estable al calor de *E. coli* (ST), toxina Eritrogénica, toxina Exfoliativa, Exotoxina A, enterotoxina de *Perfringens*, toxina de Pertussis (PT, Ptx), toxina Shiga (ST, Stx), subunidad B de toxina Shiga (STB, StxB), toxina de tipo Shiga, enterotoxinas de *Staphylococcus*, toxina del Tétanos (TT), toxina del Síndrome de choque tóxico (TSST-1), toxina Vero (VT), Toxina A (TA) y Toxina B (TB) de *Clostridium difficile*, Toxina Letal (LT) y Toxina Hemorrágica (HT) de *Clostridium sordellii*, Toxina alfa (AT) de *Clostridium novyi*”.

8. El microorganismo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, donde el componente (I) y el componente (II) se conectan entre sí para permitir la expresión y/o secreción de una proteína de fusión codificada por ambos componentes.

5 9. El microorganismo de acuerdo con la reivindicación 8, donde la proteína de fusión se selecciona del grupo que consiste en “CtxB-PSA, CtxB-B-Raf V600E KD, dominio quinasa CtxB-B-Raf V600E, dominio quinasa CtxB-B-Raf V600E KD, CtxB-B-Raf, CtxB-B-Raf KD, dominio quinasa CtxB B-Raf KD, CtxB-HA1, CtxB-HA12C”.

10 10. El microorganismo de acuerdo con cualquiera las reivindicaciones 1 a 9, donde el componente (III) a) se selecciona del grupo que consiste en “sistema de secreción de tipo I, sistema de secreción de tipo II, sistema de secreción de tipo III, sistema de secreción de tipo IV, sistema de secreción de tipo V, sistema de transporte de hemolisina (señal) de *Escherichia coli* (secuencias de nucleótidos que contienen HlyA, HlyB y HlyD bajo el control de del promotor específico de hly), sistema de transporte de hemolisina (señal) de *Escherichia coli* (secuencias de nucleótidos que contienen HlyA, HlyB y HlyD bajo el control de un promotor bacteriano no específico hly), señal de transporte para la proteína de la capa S (Rsa A) de *Caulobacter crescentus*, señal de transporte para la proteína ToIC de *Escherichia coli*, señal de secreción Vtgss y/o señales de secreción derivadas de de listeriolisina, p60 y/o ActA”

y

20 donde el componente (III) b) se selecciona del grupo que consiste en “endolisinas, proteína lítica de bacterias gram-positivas, proteína lítica de *Listeria monocytogenes*, PLY551 de *Listeria monocytogenes* y/o holina de *Listeria monocytogenes*”.

25 11. El microorganismo de acuerdo con la reivindicación 10, donde el componente (III) a) es al menos una secuencia de nucleótidos que codifica solamente un sistema de transporte, que permite la expresión concomitante de los productos de expresión del componente (I) y el componente (II) sobre la superficie externa del microorganismo y/o permite la secreción concomitante de los productos de expresión del componente (I) y el componente (II), donde semejante componente (III) a) es preferiblemente al menos una secuencia de nucleótidos que codifica el sistema de transporte de hemolisina (señal) de *Escherichia coli* (secuencias de nucleótidos que contienen HlyA, HlyB y HlyD bajo el control del promotor específico de hly) o el sistema de transporte de hemolisina (señal) de *Escherichia coli* (secuencias de nucleótidos que contienen HlyA, HlyB y HlyD bajo el control de un promotor bacteriano no específico de hly).

35 12. El microorganismo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, donde de acuerdo con el componente (III) a) los productos de expresión del componente (I) y el componente (II) son secretados.

13. El microorganismo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, donde

40 el componente (I) se selecciona del grupo que consiste en B-Raf V600E, dominio quinasa B-Raf V600E, B-Raf V600E KD, dominio quinasa B-Raf V600E KD, B-Raf KD, dominio quinasa B-Raf, dominio quinasa B-Raf KD, antígeno específico de próstata (PSA), hemaglutinina HA1 (preferiblemente de virus Influenza A (A/Thailand/1 (KAN-1)2004(H5N1), hemaglutinina HA12 (preferiblemente de virus Influenza A (A/Thailand/1 (KAN-1)2004(H5N1), hemaglutinina HA12C (preferiblemente de virus Influenza A (A/Thailand/1 (KAN-1)2004(H5N1);

45 el componente (II) se selecciona del grupo que consiste en la “subunidad B de toxina del Cólera (CTB, CtxB), subunidad B de enterotoxina lábil al calor de *E. coli* (LTB), toxina del tétanos (TT)”;

50 el componente (III) a) se selecciona del grupo que consiste en la “señal de transporte de hemolisina HlyA de *Escherichia coli* junto con componentes del sistema de secreción de Hly (secuencias de nucleótidos que contienen HlyA, HlyB y HlyD bajo el control del promotor específico de hly)”;

el componente (IV) se selecciona del grupo que consiste en “el promotor endógeno del locus hly de *E. coli*”;

55 donde el componente (I) y el componente (II) se conectan entre sí para permitir la expresión de una proteína de fusión codificada por ambos componentes y donde la proteína de fusión es secretada.

60 14. Una composición farmacéutica que comprende al menos un microorganismo, preferiblemente al menos un microorganismo liofilizado, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 y un portador farmacéuticamente aceptable, preferiblemente cápsulas.

65 15. Un medicamento que comprende al menos un microorganismo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 o al menos una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 14.

16. El uso de un microorganismo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 para la producción de un medicamento para el tratamiento y/o la profilaxis de estados fisiológicos y/o patofisiológicos seleccionados del grupo que consiste en “división celular incontrolada, tumores malignos, tumores benignos, tumores sólidos, sarcomas,

## ES 2 347 019 T3

carcinomas, trastornos hiperproliferativos, carcinoides, sarcomas de Ewing, sarcomas de Kaposi, tumores cerebrales, tumores que se originan en el cerebro y/o el sistema nervioso y/o las meninges, gliomas, neuroblastomas, cáncer de estómago, cáncer de riñón, carcinomas de células renales, cáncer de próstata, carcinomas de próstata, tumores de tejido conectivo, sarcomas de tejidos blandos, tumores de páncreas, tumores de hígado, tumores de cabeza, tumores de cuello, 5 cáncer esofágico, cáncer de tiroides, osteosarcomas, retinoblastomas, timoma, cáncer testicular, cáncer de pulmón, carcinomas bronquiales, cáncer de mama, carcinomas de mama, cáncer intestinal, tumores colorrectales, carcinomas de colon, carcinomas de recto, tumores ginecológicos, tumores de ovario/tumores ováricos, cáncer uterino, cáncer cervical, carcinomas de cérvix, cáncer del cuerpo del útero, carcinomas del corpus, carcinomas endometriales, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de vejiga, cáncer de piel, basaliomas, espinaliomas, melanomas, melanomas intraoculares, 10 leucemia, leucemia crónica, leucemia aguda, linfomas, infección, infección viral o bacteriana, influenza, inflamación crónica, rechazo de órganos y/o enfermedades autoinmunitarias”.

17. Un plásmido o vector de expresión que comprende los componentes (I) a (IV) de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13.

18. Un procedimiento para la producción de un microorganismo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, donde se produce un plásmido o vector de expresión de acuerdo con la reivindicación 17, y se transforma un microorganismo con este plásmido o vector de expresión.

19. Un kit farmacéutico que comprende al menos un microorganismo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 o una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 14 o un medicamento de acuerdo con la reivindicación 15 y un tampón farmacológicamente aceptable, preferiblemente un tampón carbonato.



**Figura I**

**hlyA:**

ATGCCAACAATAACCACTGCACAAATTAAAAGCACACTGCAGTCTGCAAAGCAATCCGCT  
GCAAATAAATTGCACTCAGCAGGACAAAGCACGAAAGATGCATTAGCCTATGGAAGTCAG  
GGTGATCTTAATCCATTAAATTAATGAAATCAGCAAAATCATTTCAGCTGCAGGTAGCTTC  
GATGTAAAGAGGAAAGAACTGCAGCTTCTTTATTGCAGTTGTCCGGTAATGCCAGTGAT  
TTTTCATATGGACGGAACCTCAATAACCCCTGACCACATCAGCATAA

Figura 2

hlyB:

ATGGATTCTTGTCATAAAATTGATTATGGGTTATACGCCCTGGAGATTTTAGCCCAATAC  
 CATAACGTCCTCTGTAAACCCGGAAGAAATTAAACATAGATTGATACAGACGGGACAGGT  
 CTGGGATTAAACGTCATGGTTGCTTGCTGCGAAATCTTTAGAACTAAAGGTAAAACAGGTA  
 AAAAAACAATTGATCGATTAACTTTATTTTTCTGCCCGCATTAGTCTGGAGAGAGGAT  
 GGACGTCATTTTATTCTGACTAAAATCAGCAAAGAAGTAAACAGATATCTTATTTTTGAT  
 TTGGAGCAGCGAAATCCCGTGTTCTCGAACAGTCTGAGTTTGAGGCGTTATATCAGGGG  
 CATATTATTCTTAATTACTTCCCGTTCTTCTGTIACCGGGAACTGGCAAAATTTGACTTT  
 ACCTGGTTTATTCCTGCCATTATAAAATACAGGAGAATATTTATTGAAACCCCTTGTTGTA  
 TCTGTTTTTTTACAATTATTTGCATTAAATAACCCCCCTTTTTTTTCAGGTGGTIATGGAC  
 AAAGTATTAGTGACAGGGGGTTTTCAACCCCTTAATGTTATTACTGTTCCTTAICTGTT  
 GTAGTGGTGTGTTGAGATTATACTCAGCGGTTTAAGAACTTACATTTTGCACATAGTACA  
 AGTCGGATTGATGTTGAGTTGGGTGCCAAACTCTTCCGGCATTACTGGCGCTACCGATC  
 TCTTATTTTGAGAGTCGTCGTGTTGGTGATACTGTTGCGAGGGTAAAGAGAATTAGACCAG  
 ATCCGTAATTTTCTGACAGGACAGGCATTAACATCTGTTTTGGACTTATTATTTTCACTC  
 ATATTTTTTGCGGTAATGTGGTATTACAGCCCAAAGCTTACTCTGGTGATCTTATTTTCG  
 CTGCCTTGTTATGCTGCATGGTCTGTTTTATTAGCCCCATTTTGGCAGCTCGCCTTGAT  
 GATAAGTTTTCACGGAATGCGGAIAATCAATCTTTCTGGTGGAATCAGTAACGGCGATT  
 AACACTATAAAAGCTATGGCAGTCTCACCTCAGATGACGAACATATGGGACAAACAATTG  
 GCAGGATATGTTGCTGCAGGCTTTAAAGTGACAGTATTAGCAACCATTGGTCAACAAGGA  
 ATACAGTTAATACAAAAGACTGTTATGATCATCAACCTATGGTTGGGAGCACACCTGGTT  
 ATTTCCGGGGAATTAAGIATTGGTCAGTTAATTGCTTTTAAATATGCTTGCTGGTCAGATT  
 GTTGCACCGGTTATTGCGCTTGACAAAATCTGGCAGGATTTCCAGCAGGTTGGTATATCA  
 GTTACCCGCCTTGGTGATGTGCTTAACCTCCTCAACTGAAAGTTATCATGGGAAACTGACA  
 TTGCCGGAATTAATGGTGATATCATTTCGTAAATATCCGGTTTCGCTATAAACCTGAT  
 TCTCCGGTTATTTGGACAATATCAATCTTAGTATTAAGCAGGGGGAGGTATTGGTATT  
 GTCGGACGTTCTGGTTTACAGGAAAAGCACATTAACTAAATTAATTCAACGTTTTTATATT  
 CCTGAAAATGGCCAGGTATTAATTGATGGACATGATCTTGCGTTGGCCGATCCTAACTGG  
 TTACGTCGTCAGGTGGGGGTTGTGTTGCAGGACAATGTGCTGCTTAATCGCAGTATTATT  
 GATAATATTTCACTGGCTAATCCTGGCATGTCCGTGCAAAAAGTTATTTATGCAGCGAAA  
 TTAGCAGGTGCTCATGATTTTATTTCTGAATTGCGTGAGGGGTATAACACCATTTGTCGGG  
 GAACAGGGGGCAGGATTATCCGGAGGTCAACGTCAACGCATCGCAATTGCAAGGGCGCTG  
 GTGAACAACCCTAAAATACTCATTTTTTGATGAAGCAACCAGTGCTCTGGATTATGAGTCG  
 GAGCATGTCATCATGCGCAATATGCACAAAATAIGTAAGGGCAGAACGGTTATAATCATT  
 GCTCATCGTCGTCTACAGTAAAAAATGCAGACCGCATTATTGTGTCATGGAAAAAGGGAAA  
 ATTGTTGAACAGGGTAAACATAAGGAGCTGCTTCTGAACCGGAAAGTTTATACAGTTAC  
 TTATATCAGTTACAGTCAGACTAA

**Figura 3**

**hlyD:**

ATGAAAACATGGTTAATGGGGTTCAGCGAGTTCCTGTTGCGCTATAAACTTGTCTGGAGT  
GAAACATGGAAAATCCGGAAGCAATTAGATACTCCGGTACGTGAAAAGGACGAAAATGAA  
TTCTTACCCGCTCATCTGGAATTAATTGAAACGCCAGTATCCAGACGGCCGCGTCTGGTT  
GCTTATTTTATTAAGGGGTTTCTGGTTATTGCTTTTATTTTATCTGTTTITAGGCCAAGTG  
GAAATTGTIGCCACTGCAAAIGGGAAATTAACACACAGTGGGCGTAGTAAAGAAATTAAA  
CCTATTGAAAACCTCAATAGTTTAAAGAAATTATCGTAAAAGAAGGAGAGTCAGTCCGGAAA  
GGGGATGTGTTATTAAAGCTTACAGCACTGGGAGCTGAAGCTGATACGTTAAAAACACAG  
TCATCACTGTTACAGGCCAGGCTGGAACAAACTCGGTATCAAATTCTGAGCAGGTCAATT  
GAATTAAATAAACTACCTGAACTAAAGCTTCTGATGAGCCTTATTTTCAGAATGTATCT  
GAAGAGGAAGTACTGCGTTTAACTTCTTTGATAAAAGAACAGTTTTCCACATGGCAAAAT  
CAGAAGTATCAAAAAGAACTGAATTTGGATAAGAAAAGAGCAGAGCGATTAAACAGTACTT  
GCCCGTATAAACCGTTATGAAAATTTATCAAGGGTTGAAAAAGCCGTCTGGATGATTTT  
AGTAGTTTATTGCATAAACAGGCAATTGCAAAACATGCTGTACTTGAGCAGGAGAATAAA  
TATGTCGAAGCAGTAAATGAATTACGAGTTTATAAATCACAACCTGGAGCAAATTGAGAGT  
GAGATATTGTCTGCAAAAGAAGAATATCAGCTTGTTACGCAGCTTTTTAAAAATGAAATT  
TTAGATAAGCTAAGACAAACCACAGACAACATTGGGTTATTAACCTCTGGAATTAGCGAAA  
AATGAAGAGCGTCAACAGGCTTCAGTAATCAGGGCCCCAGTTTCGGTAAAAGTTTACGCAA  
CTGAAGGTTTCACTGAAGGTGGGGTTGTTACAACAGCGGAAACACTGATGGTTCATCGTT  
CCGGAAGATGACACGCTGGAGGTTACTGCTCTGGTACAAAATAAAGATATTGGTTTTATT  
AACGTCGGGCAGAATGCCATCATTAAAGTGGAGGCATTTCTTATACACGATATGGTTAT  
CTGGTGGGTAAGGTGAAAAATATAAATTTAGATGCAATAGAAGACCAGAGACTGGGACTT  
GTTTTTAATGTTATTATTTCTATTGAAGAGAATTGTTTGTCAACCGGAAATAAAAACATT  
CCATTAAGCTCGGGTATGGCAGTCACTGCAGAAATAAAGACAGGTATGCGAAGTGTAATC  
AGTTATCTTCTTAGTCCTTTAGAAGAGTCAGTAACAGAAAGTTTACGTGAGCGTTAA

**Figura 4**

**PSA:**

GTGGGAGGCTGGGAGTGCAGAGAAGCATTCCCAACCCTGGCAGGTGCTTGTGGCCTCTCGT  
GGCAGGGCAGTCTGCGGCGGTGTTCTGGTGCACCCCCAGTGGGTCCCTCACAGCTGCCCAC  
TGCAATCAGGAACAAAAGCGTGATCTTGCTGGGTGCGGCACAGCCTGTTTCATCCTGAAGAC  
ACAGGCCAGGTATTTAGGTTCAGCCACAGCTTCCCACACCCGCTCTACGATATGAGCCTC  
CTGAAGAATCGATTCCCTCAGGCCAGGTGATGACTCCAGCCACGACCTCATGCTGCTCCGC  
CTGTCAGAGCCTGCCGAGCTCACGGAATGCTGTGAAGGTTCATGGACCTGCCACCCAGGAG  
CCAGCACTGGGGACCACCTGCTACGCCTCAGGCTGGGGCAGCATTGAACCAGAGGAGTTC  
TTGACCCCAAAGAACTTCAGTGTGTGGACCTCCATGTTATTTCCAATGACGTGTGTGCG  
CAAGTTCACCCTCAGAAGGTGACCAAGTTCATGCTGTGTGCTGGACGCTGGACAGGGGGC  
AAAAGCACCTGCTCGGGTGATTCTGGGGGCCCCACTTGTCTGTAATGGTGTGCTTCAAGGT  
ATCACGTCATGGGGCAGTGAACCATGTGCCCTGCCCGAAAGGCCTTCCCTGTACACCAAG  
GTGGTGCATTACCGGAAGTGGATCAAGGACACCATCGTGGCCAACCCC

**Figura 5**

**CtxB:**

CCTCAAAATATTACTGATTTGTGTGCAGAATACCACAACACACAAATATATACGCTAAAT  
GATAAGATATTTTCGTATACAGAATCTCTAGCTGGAAAAAGAGAGATGGCTATCATTACT  
TTTAAGAAATGGTGCAATTTTCAAGTAGAAGTACCAGGTAGTCAACATATAGATTCACAA  
AAAAAAGCGATTGAAAGGATGAAGGATACCTGAGGATTGCATATCTTACTGAAGCTAAA  
GTCGAAAAGTTATGTGTATGGAATAATAAAACGCCTCATGCGATTGCCGCA

**Figura 6**

**B-Raf KD:**

GATGATTGGGAGATTCTGATGGGCAGATTACAGTGGGACAAAGAAAGGGAAAGTGGCAT  
GGTGATGTGGCAGTGAAAATGTTGAATGTGACAGCACCTACACCTCAGCAGTTACAAGCC  
TTCAAAAATGAAGTAGGAGTACTCAGGAAAACACGACATGTGAATATCCTACTCTTCATG  
GGCTATTCCACAAAGCCACAACCTGGCTATTGTTACCCAGTGGTGTGAGGGCTCCAGCTTG  
TATCACCATCTCCATATCATTGAGACCAAATTTGAGATGATCAAACCTTATAGATATTGCA  
CGACAGACTGCACAGGGCATGGATTACTTACACGCCAAGTCAATCATCCACAGAGACCTC  
AAGAGTAATAATATATTTTCTTCATGAAGACCTCACAGTAAAAATAGGTGATTTTGGTCTA  
GCTACAGAGAAAATCTCGATGGAGTGGGTCCCATCAGTTTGAACAGTTGTCTGGATCCATT  
TTGTGGATGGCACCAGAAGTCATCAGAATGCAAGATAAAAAATCCATACAGCTTTCAGTCA  
GATGTATATGCATTTGGGATTGTTCTGTATGAATTGATGACTGGACAGTTACCTTATTCA  
AACATCAACAACAGGGACCAGATAATTTTTATGGTGGGACGAGGATACCTGTCTCCAGAT  
CTCAGTAAGGTACGGAGTAACTGTCCAAAAGCCATGAAGAGATTAAATGGCAGAGTGCCCTC  
AAAAAGAAAAGAGATGAGAGACCACCTCTTTCCCAAATTCCTCGCCTCTATTGAGCTGCTG  
GCCCCGCTCATTTGCCAAAAATTCACCGCAGTGCAATCAGAACCTCCTTGAATCGGGCTGGT  
TTCCAAACAGAGGATTTTAGTCTATATGCTTGTGCTTCTCCAAAACACCCATCCAGGCA  
GGGGGATATGGTGCGTTTCCTGTCCAC

**Figura 7**

**B-Raf V600E:**

CGATTTTGGCCTGGCGACCGAAAAAGCGGGCGATTTTGGCCTGGCGACCGAAAAAGCGGGC  
GATTTTGGCCTGGCGACCGAAAAAGCGGGGC

**Figura 8**

**Ctx - PSA - HlyA:**

ATGCCAACAATAACCACTGCACAAATTAAAAGCACACTGCAGTCTGCAAAGCAATCCGCT  
GCAAATAAATTGCACTCAGCAGGACAAAGCACGAAAGATGCATCACCTCAAAATATTACT  
GATTIGTGTGCAGAAATACCACAACACACAAATATATACGCTAAATGATAAGATATTTTCG  
TATACAGAATCTCTAGCTGGAAAAAGAGAGATGGCTATCATTACTTTTAAGAAATGGTGCA  
ATTTTTCAAGTAGAAGTACCAGGTAGTCAACATATAGATTACAAAAAAAAGCGATTGAA  
AGGATGAAGGATACCCTGAGGATTGCATATCTTACTGAAGCTAAAGTCGAAAAGTTATGT  
GTATGGAATAATAAAACGCCTCATGCGATTGCCGCAATGCCCGTGGGAGGCTGGGAGTGC  
GAGAAGCATTCCCAACCCTGGCAGGTGCTTGTGGCCTCTCGTGGCAGGGCAGTCTGCGGC  
GGTGTTCCTGGTGCACCCCCAGTGGGTCTCAGAGCTGCCACTGCATCAGGAACAAAAGC  
GTGATCTTGCTGGGTGCGGCACAGCCTGTTTCATCCTGAAGACACAGGCCAGGTATTTTCAG  
GTCAGCCACAGCTTCCACACCCGCTCTACGATATGAGCCTCCTGAAGAAATCGATTCTCTC  
AGGCCAGGTGATGACTCCAGCCACGACCTCATGCTGCTCCGCCTGTCAGAGCCTGCCGAG  
CTCACGGATGCTGTGAAGGTCATGGACCTGCCCACCCAGGAGCCAGCACTGGGGACCACC  
TGCTACGCCTCAGGCTGGGGCAGCAITGAACCAGAGGAGTTCTTGACCCCAAAGAACTT  
CAGTGTGTGGACCTCCATGTTATTTCCAATGACGTGTGTGCGCAAGTTCACCCTCAGAAG  
GTGACCAAGTTCATGCTGTGTGCTGGACGCTGGACAGGGGGCAAAGCACCTGCTCGGGT  
GATTCTGGGGGCCCACTTGTCTGTAATGGTGTGCTTCAAGGTATCACGTCAITGGGGCAGT  
GAACCAITGTGCCCTGCCCCGAAAGGCCTTCCCTGTACACCAAGGTGGTGCATTACCGGAAG  
TGGATCAAGGACACCATCGTGGCCAACCCCGGGCATGCATTAGCCTATGGAAGTCAGGGT  
GATCTTAATCCATTAAATTAATGAAATCAGCAAAATCATTTTCAGCTGCAGGTAGCTTCGAT  
GTTAAAGAGGAAAGAACTGCAGCTTCTTTATTGCAGTTGTCCGGTAATGCCAGTGATTTT  
TCATATGGACGGAACCTCAATAACCCTGACCACATCAGCATAA



**Figura 9**

**Ctx - epítipo B-Raf V600E - HlyA:**

ATGACAACAATAACCACTGCACAAATTAAAAGCACACTGCAGTCTGCAAAGCAATCCGCT  
GCAAATAAAATTGCACTCAGCAGGACAAAGCACGAAAGATGCATCACCTCAAAATATTACT  
GATTTGTGTGCAGAATACCACAACACACAAATACATACGCTAAATGATAAGATATTTTCG  
TATACAGAACTCTCTAGCTGGAAAAAGAGAGATGGCTATCATTACTTTTAAGAATGGTGCA  
ACTTTTCAAGTAGAAGTACCAGGTAGTCAACATATAGATTCACAAAAAAAAGCGATTGAA  
AGGATGAAGGATACCCCTGAGGATTGCATATCTTACTGAAGCTAAAGTCGAAAAGTTATGT  
GTATGGAATAATAAAACGCCTCATGCGATTGCCGCAATGCCCGGCGATTTTGGCCTGGCG  
ACCGAAAAAGCGGGCGATTTTGGCCTGGCGACCGAAAAAGCGGGCGATTTTGGCCTGGCG  
ACCGAAAAAGCGGGGCAIGCATTAGCCTATGGAAGTCAGGGTGATCTTAATCCATTAATT  
AATGAAATCAGCAAAATCATTTTCAGCTGCAGGTAGCTTCGATGTTAAAGAGGAAAGAACT  
GCAGCTTCTTTATTGCAGTTGTCCGGTAATGCCAGTGATTTTTTCATATGGACGGAACCTCA  
ATAACCCTGACCACATCAGCATAA

**Figura 10**

**Ctx - BRAF KD - HlyA:**

ATGCCAACAATAACCACTGCACAAATTAAGCAGTCTGCAAAGCAATCCGCT  
GCAAATAAATTGCACTCAGCAGGACAAAGCAGAAAGATGCATCACCTCAAAATATTACT  
GATTGTGTGTCAGAAATACCACAACACACAAATATATACGCTAAATGATAAGATATTTTCG  
TATACAGAATCTCTAGCTGGAAAAAGAGAGATGGCTATCATTACTTTTAAAGATGGTGCA  
ATTTTTCAAGTAGAAGTACCAGGTAGTCAACATATAGATTACAAAAAAGCGATTGAA  
AGGATGAAGGATACCCTGAGGATTGCATATCTTACTGAAGCTAAAGTCGAAAAGTTATGT  
GTATGGAATAATAAAACGCCTCATGCGATTGCCGCAATGCCCGATGATTGGGAGATTCCCT  
GATGGGCAGATTACAGTGGGACAAAGAAAGGGAAAGTGGCATGGTGATGTGGCAGTGAAA  
ATGTTGAATGTGACAGCACCTACACCTCAGCAGTTACAAGCCTTCAAAAATGAAGTAGGA  
GTACTCAGGAAAAACAGACATGTGAATATCCTACTCTTCATGGGCTATTCCACAAAGCCA  
CAACTGGCTATTGTTACCCAGTGGTGTGAGGGCTCCAGCTTGTATCACCATCTCCATATC  
ATTGAGACCAAATTTGAGATGATCAAACCTTATAGATATTGCACGACAGACTGCACAGGGC  
ATGGATTACTTACACGCCAAGTCAATCATCCACAGAGACCTCAAGAGTAATAATATATTT  
CTTCATGAAGACCTCACAGTAAAAATAGGTGATTTTGGTCTAGCTACAGAGAAATCTCGA  
TGGAGTGGGTCCCATCAGTTTGAACAGTTGTCTGGATCCATTTTGTGGATGGCACCAGAA  
GTCATCAGAATGCAAGATAAAAAATCCATACAGCTTTTTCAGTCAGATGTATATGCATTITGGG  
ATTGTTCTGTATGAATTGATGACTGGACAGTTACCTTATTCAAACATCAACAACAGGGAC  
CAGATAATTTTTATGGTGGGACGAGGATACCTGTCTCCAGATCTCAGTAAGGTACGGAGT  
AACTGTCCAAAAGCCATGAAGAGATTAATGGCAGAGTGCCICAAAAGAAAAGAGATGAG  
AGACCACTCTTTCCCCAAATTTCTCGCCTCTATTGAGCTGCTGGCCCGCTCATTGCCAAAA  
ATTACCCGCAGTGCATCAGAACCTCCTTGAATCGGGCTGGTTTCCAAACAGAGGATTTT  
AGTCTATATGCTTGTGCTTCTCCAAAAACACCAATCCAGGCAGGGGGATATGGTGCCTTT  
CCGTGCCACGGGCATGCATTAGCCTATGGAAGTCAGGGTGATCTTAATCCATTAAATTAAT  
GAAATCAGCAAAATCATTTTTCAGCTGCAGGTAGCTTCGATGTTAAAGAGGAAAGAACTGCA  
GCTTCTTTTATTGCAGTTGTCCGGTAATGCCAGTGATTTTTCATATGGACGGAACCTCAATA  
ACCCTGACCACATCAGCATAA

Figura 11

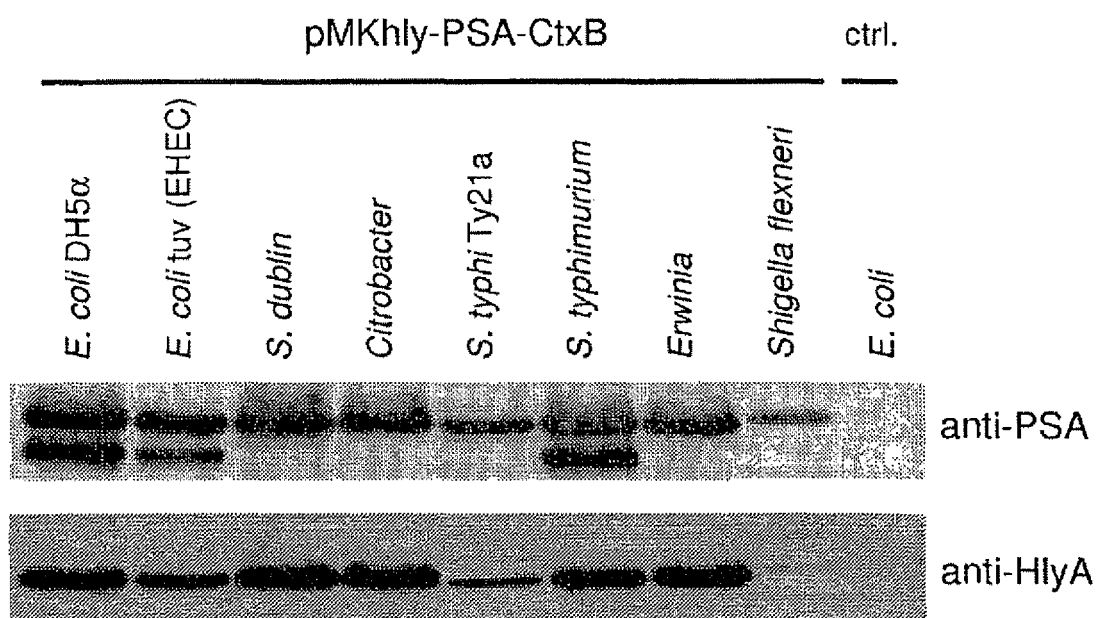


Figura 12

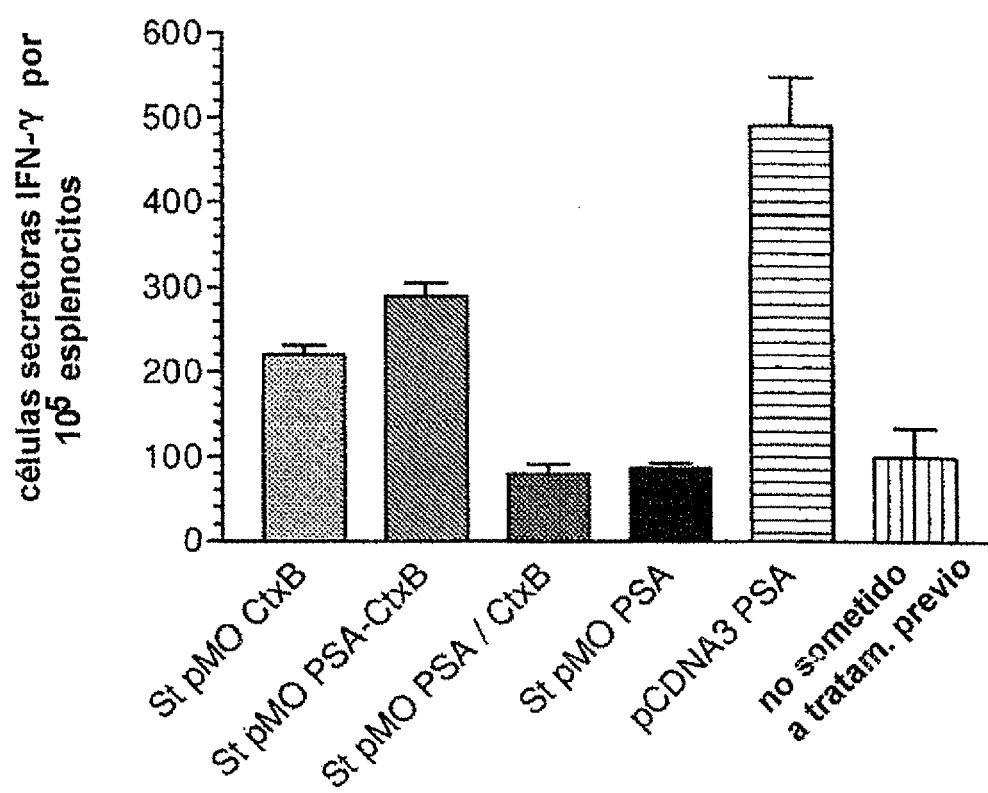


Figura 13

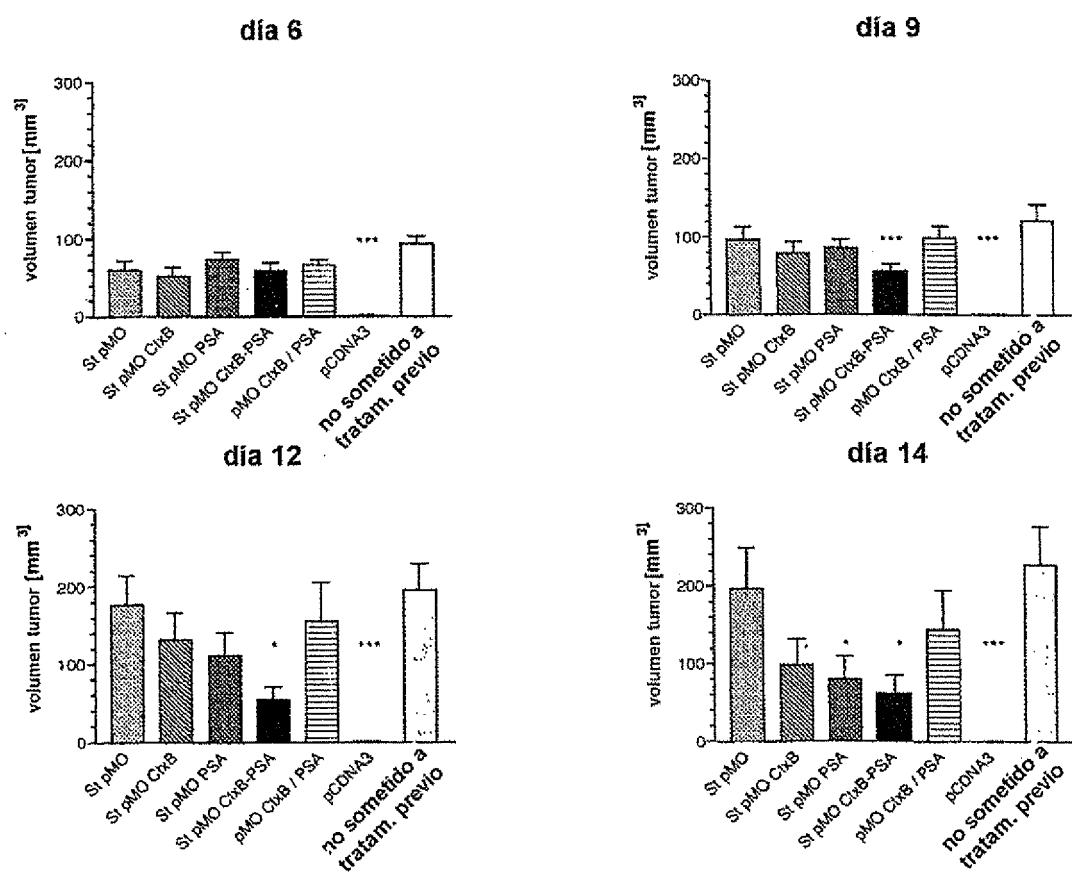


Figura 14

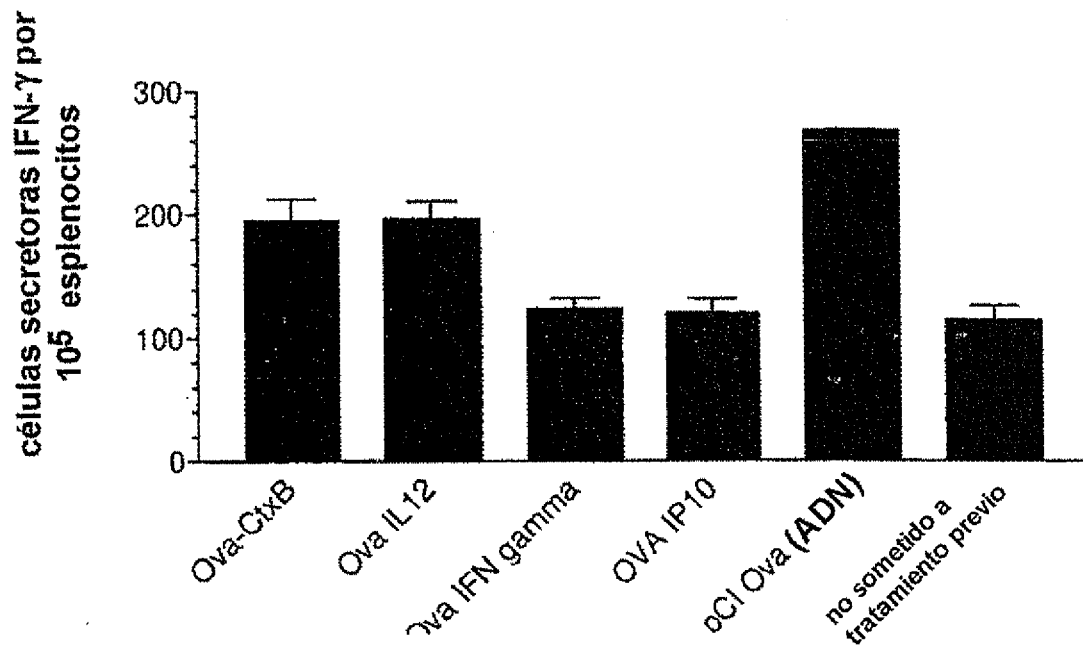


Figura 15

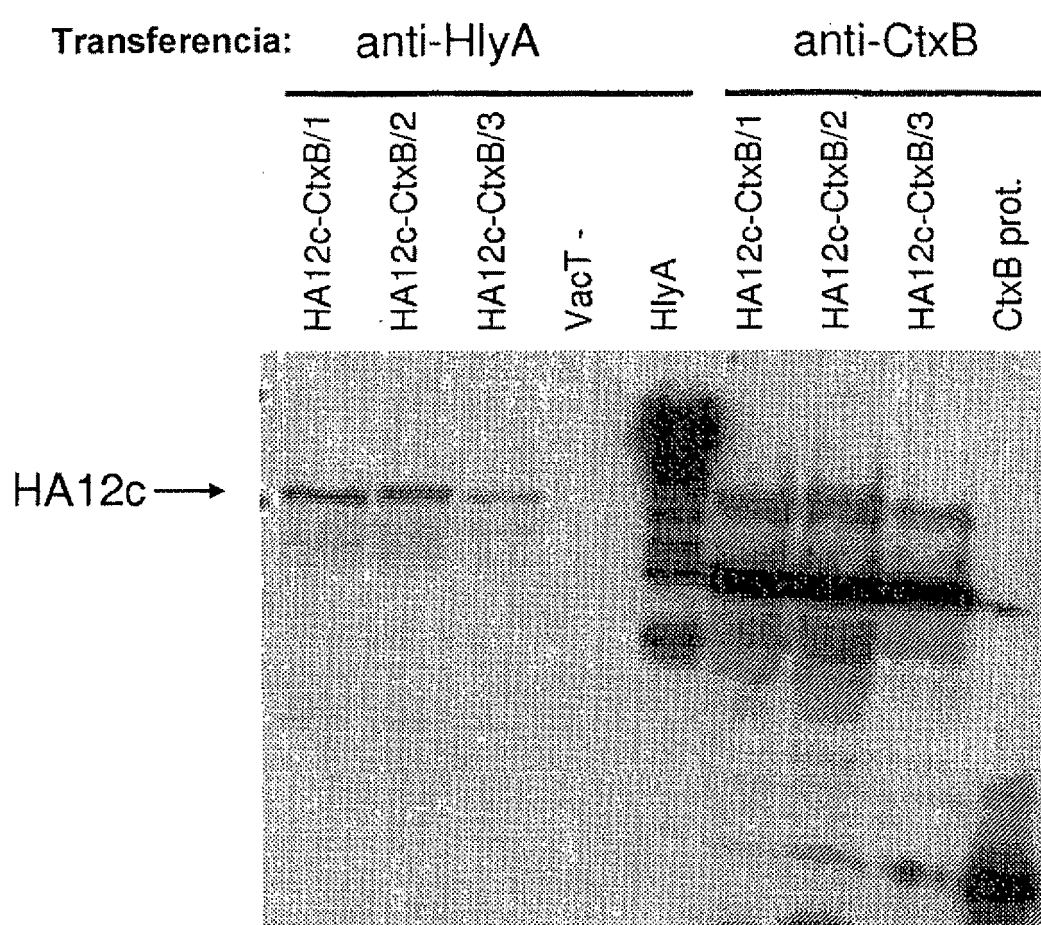


Figura 16

**CtxB-HA12c-HlyA:**

ATGACAACAATAACCACTGCACAAATTAAAAGCACACTGCAGTCTGCAAAGCAATCCGCT  
 GCAAATAAATTGCACTCAGCAGGACAAAGCACGAAAGATGCATCACCTCAAAATATTACT  
 GATTTGTGTGCAGAAATACCACAACACACAAATACATACGCTAAATGATAAGATAATTTTCG  
 TATACAGAATCTCTAGCTGGAAAAAGAGAGATGGCTATCATTACTTTTAAGAATGGTGCA  
 ACTTTTCAAGTAGAAGTACCAGGTAGTCAACATATAGATTACAAAAAAAAGCGATTGAA  
 AGGATGAAGGATACCCCTGAGGATTGCATATCTTACTGAAGCTAAAGTCGAAAAAGTTATGT  
 GTATGGAAATAATAAAACGCCTCATGCGATTGCCGCAATGCCATCTGTCAAATGGAGAAA  
 ATAGTGCTTCTTTTTGCAATAGTCAGTCTTGTAAAAGTGATCAGATTTGCATGGTTAC  
 CATGCCAACTCGACAGAGCAGGTTGACACAATAATGGAAAAGAACGTIACITGTTACA  
 CATGCCCAAGACATACTGGAAAAGACACACAACGGGAAGCTCTGCGATCTAGATGGAGTG  
 AAGCCTCTAATTTTGGAGAGATTGTAGTGTAGCTGGATGGCTCCTCGGAAACCCAATGTGT  
 GACGAATTCATCAATGTGCCGGAATGGTCTACATAGTGGAGAAGGCCAATCCAGTCAAT  
 GACCTCTGTTACCCAGGGGATTTCAATGACTATGAAGAATTGAAACACCTATTGAGCAGA  
 ATAAACCATTTTGGAGAAAATTCAGATCATCCCCAAAAGTTCTTGGTCCAGTCATGAAGCC  
 TCATTAGGGGTGAGCTCAGCAITGCCATACCAGAGAAAGTCCCTCTTTTTCAGAAATGTG  
 GTATGGCTTATCAAAAAGAACAGTACATACCCAACAATAAAGAGGAGCTACAATAATACC  
 AACCAAGAAGATCTTTTGGTACTGTGGGGGATTCACCATCCTAATGATGCGGCAGAGCAG  
 ACAAAGCTCTATCAAAACCCAACCACCTATATTTCCGTTGGGACATCAACACIAAACAG  
 AGATTGGTACCAAGAATAGCTACTAGATCCAAAGTAAACGGGCAAAGTGGAAGGATGGAG  
 TTCTTCTGGACAATTTTAAACCGAATGATGCAATCAACTTCGAGAGTAATGGAAATTC  
 ATTGCTCCAGAATATGCATACAAAATTGICAAAGAAAGGGGACTCAACAAATTATGAAAAGT  
 GAATTGGAATATGGTAACTGCAACACCAAGTGTCAAACCTCAATGGGGGCGATAAATCTT  
 AGTATGCCATTCACAATATACACCCCTCTCACCATCGGGGAATGCCCCAAATATGTGAAA  
 TCAAACAGATTAGTCCTTGGGACTGGGCTCAGAAATAGCCCTCAAAGAGAGAGAAGAAGA  
 AAAAGAGAGGATTATTTGGAGCTATAGCAGGTTTTATAGAGGGAGGATGGCAGGGAATG  
 GTAGATGGTTGGTATGGGTACCACCATAGCAATGAGCAGGGGAGTGGGTACGCTGCAGAC  
 AAAGAATCCACTCAAAAAGGCAATAGATGGAGTCACCAATAAGGTCAACTCGATCATTGAC  
 AAAATGAACACTCAGTTTGAAGCCGTTGGAAGGGAAATTAACAACTTAGAAAGGAGAATA  
 GAGAATTTAAACAAGAAGATGGAAGACGGGTTCTAGATGTCTGGACTTATAATGCTGAA  
 CTTCTGGTTTCTCATGGAAAATGAGAGAATCTAGACTTTTCACTACTCAAATGTCAAGAAC  
 CTTTACGACAAGGTCCGACTACAGCTTAGGGATAATGCAAAGGAACTGGGTAACGGTTGT  
 TTCGAGTTCATCATAAATGTGATAATGAATGTATGGAAGTGTAAGAAACGGAACGTAT  
 GACTACCCGCGAGTATTCAGAAGAAGCAAGACTAAAAAGAGAGGAAATAAGTGAGTAGGG  
 CATGCATTAGCCTATGGAAGTCAGGGTGATCTTAATCCATTAATTAATGAAATCAGCAAA  
 ATCATTTAGCTGCAGGTAGCTTCGATGTTAAAGAGGAAAGAACTGCAGCTTCTTTATTG  
 CAGTTGTCCGGTAATGCCAGTGATTTTTTCATATGGACGGAACCAATAACCCCTGACCACA



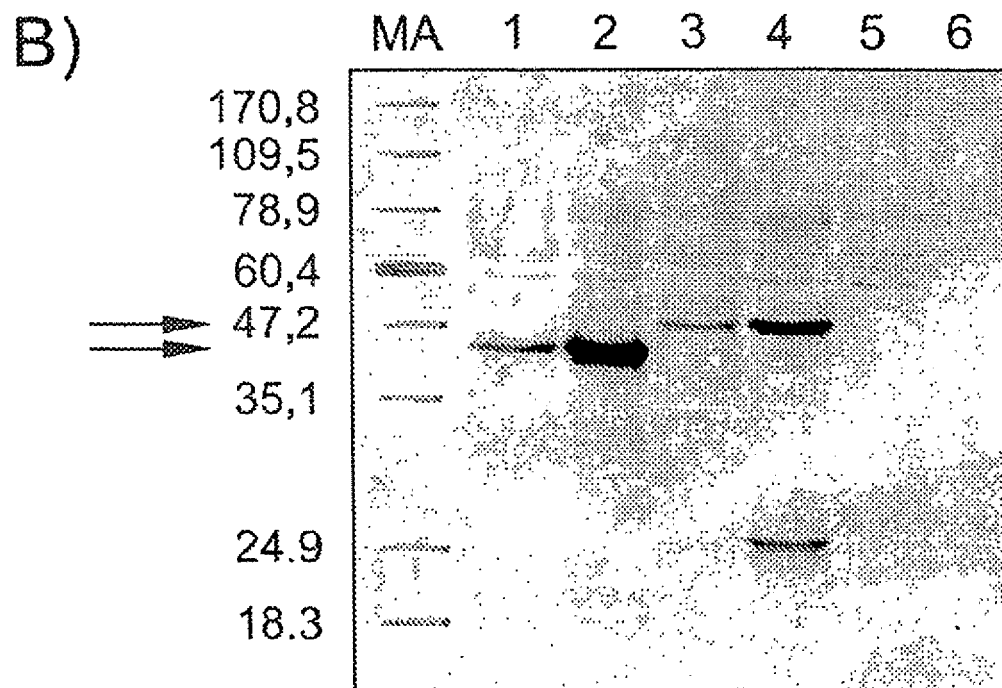
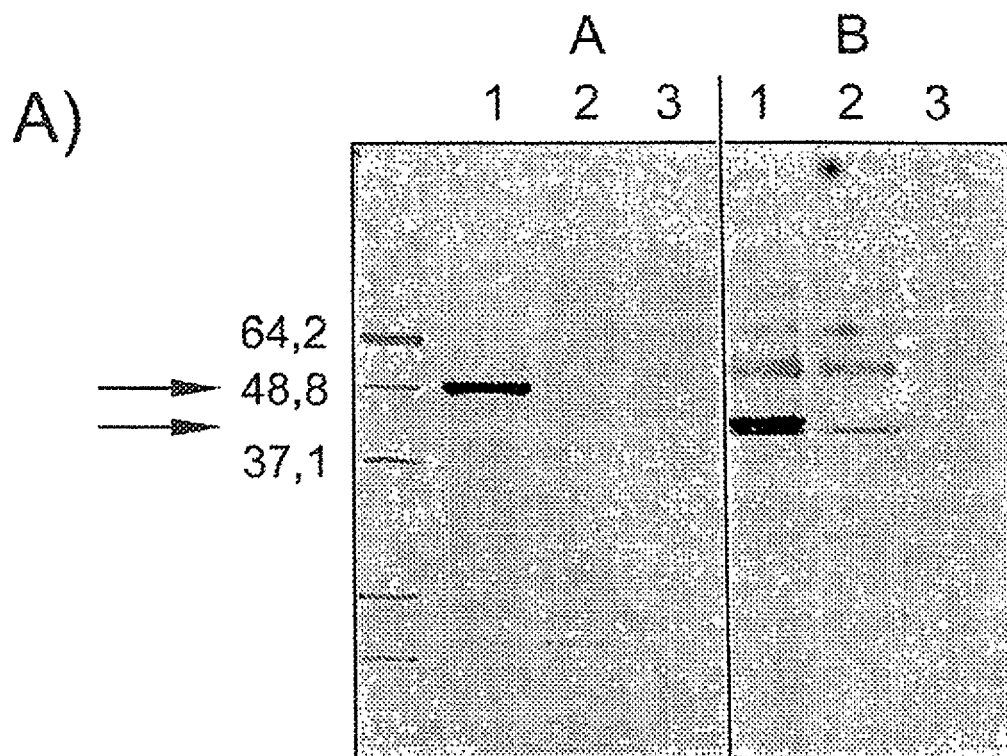


Figura 18

Vector pMKhly1 (secuencia completa):  
 LOCUS pMO Kan 12672 pb ADN CIRCULAR SIN 13-NOV-2006  
 DEFINICIÓN pMO Kan vector de secreción  
 CLAVES pMO Kan  
 ACCESO  
 FUENTE Desconocida  
 ORGANISMO Desconocido  
 No clasificado  
 REFERENCIA 1 (bases 1 a 12672)  
 AUTORES El mismo  
 PUBLICACIÓN No publicado  
 RASGOS Localización/Clasificador  
 CDS 2503..3015  
 /gen = "HlyC"  
 CDS 3027..3128  
 /gen = "5hlyA nter"  
 CDS 3129..3311  
 /gen = "3'hlyA"  
 /producto = "hlyA"  
 CDS 3383..5506  
 /gen = "hlyB"  
 /producto = "hlyB"  
 CDS 5525..6961  
 /gen = "hlyD"  
 /producto = "hlyD"  
 CDS complemento (11029..11823)  
 /gen = "KM-Res"  
 RECUENTO BASES 3420 a 2832 c 3095 g 3325 t

## ORIGEN

```

1 GAATTCGAAG CGAAGTCCAT CCCCCTCCCT CTTGATTACA AGGGTGATAA TTATTATTCG
61 CATTIGTGTG GTAATGGGAT AGAAAGGAAT GGATAGAAAA AGAACAAAAT TAGTATAGCA
121 ATAGATATGC CCACTGCAAT GAATACTTAC AGGGCATTAT TTTATTATCT TTAAATTGAA
181 GTGGTCTCTG GTTIGATTIA TTTGTTATTC AAGGGGGCTG TTIGGAGATC GGAAAAATCT
241 GTACGTAAAG TGTATTATTT AACCAGTTTC GATGCGTAAC AGATTGATTT TCGTCCAGCG
301 GTTATCGCTT TTAAGTTGTT GCTCTTGC GC TATCGCGTTT AGGTTATCCG ATTAAAGTCA
361 AATTTCCTGA AAATGCTGTA TAGCGCGGGA GTGCACCTTA TAGCTGTAGG TAAGTATGTT
421 CAAAAAATAG TCTTGCCGTA CAATAATTTT CCATATCCAA ACTCACTCCT TCAAGATTCT
481 GGTCCTGGTT TACGGGTAGT TTCCGGAAGG GCGGTAGCAT GCTGATTCAA ACTGCAAGAT
541 GAAACATTGT CGGAGTTGGA TGGAAATTAAG TCAATGGCTAT AGCATTGGGG CGTGCATAAC
601 AAAATTGGTC CTCATATTTT AGAGTATGAT TGCATATICA CTAATATTTT TACTTTCTGA
661 TCGGTGGTGG CATCATGCTT TATGAGATAA ACAATCCCTG TAGACTAGCC CCCGAAATCT
721 CCAGACAACC AATATCACTT ATTTAAGTGA TAGTCTTAAT ACTAGTTTTT AGACTAGTCA
781 TTGGAGAACA GATGATTGAT GTCTTAGGAT CGGAGAAACG CAGACGGCGT ACTACACAGG
841 AAAAGATCGC TATCGTTTCA GAGAGCTTTG AACCAGGAAT GACGGTCTCC CTTGTTGCCC
901 GGCAACATGG TGTGGCAGCC AGCCAGCTAT TTCTCTGGCG CAAGCAATAC CAGGAGGGAA
961 GCTTACTGCT TGTGGCTGCC GGAGAACAGG TCGTTCTCTG CTCTGAACTT GCTGCCGCCA
1021 TGAAGCAGAT TAAAGAGCTC CAGCGCCTGC TCGGCAAAAA AACGATGGAA AATGAATCC
1081 TTAAAGAAGC CGTTGAATAT GGGCGAGCAA AAAAGTGGAT AGCGCACGCG CCCTTATTGC
1141 CCGGGGATGG GGAGTAAGCT TCGTCAGCCG TTGTCTCCGG GTGTCCGCTG CGCAGTTGCA
1201 CGTCATTCTC AGACGAACCG ATGACTGGAA GGACGGCCGC CGCAGCCGTC ACACGGATGA
1261 TACGGATGTG CTTCGCCGTA TACATCATGT TATCGGAGAG CTGCCCACAT ATGGTTATCG
1321 TCGGGTATGG GCGCTGCTTC GCAGACAAAC AGAAGTTGAT GGTATGCCCTG CGATCAATGC
1381 CAAATGTGTT TACCGGATCA TGTGCCAGAA TCGCTGTGTT CTTGAGCGAA AACCCGCTGT
1441 ACCGCCATCG AAACGGGCAC ATACCGGCAG AGTGGCTGTG AAAGAAAGTA ATCAGCGATG
1501 GTGCTCTGAC GGGTTTGTAGT TCCGCTGTGA TAACGGAGAA AAACGTGCGG TCACGTTCCG

```

Figura 18 - continuación

```

1561 GCTGGACTGC TGTGATCGTG AGGCACIGCA CIGGGCGGTC ACAACGGGTG GCTTCAACAG
1621 TGAAACAGTA CAGGACGTCA TGCTGGGAGC AGTGGAAACG CGCTTTGGCA GCGAGCTTCC
1681 GGCCTCTCCA GGGAGTGGC TGACGGATAA TGGTTCATGC TACCGGGCGA ATGAAACACG
1741 TCAGTTCGCC AGGATGTTGG GACTTGAACC GAAGAACACG GCAGTGCGBA GTCCGGAGAG
1801 TAACGGAATA ACAGAGAGCT TCGTGAAGAC GATAAAGCGT GATTACATAA GTATCATGCC
1861 CAAACCAGAC GGGTTAACGG CAGCAAAGAA CCTTGCAGAG GCGTTCGAGC ATTATAACGA
1921 ATGGCATCCG CATAGTGCGC TGGGTTATCG CTCGCCACGG GAATATCTGC GGCAGCGGGC
1981 CAGTAATGGG TTAAGTGATA ACAGGTATCT GGAAATATAG GGGCAAATCC ACCTGGTCAT
2041 TATCTGGAAT TTGACGAAGT GTGATAACIG GTATAGCCAG ATTAATCTAA ACCTTIGTCT
2101 GACAAAATCA GATAAAGAAG AGTAGTTCAC AAGACAACCT GTGGACTCTC ATTACAGAG
2161 ATAGGCGTTA CCAAAATTTG TTTGGAACIG AACAAGAAAA TTGTATTTGT GTAACTATAA
2221 TCTTAATGTA AAATAAAGA CACCAGTTCT GTAGAATATG CTTATTGAAG AGAGTGTAAI
2281 AATAATTTTA TATAGATGTT GTACAAAGAA CAGGAATGAG TAATTATTTA TGCITGATGI
2341 TTTTGTACTC TTGCTTTTTA TAGTTATTAI TTTTAAGITA GTCAGCGCAA TAAAAACTTG
2401 CTTTTAATAT TAATGCGAGI TATGACATTA AACGGAAGAA ACATAAAGGC ATATTTTTCG
2461 CACAATATTT AATCATATAA TTTAAGTTGT AGTGAGTTTA TTATGAATAT AAACAAACCA
2521 TTAGAGATTG TTGGGCATGT ATCCTGGCIA TGGGCCAGTT CTCCACTACA CAGAAACIGG
2581 CCAGTATCTT TGTITGCAAT AAATGTATTA CCCGCAATAC AGGCTAACCA ATATGTTTTA
2641 TTAACCCGGG AIGATTACCC IGTCGCGTAT TGTAGTTGGG CTAATTTAAG TTTAGAAAAI
2701 GAAATTAAT ATCTTAATGA TGTACCTTCA TTAGTTGCAG AAGACTGGAC TTCAGGTGAT
2761 CGTAAATGGT TCAITGACTG GAITGCTCCT TTCGGGGATA ACGGIGCCCT GTACAAATAT
2821 ATGCGAAAAA AATTCCTTGA TGAACATTTT AGAGCCATCA GGGTGGATCC CAAAACCTCAI
2881 GTTGGIAAAG TATCAGAATT TCATGGAGGT AAAATTGATA AACAGTTAGC GAATAAAATT
2941 TTTAAACAAT ATCACCACGA GTTAATAACT GAAGTAAAAA GAAAGTCAGA TTTTAATTTT
3001 TCATTAACTG GTTAAGAGGT AATTAAATGC CAACAATAAC CACTGCACAA ATTTAAAGCA
3061 CACTGCAGTC TGCAAGCAA TCCGCTGCAA ATAAATTGCA CTCAGCAGGA CAAAGCACGA
3121 AAGATGCATT AGCCTATGGA AGTCAGGGIG ATCTTAATCC ATTAATTAAT GAAATCAGCA
3181 AAATCAITTC AGCIGCAGGT AGCTTCGATG TTAAGAGGGA AAGAACTGCA GCTTCTTTAT
3241 TGCAGTTGTC CGGTAATGCC AGTGATTTIT CATATGGACG GAACTCAATA ACCCTGACCA
3301 CATCAGCATA ATATATTAAT TTAAATGATA GCAATCTTAC TGGGCTGTGC CACATAAGAT
3361 TGCATTTTTT TTTGGAGTCA TAATGGATTG TTGTCATAAA ATTGATTATG GGTATACGC
3421 CCTGGAGATT TTAGCCCAAT ACCATAACGT CTCTGTAAAC CCGGAAGAAA TTAACATAG
3481 ATTTGATACA GACGGGACAG GTCTGGGATT AACGTCTATG TTGCTTGCTG CGAAATCTTT
3541 AGAACTAAAG GTAAACAGG TAAAAAAAC AATTGATCGA TTAACITTA TTTTCTGCC
3601 CGCATTAGIC TGGAGAGAGG ATGGACGTCA TTTTATTCIG ACTAAATCA CAAAGAGGT
3661 AAACAGATAT CTTATTTTTG ATTTGGAGCA GCGAAATCCC CGTGTCTCTG AACAGTCTGA
3721 GTTTGAGGCG TTATATCAGG GGCATATTAI TCTTATTACI TCCCGTICTT CTGTTACCGG
3781 GAAACTGGCA AAATTTIGACT TTACCTGGTT TATTCCTGCC ATTATAAAAT ACAGGAGAAI
3841 ATTTATTGAA ACCCTTGTG TATCTGTTTT TTTACAATTA TTTGCATTAA TAACCCCCCT
3901 TTTTTTCCAG GTGGTTAIGG ACAAAGTATT AGTGCACAGG GGGTTTTCAA CCCTTAATGT
3961 TATTACTGTT GCATTATCTG TTGTAGTGGT GTTTGAGATT ATACTCAGCG GTTTAAGAAC
4021 TTACATTTTT GCACATAGTA CAAGTCGGAT TGATGTTGAG TTGGGTGCCA AACTCTTCCG
4081 GCATTTTACTG GCGCTACCGA TCTCTTATTT TGAGAGTCGT CGTGTGGIG ATACTGTTCG
4141 GAGGGTAAAG GAATTAGACC AGATCCGTAA TTTTCTGACA GGACAGGCAT TAACATCTGT
4201 TTTGGACTTA TTATTTTTCAC TCATATTTTT TGCGGTAAAT IGGTATTACA GCCCAAAGCT
4261 TACTCTGGTG ATCTTATTTT CGCTGCCTTG TTATGCTGCA TGGTCTGTTT TTATTAGCCC
4321 CATTTTGCAG CGTCGCCITG ATGATAAGTT TTCACGGAAT GCGGATAATC AATCTTTCTT
4381 GGTGGAATCA GTAACGGCGA TTAACACTAT AAAAGCTATG GCAGTCTCAC CTCAGATGAC
4441 GAACATATGG GACAAACAAT TGGCAGGATA TGTTCGTGCA GGCTTTAAAG TGACAGTATT
4501 AGCAACCATT GGTCAACAAG GAATACAGTT AATACAAAAG ACIGTTATGA TCATCAACCT
4561 ATGGTTGGGA GCACACCTGG TTATTTCCGG GGATTTAAGT ATTTGGTCAGT TAATTGCTTT
4621 TAATATGCTT GCTGGTCAQA TTGTTGCACC GGTTATTCGC CTTCACAAA TCTGGCAGGA
4681 TTTCCAGCAG GTTGGTATAT CAGTTACCGG CCTTGGTGAT GTGCTTAAC CTCCAAGTA
4741 AAGTTATCAT GGGAAACIGA CATTGCCGGA AATTAATGGT GATATCACTT TTCGTAATAT
4801 CCGGTTTCGC TATAAACCTG ATTCTCCGGT TATTTTGGAC AATATCAATC TTAGTATTTA
4861 GCAGGGGGAG GTTATTGGTA TTGTCGGACG TTCTGGTTCA GGAAAAAGCA CATTAACATA
4921 ATTAATTCAC CGTTTTTATA TTCTGAAAA TGGCCAGGTA TTAATTGATG GACATGATCT

```

Figura 18 - continuación

```

4981 TCGGTGGCT GATCCIAACT GGTACGTCG TCAGGTGGGG GTTGIGTTGC AGGACAAIGT
5041 GCTGCTTAAT CGCAGTATTA TTGATAATAT TTCCTGGCT AATCCTGGCA TGTCCGTCGA
5101 AAAAGTTATT TATGCAGCGA AATTAGCAGG CGCICATGAT TTTATTICTG ATTTGCGTGA
5161 GGGGTATAAC ACCATTGTCTG GGGAACAGGG GGCAGGATTA TCCGGAGGTC AACGTCAACG
5221 CATCGCAATT GCAAGGGCGC TGGTGAACAA CCGTAAAATA CTCATTTTTG ATGAAGCAAC
5281 CAGTGCTCTG GATTAIGAGT CGGAGCATGT CATCATGCGC AATAIGCACA AAATATGTAA
5341 GGGCAGAACG GTTATAATCA TTGCTCATCG TCTGTCTACA GTAAAAATG CAGACCGCAT
5401 TATTGTCTATG GAAAAAGGGA AAATTGTGTA ACAGGGTAAA CATAGGAGC TGCTTTCTGA
5461 ACCGGAAAGT TTATACAGTT ACTTATATCA GTTACAGTCA GACTAACAGA AAGAACAGAA
5521 GAATATGAAA ACATGGTTAA TGGGGTTCAG CGAGTTCCTG TTGCGCTATA AACTTGCTCTG
5581 GAGTGAAACA TGGAAAATCC GGAAGCAAT AGATACTCCG GTACGTGAAA AGGACGAAAA
5641 TGAATTCTTA CCCGCTCATC TGGAAATTAAT TGAAACGCCA GTATCCAGAC GGCCGCGTCT
5701 GGTIGCTTAT TTTATTATGG GGTTCCTGGT TATTGCTTTT ATTTTATCTG TTTTAGGCCA
5761 AGTGGAAATT GTTGCCACTG CAAATGGGAA ATTAACACAC AGTGGGCGTA GTAAAGAAAT
5821 TAAACCTATT GAAAACCTAA TAGTTAAAGA AATTATCGTA AAAGAAGGAG AGTCAGTCCG
5881 GAAAGGGGAT GTGTATTTAA AGCTTACAGC ACTGGGAGCT GAAGCTGATA CGTTAAAAAC
5941 ACAGTCATCA CTGTTACAGG CCAGGCTGGA ACAAACTCGG TATCAAATTC TGAGCAGGTC
6001 AATTGAATTA AATAAACTAC CTGAACATAA GCTTCCTGAT GAGCCTTATT TTCAGAATGT
6061 ATCTGAAGAG GAAGTACTGC GTTAACTTC TTGTATAAAA GAACAGTTTT CCACATGGCA
6121 AATCAGAAAG TATCAAAAAG AACTGAATTT GGATAAGAAA AGAGCAGAGC GATTAACAGT
6181 ACTTGCCCGT ATAAACCGTT ATGAAAATTT ATCAAGGGTT GAAAAAGCC GCTGGATGA
6241 TTTCACTAGT TTATTGCATA AACAGGCAAT TGCAAAACAT GCTGTACTTG AGCAGGAGAA
6301 TAAATATGTC GAAGCAGTAA ATGAATTACG AGTTTATAAA TCACAACTGG AGCAAAATGA
6361 GAGTGAGATA TTGCTGCAA AAGAAGAATA TCAGCTTGTT ACGCAGCTTT TTAATAATGA
6421 AATTTTAGAT AAGCTAAGAC AAACAACAGA CAACATTGGG TTATTAATCT TGAATTAGC
6481 GAAAAATGAA GAGCGTCAAC AGGCTTCAGT AATCAGGGCC CAGTTTCGG GAAAAGTTCA
6541 GCAACTGAAG GTTCATACTG AAGGTGGGGT TGTTACAACA GCGGAAACAC TGATGGTCAT
6601 CGTTCGGGAA GATGACACGC TGGAGGTTAC TGCTCTGGTA CAAAATAAAG ATATTGTTTT
6661 TATTAACGTC GGGCAGAATG CCATCATTAA AGTGGAGGCA TTTCCTTATA CACGATATGG
6721 TTATCTGGTG GGTAAAGGTGA AAAATATAAA TTTAGATGCA ATAGAAGACC AGAGACTGGG
6781 ACTTGTTTTT AATGTTATTA TTTCTATTGA AGAGAATTGT TTGTCAACCG GGAATAAAAA
6841 CATTCATTA AGCTCGGGTA TGGCAGTCA TSCAGAATA AAGACAGGTA TGCGAAGTTG
6901 AATCAGTTAT CTTCCTAGTC CTTIAGAAGA GTCAGTAAAC GAAAGTTTAC GTGAGCGTTA
6961 AGTTTCAGAA GTCCAGTATT TGCTGCTATA CGTGCTGCGT GGCCTTGCC GTCTGAACGG
7021 CATTCATCCG GAAGCCAAAGT CAAACAACAG CGTGATGAGC GTCAGGGCAA AACACCAAGG
7081 CTCCTCTCAT GACACCAGAA CAAATTGAAA TACGTGAGCT GAGGAAAAAG CTACCGAGTT
7141 CTTGATGTTG GACTCCCTGA ACAGTCTCTC GTATTCGGGA AACTCAGGAC CGGTTATCTT
7201 GTGGTACAC TCTGCCATGT GTTTAGGGTT CATCACAGCA GCTACAGATA CTGTTAAAAAC
7261 CGTCCGAAA AACGAGACGG CAGACGGGCT GTATTACGTA GTCAGGTACT TGAGCTACAT
7321 GGCATCAGTC ACGGTTTGGC CGGAGCAAGA CGTATCACC CAATGGCAAC CCGGAGAGGT
7381 GTCAGCGCCA GTGATATAAG ACGGTTAACG GTTAAAAATC GTGGCGTTGA CAACATCCCA
7441 GTGGACTGAG GTCACACAGG CCTGGCAGCA TTCTCTTCC GGCCGGATGA CCCGGATTTT
7501 ACGGGGAAA TACGCCGATA ACAGTTTACG GGCTGAAGAT TGGCGTAGGG AGGATAGCAG
7561 ACGTTTTGCC GCCCCCATTTG TCTGGAGTTG GGTGAGAAGG CATCATTTCA CCAACACCAA
7621 CATTTACAG TTACACCCCA CAGCTACATG AAGCGCTTCC ATGAATTATC GCTTTGATTT
7681 ATCATGTTAA AATAGCTCTA CACGGTTGGT TCAGGATTGC GCACCGAAAC CCTCTAAAAAT
7741 CCACGTACGC GCTGCGAAT TATCCAGCAC CGCGCCTTTC GAGATCCTCT ACGCCGGACG
7801 CATCGTGGCC GGCATCACCG GCGCCACAGG TCGGTTTGT GCGCCCTATA TCGCCGACAT
7861 CACCGATGGG GAAGATCGGG CTCGCCACTT CGGGCTCATG AGCGCTTGT TCGGCGTGGG
7921 TATGGTGGCA GGCCCGGTGG CCGGGGGACT GTTGGGCGCC ATCTCCTTGC ATGCACCATT
7981 CCTTGGGCG GCGGTGCTCA ACGGCCTCAA CCTACTACTG GGCTGCTTCC TAATGCAGGA
8041 GTCCGATAAG GGAGAGCGTC GACCGATGCC CTTGAGAGCC TTCAACCCAG TCAGCTCCTT
8101 CCGGTGGGCG CGGGGCATGA CTATCGTCCG CGCACTTATG ACTGTCTTCT TTATCATGCA
8161 ACTCGTAGGA CAGGTGCCGG CAGCGCTCTG GGTCAATTTT GGCGAGGACC GCTTTCGCTG
8221 GAGCGGACG ATGATCGGCC TGTGCTTGG GGTATTCGGA ATCTTGACAG CCCTCGCTCA
8281 AGCCTTCGTC ACTGTCCTCG CCACCAAAAG TTTCGGCGAG AAGCAGGCCA TTATCGCCGG
8341 CATGGCGGCC GACGCGCTGG GCTACGTCTT GCTGGCGTTC GCGACGCGAG GCTGGATGGC

```

Figura 18 - continuación

```

8401 CTTCCTCCATT ATGATTCCTC TCGCTTCCGG CGGCATCGGG ATGCCCCGGT TGCAGGCCAT
8461 GCTGTCCAGG CAGGTAGATG ACGACCATCA GGGACAGCTT CAAGGATCGC TCGCGGCTCI
8521 TACCAGCCTA ACTTCGATCA TTGGACCGCT GATCGTCACG GCGATTIATG CCGCCTCGGC
8581 GAGCACATGG AACGGGTTGG CATGGATTGT AGGCGCCGCC CTATACCTTG TCTGCTCCC
8641 CGCGTTGCGT CGCGGTGCAI GGAGCCGGGC CACCTCGACC TGAATGGAAG CCGGCGGCAC
8701 CTCGCTAACG GATTCACCAC TCCAAGAATT GGAGCCAATC AATTCITGCG GAGAACTGTG
8761 AATGCGCAAA CCAACCCCTG GCAGAACATA TCCATCGCGT CCGCCATCTC CAGCAGCCGC
8821 ACGCGGCGCA TCTCGGGCAG CGTTGGGTCC TGGCCACGGG TCGCATGAT CGTGCTCCTG
8881 TCGTTGAGGA CCCGGCTAGG CTGGCGGGGT TGCCCTIACG GTTAGCAGAA TGAATCACC
8941 ATACCGGAGC GAACGTGAAG CGACTGCTGC TGCAAAACGT CTGCGACCTG AGCAACAACA
9001 TGAATGGTCT TCGGTTTCCG TGTTCGTAA AGTCTGGAAG CCGGGAAGTC AGCGCCCTGC
9061 ACCATTATGT TCCGATCTG CATCGCAGGA TGCTGCTGGC TACCCTGTGG AACACCTACA
9121 TCTGTATTAA CGAAGCGCTG GCATTGACCC TGAGTGATTI TTCTCTGGTC CCGCGCATC
9181 CATACCGCCA GTTGTITACC CTCACAACGT TCCAGTAACC GGCATGTTC ATCATCAGTA
9241 ACCCGTATCG TGAGCATCCT CTCTCGTTTC ATCGGIATCA TTACCCCAT. GAACAGAAAT
9301 CCCCCTTACA CGGAGGCATC AGTGACCAAA CAGGAAAAAA CCGCCCTTAA CATGGCCCGC
9361 TTTATCAGAA GCCAGACATT AACGCTTCTG GAGAACTICA ACGAGCTGGA CCGGATGAA
9421 CAGGCAGACA TCTGTGAATC GCTTCACGAC CACGCTGATG AGCTTTACCG CAGCTGCCTC
9481 GCGCGTTTCG GTGATGACGG TGAAAACCTC TGACACATGC AGCTCCGGA GACGGTCACA
9541 GCTTGTCTGT AAGCGGATGC CGGGAGCAGA CAAGCCCGTC AGGGCGGTC AGCGGTGTT
9601 GCGCGGTGTC GGGGCGCAGC CATGACCCAG TCACGTAGCG ATAGCGGAGT GTAIACCTGC
9661 TTAACATATG GGCATCAGAG CAGATTGTAC TGAGAGTGCA CCATATGCGG TGTGAAATAC
9721 CGCACAGATG CGTAAGGAGA AAATACCGCA TCAGGCGCTC TTCCGCTTCC TCGCTCACTG
9781 ACTCGCTGCG CTCGGTCTGT CGGCTGCGGC GAGCGGTATC AGCTCACTCA AAGGCGGTAA
9841 TACGGTTATC CACAGAAICA GGGGATAACG CAGGAAAGAA CATGTGAGCA AAAGGCCAGC
9901 AAAAGGCCAG GAACCGTAAA AAGGCCGCGT TGCTGGCGTT TTTCCATAGG CTCCGCCCCC
9961 CTGACGAGCA TCACAAAAAT CGACGCTCAA GTCAGAGGTG GCGAAACCGC ACAGGACTAT
10021 AAAGATACCA GCGGTTTCCC CCTGGAAGCT CCTCGTGGC CTCTCCTGTT CCGACCTGTC
10081 CGCTTACCGG ATACCTGTCC GCCTTTCTCC CTTGCGGAAG CGTGGCGCTT TCTCATAGCT
10141 CACGCTGTAG GIATCTCAGT TCGGTGTAGG TCGTTCGCTC CAAGCTGGGC TGTGTGCACG
10201 AACCCTCCGT TCAGCCCGAC CGCTGCGCCT TATCCGGTAA CTATCGTCTT GAGTCCAACC
10261 CCGTAAGACA CGACTTATCG CCACTGGCAG CAGCCACTGG TAACAGGATT AGCAGCGCA
10321 GGTATGTAGG CGGTGCTACA GAGTCTTGA AGTGTGTGCC TAACIACGCG TACACTAGAA
10381 GGACAGTATT TGGTATCTGC GCTCTGCTGA AGCCAGTTAC CTTCGAAAA AGAGITGGTA
10441 GCTCTTGAAT CCGCAAAACA ACCACCGCTG GIAGCGGTGG TTTTTTTGTT TGCAAGCAGC
10501 AGATTACGCG CAGAAAAAAA GGATCTCAAG AAGATCCTTT GATCTTTCTI ACGGGGICTG
10561 ACGCTCAGTG GAACGAAAAC TCACGTTAAG GGATTTTGGT CATGAGATTA TCAAAAAGGA
10621 TCTTCACCTA GATCCTTTTA AATTAATAAT GAAGTTTIAA ATCAATCTAA AGTATATATG
10681 AGTAAACTTG GTCTGACAGT TACCAATGCT TAATCAGTGA GGCACCTATC TCAGCGATCT
10741 GTCTATTTTC TTATCCATA GTTGCCTGAC TCCCCATATG AATATCTTCC TTAGTTCCTA
10801 TTCCGAAGTT CCTATTCTCT AGAAAGTATA GGAATTCAG AGCGCTTTTG AAGCTGGGGT
10861 GGGCGAAGAA CTCCAGCATG AGATCCCCGC GCTGGAGGAT CATCCAGCCG GCGTCCCAGA
10921 AAACGATTCC GAAGCCCAAC CTTTCATAGA AGGCGGCGGT GGAATCGAAA TCTCGTGAIG
10981 GCAGGTITGG CGTCTGCTTG TCGGTATTTI CGAACCCAG AGTCCCGCTC AGAAGAACTC
11041 GTCAAGAAAG CGATAGAAGG CGATGCGCTG CGAATCGGGA GCGGCGATAC CGTAAAGCAC
11101 GAGGAAGCGG TCAGCCCATT CCGCGCCAAG CTCTTCAGCA ATATCACGGG TAGCCAACGC
11161 TATGTCTTGA TAGCGGTCCG CCACACCCAG CCGGCCACAG TCGATGAATC CAGAAAAGCG
11221 GCCATTTTCC ACCATGATAT TCGCAAGCA GGCATCGCCA TGGGTACAGA CGAGATCCTC
11281 GCGTCTGGGC ATGCGCGCCT TGAGCCTGGC GAACAGTTCG GCTGGCGCGA GCGCTGTATG
11341 CTCTTCGTCC AGATCATCCT GATCGACAAG ACCGCGTTCC ATCCGAGTAC GTGCTCGCTC
11401 GATGCGATGT TTCGCTTGGT GGTGGAATGG GCAGGTAGCC GGATCAAGCG TATGACCGC
11461 CCGCATTTGA TCAGCCATGA TGGATACTTT CTCGGCAGGA GCAAGGTGAG ATGACAGGAG
11521 ATCTGCCCC GGCACITCGC CCAATAGCAG CCAGTCCCTT CCGGCTTCAG TGACAACGTC
11581 GAGCACAGCT GCGCAAGGAA CGCCCGTCTG GGCCAGCCAC GATAGCCGCG CTGCTCTGTC
11641 CTGCAATTCA TTCAGGGCAC CGGACAGGTC GGTCTTGACA AAAAGAACCG GCGCGCCCTG
11701 CGCTGACAGC CGGAACACGG CGGCATCAGA GCAGCCGATT GTCTGTTGTG CCCAGTCATA
11761 GCCGAATAGC CTCTCCACCC AAGCGCGCGG AGAACCTGCG TGCAATCCAT CTGTTCAT

```

## Figura 18 - continuación

```

11821 CATGCGAAAC GATCCTCAIC CTGTCICTTG ATCAGATCTT GATCCCCTGC GCCATCAGAT
11881 CCTTGGCGGC AAGAAAGCCA ICCAGTTTAC TTTCAGGGC TTCCCAACCT TACCAGAGGG
11941 CGCCCCAGCT GGCAATTCCG GTTCGCTTGC TGTCCATAAA ACCGCCCAGT CTAGCTATCG
12001 CCATGTAAGC CCACTGCAAG CTACCTGCTT TCTCTTTGCG CTTCGTTTTT CCCTTGTCCA
12061 GATAGCCCAAG TAGCTGACAT TCATCCGGGG TCAGCACCGT TTCTGCGGAC TGGCTTTCTA
12121 CGTGTCCGC TTCTTTTAGC AGCCCTTGCG CCCTGAGTGC TTGCGGCAGC GTGGGGGATC
12181 TTGAAGTCC TATTCGAAG TTCCTATTCT CTAGAAAGTA TAGGAACCTC GAAGCAGCTC
12241 CAGCCTACAC CAAAAAAGGG AATAAGGGCG ACACGGAAAT GTTGAATACT CATACTCTTC
12301 CTTTTTCAAT ATTATTGAAG CATTTATCAG GGTTATTGTC TCAIGAGCGG ATACATATTT
12361 GAATGTATTT AGAAAAATAA ACAAATAGGG GTTCCGCGCA CATTTCCCCG AAAAGTGCCA
12421 CCTGACGTCT AAGAAACCAT TATTATCATG ACATTAACTT ATAAAAATAG GCGIATCACG
12481 AGGCCCTTTC GTCTTCAAGA ATTCTCATGT TTGACAGCTT ATCAICGATG GACATTATTT
12541 TTGTGGAGCC GGAGGAAACA GACCAGACGG TTCAGATGAG GCGCTTACCA CCAGAACCGC
12601 TGTGTCCCA CCATTCTGGC GATTCCCAA CGCTATTGTT ATAAAAAGTA GCCTTAACGT
12661 GGTTTATTTT CC

```

//

# ES 2 347 019 T3

## LISTA DE SECUENCIAS

<110> Zentaris GmbH

5 <120> Microorganismos como portadores de secuencias de nucleótidos que codifican antígenos y toxinas proteicas, procedimiento para su fabricación y usos de los mismos

<130> 06/02 Z

10

<160> 40

<170> PatentIn versión 3.3

15

<210> 1

<211> 61

<212> ADN

20

<213> artificial

<220>

<223> secuencia de ADN artificial

25

<400> 1

30

gagtattcaa catttcogtg tcgcccttat tccctttttt ggtgtaggct ggagctgctt 60  
c 61

<210> 2

35

<211> 60

<212> ADN

<213> artificial

<220>

40

<223> secuencia de ADN artificial

<400> 2

45

gcgatctgtc tatttcgttc atccatagtt gctgactcc ccatatgaat atcctcctta 60

<210> 3

50

<211> 21

<212> ADN

<213> artificial

55

<220>

<223> secuencia de ADN artificial

60

<400> 3

gattggatgat gcatccctca t 21

65

<210> 4

<211> 21

## ES 2 347 019 T3

<212> ADN  
<213> artificial

5 <220>  
<223> secuencia de ADN artificial

<400> 4

10 ggtgctcatg cattggccac g 21

<210> 5  
15 <211> 37  
<212> ADN  
<213> artificial

20 <220>  
<223> secuencia de ADN artificial

25 <400> 5  
aaaaaagtcg acggctgtgc aggtcgtaaa tcactgc 37

30 <210> 6  
<211> 39  
<212> ADN  
35 <213> artificial

<220>  
<223> secuencia de ADN artificial

40 <400> 6  
aaaaaagcgg ccgcgaaatt gttatccgct cacaattcc 39

45 <210> 7  
<211> 46  
<212> ADN  
50 <213> artificial

<220>  
<223> secuencia de ADN artificial

55 <400> 7  
aaaaaagcgg ccgctaagga tgaattatga ttaaattaaa atttgg 46

60 <210> 8  
<211> 42  
65 <212> ADN  
<213> artificial



## ES 2 347 019 T3

<220>

<223> secuencia de ADN artificial

5 <400> 8

tttatagtcg acttaatttg ccataactaat tgcggcaatc gc

42

10 <210> 9

<211> 36

<212> ADN

15 <213> artificial

<220>

<223> secuencia de ADN artificial

20

<400> 9

gcatatgcac atgcatcacc tcaaaatatt actgat

36

25

<210> 10

<211> 44

<212> ADN

30

<213> artificial

<220>

35 <223> secuencia de ADN artificial

<400> 10

ggctttttta tatcttatgc atgcccgggc attgcggcaa tgc

44

40

<210> 11

<211> 18

45

<212> ADN

<213> artificial

<220>

50

<223> secuencia de ADN artificial

<400> 11

gtgggaggct gggagtgc

18

55

<210> 12

60

<211> 18

<212> ADN

<213> artificial

65

<220>

<223> secuencia de ADN artificial

# ES 2 347 019 T3

	<400> 12	
5	gggggttggcc acgatggt	18
	<210> 13	
	<211> 29	
10	<212> ADN	
	<213> artificial	
	<220>	
15	<223> secuencia de ADN artificial	
	<400> 13	
20	catgtatgca ttagccatgg tatacctgg	29
	<210> 14	
25	<211> 33	
	<212> ADN	
	<213> artificial	
30	<220>	
	<223> secuencia de ADN artificial	
	<400> 14	
35	ttttttatgc ataagggaac caccacatct gcc	33
40	<210> 15	
	<211> 18	
	<212> ADN	
	<213> artificial	
45	<220>	
	<223> secuencia de ADN artificial	
50	<400> 15	
	gccatcatgt cagctcta	18
55	<210> 16	
	<211> 18	
	<212> ADN	
60	<213> artificial	
	<220>	
	<223> secuencia de ADN artificial	
65		

# ES 2 347 019 T3

<400> 16

aggggaaaca catctgcc

18

5

<210> 17

<211> 18

10 <212> ADN

<213> artificial

<220>

15 <223> secuencia de ADN artificial

<400> 17

atctgtcaaa tggagaaa

18

20

<210> 18

25 <211> 21

<212> ADN

<213> artificial

30 <220>

<223> secuencia de ADN artificial

<400> 18

35

tactccactt atttcctctc t

21

<210> 19

40

<211> 87

<212> ADN

<213> artificial

45

<220>

<223> secuencia de ADN artificial

50 <400> 19

ctgaattcat gaaaatatca tcatttatct ctacatcact gccctgccg gcatcagtg  
caaataaagt aaaatgttat gttttat

60

87

55

<210> 20

<211> 32

60 <212> ADN

<213> artificial

<220>

65 <223> secuencia de ADN artificial

## ES 2 347 019 T3

	<400> 20	
5	gttttccata ctgattgccg caattgaatt gg	32
	<210> 21	
	<211> 21	
10	<212> ADN	
	<213> artificial	
	<220>	
15	<223> secuencia de ADN artificial	
	<400> 21	
20	gtgggaggct gggagtgcga g	21
	<210> 22	
25	<211> 32	
	<212> ADN	
	<213> artificial	
30	<220>	
	<223> secuencia de ADN artificial	
	<400> 22	
35	cctgaattct tagaogtgat accttgaagc ac	32
40	<210> 23	
	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> artificial	
45	<220>	
	<223> secuencia de ADN artificial	
50	<400> 23	
	taaaaatctg gattgttggg ttg	23
55	<210> 24	
	<211> 23	
	<212> ADN	
60	<213> artificial	
	<220>	
	<223> secuencia de ADN artificial	
65		

ES 2 347 019 T3

<400> 24

5 atcatttgtc catccttcac ctg 23

<210> 25

&lt;211&gt; 19

10 <212> ADN

<213> artificial

 $\langle 220 \rangle$ 

<sup>15</sup> <223> secuencia de ADN artificial

<400> 25

20 gattgggaga ttcttgatg 19

&lt;210&gt; 26

25 <211> 21

<212> ADN

<213> artificial

30  $\langle 220 \rangle$ 

<223> secuencia de ADN artificial

<400> 26

35  
cccgtggaca ggaaacgcac c 21

40 <210> 27

&lt;211&gt; 33

<212> ADN

<213> artificial

45

 $\langle 220 \rangle$ 

<223> secuencia de ADN artificial

50      <400> 27

atcggatcct caaaatatta ctgatttgtg tgc 33

55

<210> 28

<211> 36

<212> ADN

60 <213> artificial

 $\langle 220 \rangle$ 

<223> secuencia de ADN artificial

65

# ES 2 347 019 T3

<400> 28

tagggatcct tagtggacag gaaaagcacc atatcc

36

5

<210> 29

<211> 285

10 <212> ADN

<213> artificial

<220>

15 <223> secuencia de ADN artificial

<400> 29

20 atgccaacaa taaccactgc acaaattaaa agcacactgc agtctgcaaa gcaatccgct 60

gcaaataaat tgcactcagc aggacaaagc acgaaagatg cattagccta tggaaagtcag 120

ggtgatctta atccattaat taatgaaatc agcaaaatca tttcagctgc aggtagcttc 180

25 gatgttaaag aggaaagaac tgcagcttct ttattgcagt tgtccggtaa tgccagtgat 240

ttttcatatg gacggaactc aataaccctg accacatcag cataa 285

30 <210> 30

<211> 2124

<212> ADN

35 <213> artificial

<220>

<223> secuencia de ADN artificial

40

45

50

55

60

65

# ES 2 347 019 T3

<400> 30

atggattctt gtcataaaat tgattatggg ttatacgccc tggagatttt agcccaatac 60  
 5 cataacgtct ctgttaaccc ggaagaaatt aaacatagat ttgatacaga cgggacaggt 120  
 ctgggattaa cgtcatgggt gcttgctgcg aaatcttttag aactaaaggt aaaacaggta 180  
 10 aaaaaaacia ttgatcgatt aaactttatt tttctgcccg cattagtctg gagagaggat 240  
 ggacgtcatt ttattctgac taaaatcagc aaagaagtaa acagatatct tatttttgat 300  
 15 ttggagcagc gaaatccccg tgttctcgaa cagtctgagt ttgaggcgtt atatcagggg 360  
 catattattc ttattacttc ccgttcttct gttaccggga aactggcaaa atttgacttt 420  
 acctggttta ttctgccat tataaaatac aggagaatat ttattgaaac ccttggtgta 480  
 20 tctgtttttt tacaattatt tgcattaata accccccttt tttttcaggt gggtatggac 540  
 aaagtattag tgcacagggg gttttcaacc cttaatgtta ttactgttgc cttatctggt 600  
 25 gtagtgggtg ttgagattat actcagcggg ttaagaactt acatttttgc acatagtaca 660  
 agtcggattg atgttgagtt ggggtgcaaa ctcttcgggc atttactggc gctaccgatc 720  
 30 tcttattttg agagtcgtcg tgttggtgat actgttgcca gggtaagaga attagaccag 780  
 atccgtaatt ttctgacagg acaggcatta acatctgttt tggacttatt attttcactc 840  
 35 atattttttg cggtaatgtg gtattacagc ccaaagctta ctctggtgat cttattttcg 900  
 ctgccttggt atgctgcatg gtctgttttt attagcccca ttttgcgacg tcgccttgat 960  
 gataagtttt cacggaatgc ggataatcaa tctttcctgg tggaatcagt aacggcgatt 1020  
 40 aacactataa aagctatggc agtctcacct cagatgacga acatatggga caaacaattg 1080  
 gcaggatatg ttgctgcagg ctttaaagtg acagtattag caaccattgg tcaacaagga 1140  
 45 atacagttaa tacaaaagac tggtatgatc atcaacctat gggtgggagc acacctggtt 1200

50

55

60

65

## ES 2 347 019 T3

atttccgggg atttaagtat tggtcagtta attgctttta atatgcttgc tggtcagatt 1260  
 gttgcaccgg ttattgcct tgcacaaatc tggcaggatt tccagcaggt tggatatatca 1320  
 5 gttaccggcc ttggtgatgt gcttaactct ccaactgaaa gttatcatgg gaaactgaca 1380  
 ttgccggaaa ttaatggtga taccactttt cgtaatatcc ggtttcgcta taaacctgat 1440  
 10 tctccgggta ttttggacaa tatcaatctt agtattaagc agggggaggt tattggtatt 1500  
 gtcggaogtt ctgggtcagg aaaaagcaca ttaactaaat taattcaacg tttttatatt 1560  
 15 cctgaaaatg gccaggattt aattgatgga catgatcttg cgttggccga tcctaactgg 1620  
 ttacgtcgtc aggtgggggt tgtgttgag gacaatgtgc tgcttaatcg cagtattatt 1680  
 20 gataatattt cactggctaa tcctggcatg tccgtcgaaa aagttattta tgcagcgaaa 1740  
 ttagcagggtg ctcatgattt tatttctgaa ttgcgtgagg ggtataacac cattgtcggg 1800  
 gaacaggggg caggattatc cggagggtcaa cgtcaacgca tcgcaattgc aagggcgctg 1860  
 25 gtgaacaacc ctaaaatact catttttgat gaagcaacca gtgctctgga ttatgagtcg 1920  
 gagcatgtca tcatgcgcaa tatgcacaaa atatgtaagg gcagaacggt tataatcatt 1980  
 30 gctcatcgtc tgtctacagt aaaaaatgca gaccgcatta ttgtcatgga aaaagggaaa 2040  
 attggtgaac agggtaaac taaggagctg ctttctgaac cggaaagttt atacagttac 2100  
 35 ttatatcagt tacagtcaga ctaa 2124

<210> 31  
 40 <211> 1437  
 <212> ADN  
 <213> artificial  
 45 <220>  
 <223> secuencia de ADN artificial

50

55

60

65



# ES 2 347 019 T3

<400> 31

```

5      atgaaaacat gggttaatggg gttcagcgag ttctgtgtgc gctataaaact tgtctggagt   60
      gaaacatgga aaatccggaa gcaattagat actccggtac gtgaaaagga cgaaaatgaa  120
      ttcttaccog ctcatctgga attaattgaa acgccagtat ccagacggcc gcgtctgggt  180
10     gcttatttta ttatgggggtt tctgggttatt gcttttattt tatctgtttt aggccaagtg  240
      gaaattgttg ccaactgcaaa tgggaaatta acacacagtg ggcgtagtaa agaaattaaa  300

15
      cctattgaaa actcaatagt taaagaaatt atcgtaaaag aaggagagtc agtccggaaa  360
      ggggatgtgt tattaaagct tacagcactg ggagctgaag ctgatacggt aaaaacacag  420
20     tcatcactgt tacaggccag gctggaacaa actcgggtatc aaattctgag cagggtcaatt  480
      gaattaaata aactacctga actaaagctt cctgatgagc cttattttca gaatgtatct  540
25     gaagaggaag tactgcgttt aacttctttg ataaaagaac agttttccac atggcaaaat  600
      cagaagtatc aaaaagaact gaatttggtt aagaaaagag cagagcgatt aacagtactt  660
30     gcccgataaa accgttatga aaatttatca aggggttgaag aaagccgtct ggatgatttc  720
      agtagtttat tgcataaaca ggcaattgca aaacatgctg tacttgagca ggagaataaa  780
35     tatgtcgaag cagtaaatga attacgagtt tataaatcac aactggagca aattgagagt  840
      gagatattgt ctgcaaaaaga agaatatcag cttgttaacg agctttttta aaatgaaatt  900
      ttagataagc taagacaaac cacagacaac attgggttat taactctgga attagcgaaa  960
40     aatqaagagc gtcaacaggc ttcagtaatc agggccccag tttcggtaaa agttcagcaa 1020
      ctgaagggtc atactgaagg tgggggtgtt acaacagcgg aaacactgat ggtcatcggt 1080
45     ccggaagatg acacgctgga ggttactgct ctggtacaaa ataaagatat tggttttatt 1140
      aacgtcgggc agaatgccat cattaaagtg gaggcatttc cttatacacg atatgggttat 1200
50     ctggtgggta aggtgaaaaa tataaattta gatgcaatag aagaccagag actgggactt 1260
      gtttttaatg ttattatttc tattgaagag aattgtttgt caaccggaaa taaaaacatt 1320
55     ccattaagct cgggtatggc agtcaactgca gaaataaaga caggatatgcg aagtgtaatc 1380
      agttatcttc ttagtccttc agaagagtca gtaacagaaa gtttacgtga gcgttaa   1437

```

<210> 32

<211> 708

<212> ADN

<213> artificial

<220>

<223> secuencia de ADN artificial

# ES 2 347 019 T3

<400> 32

```

5      gtgggagggt gggagtgcga gaagcattcc caaccctggc aggtgcttgt ggcctctcgt   60
      ggcagggcag tctgcggcgg tgttctggtg caccoccagt gggtcctcac agctgcccac  120

10     tgcattcagga acaaaagcgt gatcttgctg ggtcggcaca gcctgtttca tcctgaagac  180
      acaggccagg tatttcaggt cagccacagc ttcccacacc cgctctacga tatgagcctc  240
15     ctgaagaatc gattcctcag gccaggatgat gactccagcc acgacctcat gctgctccgc  300
      ctgtcagagc ctgccgagct cacggatgct gtgaagggtca tggacctgcc caccaggag  360
20     ccagcactgg ggaccacctg ctacgcctca ggctggggca gcattgaacc agaggagtgc  420
      ttgaccccaa agaaaacttca gtgtgtggac ctccatgtta tttccaatga cgtgtgtgcg  480
25     caagttcacc ctcagaaggt gaccaagttc atgctgtgtg ctggacgctg gacagggggc  540
      aaaagcacct gctcgggtga ttctgggggc ccaattgtct gtaatgggtg gcttcaaggt  600
30     atcacgtcat ggggcagtga accatgtgcc ctgcccgaag ggccttccct gtacaccaag  660
      gtggtgcatt accggaagtg gatcaaggac accatcgtgg ccaacccc   708

```

35 <210> 33

<211> 291

<212> ADN

40 <213> artificial

<220>

<223> secuencia de ADN artificial

45

<400> 33

```

50     cctcaaaata ttactgattt gtgtgcagaa taccacaaca cacaaatata tacgctaaat   60
      gataagatat tttcgtatac agaattctcta gctggaaaaa gagagatggc tatcattact  120
      tttaagaatg gtgcaatttt tcaagtagaa gtaccaggta gtcaacatat agattcacaa  180
55     aaaaaagcga ttgaaaggat gaaggatacc ctgaggattg catatcttac tgaagctaaa  240
      gtcgaaaagt tatgtgtatg gaataataaa acgcctcatg cgattgccgc a   291

```

60

<210> 34

<211> 927

<212> ADN

65 <213> artificial

# ES 2 347 019 T3

<220>

<223> secuencia de ADN artificial

5 <400> 34

```

gatgatattggg agattcctga tgggcagatt acagtgggac aaagaaaggg aaagtggcat 60
10 ggtgatgtgg cagtgaaaat gttgaatgtg acagcaccta cacctcagca gttacaagcc 120
ttcaaaaatg aagtaggagt actcaggaaa acacgacatg tgaatatcct actcttcatg 180
15 ggctattcca caaagccaca actggctatt gttaccaggt ggtgtgaggg ctccagcttg 240
tatcaccatc tccatatcat tgagaccaa tttgagatga tcaaacttat agatattgca 300
cgacagactg cacagggcat ggattaacta cagccaagt caatcatcca cagagacctc 360
20 aagagtaata atatatttct tcatgaagac ctcacagtaa aaatagggtga ttttggtcta 420
gctacagaga aatctcgatg gagtgggtcc catcagtttg aacagttgtc tggatccatt 480
25 ttgtggatgg caccagaagt catcagaatg caagataaaa atccatacag ctttcagtca 540
gatgtatatg catttgggat tgttctgtat gaattgatga ctggacagtt accttattca 600
30 aacatcaaca acagggacca gataattttt atgggtgggac gaggatacct gtctccagat 660
ctcagtaagg tacggagtaa ctgtccaaaa gccatgaaga gattaatggc agagtgcctc 720
35 aaaaagaaaa gagatgagag accactcttt ccccaaattc tcgcctctat tgagctgctg 780
gcccgtcat tgccaaaaat tcaccgcagt gcatcagaac cctccttgaa tcgggctggg 840
ttocaaacag aggattttag tctatatgct tgtgcttctc caaaaacacc catccaggca 900
40 gggggatatg gtgcgtttcc tgtccac 927

```

<210> 35

45 <211> 92

<212> ADN

<213> artificial

50 <220>

<223> secuencia de ADN artificial

<400> 35

```

55 cgatttttggc ctggcgaccg aaaaagcggg cgatttttggc ctggcgaccg aaaaagcggg 60
cgatttttggc ctggcgaccg aaaaagcggg gc 92
60

```

<210> 36

<211> 1302

65 <212> ADN

<213> artificial

# ES 2 347 019 T3

<220>

<223> secuencia de ADN artificial

5 <400> 36

```

      atgccaacaa taaccactgc acaaattaaa agcacactgc agtctgcaaa gcaatccgct   60
10    gcaaataaat tgcactcagc aggacaaagc acgaaagatg catcacctca aaatattact  120
      gatttgtgtg cagaatacca caacacacaa atatatacgc taaatgataa gatatttttcg  180
15    tatacagaat ctctagctgg aaaaagagag atggctatca ttacttttaa gaatggtgca  240
      atttttcaag tagaagtacc aggtagtcaa catatagatt cacaaaaaaa agcgattgaa  300
      aggatgaagg ataccctgag gattgcatat cttactgaag ctaaagtcga aaagtatatgt  360
20    gtatggaata ataaaacgcc tcatgcgatt gccgcaatgc ccgtgggagg ctgggagtgcc  420
      gagaagcatt cccaaccctg gcaggtgctt gtggcctctc gtggcagggc agtctgcggc  480
25    ggtgttcttg tgcaccccca gtgggtcctc acagctgccc actgcatcag gaacaaaagc  540
      gtgatcttgc tgggtcggca cagcctgttt catcctgaag acacaggcca ggtatttcag  600
30    gtcagccaca gcttcccaca cccgctctac gatatgagcc tcctgaagaa tcgattcctc  660
      aggccagggtg atgactccag ccacgacctc atgctgctcc gcctgtcaga gcctgccgag  720
35    ctcaaggatg ctgtgaaggt catggacctg cccaccaggg agccagcact ggggaccacc  780
      tgctacgcct caggctgggg cagcattgaa ccagaggagt tcttgacccc aaagaaactt  840
      cagtgtgtgg acctccatgt tatttccaat gacgtgtgtg cgcaagttca ccctcagaag  900
40    gtgaccaagt tcatgctgtg tgctggacgc tggacagggg gcaaaagcac ctgctcgggt  960
      gattctgggg gccacttgt ctgtaatggt gtgcttcaag gtatcacgtc atggggcagt 1020
45    gaaccatgtg ccctgcccga aaggccttcc ctgtacacca aggtggtgca ttaccggaag 1080
      tggatcaagg acaccatcgt ggccaacccc gggcatgcat tagcctatgg aagtcagggt 1140
50    gatcttaatc cattaattaa tgaaatcagc aaaatcattt cagctgcagg tagcttcgat 1200
      gttaaagagg aaagaactgc agcttcttta ttgcagttgt ccggtaatgc cagtgatattt 1260
55    tcatatggac ggaactcaat aaccctgacc acatcagcat aa                                1302

```

<210> 37

<211> 684

60 <212> ADN

<213> artificial

<220>

65 <223> secuencia de ADN artificial

# ES 2 347 019 T3

<400> 37

```

5      atgacaacaa taaccactgc acaaattaaa agcacactgc agtctgcaaa gcaatccgct   60
      gcaaataaat tgcactcagc aggacaaagc acgaaagatg catcacctca aaatattact   120
      gatttgtgtg cagaatacca caacacacaa atacatacgc taaatgataa gatatttttcg   180
10     tatacagaat ctctagctgg aaaaagagag atggctatca ttacttttaa gaatggtgca   240
      acttttcaag tagaagtacc aggtagtcaa catatagatt cacaaaaaaa agcgattgaa   300
15     aggatgaagg ataccctgag gattgcatat ottactgaag ctaaagtcga aaagttatgt   360
      gtatggaata ataaaacgcc tcatgcgatt gccgcaatgc ccggcgattt tggcctggcg   420
20     accgaaaaag cgggcgattt tggcctggcg accgaaaaag cgggcgattt tggcctggcg   480
      accgaaaaag cggggcatgc attagcctat ggaagtcagg gtgatcttaa tccattaatt   540
      aatgaaatca gcaaatcat ttcagctgca ggtagcttcg atgttaaaga ggaaagaact   600
25     gcagcttctt tattgcagtt gtccggtaat gccagtgatt tttcatatgg acggaactca   660
      ataaccctga ccacatcagc ataa                                     684

```

30

<210> 38

<211> 1521

<212> ADN

35

<213> artificial

<220>

40

<223> secuencia de ADN artificial

45

50

55

60

65

# ES 2 347 019 T3

<400> 38

```

5      atgccaacaa taaccactgc acaaattaaa agcacactgc agtctgcaaa gcaatccgct 60
      gcaaataaat tgcactcagc aggacaaagc acgaaagatg catcacctca aaatattact 120
      gatttgtgtg cagaatacca caacacacaa atatatacgc taaatgataa gatatttttcg 180
10     tatacagaat ctctagctgg aaaaagagag atggctatca ttacttttaa gaatggtgca 240
      atttttcaag tagaagtacc aggtagtcaa catatagatt cacaaaaaaa agcgattgaa 300
15     aggatgaagg ataccctgag gattgcatat cttactgaag ctaaagtcga aaagttatgt 360
      gtatggaata ataaaacgcc tcatgcgatt gccgcaatgc ccgatgattg ggagattcct 420
20     gatgggcaga ttacagtggg acaaagaaag ggaaagtggc atggtgatgt ggcagtgaaa 480
      atgttgaatg tgacagcacc tacacctcag cagttacaag ccttcaaaaa tgaagtagga 540
25     gtactcagga aaacacgaca tgtgaatata ctactcttca tgggctattc cacaaagcca 600
      caactggcta ttgttaccga gtggtgtgag ggctccagct tgtatcacca tctccatata 660
30     attgagacca aatttgagat gatcaaactt atagatatattg cagcacagac tgcacagggc 720
      atggattact tacacgcca gtcaatcata cacagagacc tcaagagtaa taatatattt 780
35     cttcatgaag acctcacagt aaaaataggt gattttggtc tagctacaga gaaatctcga 840
      tggagtgggt cccatcagtt tgaacagttg tctggatcca ttttgtggat ggcaccagaa 900
40     gtcatacaga tgcaagataa aaatccatac agctttcagt cagatgtata tgcatttggg 960
      attgttctgt atgaattgat gactggacag ttaccttatt caaacatcaa caacagggac 1020
      cagataattt ttatgggtggg acgaggatac ctgtctccag atctcagtaa ggtacggagt 1080
45     aactgtccaa aagccatgaa gagattaatg gcagagtgcc tcaaaaagaa aagagatgag 1140
      agaccactct ttccccaat tctcgctctt attgagctgc tggeccgctc attgccaaaa 1200
50     attcaccgca gtgcatcaga accctccttg aatcgggctg gtttccaaac agaggatttt 1260
      agtctatatg cttgtgcttc tccaaaaaca cccatccagg cagggggata tgggtgcgttt 1320
55     cctgtccacg ggcattgcatt agcctatgga agtcagggtg atcttaatcc attaatatt 1380
      gaaatcagca aaatcatttc agctgcaggt agcttcgatg ttaaagagga aagaactgca 1440
60     gcttctttat tgcagttgtc cggtaatgcc agtgattttt catatggacg gaactcaata 1500
      accctgacca catcagcata a 1521

```

<210> 39

65 <211> 2169

<212> ADN

<213> artificial

# ES 2 347 019 T3

<220>

<223> secuencia de ADN artificial

5 <400> 39

```

        atgacaacaa taaccactgc acaaattaaa agcacactgc agtctgcaaa gcaatccgct   60
10      gcaaataaat tgcactcagc aggacaaagc acgaaagatg catcacctca aaatattact  120
        gatttgtgtg cagaatacca caacacacaa atacatacgc taaatgataa gatatttttcg  180
15      tatacagaat ctctagctgg aaaaagagag atggctatca ttactttttaa gaatgggtgca  240
        acttttcaag tagaagtacc aggtagtcaa catatagatt cacaaaaaaa agcgattgaa  300
        aggatgaagg ataccctgag gattgcatat cttactgaag cttaaagtcga aaagttatgt  360
20      gtatggaata ataaaacgcc tcatgcgatt gccgcaatgc ccatctgtca aatggagaaa  420
        atagtgtctt tttttgcaat agtcagtcct gttaaaagtg atcagatttg cattgggttac  480
25      catgcaaaca actcgacaga gcaggttgac acaataatgg aaaagaacgt tactgtttaca  540
        catgcccagg acatactgga aaagacacac aacgggaagc tctgcgatct agatggagtg  600
30      aagcctctaa ttttgagaga ttgtagtgtg gctggatggc tcctcggaag cccaatgtgt  660
        gacgaattca tcaatgtgcc ggaatggtcc tacatagtgg agaaggccaa tccagtcaat  720
35      gacctctgtt acccagggga tttcaatgac tatgaagaat tgaaacacct attgagcaga  780
        ataaaccatt ttgagaaaat tcagatcatc cccaaaagtt cttgggtccag tcatgaagcc  840
40      tcattagggg tgagctcagc atgtccatac cagagaaagt cctccttttt cagaaatgtg  900
        gtatggctta tcaaaaagaa cagtacatac ccaacaataa agaggagcta caataatacc  960
        aaccaagaag atcttttggg actgtggggg attcaccatc ctaatgatgc ggcagagcag 1020
45      acaaagctct atcaaaaccc aaccac:ctat atttccgttg ggacatcaac actaaaccag 1080
        agattggtac caagaatagc tactagatcc aaagtaaacg ggcaaagtgg aaggatggag 1140
50      ttcttctgga caattttaaa acogaatgat gcaatcaact tcgagagtaa tggaaatttc 1200
        attgctccag aatatgcata caaaattgtc aagaaagggg actcaacaat tatgaaaagt 1260
55      gaattggaat atggtaactg caacaccaag tgtcaaaact caatgggggc gataaactct 1320
        agtatgccat tccacaatat acaccctctc accatcgggg aatgccccaa atatgtgaaa 1380
60      tcaaacagat tagtccttgc gactgggctc agaaatagcc ctcaaagaga gagaagaaga 1440
        aaaaagagag gattatttgg agctatagca ggttttatag agggaggatg gcagggaatg 1500

```

65

## ES 2 347 019 T3

gtagatgggtt ggtatgggta ccaccatagc aatgagcagg ggagtgggta cgctgcagac 1560  
 aaagaatcca ctcaaaaggc aatagatgga gtcaccaata aggtcaactc gatcattgac 1620  
 5 aaaatgaaca ctcagtttga ggccgttgga aggggaattta acaacttaga aaggagaata 1680  
 gagaatttaa acaagaagat ggaagacggg ttcctagatg tctggactta taatgctgaa 1740  
 10 cttctgggttc tcatggaaaa tgagagaact ctagactttc atgactcaaa tgtcaagaac 1800  
 ctttacgaca aggtccgact acagcttagg gataatgcaa aggaactggg taacggttgt 1860  
 15 ttcgagttct atcataaatg tgataatgaa tgtatggaaa gtgtaagaaa cggaacgtat 1920  
 gactacccgc agtattcaga agaagcaaga ctaaaaagag aggaataaag tggagtaggg 1980  
 20 catgcattag cctatggaag tcaggggtgat cttaatccat taattaatga aatcagcaaa 2040  
 atcatttcag ctgcaggtag cttcgatgtt aaagaggaaa gaactgcagc ttctttattg 2100  
 cagttgtccg gtaatgccag tgatttttca tatggacgga actcaataac cctgaccaca 2160  
 25 tcagcataa 2169

30 <210> 49  
 <211> 12672  
 <212> ADN  
 <213> artificial

35 <220>  
 <223> secuencia de ADN artificial

40 <400> 40

gaattccaag cgaagtcatt cccctccct cttgattaca agggtgataa ttattattcg 60  
 45 catttgtgtg gtaatgggat agaaaggaat ggatagaaaa agaacaaaat tagtatagca 120  
 atagatatgc ccaactgcatt gaatacttac agggcattat tttattatgt ttaaattgaa 180  
 50 gtggctctctg gtttgattta tttgttattc aagggggctg tttggagatc ggaaaattct 240  
 gtacgttaag tgtattattt aaccagtttc gatgcgtaac agattgattt tgcgtcagcg 300  
 55 gttatcgctt ttaagttgtt gctcttgccg tatcgcgttt aggttatccg attaaagtca 360  
 aatttcctga aaatgctgta tagcgcgga gtgcacctta tagctgtagg taagtatgtt 420  
 caaaaaatag tcttgccgta caataatttt ccatatccaa actcactcct tcaagattct 480  
 60 ggtcccgggtt tacgggtagt ttccggaagg gcggtagcat gctgattcaa actgcaagat 540

65



# ES 2 347 019 T3

gaaacattgt cggagttgga tggaattaag tcatggctat agcatttggg cgtgcataac 600  
 aaaattgggc ctcatatatt agagtatgat tgcataattca ctaatatatt tactttctga 660  
 5 tgcgtgggtgg catcatgctt tatgagataa acaatcctgg tagactagcc ccctgaatct 720  
 ccagacaacc aatatcactt atttaagtga tagtcttaat actagttttt agactagtca 780  
 10 ttggagaaca gatgattgat gtcttaggat cggagaaacg cagacggcgt actacacagg 840  
 aaaagatcgc tctcgttcag cagagctttg aaccgggaat gacggtctcc cttgttgccc 900  
 ggcaacatgg tgtggcagcc agccagctat ttctctggcg caagcaatac caggagggaa 960  
 15 gtcttactgc tgtggctgcc ggagaacagg tcgttctctgc ctctgaactt gctgccgcca 1020  
 tgaagcagat taaagagctc cagcgcctgc tcggcaaaaa aacgatggaa aatgaaactcc 1080  
 20 ttaaagaagc cgttgaatat gggcgagcaa aaaagtggat agcgcacggc cccttattgc 1140  
 ccggggatgg ggagtaagct tcgtcagccg ttgtctccgg gtgtcgcgtg cgcagttgca 1200  
 25 cgtcattctc agacgaaccg atgactggaa ggacggccgc cgcagccgct acacggatga 1260  
 tacggatgtg cttcgccgta tacatcatgt tatcggagag ctgcccacat atggttatcg 1320  
 tcgggtatgg gcgctgcttc gcagacaaac agaacttgat ggtatgcctg cgatcaatgc 1380  
 30 caaatgtgtt taccggatca tgtgccagaa tgcgctgttg cttgagcgaa aaccgcgtgt 1440  
 accgccatcg aaacgggcac ataccggcag agtggctgtg aaagaaagta atcagcgatg 1500  
 35 gtgctctgac gggtttgagt tccgctgtga taacggagaa aaactgcggg tcacgttcgc 1560  
 gctggactgc tgtgatcgtg aggcactgca ctgggcggtc acaacgggtg gcttcaacag 1620  
 tgaaacagta caggacgtca tgctgggagc agtggaacgc cgctttggca gcgagcttcc 1680  
 40 ggcgtctcca gtggagtggc tgacggataa tggttcatgc taccgggcca atgaaacacg 1740  
 tcagttcgcc aggatgttgg gacttgaacc gaagaacacg gcagtgcgga gtccggagag 1800  
 45 taacggaata acagagagct tcgtgaaaac gataaagcgt gattacataa gtatcatgcc 1860  
 caaaccagac gggttaacgg cagcaaagaa ccttgacagag gcgttcgagc attataacga 1920  
 50 atggcatccg catagtgcgc tgggttatcg ctgcgccagg gaatatctgc ggcagcgggc 1980  
 cagtaatggg ttaagtgata acaggtatct ggaaatatag gggcaaatcc acctggtcat 2040  
 tatctggaat ttgacgaagt gtgataactg gtatagccag attaatactaa acctttgtct 2100  
 55 gacaaaatca gataaagaag agtagttcaa aagacaactc gtggactctc attcagagag 2160  
 ataggcggtta ccaaaatttg tttggaactg aacaagaaaa ttgtatttgt gtaactataa 2220  
 60 tcttaatgta aaataaaaaga caccagttct gtagaatatg cttattgaag agagtgtaat 2280

# ES 2 347 019 T3

aataatttta tatagatggt gtacaaagaa caggaatgag taattattta tgcttgatgt 2340  
 tttttgactc ttgcttttta tagttattat ttttaagtta gtcagcgcaa taaaaacttg 2400  
 5 cttttaatat taatgcgagt tatgacatta aacggaagaa acataaaggc atatttttgc 2460  
 cacaatattt aatcatataa ttttaagttgt agtgagttta ttatgaatat aaacaaacca 2520  
 10 ttagagattc ttgggcatgt atcctggcta tgggccagtt ctccactaca cagaaactgg 2580  
 ccagtatctt tgtttgcaat aaatgtatta cccgcaatac aggctaacca atatgtttta 2640  
 ttaaccggg atgattaccc tgtcgcgtat tgtagttggg ctaatttaag tttagaaaat 2700  
 15 gaaattaaat atcttaatga tgttacctca ttagttgcag aagactggac ttcaggtgat 2760  
 cgtaaatggg tcattgactg gattgctcct ttcggggata acggtgccct gtacaaatat 2820  
 20 atgcgaaaaa aattccctga tgaactatc agagccatca gggtggtacc caaaactcat 2880  
 gttggtaaag tatcagaatt tcatggaggt aaaattgata aacagttagc gaataaaatt 2940  
 25 tttaaacaat atcaccacga gtttaataact gaagtaaaaa gaaagtcaga ttttaatttt 3000  
 tcattaactg gttaagaggt aattaaatgc caacaataac cactgcacaa attaaaagca 3060  
 cactgcagtc tgcaaagcaa tccgctgcaa ataaattgca ctcagcagga caaagcacga 3120  
 30 aagatgcatt agcctatgga agtcaggggtg atcttaatcc attaatatt gaaatcagca 3180  
 aaatcatttc agctgcaggt agcttcgatg ttaaagagga aagaactgca gcttctttat 3240  
 35 tgcagttgtc cggtaatgcc agtgattttt catatggacg gaactcaata accctgacca 3300  
 catcagcata atatattaat ttaaatgata gcaatcttac tgggctgtgc cacataagat 3360  
 tgctattttt tttggagtca taatggattc ttgtcataaa attgattatg gggtatagc 3420  
 40 cctggagatt ttagcccaat accataacgt ctctgttaac ccggaagaaa ttaaacatag 3480  
 atttgataca gacgggacag gtctgggatt aacgtcatgg ttgcttgctg cgaaatcttt 3540  
 45 agaactaaag gtaaaacagg taaaaaaaac aattgatcga ttaaaactta tttttctgcc 3600  
 cgcattagtc tggagagagg atggacgtca ttttattctg actaaaatca gcaaagaagt 3660  
 50 aaacagatat cttatttttg atttgagca gcgaaatccc cgtgttctcg aacagtctga 3720  
 gtttgaggcg ttatatcagg ggcattattat tcttattact tcccgttctt ctgttaccgg 3780  
 gaaactggca aaatttgact ttacctggtt tattcctgcc attataaaat acaggagaat 3840  
 55 atttattgaa acccttggtg tatctgtttt tttacaatta tttgcattaa taacccccct 3900  
 ttttttccag gtggttatgg acaaagtatt agtgcacagg gggttttcaa cccttaatgt 3960  
 60 tattactggt gcattatctg ttgtagtggt gtttgagatt atactcagcg gtttaagaac 4020

65

# ES 2 347 019 T3

ttacatTTTT gcacatagta caagtcggat tgatgttgag ttgggtgcc aactcttccg 4080  
 gcatttactg gcgctaccga tctcttattt tgagagtcgt cgtgttggtg atactgttgc 4140  
 5 gagggtaaga gaattagacc agatccgtaa ttttctgaca ggacaggcat taacatctgt 4200  
 tttggactta ttattttcac tcatatTTTT tgcggtaatg tggattaca gcccaaagct 4260  
 10 tactctgggtg atcttatttt cgctgccttg ttatgctgca tggctctgtt ttattagccc 4320  
 cattttgcga cgctgccttg atgataagtt ttcacggaat ggggataatc aatctttcct 4380  
 ggtggaatca gtaacggcga ttaacactat aaaagctatg gcagtctcac ctccagatgac 4440  
 15 gaacatatgg gacaaacaat tggcaggata tgttgctgca ggctttaaag tgacagtatt 4500  
 agcaaccatt ggtcaacaag gaatacagtt aatacaaaaag actgttatga tcatcaacct 4560  
 20 atggttggtg gcacacctgg ttatttccgg ggattttaagt attggtcagt taattgcttt 4620  
 taatatgctt gctggtcaga ttgttgccac ggttattcgc cttgcacaaa tctggcagga 4680  
 tttccagcag gttggtatat cagttaccgg ccttggtgat gtgcttaact ctccaactga 4740  
 25 aagtatatcat gggaaactga cattgcccga aattaatggt gatatcactt ttcgtaatat 4800  
 ccggtttcgc tataaacctg attctccggg tattttggac aatatcaatc ttagtattaa 4860  
 30 gcagggggag gttattggtg ttgtcggacg ttctgggtca ggaaaaagca cattaactaa 4920  
 attaattcaa cgtttttata ttctgaaaa tggccaggta ttaattgatg gacatgatct 4980  
 tgcggtgggt gatectaact gggtacgtcg tcagggtggg gttgtgttgc aggacaatgt 5040  
 35 gctgcttaat cgcagtatta ttgataatat ttcactggct aatcctggca tgtccgtcga 5100  
 aaaagttatt tatgnagcga aattagcagg cgctcatgat tttatttctg atttgcgtga 5160  
 40 ggggtataac accattgtcg gggaacaggg ggcaggatta tccggaggtc aacgtcaacg 5220  
 catcgcaatt gcaagggcgc tgggtgaacaa ccctaaaata ctcatTTTT atgaagcaac 5280  
 cagtgtctcg gattatgagt cggagcatgt catcatgcgc aatatgcaca aaatatgtaa 5340  
 45 gggcagaacg gttataatca ttgctcatcg tctgtctaca gtaaaaaatg cagaccgcat 5400  
 tattgtcatg gaaaaaggga aaattgttga acagggtaaa cataaggagc tgctttctga 5460  
 50 accggaaagt ttatacagt acttatatca gttacagtca gactaacaga aagaacagaa 5520  
 gaatatgaaa acatggttaa tggggttcag cgagttcctg ttgcgtata aacttgtctg 5580  
 55 gagtgaacaa tggaaaatcc ggaagcaatt agatactccg gtacgtgaaa aggacgaaaa 5640  
 tgaattctta cccgctcatc tggaaattaat tgaaacgccg gtatccagac ggccgcgtct 5700  
 ggttgcttat tttattatgg ggtttctggt tattgctttt attttatctg ttttaggcca 5760

60

65

# ES 2 347 019 T3

agtggaaatt gttgccactg caaatgggaa attaacacac agtgggcgta gtaaagaaat 5820  
 taaacctatt gaaaactcaa tagttaaaga aattatcgta aaagaaggag agtcagtcg 5880  
 5 gaaaggggat gtgttattaa agcttacagc actgggagct gaagctgata cgtaaaaaac 5940  
 acagtcacat ctgttacagg ccaggctgga acaaaactcg tatcaaattc tgagcaggtc 6000  
 10 aattgaatta aataaactac ctgaactaaa gcttcctgat gagccttatt ttcagaatgt 6060  
 atctgaagag gaagtactgc gtttaacttc tttgataaaa gaacagtttt ccacatggca 6120  
 15 aaatcagaag tatcaaaaag aactgaatgt ggataagaaa agagcagagc gattaacagt 6180  
 acttgcccgat ataaaccgtt atgaaaatgt atcaagggtt gaaaaaagcc gtctggatga 6240  
 tttcagtagt ttattgcata aacaggcaat tgcaaaacat gctgtacttg agcaggagaa 6300  
 20 taaatatgtc gaagcagtaa atgaattacg agttttataaa tcacaactgg agcaaatga 6360  
 gagtgagata ttgtctgcaa aagaagaata tcagcttggtt acgcagcttt ttaaaaatga 6420  
 25 aatttttagat aagctaagac aaacaacaga caacattggg ttattaactc tggaattagc 6480  
 gaaaaatgaa gagcgtcaac aggtttcagt aatcagggcc ccagtttcgg gaaaagtca 6540  
 30 gcaactgaag gttcactactg aaggtgggggt tggtacaaca gcggaaacac tgatggtcat 6600  
 cgttccggaa gatgacacgc tggagggttac tgctctggta caaaataaag atattggttt 6660  
 tattaacgtc gggcagaatg ccatcattaa agtggaggca tttccttata cacgatatgg 6720  
 35 ttatctggtg ggtaagggtg aaaatataaa tttagatgca atagaagacc agagactggg 6780  
 acttggttttt aatgttatta tttctattga agagaattgt ttgtcaaccg ggaataaaaa 6840  
 40 cattccatta agctcgggta tggcagtcac tgcagaaata aagacaggta tgcgaagtgt 6900  
 aatcagttat cttcttagtc ctttagaaga gtcagtaaca gaaagtttac gtgagcgta 6960  
 45 agtttcagaa gtccagtatt tgctgctata cgtgctgctt ggcacttgcc gtctgaacgg 7020  
 cattgatccg gaagccaagt caaacaacag cgtgatgagc gtcagggcaa aacaccaagg 7080  
 ctctctcgat gacaccagaa caaattgaaa tacgtgagct gaggaaaaag ctaccgagtt 7140  
 50 cttgatgttg gactccctga acagttctct gtaateggga aactcaggac gcgttatcct 7200  
 gtggtcacac tctgccatgt gtttaggggt catcacagca gctacagata ctggtaaaac 7260  
 55 cgtcctgaaa aaccagacgg cagacgggct gtattacgta gtcagggtact tgagctacat 7320  
 ggcacagtc acggtttggc cggagcaaga cgtatcacca caatggcaac ccggagaggt 7380  
 60 gtcagcgcca gtgatataag acggttaacg gttaaaaatc gtggcggtga caacatccca 7440  
 gtggactgag gtcacacagg cctggcagca ttcctcttcc ggccggatga ccgggatttc 7500

65

# ES 2 347 019 T3

acgggggaaag tacgccgata acagtttacg ggctgaagat tggcgtaggg aggatagcag 7560  
acgttttgcc gccccattg tctggagttg ggtgagaagg catcatttca ccaacaccaa 7620  
5 catttcacag ttacacccca cagctacatg aagcgcttcc atgaattatc gctttgattt 7680  
atcatgttaa aatagctcta cacggttggt tcaggattgc gcaccgaaac cctctaaaat 7740  
10 ccactgacgc gcctgcgaat tatccagcac cgcgccttcc gagatcctct acgcgggacg 7800  
catcgtggcc ggcatcaccg gcgccacagg tgcggttgct ggcgctata togcgacat 7860  
caccgatggg gaagatcggg ctcgccactt cgggctcatg agcgcttggt tcggcggtgg 7920  
15 tatggtggca ggccccgtg cggggggact gttgggcgcc atctccttgc atgcaccatt 7980  
ccttgccggc gcggtgctca acggcctcaa cctactactg ggctgcttcc taatgcagga 8040  
20 gtcgcataag ggagagcgtc gaccgatgcc cttgagagcc ttcaaccag tcagctcctt 8100  
ccggtgggcg cggggcatga ctatcgctgc cgcacttatg actgtcttct ttatcatgca 8160  
actcgtagga caggtgccgg cagcgtcttg ggtcatttcc ggcgaggacc gctttcgctg 8220  
25 gagecgacg atgatcgcc tgcgcttgc ggtattcgga atcttgacg cctcgctca 8280  
agccttcgtc actggtcccg ccaccaaacg ttccggcgag aagcaggcca ttatcgccgg 8340  
30 catggcggcc gacgcgctgg gctacgtctt gctggcgctc gcgacgcgag gctggatggc 8400  
cttccccatt atgattcttc tcgcttcogg cggcatcggg atgcccgctg tgcaggccat 8460  
gctgtccagg caggtagatg acgaccatca gggacagctt caaggatcgc tcgcggtctc 8520  
35 taccagccta acttcgatca ttggaccgct gatcgtcacg gcgatttatg ccgcctcggc 8580  
gagcacatgg aacgggttgg catggattgt aggcgccgcc ctataccttg tctgcctccc 8640  
40 cgcgttgctg cgcggtgcat ggagccgggc cactcgacc tgaatggaag ccggcgccac 8700  
ctcgctaacg gattcaccac tccaagaatt ggagccaatc aattcttgcg gagaactgtg 8760  
aatgcgcaaa ccaacccttg gcagaacata tccatcgctc ccgccatctc cagcagccgc 8820  
acgcggcgca tctcgggcag cgttgggtcc tggccacggg tgcgcatgat cgtgctcctg 8880  
tcgttgagga cccggctagg ctggcgggtg tgccttactg gttagcagaa tgaatcaccg 8940  
50 atacgcgagc gaacgtgaag cgactgctgc tgcaaaacgt ctgogacctg agcaacaaca 9000  
tgaatggtct tcggtttccg tgtttcgtaa agtctgaaa cgcggaagtc agcgccctgc 9060  
accattatgt tccgatctg catcgagga tgcgtctggc taccctgtgg aacacctaca 9120  
55 tctgtattaa cgaagcgtg gcattgacce tgagtgattt ttctctggtc ccgcgcate 9180  
cataccgcca gttgtttacc ctcacaacgt tccagtaacc gggcatgttc atcatcagta 9240  
60

65

# ES 2 347 019 T3

acccgtatcg tgagcatcct ctctcgtttc atcggatatca ttacccccat gaacagaaat 9300  
 ccccttaca cggaggcatc agtgaccaa caggaaaaaa ccgcccttaa catggcccgc 9360  
 5 tttatcagaa gccagacatt aacgcttctg gagaaactca acgagctgga cgcggatgaa 9420  
 caggcagaca tctgtgaatc gcttcacgac cacgctgatg agctttaccg cagctgcctc 9480  
 10 gcgcggtttcg gtgatgacgg tgaaaacctc tgacacatgc agctcccgga gacggtcaca 9540  
 gcttgtctgt aagcggatgc cgggagcaga caagcccgtc agggcgcgtc agcgggtgtt 9600  
 15 ggcgggtgtc ggggcgcagc catgaccagc tcacgtagcg atagcggagt gtatactggc 9660  
 ttaactatgc ggcacagag cagattgtac tgagagtga ccatatgcgg tgtgaaatac 9720  
 cgcacagatg cgtaaggaga aaataccgca tcaggcgctc ttcgcttcc tcgctcactg 9780  
 20 actcgctgcg ctcggtcggt cggtgcggc gagcggatc agctcactca aaggcggtaa 9840  
 tacggttatc cacagaatca ggggataacg caggaaagaa catgtgagca aaaggccagc 9900  
 25 aaaaggccag gaaccgtaaa aaggccgctg tgctggcggt tttccatagg ctccgcccc 9960  
 ctgacgagca tcacaaaaat cgacgctcaa gtcagagggt gcgaaaccg acaggactat10020  
 aaagatacca ggcgtttccc cctggaagct cctcgtgcg ctctcctgtt ccgaccctgc10080  
 30 cgcttaccgg atacctgtcc gcctttctcc ctccgggaag cgtggcgctt tctcatagct10140  
 cacgctgtag gtatctcagt tcggtgtagg tcgttcgctc caagctgggc tgtgtgcacg10200  
 35 aaccccccg tccagccgac cgctgcgcct tatccggtaa ctatcgtctt gagtccaacc10260  
 cggtaagaca cgacttatcg ccactggcag cagccactgg taacaggatt agcagagcga10320  
 40 ggtatgtagg cggtgctaca gagttcttga agtggtggcc taactacggc tacactagaa10380  
 ggacagtatt tggatatctg gctctgctga agccagttac ctccggaaaa agagttggta10440  
 gctcttgatc cggcaaaaa accaccgctg gtagcgggtg tttttttgtt tgcaagcagc10500  
 45 agattacgcg cagaaaaaaa ggatctcaag aagatccttt gatcttttct acggggtctg10560  
 acgctcagtg gaacgaaaac tcacgttaag ggattttggt catgagatta tcaaaaagga10620  
 50 tcttcaccta gatcctttta aattaaaaat gaagttttta atcaatctaa agtatatatg10680  
 agtaaaactg gtctgacagt taccaatgct taatcagtga ggcacctatc tcagcgatct10740  
 55 gtctatttcg ttcattccata gttgcctgac tccccatatg aatatactcc ttagttccta10800  
 ttccgaagtt cctattctct agaaagtata ggaacttcag agcgcttttg aagctggggt10860  
 60 gggcgaagaa ctccagcatg agatccccgc gctggaggat catccagccg gcgtcccggga10920  
 aaacgattcc gaagcccaac ctttcataga aggcggcggt ggaatcgaaa tctcgtgatg10980

65

# ES 2 347 019 T3

gcaggttggg cgtcgcttgg tcggtcattt cgaaccccag agtcccgcctc agaagaactc11040  
gtcaagaagg cgatagaagg cgatgcgctg cgaatcgga ggcgcgatac cgtaaagcac11100  
5 gaggaagcgg tcagcccatt cgccgccaag ctcttcagca atatcacggg tagccaacgc11160  
tatgtcctga tagcggtccg ccacaccag ccggccacag tcgatgaate cagaaaagcg11220  
10 gccattttcc accatgatat tcggcaagca ggcacgcga tgggtcacga cgagatcctc11280  
gccgtcgggc atgcgcgcct tgagcctggc gaacagttcg gctgggcgca gccctgatg11340  
15 ctcttcgtcc agatcatcct gatcgacaag accggcttcc atccgagtac gtgctcgctc11400  
gatgcgatgt ttgccttggg ggtcgaatgg gcaggtagcc ggatcaagcg tatgcagccg11460  
ccgcattgca tcagccatga tggatacttt ctcggcagga gcaaggtgag atgacaggag11520  
20 atcctgcccc ggcaacttcgc ccaatagcag ccagtcctt cccgcttcag tgacaacgctc11580  
gagcacagct gcgcaaggaa cgcccgtcgt ggccagccac gatagccgcg ctgcctcgctc11640  
25 ctgcagttca ttcagggcac cggacaggtc ggtcttgaca aaaagaaccg ggcgcccctg11700  
cgctgacagc cggaacacgg cggcatcaga gcagccgatt gtctgttgtg cccagtcata11760  
gccgaatagc ctctccaccc aagcggcccg agaacctgcg tgcaatccat cttgttcaat11820  
30 catgcgaaac gatcctcctc ctgtctcttg atcagatctt gatccctgc gccatcagat11880  
ccttggcggc aagaaagcca tccagtttac tttgcagggc ttcccaacct taccagagg11940  
35 cgccccagct ggcaattccg gttcgcttgc tgtccataaa accgcccagt ctagctatcg12000  
ccatgtaagc cactgcaag ctacctgctt tctctttgcg cttgcgtttt ccctgtccal12060  
40 gatagcccag tagctgacat tcatccgggg tcagcaccgt ttctgcggac tggctttcta12120  
cgtgttccgc ttcctttagc agcccttgcg cctgagtgcc ttgcggcagc gtgggggatc12180  
ttgaagtcc tattccgaag ttcctattct ctagaaagta taggaacttc gaagcagctc12240  
45 cagcctacac caaaaaagg aataaggcg acacggaaat gttgaatact catactcttc12300  
ctttttcaat attattgaag catctatcag ggttattgtc tcatgagcgg atacatattt12360  
50 gaatgtattt agaaaaataa acaaatagg gttccgcgca catttccccg aaaagtgccal12420  
cctgacgtct aagaaacat tattatcatg acattaacct ataaaaatag gcgtatcacg12480  
55 aggcccttcc gtcttcaaga attctcatgt ttgacagctt atcatcgatg gacattattt12540  
ttgtggagcc ggaggaaaca gaccagacgg ttcagatgag gcgcttacca ccagaaccgc12600  
tggtgtccca ccattctggc gattcccaaa cgctatttgg ataaaaagta gccttaacgt12660  
60 ggtttatttt cc 12672