



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 313 792**

51 Int. Cl.:

C12N 15/31 (2006.01)	C12N 15/63 (2006.01)
C12N 1/21 (2006.01)	C07K 14/255 (2006.01)
C07K 16/12 (2006.01)	C12N 15/62 (2006.01)
C12N 15/74 (2006.01)	A61K 39/112 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **99946122 .1**

96 Fecha de presentación : **03.09.1999**

97 Número de publicación de la solicitud: **1108034**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **20.06.2001**

54 Título: **Mutantes atenuados de SPI2 de *Salmonella* como portadores de antígeno.**

30 Prioridad: **04.09.1998 EP 98116827**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.03.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.03.2009

73 Titular/es:
Emergent Product Development UK Limited
545 Eskdale Road, Winnersh Triangle
Wokingham, Berkshire RG41 5TU, GB

72 Inventor/es: **Hensel, Michael;**
Guzman, Carlos, Alberto;
Medina, Eva;
Apfel, Heiko;
Hueck, Christoph;
Holden, David William y
Shea, Jacqueline Elizabeth

74 Agente: **Urizar Anasagasti, José Antonio**

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

Mutantes atenuados de SPI2 de *Salmonella* como portadores de antígeno.

5 Antecedentes de la invención

En 1996, más de 17 millones de personas en todo el mundo, principalmente en países en desarrollo, murieron por infecciones diversas. La aparición y la propagación de resistencias a los antibióticos asociadas con el incremento en los viajes por todo el mundo han conducido a un riesgo creciente para el desencadenamiento de infecciones pandémicas. Esta posibilidad debe ser tomada muy seriamente dado que, para algunas bacterias patógenas, las alternativas terapéuticas disponibles se hayan reducidas a una única opción. Desconcertantemente, se ha descubierto que las bacterias patógenas también son un factor relevante en muchas enfermedades crónicas. El cáncer del estómago, por ejemplo, es el segundo cáncer mundial más común y está directamente vinculado con las infecciones crónicas de *Helicobacter pylori*. Las neumonías por *Chlamidia* han sido detectadas en placas arterioscleróticas y recientemente esta bacteria ha sido encontrada en las regiones enfermas del cerebro de personas que sufren de la enfermedad de Alzheimer. Muchas enfermedades autoinmunes, tales como la artritis reumatoide, parecen tener un origen bacteriano. La *Borrelia burgdorferi* es, además de muchas otras bacterias, un ejemplo prominente de un organismo que causa la enfermedad que afecta un número en aumento de personas. Finalmente, la *Nanobacteria* ha sido identificada en los riñones crónicamente enfermos de pacientes con depósitos cristalinos. Otras enfermedades crónicas severas se deben a los agentes patógenos virales, los más clínicamente relevantes son los virus de *Hepatitis B* y *C* (cáncer del hígado) y el virus del papiloma humano (cáncer cervical).

La importancia clínica creciente de los agentes patógenos bacterianos ha provocado la discusión creciente que considera el paradigma de prevención o tratamiento medicinal como la manera de tratar las enfermedades crónicas. Consistentemente, algunas enfermedades crónicas han sido exitosamente curadas por tratamiento con antibióticos. Sin embargo, como se ha indicado anteriormente, todos los microorganismos son genéticamente capaces de generar progenies rápidamente con resistencias adecuadas al antibiótico, impidiendo así el tratamiento eficiente de rutina. Concluyentemente, las vacunas representan una alternativa excelente para las drogas farmacológicas, y, considerando el aspecto financiero de que la prevención de la enfermedad es menos costosa que la terapia, la opción de la vacunación es aún más atractiva. Por consiguiente, el advenimiento de la vacunación terapéutica se ha vuelto particularmente relevante, especialmente con relación al tratamiento del cáncer y de las enfermedades crónicas bacterianas o virales.

La estrategia más frecuentemente practicada usa la entrega oral ya sea de agentes patógenos desactivados (vacuna muerta) o de inyecciones parenterales de una mezcla definida de componentes purificados (vacunas de unidades secundarias). La mayoría de las vacunas muertas son eficaces, sin embargo, el riesgo de que el procedimiento de desactivación sea incompleto y que las vacunas puedan volverse infecciosas permanece como un problema. Además, las vacunas muertas muy a menudo no cubren todas las variantes genéticas que aparecen en la naturaleza. Las vacunas de unidades secundarias cancelan la mayoría de las desventajas de las vacunas muertas tradicionales. Sin embargo, requieren un antígeno y preparaciones adyuvantes desarrollados tecnológicamente, lo cual hace tales vacunas relativamente caras. Además, las vacunas de unidades secundarias son preferentemente inoculadas por la ruta parenteral, la cual no es la ruta óptima para producir una respuesta inmune amplia. En particular, la rama mucosa del sistema inmunológico, la cual es la línea primaria de protección en contra de muchos agentes patógenos, está fuertemente abandonada para las inmunizaciones parenterales.

Otra generación de vacunas es representada por vacunas atenuadas vivas, las cuales se basan en virus o bacterias patógenas que han sido mutadas a las variantes no patogénicas. Estas variantes se multiplican *in vivo* por un período de tiempo limitado antes de que sean completamente liberadas por el huésped. Su prevalencia limitada en el tejido huésped es suficiente para provocar adecuadamente que el sistema inmunológico del huésped, el cual es entonces capaz de establecer una respuesta inmune protectora. Desde el aspecto de la seguridad, las vacunas bacterianas vivas atenuadas están más favorecidas que las vacunas virales vivas atenuadas. Si una vacuna bacteriana se convirtiera en una amenaza para una vacuna, la bacteria atenuada puede generalmente controlarse por el tratamiento de antibiótico. En contraste, las vacunas virales vivas, que usan el mecanismo de replicación de la célula huésped, son casi imposibles de controlar. Las vacunas bacterianas vivas son típicamente administradas oralmente y sirven de estimuladores excelentes del sistema inmunológico mucoso. Además, las vacunas bacterianas vivas son también buenos estimuladores del sistema inmunológico sistemáticamente activo, a saber las ramas celulares y humorales. Debido a estas excelentes características inmunoestimuladoras, las cepas de la vacuna bacteriana viva, como la *Salmonella*, son portadores ideales para la expresión de los antígenos de un agente patógeno heterólogo. Tales vacunas bivalentes (o multivalentes) median la protección en contra de dos agentes patógenos: el agente patógeno homólogo para el portador así como también el agente patógeno cuyo antígeno protector (s) son expresados por el portador. Aunque ninguna vacuna bacteriana bivalente que expresa antígenos heterólogos está actualmente en uso, los portadores potenciales actualmente bajo investigación incluyen a las especies *Bacille Calmette Guérin* (BCG), *Salmonella*, *Vibrio cholerae* y *Escherichia coli*.

En el proceso de atenuación, las mutaciones son preferentemente dirigidas a sectores específicos para los genes que soportan la supervivencia del agente patógeno en el huésped. Inicialmente, los regímenes químicos de mutación fueron aplicados para la cepa Ty2 de *Salmonella typhi*, resultando en lo que fuera pensado para ser perfectamente atenuados los agentes patógenos capaces de mediar la inmunidad protectora, en contraste al del homólogo muerto. Sin embargo,

las subsiguientes pruebas clínicas en gran escala revelaron que tales cepas no fueron todavía suficientemente eficaces en la prevención de la fiebre tifoidea. Aparece que tales cepas fueron mutadas en varios genes, resultando en una sobre atenuación, que adversamente afecta el potencial inmunogénico de la cepa. Las nuevas cepas de la vacuna de tifoidea han sido desarrolladas por la introducción de mutaciones genéticamente definidas. La mayoría de estas mutaciones han sido establecidas en la *S. typhimurium*. La infección con la *S. typhimurium* causa síntomas parecidos a los de la fiebre tifoidea en ratones y la *salmonellosis murina* es un modelo bien aceptado para la fiebre tifoidea humana. Tales cepas de la vacuna contienen mutaciones en proteínas que causan deficiencias en la biosíntesis de los aminoácidos aromáticos (por ejemplo *aroA*, *aroC* y *aroD*) o en las purinas (por ejemplo *purA* y *purE*), en el gen ciclasa adenilato (*cya*) o en la proteína del receptor cAMP (*crp*), o posee mutaciones que afectan la regulación de varios factores de virulencia (*phoP* y *phoQ*). Sin embargo, aunque un número de mutantes atenuados han sido generados y caracterizados en el modelo de ratón con respecto a su papel en la virulencia, relativamente pocos de ellos han sido evaluados como portadores de vacunas en humanos. La razón para esto es que los mutantes usados están ya sea todavía demasiado virulentos, causando efectos secundarios severos en el huésped, o no son suficientemente inmunogénicos, debido a la presentación inadecuada al sistema inmunológico, la cual requiere un nivel crítico de persistencia de la cepa de la vacuna en el huésped para la activación.

Un estudio reciente reveló que la desactivación de genes individuales de la *Salmonella* que causan atenuación de la virulencia directamente influye en la calidad de una respuesta inmune en contra de la cepa portadora de la vacuna. De este descubrimiento, uno puede concluir que podría lograrse generar una variedad de cepas de vacunas de *Salmonella* atenuadas diferentemente, cada una con un único perfil y capacidades individuales para producir como respuesta una respuesta inmune. Con este repertorio, podría lograrse hacer a la medida una cepa de vacuna según las demandas inmunológicas específicas. Como una consecuencia lógica, uno también debería poder desarrollar cepas de vacunas de *Salmonella* atenuadas ya sea para propósitos profilácticos o terapéuticos. Sin embargo, la manera por la cual un repertorio tan representativo de cepas de vacunas de *Salmonella* es obtenido y adicionalmente desarrollado en una vacuna eficaz debe ser determinada.

En los casos en los cuales una cepa de vacuna de *Salmonella* es utilizada como portador para antígenos heterólogos, los parámetros adicionales deben ser considerados. Tradicionalmente, los antígenos heterólogos han sido expresados en el citosol de la *Salmonella*. En el modelo de tifoidea del ratón, fue demostrado que, cuando los antígenos heterólogos son expresados en niveles altos en el Citosol de la *Salmonella*, los cuerpos de inclusión se forman a menudo, lo cual negativamente influye en la inmunogenicidad de la cepa de la vacuna viva recombinante en el huésped vacunado. Se concluyó que la formación de cuerpos de inclusión podría ser fatal para la bacteria, disminuyendo la vitalidad y aumentando la atenuación adicionalmente, y así bajando la inmunogenicidad. Ciertamente, los sistemas de expresión específicos que soslayan este principio secundario de atenuación, por ejemplo el sistema de expresión regulado de dos fases, pueden mejorar la eficacia de la presentación de antígenos heterólogos para el sistema inmunológico del huésped.

Ha sido demostrado que la secreción de antígenos por la *Salmonella* viva atenuada puede ser superior para la expresión intracelular de los mismos antígenos tanto en producir como respuesta respuestas de la célula T protectora (Hess et al., 1996; Hess et al., 1997b) como en producir como respuesta niveles elevados de anticuerpo específico de antígeno (Gentshev Et Al., 1998). Las eficiencias de los sistemas de secreción dirigidos HlyA, sin embargo, son usualmente bajas (30% o menos del total de antígeno sintetizado) (Hess Et Al., 1997a; Hess et al., 1996), y el sistema parece ser problemático en *S. typhi* para la exportación de antígenos heterólogos (Orr Et Al., 1999).

Un perfil inmunológico similar es inducido por los dos sistemas de secreción del tipo III, los cuales están codificados por las Islas 1 y 2 de patogenicidad de la *Salmonella*. Estas maquinarias complicadas de secreción naturalmente entregan "proteínas efectoras" en el citosol de la célula huésped infectada, dando apoyo a la supervivencia del agente patógeno dentro de la célula huésped. Por medio de la tecnología de gen, las "proteínas efectoras" pueden convertirse en vehículos portadores para los epítopes de los antígenos heterólogos. Tales "proteínas efectoras" quiméricas pierden su carácter virulento pero retienen su carácter secretor. Consecuentemente, la "proteína efectora" quimérica es entregada en el lumen de la célula huésped, en donde es apropiadamente procesada y subsiguientemente estimula la rama citotóxica del sistema inmunológico huésped.

La proteína más abundante secretada por la *Salmonella* es la flagelina (ver, por ejemplo (Hueck Et Al., 1995)). En la *S. typhimurium*, la flagelina ocurre en dos variantes alélicas, FliC o FljB, mientras la *S. typhi* porta sólo el gen FliC. La flagelina es secretada mediante la senda de exportación específica del flagelo (FEX) (Macnab, 1996; Minamino y Macnab, 1999), el cual es homólogo a la senda de secreción de tipo III (Hueck, 1998). También ha sido mostrado recientemente que la senda FEX funciona en la secreción de proteínas no flagélicas en *Yersinia enterocolitica* (Young et al., 1999). Como en la secreción del tipo III, el terminal amino de FliC dirige la secreción. Así, una versión truncada de 183 aminoácidos de terminal amino de FliC (la longitud total es 495 aa) es constitutivamente secretada en cantidades grandes (Kuwayama et al 1989). En analogía a una secreción del tipo III, la señal de secreción efectiva en FliC puede ser tan pequeña como 10 a 20 aminoácidos. Las señales de excreción FliC o FljB potencialmente pueden usarse para secretar cantidades grandes de una proteína heteróloga que puede servir como antígeno en la vacunación de heterólogos. Es probable que la cantidad de antígeno secretado pueda estar aun adicionalmente aumentada en mutantes reguladores afectando la expresión de biosíntesis de genes flagelares (Macnab, 1996; Schmitt et al., 1996) o usando promotores recombinantes para conducir la expresión del gen de flagelina.

La secreción por medio de la senda de FEX puede permitir la entrega de grandes cantidades de antígeno en la *Salmonella* que contiene el fagosoma para el procesamiento rápido y eficiente del antígeno y la presentación del antígeno al sistema inmunológico huésped. Especialmente la rama dependiente clase II de CPH del sistema inmunológico del huésped es fuertemente respaldada por el sendero de la entrega de antígeno mediado de FEX.

Las otras maquinarias conocidas de exportación y los sistemas de despliegue de la superficie de bacterias gram negativas pueden ser también aplicadas para los portadores de vacuna bacteriana tales como la *Salmonella*. En general, una buena respuesta inmune es lograda cuando el antígeno es presentado en la superficie de la *Salmonella*. Sin embargo, como se sabe poco acerca de la consecuencia inmunológica de tales sistemas de presentación del antígeno, el trabajo experimental adicional es necesario.

Los efectos adicionales inmunomodulatorios pueden ser logrados cuando los promotores de *Salmonella* ambientalmente regulados se usan para la expresión de antígenos heterólogos. Por ejemplo, la expresión de un gen heterólogo en una cepa portadora de *Salmonella* bajo el control del promotor del gen *htrA* de respuesta de estrés regulada *in vivo* resultó en una respuesta inmune más fuerte que fue obtenida cuando está bajo el control del promotor inducible anaeróbicamente del gen *nirB*.

El WO 96/17951 se relaciona con un método para identificar un microorganismo que tiene una adaptación reducida a un ambiente particular, y a microorganismos mutantes y genes identificados por el método.

Hensel et al (1997) Mol. Microbiol. 24, 155-167 trata sobre el análisis funcional de *ssaJ* y el *ssak/U* operón.

Ochman et al (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 7800-7804 se relaciona con la identificación de una isla de patogenicidad requerida para la supervivencia de la *Salmonella* en las células huéspedes.

El acceso No. AF 0208080 de la base de datos EMBL/GenBank se relaciona con una secuencia parcial de la isla 2 de patogenicidad de la *Salmonella typhimurium*.

El acceso No. Z 95891 de la base de datos EMBL/GenBank se relaciona con los genes *ssrA* y *ssrB* de la *Salmonella typhimurium*.

Valentine (1998) Infection Immun. 66, 3378-3383 se relaciona con la identificación de tres mutantes de la *Salmonella typhimurium* altamente atenuados que son más inmunogénicos y protectores en ratones que un mutante del *aroA* prototípico.

El mecanismo presente describe una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de ácido nucleico que consta de al menos 50 nucleótidos a) de la secuencia de ácido nucleico de una de las Figs. 21 A, B, b) de un alelo de la secuencia de ácido nucleico de una de las Figs. 21 A, B, o c) de una secuencia de ácido nucleico la cual bajo condiciones estrictas hibridiza con la secuencia de ácido nucleico de una de las Figs. 21 A, B.

Las condiciones estrictas de hibridación en el sentido de la invención presente están definidas como las descritas por *Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989), 1.101-1.104*. Según esto, la hibridación bajo condiciones estrictas quiere decir que una señal positiva de hibridación es todavía observada después de lavar por 1 hora con tampón 1 x SSC y 0,1% a 55°C, preferentemente a 62°C y más preferentemente a 68°C, en particular, por 1 hora en tampón 0,2 x SSC y de 0,1% a 55°C, preferentemente a 62°C y más preferentemente a 68°C.

En particular, el mecanismo presente describe tal molécula de ácido nucleico la cual comprende las regiones completas de codificación o partes de la misma de los genes *ssaD*, *ssaE*, *sseA*, *sseB*, *sscA*, *sseC*, *sseD*, *sseE*, *ssbB*, *sseF*, *sseG*, *ssaG*, *ssaH*, *ssaE*, *ssaJ*, *ssrA* y *ssrB*. La invención se aplica también para tales ácidos nucleicos, en donde al menos una región de codificación de dichos genes es funcionalmente suprimida.

En una realización, la molécula de ácido nucleico comprende un casete de inserción para facilitar la introducción de una molécula de ácido nucleico heteróloga por el mecanismo mediado por transposón o fago.

Además, dichas moléculas de ácido nucleico pueden comprender al menos una molécula de ácido nucleico heteróloga. En este caso la molécula de ácido nucleico heteróloga puede ser combinada 5' o 3', insertada o delección-insertada a la molécula de ácido nucleico inventiva. Por el término "delección-insertada" está sobreentendido que la inserción de la molécula heteróloga de ácido nucleico se asocia con una delección concurrente de partes de la molécula de ácido nucleico inventiva. Preferentemente, la molécula de ácido nucleico está insertada o delección-insertada y en una realización preferida la molécula de ácido nucleico heteróloga está flanqueada 5' y 3' por las secuencias de la molécula de ácido nucleico según la invención, en donde cada una de dichas secuencias tiene un largo de al menos 50 nucleótidos, preferentemente 200 a 250 nucleótidos.

Preferiblemente, la molécula de ácido nucleico heteróloga codifica para un polipéptido o péptido, más preferiblemente codifica para un antígeno bacteriano o viral o un homólogo del mismo o para un antígeno del tumor.

Es preferido que la molécula de ácido nucleico también comprenda al menos un casete de expresión del gen para permitir la expresión eficiente de la molécula de ácido nucleico heteróloga. Tal casete de expresión del gen usualmente comprende elementos tales como promotores y/o mejoradores los cuales mejoran la expresión de la molécula de ácido nucleico heteróloga. Usualmente, tal casete de expresión del gen comprende elementos para la terminación de la transcripción. La presencia de terminadores de la transcripción, sin embargo, no puede ser preferida en casos donde la molécula de ácido nucleico heteróloga debe transcribirse conjuntamente con otros genes en un mRNA cistronómico.

La molécula de ácido nucleico, uno o más casetes marcadores selectivos y uno o más casetes transactivadores y opcionalmente casetes de invertasa para permitir la expresión de las moléculas de ácido nucleico heterólogas en un sistema de una fase o un sistema de dos fases. Además, las secuencias pueden estar presentes la cuales codifican para un polipéptido o un dominio de selección de péptido y, así, permitir la selección del producto de expresión de la molécula de ácido nucleico heteróloga en un compartimiento de la célula predeterminado tal como citosol, periplasma o una membrana exterior, o la secreción de dicho producto de expresión, o el cuál codifica para un dominio inmunoestimulador.

La presente solicitud también describe un vector recombinante que comprende la molécula de ácido nucleico descrita arriba. La presente solicitud también describe una célula que comprende una molécula de ácido nucleico inventiva modificada como se describió arriba por la inserción de una secuencia heteróloga o el vector recombinante. La célula puede ser una célula procariótica tal como una célula gram negativa, por ejemplo una célula de *Salmonella*, o puede ser una célula eucariótica tal como una célula de mamífero, por ejemplo una célula humana, y, en particular, un macrófago.

La presente solicitud describe un péptido o un polipéptido que comprende una secuencia péptida que comprende al menos 20 aminoácidos, a) de la secuencia de una de las Figs. 23 A-Q, o b) de una secuencia que es el 60%, preferible el 65% y más preferible el 70% de los homólogos a la secuencia de una de las Figs. 23 A-Q. En particular, la invención refiere a un polipéptido que comprende la secuencia a) de una de las Figs. 23 A-Q, o b) la cual es el 60%, preferible el 65% y más preferible el 70% del homólogo para la secuencia de una de las Figs. 23 A-Q.

Los porcentajes (%) de homología son determinados según la siguiente ecuación:

$$H = \frac{n}{L} \times 100$$

en donde las H son los % de homología, L es la longitud de la secuencia básica y n es el número de las diferencias de nucleótido o de aminoácido de una secuencia a la secuencia básica dada.

La presente solicitud también describe un anticuerpo el cual es dirigido en contra de un epítipo el cual está comprendido del péptido o polipéptido antes mencionados. El anticuerpo puede ser policlonal o monoclonal. Los métodos para producir tal anticuerpo son conocidos por el experto en la técnica.

La presente solicitud también describe una proteína de fusión que comprende el polipéptido según cualesquiera de las reivindicaciones 17 y 18 teniendo insertado o insertado por delección o estando combinada C- ó NH₂- terminalmente con al menos un polipéptido heterólogo. El polipéptido heterólogo preferido es un antígeno, más preferido un antígeno bacteriano o viral o un antígeno del tumor.

La presente solicitud además provee instrucciones para el desarrollo de una variedad de cepas de vacunas de *Salmonella* vivas potenciales con niveles de atenuación diferentes, las cuales subsiguientemente sirven como plataformas para el desarrollo de cepas portadoras de vacunas de *Salmonella* vivas recombinantes que expresan antígenos de agentes patógenos heterólogos, así sirviendo de vacunas multivalentes. Tales portadores de vacuna recombinante de *Salmonella* viva están equipados con módulos que comprenden casetes de gen variable que regulan la expresión de antígenos heterólogos en la *Salmonella* y determina la presentación de los antígenos heterólogos para el sistema inmunológico del huésped. Por combinaciones de ambos sistemas, las cepas de la vacuna de *Salmonella* viva atenuadas diferentemente y los casetes del gen variable, una variedad de cepas portadoras de la vacuna viva recombinante puede ser generada que tiene, debido a sus características inmunogénicas variables, un espectro amplio de aplicación para ambos usos profiláctico y terapéutico. El principio básico de atenuación se origina de las mutaciones nuevas en el locus del gen (SPI2) de la Isla 2 de patogenicidad de la *Salmonella*. Las mutaciones adicionales, las cuales pueden ser usadas ya sea solas o en combinación con las mutaciones en genes sse o SPI-2 o en combinación con la mutación del aroA para la atenuación óptima de las cepas portadoras de la vacuna viva, se han reportado recientemente (Heithoff et al., 1999; Valentine et al., 1998). Por la combinación de las mutaciones individuales en el locus del gen SPI-2 con cada otro y con otras mutaciones atenuantes del gen conocidas, tal como aroA, etc., un repertorio amplio de atenuación e inmunogenicidad puede ser logrado. Los casetes de expresión diferentes pueden ser introducidos en estas plataformas, permitiendo la modulación adicional de la respuesta inmunológica dirigida en contra de los antígenos heterólogos. Fi-

nalmente, una biblioteca de cepas portadoras de la vacuna de *Salmonella* viva recombinante individual es generada, cubriendo un espectro amplio de potencial inmunoestimulante, de la cual una cepa de vacuna viva genuina puede estar hecha a la medida para el tratamiento o protección óptima de humanos y/o animales en contra de la enfermedad o de los agentes patógenos específicos.

5

Así, la presente solicitud también describe una célula gram negativa atenuada que comprende el locus del gen SPI2, en donde al menos un gen del locus del SPI2 es desactivado, en donde dicha desactivación resulta en una atenuación/reducción de la virulencia comparada al tipo natural de dicha célula.

10 Los genes presentes en la isla 2 de patogenicidad de la *Salmonella* que codifica para una variedad de proteínas involucradas en la secreción tipo III y esas que son requeridas para la propagación y la supervivencia sistémica dentro de las células fagocitarias son candidatos ideales para la atenuación del ssp de la *Salmonella* patógena.

15 Varios agentes patógenos bacterianos gram negativos secretan ciertas proteínas de virulencia por los sistemas de secreción de tipo III especializados. Los factores de virulencia posibilitan a la bacteria patógena colonizar un nicho en el huésped a pesar de los ataques específicos del sistema inmunológico. Los sistemas de secreción del tipo III comprenden un número grande de proteínas requeridas para transferir las proteínas efectoras específicas en las células huéspedes eucarióticas en una manera de contacto dependiente, así han sido nombrados los sistemas secretorios de contacto dependiente. Aunque varios componentes del mecanismo del sistema de secreción muestran conservación evolutiva y funcional a través de las especies bacterianas, las proteínas efectoras son menos bien conservadas y tienen funciones diferentes. Los efectores *Yersinia* YpkA y YopH tienen actividades treonina/serina quinasa y tirosina fosfatasa, respectivamente. Las acciones de estos y otros Yops inhiben la fagocitosis bacteriana por las células huéspedes, lo cual se piensa que posibilita la proliferación bacteriana extracelular. Las proteínas *Shigella* Ipa, secretadas por el sistema de secreción del tipo III de mxi/spa promueven la entrada de esta bacteria en las células epiteliales. EspA, EspB y EspD, codificadas por el locus de eliminación de enterocita (LEE) de la *Escherichia coli* enteropatogénica (ECEP) son requeridos para la translocación de las proteínas que causan nuevas disposiciones del citoesqueleto y la formación de estructuras como pedestales en la superficie de la célula huésped.

30 Para los propósitos de la solicitud presente una "célula gram negativa que comprende el locus del gen SPI2" es una célula que tiene un locus del gen que alberga los genes requeridos para la propagación y la supervivencia sistémica dentro de las células fagocitarias y, así, es un homólogo o equivalente funcional del locus del SPI2 de la *Salmonella*. Preferente, la célula gram negativa atenuada inventiva es una célula Enterobacteriaca, más preferente, una célula de *Salmonella*, una célula *Shigella* o una célula *Vibrio*. En general, las células que tienen un rango huésped amplio son preferidas. Los huéspedes típicos son mamíferos, por ejemplo, el hombre, y las aves, por ejemplo, el pollo. Las células de la *Salmonella* son más preferidas, y particularmente preferidas es la *Salmonella* Serotipo Typhimurium Tipo Definitivo 104 (DT 104).

40 La *Salmonella typhimurium* es inusual en que contiene dos sistemas de secreción de tipo III para los factores determinantes de virulencia. El primero controla la invasión bacteriana de células epiteliales, y está codificada por genes dentro de una isla (SPI1) de patogenicidad de 40 kb. El otro está codificado por genes dentro de una segunda isla (SPI2) de patogenicidad de 40 kb y es requerido para el crecimiento sistémico de este agente patógeno dentro de su huésped. Los genes localizados en la isla de patogenicidad SPI1 son principalmente responsables de los pasos primarios del proceso de infección, la invasión de células huéspedes no fagocitarias por la bacteria. Para la mayoría de los genes SPI1, las mutaciones resultan en una invasividad reducida *in vitro*. Sin embargo, los mutantes que son defectuosos en la invasión no son necesariamente no virulentos; los estudios en ratones demostraron que, mientras estas mutaciones en los genes SPI1 significativamente redujeron la virulencia en la entrega por la ruta oral, no tuvieron influencia en la virulencia siguiendo una ruta intraperitoneal de infección. Tomados conjuntamente, estos resultados indican que las mutaciones en genes dentro de la isla SPI1 de patogenicidad no cancelan la infección sistémica y son por consiguiente no muy útiles para el desarrollo de una cepa portadora de *Salmonella* atenuada inocua. En contraste, los estudios de virulencia de mutantes del SPI2 han mostrado estar atenuados por al menos en cinco órdenes de magnitud comparados con la cepa de tipo natural después de ambas inoculaciones oral e intraperitoneal en ratones.

55 Muchos de los componentes de codificación de genes del sistema de secreción del SPI2 están ubicados en un segmento de 25 kb de SPI2. El SPI2 contiene genes para un mecanismo de secreción de tipo III (ssa) y un sistema regulador de dos componentes de (ssr), así como también genes candidatos para un conjunto de efectores secretados (sse) y sus chaperones específicos (ssc). En base de las similitudes con genes presentes en otros agentes patógenos bacterianos, los primeros 13 genes dentro del ssaK/U operón y ssaJ codifican los componentes del mecanismo del sistema de secreción. Un número de genes adicionales, incluyendo ssaC (MLA 11 en *Shea et al., 1996*; spiA en *Ochman et al., 1996*) y ssrA (MLA 12 en *Shea et al., 1996*; spiR en *Ochman et al., 1996*), los cuales codifican una proteína del mecanismo del sistema de secreción y una proteína de dos componentes reguladores, respectivamente, son encontrados en una región de aproximadamente 8 kb de ssaJ.

65 Preferentemente, la célula gram negativa atenuada ha desactivado al menos un gen seleccionado de los genes (ssa) del mecanismo de secreción del gen efector (sse), genes chaperones (ssc) y genes de regulación (ssr). Más preferentemente, al menos un gen desactivado es un gen sse, ssc y/o ssr, aún más preferente es un gen sse y/o un ssc.

Hasta que los genes sse son afectados por la desactivación, el gen desactivado es preferentemente sseC, sseD, sseE o una combinación de los mismos. Hasta que los genes ssr son afectados por la desactivación, preferentemente al menos el ssrB está desactivado. Hasta que los genes ssc son afectados por la desactivación, preferentemente al menos el sscB está desactivado.

La desactivación de dicho gen del locus del SPI2 (o el homólogo funcional del mismo en células que no sean de la *Salmonella*) es efectuada por una mutación que puede comprender la delección. Son preferidas las delecciones de al menos seis nucleótidos, y más preferida es una delección parcial y, en particular, la secuencia de codificación completa para dicho gen. La mutación también puede comprender la inserción de una molécula de ácido nucleico heteróloga en dicho gen para ser desactivada o una combinación de delección e inserción.

El ssp de la *Salmonella* patógena sirve una base para la construcción de un panel de prototipos de vacunas de *Salmonella* viva diferentes generados por atenuaciones graduales logradas a través de la introducción de mutaciones del locus del gen SPI2 definidas. Cada prototipo de vacuna de *Salmonella* viva individual resultante es adicionalmente transformado en una vacuna multivalente recombinante por la introducción de módulos portadores de ADN intercambiables (1) los genes genéticamente diseñados de agentes patógenos heterólogos y (2) los sistemas adecuados de expresión que ejecutan la presentación eficaz del antígeno al sistema inmunológico del huésped. De concierto, estas características provocan una respuesta inmune específica que o bien protege a los huéspedes vacunados en contra de la *Salmonella* que subsiguientemente invade a y/u otros agentes patógenos (vacunación profiláctica) o elimina los agentes patógenos persistentes, tales como el *Helicobacter pylori* (vacunación terapéutica).

El ssp de *Salmonella* patógena está gradualmente atenuado por mutaciones en los genes individuales de virulencia que son parte del locus del gen SPI2, por ejemplo, un gen sse que codifica para una proteína efectora, tal como sseC, sseD o sseE, o un gen ssc, tal como sscB, que codifican para un chaperón, o un gen ssr, tal como ssrB, que codifican para un regulador. La mutación individual de cada uno de estos genes conduce a un único grado de atenuación individual, la cual, a su vez, efectúa una característica de respuesta inmune en los niveles mucoso, humoral y celular. El grado individual de atenuación puede ser moderadamente aumentado por combinaciones de al menos dos mutaciones del gen dentro del locus del gen SPI2 o por combinación con una mutación en otro gen de *Salmonella* conocido para atenuar la virulencia, por ejemplo, un gen aro, tal como aroA. Un grado más fuerte de atenuación es logrado por la mutación de un gen virulento que es parte de un grupo de genes policistronicos que codifican varios factores de virulencia, tal como la unidad transcripcional que consiste de los genes sseC, sseD, sseE y sscB, tal que la mutación ejerce un efecto polar, que desestabiliza la expresión de los siguientes genes. El grado de atenuación directamente puede depender del número de genes de virulencia que son afectados por la mutación polar así como también sus características individuales. Finalmente, la atenuación más fuerte es lograda cuando los genes reguladores, tales como el ssrB, son mutados. Otra vez, cada modo de atenuación de una ssp de *Salmonella* conduce a la generación de un cepa de vacuna de *Salmonella* viva que evoca una respuesta inmune en los niveles mucoso, humoral y celular que es característica para el tipo y/o la combinación de las mutaciones atenuantes presentes en esa cepa. El panel de cepas de vacuna de *Salmonella* viva atenuadas diferentemente que es generada representa un grupo de cepas portadoras potenciales del cual el portador puede ser seleccionado para que provoque la respuesta inmune más eficaz para ya sea la prevención o la erradicación de la enfermedad en conjunto con los antígenos heterólogos que son expresados.

Las mutaciones que conducen a la atenuación de los genes de virulencia de la *Salmonella* indicados son preferentemente introducidas por la tecnología de ADN recombinante como delecciones definidas que ya sea suprimir completamente el gen de virulencia seleccionado o resulta en un gen truncado que codifica un factor de virulencia inactivo. En ambos casos, la mutación implica un único gen y no afecta la expresión de genes vecinos (mutación no polar). Una mutación interseccional en uno de los genes de virulencia indicados es preferida cuando el gen seleccionado es parte de un grupo de genes de virulencia policistronica y todos los genes de virulencia siguientes son incluidos en el proceso de atenuación (mutación polar). Las mutaciones insercionales con efectos no polares están en general restringidas para los genes que son ya sea individualmente transcritos o están localizados al final de un grupo policistronico, tal como el ssrB. Sin embargo, otras mutaciones atenuantes pueden originarse espontáneamente, por productos químicos, energía u otras formas de mutagénesis físicas o como un resultado de aparejarse u otras formas de intercambio genético.

Así, la mutación que resulta en la preparación de la célula gram negativa atenuada puede ser una mutación polar o no polar. Además, el grado de atenuación puede ser modificado desactivando un gen adicional fuera del locus del SPI2, por ejemplo, otro gen de virulencia o un gen que está involucrado en la biosíntesis de un metabolito o un precursor del mismo tales como los genes aro, en particular, aroA, o cualquier otro gen adecuado tal como el superóxido dismutasa (SOD).

La célula atenuada según la presente solicitud además puede comprender elementos que facilitan la detección de dicha célula y/o la expresión de una molécula de ácido nucleico heteróloga insertada. Un ejemplo de un elemento que facilita la detección de la célula atenuada es un casete marcador selectivo en particular, un casete marcador selectivo que es capaz de adjudicar resistencia antibiótica a la célula. En una realización, el casete marcador selectivo confiere una resistencia antibiótica a un antibiótico el cual no se usa para la terapia en un mamífero. Los ejemplos de elementos que facilitan la expresión de una molécula de ácido nucleico heteróloga son un casete de expresión del gen el cual puede comprender uno o más promotores, aumentadores, opcionalmente terminadores de transcripción o una

combinación de los mismos, un casete transactivador, un casete de invertasa para la expresión de una fase o de dos fases de un ácido nucleico heterólogo. Un ejemplo de un elemento que facilita la inserción de una molécula de ácido nucleico heterólogo es un casete de inserción.

5 En un primer aspecto, la invención provee un portador para la presentación de un antígeno a un huésped, cuyo portador es una célula gram negativa atenuada que comprende el locus del gene SPI2, en donde al menos uno de los genes efectores sseA, sseC, sseD, sseE, sseF y sseG es desactivado y/o en donde el gen chaperón sscB es desactivado y/o en donde al menos uno de los genes ssaE, ssaG y ssaH del mecanismo de secreción es desactivado y en donde los resultados de la desactivación en una atenuación/reducción de la virulencia se compararon al tipo natural de dichas
10 células, en donde dicha célula comprende al menos una molécula de ácido nucleico heteróloga que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica para dicho antígeno, en donde dicha célula es capaz de expresar dicha molécula de ácido nucleico o es capaz de causar la expresión de dicha molécula de ácido nucleico en una célula seleccionada.

15 Preferentemente, dichas moléculas de ácido nucleico comprenden una secuencia de ácido nucleico que codifica para un antígeno bacteriano o viral o para un antígeno del tumor. Los ejemplos de antígenos bacterianos son los antígenos de *Helicobacter pyori*, *Chlamydia pneumoniae*, *Borrelia burgdMLAeri* y *Nanobacteria*. Los ejemplos de antígenos virales son los antígenos del virus de Hepatitis, por ejemplo, las hepatitis B y C, el virus del papiloma humano y el *Herpes virus*. La molécula de ácido nucleico heteróloga puede comprender una secuencia de ácido nucleico que codifica al menos un polipéptido o un dominio de péptido seleccionado y/o el dominio immunoestimulante. Así,
20 el producto de expresión de dicha molécula de ácido nucleico heteróloga puede ser seleccionado específicamente para compartimientos predeterminados tales como el periplasma, la membrana exterior, etc. La molécula de ácido nucleico heteróloga puede codificar para una proteína de fusión.

25 Según una realización la molécula de ácido nucleico heteróloga es introducida en el locus del SPI2, preferiblemente, en un gen sse y, más preferiblemente, en sseC, sseD y/o sseE, en particular, sseC.

La inserción puede ser una inserción polar o una inserción no polar. Generalmente, la introducción de una inserción no polar es preferida, ya que permite la expresión de los genes restantes de un grupo de gen policistrónico, lo cual
30 puede ser usado para la generación de portadores que tienen grados diferentes de atenuación.

Las vacunas de Salmonella vivas atenuadas son utilizadas como portadores para antígenos específicos de agentes patógenos heterólogos, por ejemplo, *Helicobacter*, etc., así actuando como una vacuna multivalente. Los antígenos heterólogos son provistos por un casete de expresión del gen (CEG) que está insertado por ingeniería genética en
35 el genoma de una cepa de *Salmonella* atenuada. Preferentemente, la inserción del casete de expresión del gen es seleccionada para uno de los genes de virulencia indicados, por consiguiente causando una mutación insercional como la descrita en el párrafo anterior. En otra forma de aplicación, la expresión de los genes heterólogos en el casete de expresión del gen está regulada por los factores que transactúan codificados por un casete transactivador (CT) o un casete de invertasa realizando un modo variable de expresión de dos fases. Preferentemente, la inserción
40 del casete transactivador es seleccionada por un segundo gen de virulencia escogido, el cual es entonces desactivado. Alternativamente, el casete de expresión del gen o el casete transactivador o el casete de invertasa puede ser introducido en el genoma de *Salmonella* por la inserción mediada por transposón, lo cual no tiene efecto de atenuación.

Se requieren principios de ingeniería genética para generar ya sea mutaciones de delección ya sea inserción en genes
45 de virulencia de *Salmonella*. Generalmente, un plásmido suicida que transporta un casete de gen de virulencia mutado el cual contiene un casete marcador selectivo (CMS) solo o en combinación con un casete de expresión de gen, o un casete transactivador, o el casete invertasa, es introducido en la cepa receptora de *Salmonella* por conjugación. El gen original de virulencia es reemplazado con el casete de gen de virulencia mutado por medio de la recombinación homóloga, y el plásmido suicida, incapaz de replicarse en la cepa receptora de *Salmonella*, se vuelve rápidamente
50 agotado. La *Salmonella* exitosamente recombinada puede ser seleccionada en base a las propiedades (tales como la resistencia antibiótica, aunque no se limitada a ella) conferidas por el producto del gen (s) dentro del casete marcador selectivo. El casete del gen de virulencia mutado comprende secuencias de ADN que son homólogas al genoma de la cepa de *Salmonella* receptora en donde el gen de virulencia original es localizado. En el caso en donde el gen de virulencia original debe ser completamente suprimido, sólo esas secuencias de ADN genómicas que bordean el
55 gen de virulencia original (indicado como regiones de flaqueo) son incluidas en el casete del gen de virulencia mutado. La arquitectura general de un casete del gen de virulencia mutado incluye en cada extremo una secuencia de ADN de al menos 50 nucleótidos, idealmente de 200 a 250 nucleótidos, que es homóloga para el segmento de genoma en donde el gen de virulencia original es localizado. Estas secuencias de ADN flanquean un casete marcador selectivo y los otros casetes, tales como el casete de expresión del gen (CEG) o el casete transactivador (CT) o el
60 casete del invertasa. Como se indicó anteriormente, estos casetes son usados para generar mutaciones insercionales que deterioran la expresión del gen original. Para las delecciones en marco, un casete marcador selectivo es preferentemente usado.

El casete marcador selectivo (CMS) principalmente consiste en un gen que media la resistencia para un antibiótico
65 el cual puede desactivar la cepa de *Salmonella* receptora pero el cual no es usado actualmente en el tratamiento de la *Salmonelosis*. Alternativamente, otro marcador seleccionable puede ser usado. El casete marcador selectivo está insertado en el marco en el gen de virulencia seleccionado y, consecuentemente, la expresión del gen marcador está bajo el control del promotor del gen de virulencia. Alternativamente, el casete está insertado dentro de una unidad

transcriptional policistrónica, en cuyo caso el gen marcador está bajo el control del promotor para esta unidad. En otra aplicación, el gen marcador selectivo está bajo el control de su propio promotor, en este caso un terminador transcriptional es adicionado secuencia abajo del gen. El marcador selectivo es necesario para indicar la introducción exitosa del casete del gen de virulencia mutado en el genoma de la cepa de *Salmonella* receptora. Además, el marcador de resistencia antibiótica es necesario para facilitar la valoración inmunológica preclínica de las diversas cepas de *Salmonella* atenuadas. En otra forma de aplicación, el marcador selectivo está flanqueado por repeticiones directas, las cuales, en ausencia de la presión selectiva, conduce a la excisión recombinatoria del casete marcador selectivo del genoma, dejando la secuencia corta de la repetición directa. Alternativamente, el casete marcador selectivo puede ser completamente removido por la tecnología de ADN recombinante. En primer lugar, el casete selectivo del marcador es removido por la endonucleasa de restricción adecuada del casete del gen de virulencia mutado original en el plásmido suicida dejando las secuencias de la región flanqueadora las cuales son homólogas para el genoma de *Salmonella*. El plásmido suicida es entonces transferido en la cepa de *Salmonella* receptora atenuada por conjugación en donde el casete del gene de virulencia mutado de CMS agotado reemplaza el CMS que lleva el casete del gen de virulencia mutado por recombinación. Después de la extracción del marcador selectivo, la cepa de *Salmonella* atenuada está libre para la aplicación en humanos. Las secuencias del terminador transcripcional son generalmente incluidas en los casetes cuando las mutaciones polares son establecidas.

El casete de expresión del gen (CEG) comprende elementos que permiten, facilitan o mejoran la expresión de un gen. En un modo funcional el casete de expresión del gen adicionalmente comprende una o más unidades de expresión del gen derivadas ya sea de genes completos de una fuente de heterólogos o fragmentos de los mismos, con un tamaño mínimo de un epítipo. Las unidades múltiples de expresión del gen están preferentemente organizadas como una estructura concatémica. Los genes o los fragmentos del gen son adicionalmente diseñados genéticamente, tales que las proteínas resultantes o las proteínas de fusión son expresadas en el citosol, en el periplasma, en la superficie exhibida o secretada. Además los genes o los fragmentos de gen pueden ser combinados con secuencias de ADN que codifican inmunologicamente porciones de proteína reactivas, por ejemplo, citoquinas o toxinas bacterianas atenuadas. Los genes o los fragmentos de gen son o controlados en un modo de una fase de un promotor dentro del casete de expresión del gen o en un modo de dos fases o indirectamente por un casete transactivador (CT). En el modo de una fase el promotor es preferentemente un promotor de *Salmonella* que es activado, por ejemplo, inducido, por las señales ambientales sino también por promotores constitutivos de fortaleza diferente pueden ser usados. En el modo de dos fases, la expresión del casete del gen se controla por una invertasa que se derivó de un casete de invertasa. La invertasa cataliza la inversión de un segmento de ADN que comprende el casete del gen. El segmento de ADN está flanqueado en cada extremo por una repetición invertida la cuál es el sustrato específico para la invertasa finalmente causando dos orientaciones del casete del gen con relación al promotor del casete de expresión del gen. En la orientación ON el casete del gen es colocado correctamente permitiendo la transcripción del casete del gen. En OFF, la orientación del casete del gen es incorrecta y ninguna transcripción ocurre. El casete de invertasa comprende de una invertasa que se controla por un promotor constitutivo o un promotor de *Salmonella* inducido o reducido por las señales ambientales.

Los antígenos heterólogos codificados dentro del casete de expresión del gen pueden ser expresados bajo el control de un promotor, por ejemplo, un promotor específico de tejido, el cual puede ser constitutivo o inducible. La expresión puede ser activada en una célula seleccionada, por medio de la cual una señal es transmitida de la célula seleccionada al interior de la célula de *Salmonella*, cuya señal induce la expresión. La célula seleccionada, por ejemplo, puede ser un macrófago. El producto de expresión puede comprender un dominio de selección o dominio immunoestimulante por ejemplo, en forma de una proteína de fusión. La proteína heteróloga misma también puede ser una proteína de fusión. Los antígenos heterólogos pueden ser opcionalmente expresados como citosólico, periplásmico, superficie exhibida o proteínas secretorias o proteínas de fusión para lograr una respuesta inmune eficaz. Las secuencias de codificación del antígeno pueden estar combinadas para las secuencias accesorias que dirigen las proteínas al periplasma o la membrana exterior de la célula de *Salmonella* o en el ambiente extracelular. Si los polipéptidos heterólogos son secretados, la secreción puede ocurrir usando un sistema de secreción de tipo III. La secreción por el sistema de secreción de tipo III de SPI2 está disponible. Las proteínas que están destinadas al compartimiento citosólico de la *Salmonella* no necesitan secuencias accesorias, en este caso, las secuencias accesorias que ocurren naturalmente deben ser removidas de los genes que codifican tales antígenos.

Las secuencias accesorias para el compartimiento periplasmático de la *Salmonella* comprenden una secuencia de ADN deducida del péptido de la señal amino terminalmente localizado de una proteína heteróloga naturalmente translocalizada por medio de la senda de secreción general, por ejemplo, CtxA, etc.

Las secuencias accesorias para el compartimiento exterior de la membrana de la *Salmonella* preferentemente comprenden las secuencias de ADN deducidas de las porciones funcionalmente relevantes de una proteína secretora tipo IV (autoportadora), por ejemplo, proteasa AIDA o IgA. La proteína apropiada de fusión contiene un péptido de la señal amino terminalmente localizada y, en los terminales carboxi, un dominio de la transmembrana en forma de β -barril al cual la proteína pasajera extraña está acoplada por un espaciador que ancla la proteína pasajera a la superficie bacteriana.

Las secuencias accesorias para la secreción en el ambiente extracelular comprenden las secuencias de ADN deducidas de las proteínas naturalmente secretadas por el sistema de secreción de tipo III. En una proteína de fusión generalmente funcional, el antígeno heterólogo es combinado en el centro de una proteína naturalmente secretada por la senda de tipo III o en el extremo terminal carboxi de la proteína respectiva.

Los *casetes transactivadores* (CT) suministran activadores que generalmente mejoran la expresión de los antígenos heterólogos codificados por los variados casetes de expresión de gen. Tales activadores actúan o directamente (polimerasa de ARN) o indirectamente (activador transcripcional) sobre el nivel de transcripción en un orden muy específico. Preferencialmente, la expresión de tales activadores son controlados por promotores de *Salmonella* los cuales son producidos *in vivo* por señales ambientales. En otra forma de aplicación la síntesis del activador dentro del casete transactivador es regulada en un modo de dos fases. La invertasa expresada por el casete de invertasa coloca el activador que codifica al fragmento de ADN en dos orientaciones con respecto al promotor transcripcional. En la orientación ON el gen activador está en el orden transcripcional correcto. En el modo OFF el activador es orientado incorrectamente y ninguna expresión ocurre.

En el sistema simple, el producto de gen del casete transactivador ejerce su efecto directamente sobre el promotor presente en el casete de expresión de gen, directamente activando o reprimiendo la expresión del gen heterólogo. En el sistema complejo, la activación del promotor en el casete de expresión de gen heterólogo es dependiente de dos o más factores interactuantes, al menos uno de los cuales (codificado en el *casete transactivador*) puede ser regulado por las señales externas. La complejidad adicional es encontrada en los sistemas de cascada, en los cuales la señal externa no ejerce directamente su efecto sobre el *casete transactivador*, sino más bien a través de un proceso de múltiples pasos, o en el cual el producto de gen del *casete transactivador* no ejerce directamente su efecto en el *casete de expresión de gen heterólogo*, sino más bien a través de un proceso multifase.

La presente solicitud describe una célula gram negativa atenuada que comprende el locus del gen SPI2, caracterizada por una falta de al menos un polipéptido SPI2, en donde dicha falta resulta en una atenuación/reducción de la virulencia comparada con el tipo natural de dicha célula. Preferentemente, dicho polipéptido SPI2 faltante es uno o más polipéptidos efectores, polipéptido de mecanismo de secreción, polipéptido chaperón o polipéptido regulador. Además, dicha célula atenuada puede ser una portadora la cual entonces es caracterizada por la presencia de al menos un péptido heterólogo o polipéptido que tiene propiedades inmunogénicas.

Un aspecto adicional de la invención presente es una composición farmacéutica la cual comprende como agente activo una vacuna viva protectora inmunologicamente la cual es una portadora gram negativa atenuada de acuerdo con la invención. La composición farmacéutica comprenderá aditivos tales como diluentes, portadores y/o adyuvantes aceptables farmacéuticamente. Estos aditivos son conocidos por la persona experta en la técnica. Generalmente, la composición se administrará a un paciente por medio de una superficie mucosa o por medio de la ruta parenteral.

Los aspectos adicionales de la invención presente incluyen un método para la preparación de una vacuna viva, la cual comprende suministrar una célula gram negativa viva que comprende el locus de SPI2 y desactivar al menos un gen del locus de SPI2 para obtener una célula gram negativa atenuada de la invención, e insertar al menos una molécula de ácido de nucleico heterólogos que codifica para un antígeno para obtener un portador de acuerdo con la invención. Un aspecto adicional está relacionado con un método para la preparación de una composición de vacuna viva que comprende la formulación de un portador de acuerdo con la invención en una cantidad efectiva farmacéuticamente junto con diluentes, portadores y/o adyuvantes aceptables farmacéuticamente. Un aspecto adicional de la invención se relaciona con un método para la detección de un portador de acuerdo con la invención, que comprende suministrar una muestra que contiene dicha célula portadora y detectar una propiedad específica no presente en una célula de tipo natural. Los métodos para detectar una propiedad específica del portador, la cual no está presente en el tipo natural, son conocidos por la persona experta en la técnica. Por ejemplo, si esta propiedad específica de la célula atenuada comprende una delección de uno o más partes del locus de SPI2, entonces la presencia de dicha célula puede ser detectada proveyendo un par de cebadores específicos los cuales son complementarios a las secuencias que flanquean esta delección y que amplifican un fragmento de longitud específica usando métodos de amplificación tales como PCR. Los métodos para detectar la presencia de un portador inventivo comprenden la amplificación PCR de un fragmento insertado o un fragmento que cruza el límite de inserción, los métodos de hibridización o la detección del producto de expresión de heterólogos o de un marcador selectivo.

Un aspecto adicional de la invención es un método para establecer una biblioteca de portadores atenuados de acuerdo con la invención. El método comprende la preparación de cepas de vacuna recombinante atenuadas cada una teniendo una mutación diferente en el locus de SPI2 que resulta en un grado de atenuación diferente. La patogenicidad o el potencial de virulencia de dichas cepas puede ser entonces determinada usando métodos conocidos como la determinación del LD50, y las cepas son evaluadas de acuerdo con las patogenicidades diferentes, o sea, a un grado diferente de atenuación. Preferentemente, el método comprende también la determinación de los otros parámetros de interés tales como la inmunogenicidad o la respuesta immunoestimuladora levantada en un huésped. Los métodos para determinar el potencial immunoestimulante son conocidos por la persona experta en la técnica y algunos de ellos son descritos en el Ejemplo 6. Preferentemente, el potencial immunoestimulante de los portadores inventivos es determinado en el nivel humoral, celular y/o mucoso. De este modo es posible establecer una biblioteca de portadores los cuales tienen un grado de atenuación predeterminado y propiedades immuno estimuladoras predeterminadas. Por lo tanto, para cada aplicación, la cepa que tiene las propiedades deseadas puede ser seleccionada específicamente. Por ejemplo, será usualmente preferido seleccionar una cepa atenuada fuerte para la administración a pacientes los cuales reciben fármacos inmunosupresores.

De manera similar, la invención permite el establecimiento de bibliotecas de portadores atenuados que tienen definidas patogenicidades y opcionalmente inmunogenicidades. El establecimiento de una biblioteca de portadores

adicionalmente comprenderá la determinación de la presentación de antígeno de dichas cepas portadoras a un huésped, en donde un panel de cepas portadoras diferentes será obtenido habiendo definido las propiedades con respecto a la patogenicidad, el potencial immunoestimulante de los antígenos portadores y el potencial immunoestimulante del antígeno heterólogo.

Otro aspecto de la invención es el uso del portador de acuerdo con la invención para la preparación de un fármaco para el tratamiento preventivo o terapéutico de una enfermedad aguda o crónica causada esencialmente por una bacteria o virus. Un portador de acuerdo con la invención puede ser usado para la preparación de un fármaco para el tratamiento preventivo o terapéutico de un tumor.

El potencial inmunoprotector individual de cada una de las cepas de vacuna de *Salmonella* recombinante establecidas es determinado en un modelo de ratón que usa una *Salmonella typhimurium* patogénica como cepa de provocación.

- Determinación del potencial de virulencia de la cepa de la vacuna de *Salmonella* recombinante: (1) Índice competitivo o LD50; (2) Prevalencia sistémica en sangre, hígado y bazo estrictamente excluida.
- Determinación del potencial immunoestimulante de la cepa portadora con un antígeno de prueba heterólogo citosólicamente expresado: (1) Inmunización oral única y evaluación subsiguiente de la respuesta inmunológica a corto y largo plazo: (a) análisis del perfil de respuesta inmunológica humoral, (b) análisis del perfil de respuesta inmunológica de la mucosa, (c) análisis del perfil de respuesta inmunológica celular; (2) Inmunizaciones orales múltiples y evaluación subsiguiente de la respuesta inmunológica a corto y largo plazo: (a) análisis del perfil de respuesta inmunológica humoral, (b) análisis del perfil de respuesta inmunológica de la mucosa, c) análisis del perfil de respuesta inmunológica celular;
- Determinación del potencial immunoestimulante de la cepa portadora para la entrega de ADN heterólogo (vacunación de ADN).

Preferencialmente, la cepa aceptora de *Salmonella* tiene un rango de huésped amplio, que exhibe patogenicidad importante tanto en animales como en humanos. Idealmente, esta es una cepa de *Salmonella* que es fuertemente patogénica para los ratones, tal como la *S. typhimurium*. Después del desarrollo exitoso de la cepa de vacuna de *salmonella* recombinante, la cepa es directamente aplicable para el uso tanto en animales como en humanos. Si tal cepa aceptora de *Salmonella* ideal no es satisfactoria para el huésped respectivo, otro huésped de *Salmonella* específica debe ser seleccionado, tal como *S. typhi* para humanos.

Otros aspectos de la invención se relacionan con el uso de una molécula de ácido nucleico como se muestra en las Figs. 21 A o B o en una de las Figs. 22 A - Q, modificadas opcionalmente como se describe más arriba o de un vector como se describe más arriba para la preparación de un portador para la presentación de un antígeno a un huésped y para el uso del locus de SPI2 de *Salmonella* para la preparación de un portador para la presentación de un antígeno a un huésped. En este contexto el término "Locus de SPI2 de *Salmonella*" se refiere a cualquier secuencia de ácido nucleico, que codifica o no codifica, y al producto de expresión de las secuencias de codificación.

La presente solicitud también describe una molécula de ácido nucleico aislada que comprende un ácido nucleico de al menos 100 nucleótidos a) de la secuencia de ácido nucleico de una de las Figs. 24 A, B, b) de una secuencia de ácido nucleico la cual bajo las condiciones estrictas hibridiza con la secuencia de ácido nucleico de una de las Figs. 24 A, B. Dicha molécula de ácido nucleico la cual es capaz de inducir la expresión de una secuencia de ácido nucleico que codifica para un péptido o polipéptido operativamente conectado a dicha molécula de ácido nucleico.

El Pivi promotor inducible *in vivo* comprende un fragmento de ADN que porta las secuencias para un operador y un promotor transcripcional. Tal promotor inducible *in vivo* puede ser identificado aplicando un método de gen reportero adecuado. Dos de tales promotores inducibles *in vivo* han sido identificados dentro del locus de SPI2 los cuales inician la expresión del operón ssaBCDE (promotor A2) y el operón de sseABsscAsseCDEsscBsseFG (promotor B), respectivamente. Estos promotores son inducidos por un sistema regulativo que comprende los productos de gen *ssrA* y *ssrB*. Este sistema regulativo es parte del locus de SPI2 responsable de la activación de genes de locus de SPI2 adicionales. El sistema regulativo es activado en macrófagos por señal (s) ambiental por medio de la proteína sensora *SsrA*. La proteína *SsrB* se une definitivamente en una secuencia de ADN definida la cual inicia la transcripción a través de la polimerasa de ARN.

En una forma de aplicación el fragmento de ADN que comprende las secuencias operadora/promotora es insertado delante de un gen invertasa o un gen activador o un casete de expresión de gen, para por ello ejecutar una expresión inducible *in vivo* en bacterias que llevan por lo menos el y los genes *ssrA* y *ssrB* o el locus de SPI2 completo.

Por lo tanto, la presente solicitud describe un sistema de expresión para la expresión inducible *in vivo* de un ácido nucleico heterólogo en una célula seleccionada, que comprende una célula portadora para dicho ácido nucleico heterólogo, en donde dicha célula portadora comprende (a) un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácido mostrada en la Fig. 23 P (*ssrA*) o un homólogo funcional del mismo, (b) un polipéptido que tiene la secuencia de

aminoácido mostrada en la Fig. 23 Q (ssrB) o un homólogo funcional del mismo, y, (c) la molécula de ácido nucleico de una de las Figs. 24 A, B o un homólogo funcional del mismo, como se describió arriba.

La célula seleccionada podría ser cualquier célula apropiada pero preferentemente es un macrófago. La célula portadora preferentemente es una célula de *Salmonella*. La célula seleccionada también podría comprender uno o más de los elementos descritos más arriba tales como los casetes marcadores selectivos, casetes de expresión de gen, casetes transactivadores, casetes de invertasa y/o casetes de inserción. Además, podría comprender un ácido nucleico heterólogo, en particular, los ácidos nucleicos heterólogos pueden ser insertados en un casete de expresión de gen, dando por lo tanto el GEC funcional.

La presente solicitud también describe el uso de una molécula de ácido nucleico que comprende al menos 100 nucleótidos de la secuencia de ácido nucleico mostrada en una de las Figs. 24 A, B o hibridizar con éstos y que tiene actividad promotora, para la expresión inducible *in vivo* de una molécula de ácido nucleico heteróloga.

La presente solicitud también describe el uso de dicha molécula de ácido nucleico para la detección de promotores inducibles *in vivo*.

Procedimientos experimentales

Las cepas, el material, y los métodos usados en el sistema de secreción de tipo III de la Isla 2 del trabajo de Patogenicidad de la *Salmonella* (SPI2) como se describió arriba son como sigue:

Ratones

Las hembras BALB/c (H-2^d) de 6 a 12 semanas de edad fueron mantenidas bajo las condiciones estándar de acuerdo con las pautas institucionales. Este estudio fue aprobado por un comité de ética para el uso de animales en la investigación experimental.

Cepas bacterianas, fagos y plásmidos

Las cepas bacterianas, fagos y plásmidos usados en este estudio son listados en la Tabla 1. A menos que se indique otra cosa, las bacterias fueron cultivadas a 37°C en caldo de Luria Bertani (LB) o agar, complementado con ampicillín (50 µg/ml), kanamicina (50 µg/ml), o cloramfenicol (50 µg/ml) donde fue apropiado. Las células eucarióticas fueron cultivadas en RPMI 1640 complementada con 10% de suero de feto de ternero (SFT), 100 U/ml de penicilina, 50 µg/ml estreptomycin, 5x10⁻⁵ M de 2-mercaptoetanol y 1 mM de L-glutamina (GIBCO BRL Pringle, Escocia). Para lograr la expresión constitutiva de β-gal, el plásmido pAH97 (Holtel et al., 1992) fue electroporado en las cepas portadoras como se describió en otra parte (O'Callaghan y Charbit, 1990).

(Tabla pasa a página siguiente)

ES 2 313 792 T3

TABLA 1

Fagos, plásmidos y cepas bacterianas usados en este trabajo

5	Fago, plásmido o cepa	Descripción	Referencia
	Fagos		
	λ 1	Clon de la biblioteca genómica de <i>S. typhimurium</i> ADN en λ 1059	Shea et al., 1996
10	λ 2	Clon de la biblioteca genómica de <i>S. typhimurium</i> ADN en λ 1059	Shea et al., 1996
	λ 5	Clon de la biblioteca genómica de <i>S. typhimurium</i> ADN en λ 1059	
15	Plásmidos		
	pBluescriptKS+, pBluescriptSK+ pUC18	Amp ^r vectores de clonación de alta cantidad de copias	Stratagene, Heidelberg
		Amp ^r vectores de clonación de alta cantidad de copias	Gibco-BRL,
20	pT7-Blue	Amp ^r vectores de clonación de alta cantidad de copias	Novagen, Heidelberg
	pCVD442	Vector suicida	Donnenberg et al., 1991
	pACYC184	Cm ^r , Tet ^r ; vector de clonación de baja cantidad de copias	Chang y Cohen, 1978
25	pGPL01	R6K ori, Amp ^r ; vector suicida dependiente de λ pir para fusiones <i>luc</i>	Gunn y Miller, 1996
	pLB02	R6K ori, Amp ^r ; vector suicida dependiente de λ pir para fusiones <i>luc</i>	Gunn y Miller, 1996
	pGP704	R6K ori, Amp ^r ; vector suicida dependiente de λ pir	Miller y Mekalanos, 1988
30	pKAS32	Amp ^r ; vector suicida dependiente de λ pir; rpsl ^s	Skorupski y Taylor, 1996
	pNQ705 pSB315	R6K ori, Cm ^r ; vector suicida dependiente de λ pir Kan ^r , Amp ^r	Forsberg et al., 1994 Galán et al., 1992
35	p1-6	Amp ^r . 4,8 kb de fragmento de λ 1 PstI/BamHI en pT7-Blue	Este trabajo
	p1-20	1,7 kb de fragmento BamHI/HincII de p1-6 en pKS+	Este trabajo
	p1-21	Casete aphT en el sitio EcoRV de p1-20	Este trabajo
	p1-22	XbaI/KpnI inserto de p1-21 en pKAS32	Este trabajo
40	p2-2	Amp ^r , 5,7kb de fragmento BamHI de λ 2 en pUC18	Este trabajo
	p2-20	1,6kb de fragmento HindIII / HincII de p2-2 en HindIII/SmaI-asimilado pKS+	Este trabajo
	p2-21	Casete aphT en el sitio HincII de p2-20	Este trabajo
45	p2-22	Inserto de p2-21 en pKAS32	Este trabajo
	p2-50	3,7 kb de fragmento BamHI/KpnI p2-2 en pKS+	Este trabajo
	p5-2	Amp ^r , 5,7kb EcoRI fragmento de λ 5 en pKS+	Este trabajo
	p5-30	3,0kb PstI/EcoRI fragmento de p5-2 en pUC18	Este trabajo
50	p5-31	aphT casete en EcoRV sitio de p5-30	Este trabajo
	p5-33	SphI/EcoRI inserto de p5-31 en pGP704	Este trabajo
	p5-4	Amp ^r , 5,8kb HindIII fragmento de λ 5 en pSK+	Este trabajo
	p5-40	4,5kb SstI/HindIII fragmento de p5-2 en pKS+	Este trabajo
	p5-41	aphT casete n SmaI sitio de p5-40	Este trabajo
55	p5-43	KpnI/SstI inserto de p5-41 en pNQ705	Este trabajo
	p5-5	Amp ^r ; PstI digestión de p5-4 y religación del fragmento seleccionado	Este trabajo
	p5-50	2,6kb BamHI/ ClaI fragmento de p5-2 en pKS+	Este trabajo
60	p5-51	aphT casete en HindIII sitio de p5-50 después de llenado Klenow	Este trabajo
	p5-53	XbaI/Sall inserto de p5-51 en pGP704	Este trabajo
	p5-60	ClaI digestión de p5-2 y religación de fragmento mayor	Este trabajo
	p5-8	Amp ^r , 2,2kb PstII-HindIII fragmento de p5-2 en pSK+	Este trabajo
65	psseA	Cm ^r ; sseA en pACYC184	Este trabajo
	psseB	Cm ^r ; sseB en pACYC184	Este trabajo
	psseC	Cm ^r ; sseC en pACYC184	Este trabajo

	Cepas de <i>E. coli</i>		
	DH5 α	Ver referencia	Gibco-BRL
	S17-1 λ pir	λ pir fago lisógeno (ver referencia)	Miller y Mekalanos, 1988
5	CC118 λ pir	λ pir fago lisógeno (ver referencia)	Herrero et al., 1990
	XL1-Blue	ver referencia	Stratagene
	Cepas de <i>S. typhimurium</i>		
	NCTC12023	tipo natural	Colindale, UK
10	CS015	phoP-102:Tn10d-Cm	Miller et al., 1989
	CS022	phoP ^c	Miller et al., 1989
	P2D6	ssaV::mTn5	Shea et al., 1996
	P3F4	ssrA::m Tn5	Shea et al., 1996
15	P4H2	hilA::mTn5	Monack et al., 1996
	P6E11	spaRS::mTn5	Shea et al., 1996
	P8G12	ssrB::mTn5	Shea et al., 1996
	P9B6	ssaV::mTn5	Shea et al., 1996
20	P9B7	ssaT::mTn5	Shea et al., 1996
	P11D10	ssaJ::mTn5	Shea et al., 1996
	NpssaV	ssaV::aphT, Km ^r ; mutación no polar	Deiwick et al., 1998
	HH100	sseA Δ ::aphT, Km ^r ; mutación no polar	Este estudio
25	HH101	HH100 conteniendo psseA	Este estudio
	HH102	sseB Δ ::a phT, Km ^r ; mutación no polar	Este estudio
	HH103	HH102 conteniendo psseB	Este estudio
	HH107	sseF Δ ::aphT, Km ^r ; mutación no polar	Este estudio
30	HH108	sseG Δ ::a phT, Km ^r ; mutación no polar	Este estudio
	MvP102	sseE Δ ::sscB, Km ^r ; mutación no polar	Este trabajo
	MvP103	sseC::aphT, Km ^r ; mutación no polar	Este trabajo
	MvP103 [psseC]	MvP103 conteniendo psseC	Este trabajo
35	MvP131	ssaB::luc en <i>S. Typhimurium</i> NCTC12023	Este trabajo
	MvP127	sseA::luc en <i>S. typhimurium</i> NCTC12023	Este trabajo
	MvP244	ssaB::luc en <i>S. Typhimurium</i> P8G12	Este trabajo
	MvP266	ssaH::luc en <i>S. Typhimurium</i> NCTC12023	Este trabajo
40	Cepas de <i>S. typhimurium</i>		
	MvP284	ssrA::a phT, Km ^r ; mutación no polar	Este trabajo
	MvP320	ssrB::aphT, Km ^r ; mutación no polar	Este trabajo
	MvP337	Deleción en marco en sseC	Este trabajo
45	MvP338	Deleción en marco en sseD	Este trabajo
	MvP339	Deleción en marco en sscB	Este trabajo
	MvP340	Deleción en marco en ssrA	Este trabajo
50	SL7207	<i>S. typhimurium</i> 2337-65 hisG46, DEL407 aroA::TnI(Tc-s)	Forma de donación de B.A.D. Stocker
	III-57 sseC	AsseC	Este trabajo

55

Ejemplo 1

Distribución de la patogenicidad de la isla SPI-2 dentro de cepas diferentes de Salmonella

60

La presencia de marcos de lectura abiertos de la región SPI-2 en varias *Salmonellas* aisladas y *E. coli* k -12 fueron analizadas por hibridización Southern como se muestra en la Tabla 2.

65

TABLA 2

Prevalencia de los genes SPI-2 en *ssp* de *Salmonella* diversas deducidas de las sondas del gen representativo

	Especies	Sub especies	serovar/serotipo	ssrAB	MLA
5	S. entérica	I	typhimurium	+	+
	S. entérica	I	typhi	+	+
	S. entérica	II		++	++
10	S. entérica	IIIa		+	+
	S. entérica	IIIb		+	+
	S. entérica	IV		+	+
	S. entérica	VI		+	+
15	S. bongori	VII	66:z41:- -	-	+
	S. bongori		44:z48:- -	-	+
	E. coli K-12			-	-

La presencia o falta de bandas de hibridización son indicadas por + o -, respectivamente.

Hibridización

El ADN genómico de distintas cepas de *Salmonella* y *E. coli* k-12 fue preparado como previamente se describió (Hensel et al., 1997a). Para el análisis de hibridización Southern, el ADN genómico fue digerido con EcoRI o EcoRV, fraccionado sobre 0,6% de geles de agarosa y se transfirieron a membranas N⁺ de Hybond (Amersham, Braunschweig). Diversas sondas que corresponden a la región de SPI - 2 fueron obtenidas como fragmentos de restricción de la inserción subclonados de λ 1. Las sondas que corresponden a MLA 242 y a MLA 319 fueron generadas por PCR usando juegos de cebadores D89 (5'-TTTTACGTGAAGCGGGGTG-3') y D90 (5'-GGCATTAGCGGATGTCTGACTG-3'), y D91 (5'-CACCAGGAACCATTTTCTCTGG-3') y D92 (5'-CAGCGATGACGA- TATTCGACAAG- 3'), respectivamente. El PCR fue efectuado de acuerdo con las especificaciones del fabricante (Perkin - Elmer; Weiterstadt). Los productos de PCR fueron sometidos a electroforesis de gel de agarosa y los fragmentos del tamaño esperado fueron recuperados y purificados. Las sondas de hibridización fueron etiquetadas usando el sistema de etiquetamiento DIG como se describe por el fabricante (Boehringer, Mannheim).

Ejemplo 2

Caracterización de los genes *sse* y construcción de *sseC::aphT*, *sseD::a phT* y *sseEA* de las cepas mutantes de *S. Typhimurium* MvP103, MvP101 y MvP102

Organización de los genes *sse* y *ssc*

Para caracterizar el SPI2 genéticamente y funcionalmente, una región central de la isla de patogenicidad (Fig. 1 A) ha sido clonada y secuenciada. Los fragmentos de ADN que cubren la región entre *ssaC* y *ssaJ* fueron subclonados en plásmidos p5 - 2 y p5 - 4 como se indica en la Fig. 1C. El arreglo y la designación de los genes en la región de 8 kb entre *ssaC* y *ssaK* son mostrados en la Fig. 1 B. Esta secuencia estará disponible en la base de datos de EMBL bajo el número de acceso AJ224892 en un futuro próximo. La región secuenciada extiende el marco de lectura abierto (MLA) de un gen que codifica una subunidad putativa de los mecanismos de secreción de tipo III referido como *spiB* (Ochman et al., 1996). Para la coherencia con la nomenclatura universal para subunidades del sistema de secreción de tipo III (Bogdanove et al., 1996) y la nomenclatura de otros genes SPI2 (Hensel et al., 1997b), este gen ha sido designado *ssaD*. La secuencia de aminoácido deducida de *ssaD* es 24% idéntico a YscD de la *Y. Enterocolítica*. Esto es seguido por un MLA con la capacidad de codificación para 9,3 kDa de una proteína, 34% idéntica a YscE de *Y. enterocolitica*. Por lo tanto, este gen es designado *ssaE*. Una secuencia de 263 bp separa el *ssaE* y un juego de nueve genes, varios de los cuales codifican proteínas con secuencia semejante a las proteínas efectoras segregadas o sus chaperones de otros agentes patógenos. Estos genes están separados por las regiones intergénicas cortas o tienen marcos de lectura de superposición y es probable que algunos sean cotranscritos y acoplados translacionalmente. Por lo tanto, los genes con semejanza a esos chaperones de codificación fueron designados *sscA* y *sscB*, y los otros *sseA* - E. La secuencia de aminoácido deducida de *sscA* muestra el 26% de identidad y el 49% de semejanza sobre residuos de aminoácidos 158 a SycD, el producto de *lcrH* de *Y. Pseudotuberculosis* que actúan como chaperones específicos de secreción para YopB y YopD (Wattiau et al., 1994). La secuencia de aminoácido deducida de *sscB* muestra el 23% de identidad y el 36% de semejanza sobre los residuos de aminoácido 98 a Ippl de *Shigella flexneri*. Ippl es un chaperón para las proteínas de invasión *S. flexneri* (Ipas) (Baundry et al., 1988). Como es el caso para los chaperones de secreción SycD, Ippl y SicA (Kaniga et al., 1995), SscB tiene un pl ácido (Tabla 3), mientras que SscA tiene un pl inusualmente alto de 8,8. SseB es el 25% idéntica y el 47% similar al EspA de EPEC sobre la longitud completa de la proteína de residuo de aminoácido 192 (Fig. 2b). SseD es el 27% idéntico y el 51% similar al EspB de EPEC sobre residuos de aminoácido 166. SseC tiene semejanza de secuencia a una clase de proteínas efectoras involucradas en el translocación de otros efectores en la célula huésped seleccionada. Éstas incluyen YopB de *Y. Enterocolítica*, EspD

de EPEC y PepB de *Pseudomonas aeruginosa*. SseC es aproximadamente el 24% idéntico y el 48% similar a tanto el EspD de EPEC como a la YopB de *Y. Enterocolitica* (Fig. 2 a). EspD y YopB tienen dos dominios hidrofóbicos que son previstos para insertarse en las membranas celulares seleccionadas (Pallen *et al.*, 1997). SseC contiene tres regiones hidrofóbicas que podían representar dominios extensores de membrana. Las otras características de estas proteínas efectoras previstas se muestran en la Tabla 1. Usando el programa de pronóstico TM (Hofmann y Stoffel, 1993), las hélices transmembrana son previstas para todas las proteínas efectoras separadas de SseA las cuales son muy hidrofílicas. Las alineaciones de SseC a los homólogos en otros agentes patógenos son mostradas en la Fig. 2 b. Los aminoácidos conservados están principalmente agrupados en la parte central más hidrofóbica de la proteína, pero a diferencia de YopB, no hay ninguna semejanza importante a la familia RTX de toxinas. Los residuos conservados en SseD están presentes principalmente en la mitad terminal N de la proteína. La comparación de las secuencias de aminoácido deducidas de sseABCDEF con las anotaciones en la base de datos de PROSITE no revela la presencia de ningún motivo de proteína característica. Nosotros sometimos las secuencias de aminoácido pronosticadas de los genes sse a las búsquedas usando los programas COIL y MULTICOIL como se describe por (Pallen *et al.*, 1997). SseA y SseD son previstos para que tengan una espiral trimérica cada uno, y SseC es previsto para que tenga dos espirales triméricas (Tabla 3). Ya que EspB y EspD son previstos para tengan una y dos espirales triméricas, respectivamente (Pallen *et al.*, 1997), esto provee pruebas adicionales de que estas proteínas están relacionadas funcionalmente.

TABLA 3

Características de las proteínas previstas

Proteína	M, (kDa)	pl	Predicciones Tm	Espirales previstas
SseA	12,5	9,3	Hidrofílico	Al menos una (trimer)
SseB	21,5	4,7	Hélice de una transmembrana	Ninguna
SseC	52,8	6,3	Hélices de tres transmembranas	Al menos dos (trimer)
SseD	20,6	4,8	Hélices de tres transmembranas	Al menos una (trimer)
SseE	16,3	9,7	Hélice de una transmembrana	Ninguna
SscA	18,1	8,8	Hidrofílico	Ninguna
SscB	16,4	4,7	Hidrofílico	Ninguna

Expresión de genes SPI2

Generación de anticuerpos contra proteínas SPI2 recombinantes

Para monitorear la expresión de genes SPI2 sseB, sseA y ssaP, fue realizado un análisis de transferencia Western de células bacterianas totales con anticuerpos policlonales levantados contra las proteínas SPI2 recombinantes SseB, SscA, y SsaP.

La electroforesis de gel de proteína y la prueba de manchado Western fueron realizadas como se describió en otra parte (Laemmli, 1970 y Sambrook *et al.*, 1989). Los plásmidos para la expresión de la proteína SPI2 recombinante fueron contruidos clonando los genes SPI2 individuales en plásmidos pQE30, pQE31 o pQE32 (Qiagen, Hilden) para generar la fusión en marco a la etiqueta 6His de terminal N. Los genes SPI2 recombinantes fueron expresados en *E. coli* M 15 [pREP] (Qiagen) y purificados por cromatografía quelante de metal de acuerdo con las recomendaciones del fabricante (Qiagen). Para la inmunización, aproximadamente 1 mg de proteínas SPI2 recombinantes fueron emulsionadas con el adyuvante completo e incompleto de Freund para las inmunizaciones primaria y de refuerzo, respectivamente. Los conejos fueron inmunizados subcutáneamente de acuerdo con los protocolos estándar (Harlow y Lane, 1988). Las proteínas SPI2 fueron detectadas con antisuero levantados contra las proteínas SPI2 recombinantes después de la separación electroforética de las proteínas de las células totales y transferidas en una membrana nitrocelulosa (Schleicher y Schuell) usando un dispositivo de manchado "Semi Seco" (Bio - Rad) de acuerdo con el manual del fabricante. El anticuerpo unido fue visualizado usando una combinación de fosfatasa alcalina anticuerpo secundaria de acuerdo con los protocolos estándar (Harlow y Lane).

Generación de fusiones de gen reportero

Las fusiones de la luciferasa de luciérnaga (*luc*) del gen reportero a varios genes SPI2 fueron obtenidas usando los vectores suicidas pLB02 y pGPL01 (Gunn y Miller, 1996), los cuales fueron amablemente suministrados por los Drs. Gunn y Miller (Seattle).

Para la generación de una fusión a ssaB, un fragmento de EcoRV de 831 bp de p2 - 2 fue subclonado en EcoRV pSK⁺ digerido. Para la generación de una fusión transcripcional a sseA, un fragmento de *SmaI/HincII* de 1060 bp de p5 - 4 fue subclonado en pSK⁺. Las inserciones de las contrucciones resultantes pGPL01 y pLB02 fueron recuperadas como un fragmento de *EcoRI/KpnI* y ligados con los vectores reporteros digeridos de *EcoR/KpnI*. Para la generación de una fusión transcripcional a ssaJ, un fragmento de *SmaI/KpnI* de 3 kb de p5 - 2 fue directamente subclonado en pGPL01 y pLB02.

Las construcciones con fusiones transcripcionales de los genes SPI2 a *luc* fueron entonces integradas en el cromosoma de la *S. typhimurium* por el apareamiento entre *E. coli* S17-1 λ pir que alberga la construcción respectiva y un mutante espontáneo de *S. typhimurium* resistente a 100 μ g x de ml^{-1} de ácido nalidíxico y la selección para exconjugantes resistentes a la carbenicilina y al ácido nalidíxico. La integración seleccionada en SPI2 (para las construcciones que usan pGLP01) o la región *zch* (para las construcciones que usan pLB02) fue confirmada por el análisis de manchado Southern. Las fusiones fueron entonces instaladas en una cepa NCTC12023 de *S. Typhimurium* pasada a un ratón por una transducción P22 de acuerdo con los procedimientos estándar (Maloy et al., 1996).

Ensayo de genes reporteros

Las actividades de β -galactosidasa de las fusiones de gen reportero fueron determinadas de acuerdo con los procedimientos estándar (Miller, 1992).

Las cepas bacterianas que albergan las fusiones de la luciferasa de luciérnaga a los genes SPI2 (cepa MvP127, sseA:: luc, cepa MvP131, ssaB:: luc, cepa MvP266, ssaH:: luc) fueron cultivadas en un medio con varias concentraciones de Mg^{2+} . La actividad luciferasa de los alícuotas de los cultivos fueron determinadas usando el equipo de ensayo de luciferasa Promega (Heidelberg) o reactivos hechos al efecto consecuentemente.

En resumen, las bacterias fueron granuladas por centrifugación durante 5 minutos en 20.000 x g a 4°C y resuspendidas en tampón de disolución (100 mM de KHPO_4 de pH 7,8, 2 mM de EDTA, 1% de Triton X - 100, 5 mg x ml^{-1} de albúmina de suero bovino, 1 mM de DTT, 5 mg x ml^{-1} de lisozima). Los lisatos fueron incubados durante 15 minutos en temperatura ambiente con agitación repetida y sometida a un ciclo de congelación/descongelación. Los alícuotas de los lisatos (25 μ l) fueron transferidos a placas de microtítulo (MicroFLUOR, Dynatech) e inmediatamente probados después de la adición de 50 μ l de reactivo de luciferasa (20 mM de Tricina-HCl, de pH 7,8, 1,07 mM de $(\text{MgCO}_3)_4\text{Mg}(\text{OH})_2$, 100 μ M de EDTA, 33,3 mM de DTT, 270 μ M de MLi3-coenzima A, 470 μ M de D (-)-luciferina, 530 μ M de Mg-ATP) para la emisión de fotón usando el luminómetro TriLux MicroBeta (Wallac, Turku). Todos los ensayos fueron hechos en triplicado y repetidos en ocasiones independientes.

La expresión de genes SPI2 como ssaB y ssaH es inducida por concentraciones bajas de Mg^{2+} del medio de cultivo

La cepa de *S. typhimurium* y las cepas de tipo natural que albergan las fusiones de gen reportero luc a ssaB (cepa MvP131) y a ssaH (cepa MvP266) fue cultivada a la fase media del registro (OD en 600 nm de aproximadamente 0,5) en medios mínimos que contienen las cantidades altas de Mg^{2+} (10 mM de MgCl_2). Este medio es referido como el medio G. Las bacterias fueron recuperadas por centrifugación, lavadas tres veces en un medio mínimo que contiene 8 μ M de Mg^{2+} . Este medio es referido como el medio F. Las bacterias fueron resuspendidas en el medio F o en el medio G y el cultivo a 37°C fue continuado. Los alícuotas de los cultivos de las cepas MvP131 y MvP266 fueron retirados en varios puntos de tiempo diferentes y sometidas al análisis de la actividad de luciferasa. Los alícuotas de la cepa de tipo natural fueron retirados en los mismos puntos de tiempo. La proteína de las células bacterianas totales fueron separada por SDS - PAGE y transferidas a membranas de nitrocelulosa. Estas manchas fueron incubadas con anticuerpos levantados contra la proteína recombinante SsaP y SsaA para detectar proteínas sintetizadas después del cambio de concentración de magnesio en la concentración de magnesio.

Después de cambiar las bacterias de un medio de cultivo con cantidades altas de Mg^{2+} a un medio con cantidades limitadas de Mg^{2+} , la expresión de genes SPI2 fue altamente inducida. Esta inducción puede ser monitoreada usando el gen reportero luc combinado en posiciones diferentes de SPI2. Además, las proteínas sintetizadas después de la inducción de SPI2 fueron detectadas por manchas Western. Sin embargo, aún en presencia de cantidades altas de Mg^{2+} , un bajo nivel de expresión de genes SPI2 fue observado.

La expresión de genes SPI2 como sseA y ssaB es modulada por la regulación de PhoP/PhoQ

Ninguna expresión de sseB o ssaA fue observada durante el cultivo en varios medios ricos, o medios de cultivo de células con o sin suero. Sin embargo una cantidad baja de SsaP fue detectada después del cultivo en LB u otros medios ricos como la infusión de cerebro corazón (BHI). El cultivo en un medio mínimo que contiene menos de 30 μ M de Mg^{2+} induce la expresión de genes SPI2. Tal efecto de la concentración de Mg^{2+} hasta ahora ha sido observado solamente para los genes regulados por PhoP/PhoQ. Esta observación está en contraposición con un informe anterior de Valdivia y Falkow (1997) que postularon que la expresión del gen SPI2 era independiente de PhoP/PhoQ. Sin embargo, en un ambiente de cepa (constitutiva) de PhoP^c (CS022, Miller et al., 1989) la expresión de genes SPI2 no era constitutiva sino aún así era dependiente de la concentración de Mg^{2+} del medio. Esto indica que la expresión del gen de SPI2 es modulada por PhoP/PhoQ, pero que los elementos reguladores adicionales tales como SsrA/B son necesarios.

Clonación y secuenciación de ADN

Las preparaciones y manipulaciones genéticas de ADN fueron realizadas de acuerdo con los protocolos estándar (Sambrook et al, 1989). La transformación de ADN plásmido de células bacterianas fue realizada por electroporación (O'Callaghan y Charbit, 1990).

Los clones que albergan fragmentos de SP12 fueron identificados de una biblioteca de ADN genómicos de *S. typhimurium* de λ 1059 la cual ha sido descrita previamente (Shea et al., 1996). Los genes sse y ssc fueron subclonados del clon λ 5 en un fragmento de 5,7 kb de EcoRI (p5 - 2) y un fragmento de HindIII (p5 - 4) de 5,8 kb en de pBluescriptKS+ como se induce en la Fig. 1 y en la Tabla 1. La secuenciación del ADN fue realizada usando una estrategia de cebador errante. El método dideoxi (Sanger et al., 1977) fue aplicado usando el sistema de secuenciación de Pharmacia T7 para la secuenciación manual y la química de terminador de tinte por el análisis automático en un instrumento de secuenciación ABI377. El ensamblaje de cóntigos de las secuencias de ADN fue realizada por medio del programa AssemblyLign and MacVector (Oxford Molecular, Oxford). Para los análisis de las secuencia adicionales, los programas de la versión 8 del paquete GCG (Devereux et al., 1984) fueron usados en la red de HGMP.

Construcción de mutaciones no polares

La construcción de las mutaciones no polares en sseC (MvP103), sseD (MvP101) y sseE (MvP102) son descritas abajo. Todas las modificaciones cromosómicas fueron confirmadas por PCR y el análisis de hibridización Southern (Southern, 1975, J. Mol. Biol. 98: 503-517).

- El MvP103 mutante, sseC. Un fragmento de 2,6 kb fue recuperado después de la digestión de BamHI y ClaI de p5 - 2 y subclonado en pBluescript II KS+ digerido por BamHI/ClaI. La construcción resultante llamada p5 - 50 fue digerida por HindIII, terminada roma usando el fragmento Klenow de ADN polimerasa y ligada al casete aphT. Un fragmento HincII de 900 bp de pSB315 que contiene un gen de aminoglicósido 3'-fosfotransferasa (aphT) del cual el terminador transcripcional había sido retirado (Gálán et al., 1992) fue ligado en la misma orientación en el sitio HindIII como del plásmido p5 - 50. Después de la transformación de *E. coli* XL - 1 Blue y la selección para la resistencia en contra de la kanamicina y la carbenicilina (50 μ g/ml de cada una) un clon ha sido escogido y el plásmido de alojamiento se aisló. Este plásmido fue nombrado p5 - 51 y su identidad confirmada por el análisis de restricción. Fue además digerido con SalI y XbaI y el inserto de 3,5 kb fue ligado a pGP704 digerido por SalI/XbaI. Este plásmido fue electroporado en *E. coli* CC 118 λ pir y los transformantes seleccionados para la resistencia a la kanamicina y la carbenicilina (50 μ g/ml cada una). Como se hizo antes, un clon fue escogido, su plásmido con el correspondiente fragmento de ADN en pGP704, nombrado p5 - 53, aislado y confirmado por el análisis de restricción. El plásmido P5 - 53 fue electroporado en *E. coli* S17-1 λ pir y transferido en NCTC12023 de *S. typhimurium* (resistente al ácido nalidixico, 100 μ g/ml) por conjugación como ha sido descrito previamente (de Lorenzo y Timmis, 1994). Los exconjugantes en los cuales el gen sseC había sido reemplazado por el gen clonado alterado por la inserción del casete aphT fueron seleccionados para la resistencia a la kanamicina y al ácido nalidixico (100 μ g/ml). Los exconjugantes resultantes fueron finalmente probados para un fenotipo de lactosa negativa y sus sensibilidades a la carbenicilina. Los clones seleccionados fueron además examinados por el análisis de manchado Southern. Para excluir las posibles mutaciones que han sido adquiridas durante el procedimiento de clonación el alelo sseC mutado fue transferido en un ambiente de *Salmonella* fresca por transducción de P22 (descrito por Maloy et al., 1996). La cepa MvP103 de *Salmonella* resultante fue examinada para la presencia del casete de resistencia dentro del gen sseC por el uso de PCR. La amplificación fue realizada usando los cebadores E25 (5'-GAAATCCCCGACAGAAATG-3') y E28 (5'-AAGGCGATAATATAAAC-3'). El fragmento resultante tuvo un tamaño de 1.6 kb para el tipo natural de *S. typhimurium* y 2,5 kb para la cepa MvP103. Para la complementación de las mutaciones no polares en sseC, los genes correspondientes fueron amplificados por PCR de ADN genómico usando una serie de cebadores que corresponden a la región 5' de los codones de inicio putativos y a los extremos 3' de los genes. Estos cebadores introdujeron sitios de restricción de BamHI en los terminales de los genes amplificados. Después de la digestión con BamHI, los genes fueron ligados a pACYC184 digerido por BamHI (Chang y Cohen, 1978) y transferidos en *E. coli* DH5 α . La orientación del inserto fue determinada por PCR, y además, la secuenciación de ADN fue realizada para confirmar la orientación y la secuencia de ADN correcta de los insertos. Los plásmidos con insertos en la misma orientación transcripcional como el gen Tetr de pACYC184 fueron seleccionados para estudios de complementación y electroporados en las cepas de *S. typhimurium* que albergan las mutaciones no polares correspondientes.
- MvP101 mutante, sseD. Un fragmento de 3,0 kb fue recuperado después de la digestión de PstI y EcoRI de p5-2 y subclonado en pUC18 digerido por PstI/EcoRI. La construcción resultante llamada p5 - 30 fue digerida por EcoRV y tratada con fosfatasa alcalina. El casete aphT fue aislado como se describió arriba y ligado al plásmido linearizado p5-30 en la misma orientación en el sitio de EcoRV única. Después de la transformación de *E. coli* XL - 1 Blue y la selección en contra de la kanamicina y la carbenicilina (50 μ g/ml cada una) un clon ha sido escogido y el plásmido de alojamiento aislado. Este plásmido fue nombrado p5 - 31 y su identidad confirmada por el análisis de restricción. El p5 - 31 fue además digerido con SphI y EcoRI, un fragmento de 4,0 kb aislado y ligado a pGP704 digerido por SphI/EcoRI. Este plásmido fue electroporado en *E. coli* CC118 λ pir y los transformantes seleccionados a la kanamicina y a la carbenicilina (50 μ g/ml cada una). Como se hizo antes, un clon fue escogido, su plásmido con el correspondiente fragmento de ADN en pGP704, nombrado p5 - 33, aislado y confirmado por el análisis de restricción. El plásmido P5 - 33 fue electroporado en *E. coli* S17-1 λ pir y trasferido en *S. Typhimurium* NCTC12023 (resistente al ácido nalidixico) por conjugación como ha sido descrito previamente (de Lorenzo y Timmis, 1994). Los exconjugantes en los cuales el gen sseD había sido reemplazado por el gen clonado alterado por la inserción del casete aphT fueron seleccionados para la resistencia a la kanamicina y al ácido nalidixico (100 μ g/ml). Los exconjugantes resultantes fueron finalmente probados para un fenotipo de lactosa negativa y

su sensibilidad a la carbenicilina. Los clones seleccionados fueron además examinados por el análisis de manchado Southern. Para excluir las posibles mutaciones las cuales podrían haber sido acumuladas durante el procedimiento de clonación el alelo *sseD* mutado fue transferido en un ambiente de *Salmonella* fresca por transducción de P22 (descrita por *Maloy et al., 1996*). La cepa de MvP101 de *Salmonella* resultante fue examinada para la presencia del casete de resistencia en el gen *sseD* por el uso de PCR. La amplificación fue realizada usando los cebadores E6 (5'-AGAGATGTATTAGATAC-3') y E28 (5'-AAGGCGATAATA-TAAAC-3'). El fragmento resultante tuvo un tamaño de 0,8 kb para la *S. typhimurium* de tipo natural fue usado y 1,7 kb en el caso de la cepa MvP101.

- MvP102 mutante, la delección de partes de *sseE* y *sscB*. Un fragmento de 4,5 kb fue recuperado después de la digestión de *SstI* y *HindIII* de p5-2 y subclonado en pKS+ digerido por *SstI*/*HindIII*. La construcción resultante llamada p5-40 fue digerida por *SmaI*, digerida con fosfatasa alcalina y ligada al casete *aphT* en la misma orientación en el sitio *SmaI* único creado en el plásmido de delección p5-40 *sseE/sseB* como se describió arriba. Después de la transformación de *E. coli* XL-1 Blue y la selección en contra de la kanamicina y la carbenicilina (50 µg/ml cada una) un clon fue escogido y el plásmido de alojamiento aislado. Este plásmido fue nombrado p5-41 y su identidad confirmada por medio del análisis de restricción. Fue además digerido con *KpnI* y *SstI* y el inserto fue ligado a pNQ705 digerido por *KpnI*/*SstI*. Este plásmido fue electroporado en *E. coli* CC118 λpir y las bacterias transformadas seleccionadas a la kanamicina y al cloramfenicol (50 µg/ml cada una) Como se hizo antes, un clon fue escogido, su plásmido con el correspondiente fragmento de ADN en pNQ705, nombrado p5-43, aislado y confirmado por el análisis de restricción. El plásmido resultante fue usado para transferir el gen mutado en el cromosoma de la *Salmonella* como se describió arriba. Los clones resultantes han sido examinados por el análisis de manchas Southern. Para excluir las mutaciones posibles las cuales pueden haber sido adquiridas durante el procedimiento de clonación el alelo *sseE/sseB* mutado fue transferido en un ambiente de *Salmonella* fresca por transducción de P22 (descrita por *Maloy et al., 1996*). La cepa MvP102 de *Salmonella* resultante fue examinada para la presencia del casete de resistencia dentro del gen *sseE/sseB* por el uso de PCR. La amplificación fue realizada usando los cebadores E6 (5'-AGAGATGTATTAGATAC-3') y E4 (5'-GCAATAAGAGTATCAAC-3'). El fragmento resultante tuvo un tamaño de 1,6 kb para la *S. typhimurium* del tipo natural y un tamaño de 1,9 kb para la cepa MvP102.

Construcción de cepas mutantes que portan las delecciones en marco en *sseC*, *sseD* y *sscB*

En base a la observación de que un no polar en *sseE* no resultó en una atenuación importante de la virulencia en el modelo de ratón (*Hensel et al., 1998*), la generación de un mutante de delección para el gen *sseE* no es de interés para la generación de cepas portadoras.

Construcción de una delección en marco en *sseC*, MvP337 mutante

Una delección de 158 bp entre el codón 264 y 422 de *sseC* se generó. El plásmido p5-2 fue digerido por *ClaI* y el fragmento más grande que contiene la porción del vector se recuperó y se autoligó para generar p5-60. El plásmido p5-60 fue linearizado por digestión con *HindIII* el cual corta una vez dentro del gen *sseC*. Los cebadores *sseC*-del-1 (5'-GCT AAG CTT CGG CTC AAA TTG TTT GGA AAA C-3') y *sseE*-del-2 (5'-GCT AAG CTT AGA GAT GTA TTA GAT ACC-3') fueron diseñados para introducir sitios de *HindIII*. PCR se realizó usando un p5-60 linearizado como plantilla de ADN. La polimerasa *TaqPlus* (*Stratagene*) se usó según las instrucciones del fabricante. Las reacciones de volumen de 100 µl fueron fijadas a usando un 10 µl de tampón de 10 x *TaqPlus Precisión* que contiene cloruro de magnesio, 0,8 µl de 100 mM de dNTPs, 250 ng de plantilla de ADN (p5-8 linearizado), 250 ng de cada cebador y 5 U de polimerasa de ADN *TaqPlus*. PCR fue realizado durante 35 ciclos de: 95°C durante 1 minuto, 60°C durante 1 minuto, 72°C durante 6 minutos. Entonces un paso final de 72°C durante 10 minutos fue agregado. 10 µl de la reacción de PCR se analizaron. Un producto del tamaño esperado fue recuperado, digerido por *HindIII*, autoligado, y la mezcla de la ligación fue usada para transformar *E. coli* DH5α a la resistencia a la carbenicilina. Los plásmidos se aislaron de los transformantes y la integridad del inserto y la delección fueron analizadas por digestión de la restricción y secuenciación de ADN. El inserto de una estructura confirmada se aisló después de la digestión con *XbaI* y *KpnI* y ligado al vector pKAS32 digerido por *XbaI*/*KpnI*. La construcción resultante fue usada para transformar la *E. coli* S17-1 λpir a la resistencia a la carbenicilina, y la transferencia conjugacional del plásmido a la *S. typhimurium* (NalR, StrepR) se realizó según los procedimientos estándar (*de Lorenzo y Timmis, 1994*). Los exconjugantes que habían integrado el plásmido suicida por recombinación homóloga fueron seleccionados a través de resistencia al ácido nalidíxico y a la carbenicilina, y protegidos para la sensibilidad a la estreptomycin. Tales clones fueron crecidos en LB a OD600 de aproximadamente 0,5 y los alícuotas fueron colocados en placas en LB que contienen 250 µg/ml de estreptomycin para seleccionar por colonias que habían perdido el plásmido integrado y habían sufrido intercambio alélico. Los clones resistentes a la estreptomycin pero sensibles a la carbenicilina se usaron para el análisis ulterior. El filtrado de los mutantes con una delección dentro del locus *sseC* fue realizado por PCR usando los cebadores *sseC*-For (5'-ATT GGA TCC GCA AGC GTC CAG AA-3') y *sseC*-Rev (5'-TAT GGA TCC TCA GAT TAA GCG CG-3'). La amplificación de ADN de clones que contienen el alelo de *sseC* de tipo natural resultó en un producto de PCR de 1520 bp, el uso de ADN de los clones que albergan un alelo de *sseC* con una delección interna resultó en un producto de PCR de 1050 bp. La integridad de los clones que albergan la delección de *sseC* fue además confirmada por el análisis Southern del locus de *sseC*. Finalmente, el locus del *sseC* que contiene la delección interna en marco se pasó a un ambiente de cepa fresca de *S. typhimurium* a través de la transducción P22 (*Maloy et al., 1996*) y la cepa resultante se nombró MvP 337.

Construcción de una delección en marco en sseD, cepa mutante MvP338

Una delección de 116 bp entre el codón 26 y 142 de sseD se generó. El plásmido p5-2 fue digerido por HindIII/PstI y un fragmento de 2,1 kb se aisló y subclonó en un vector pBluescript SK+ digerido por HindIII/PstI. La construcción resultante se nombró p5-8. El p5-8 fue linearizado por digestión con EcoRV el cual corta dos veces dentro del gen sseD. Los cebadores sseD-del-1 (5'-ATA GAA TTC GGA GGG AGA TGG AGT GGA AG -3') y sseD-del-2 (5'-ATA GAA TTC GAA GAT AAA GCG ATT GCC GAC -3') fueron diseñados para introducir sitios de EcoRI. PCR se realizó usando p5-8 linearizado como plantilla de ADN. La polimerasa *TaqPlus* (*Stratagene*) se usó según las instrucciones del fabricante. Las reacciones de volumen de 100 μ l fueron fijadas usando 10 μ l de tampón 10 x *TaqPlus Precisión* que contiene cloruro de magnesio, 0,8 μ l de 100 mM de dNTPs, 250 ng de plantilla de ADN (p5-8 linearizada), 250 ng de cada cebador y 5 U de polimerasa de ADN *TaqPlus*. PCR se realizó durante 35 ciclos de: 95°C durante 1 minuto, 60°C durante 1 minuto, 72°C durante 5 minutos. Entonces un paso final de 72°C durante 10 minutos fue agregado. 10 μ l de la reacción de PCR se analizaron. Un producto del tamaño esperado fue recuperado, digerido por EcoRI, autolimitado, y la mezcla de la ligación fue usada para transformar la *E. coli* DH5 α a la resistencia a la carbenicilina. Los plásmidos se aislaron de los transformantes y la integridad del inserto y la delección fueron analizadas por mapeo de restricción y secuenciación de ADN. El inserto de una construcción confirmada se aisló después de la digestión con XbaI y KpnI y ligado al vector pKAS32 digerido por XbaI/KpnI. La construcción resultante fue usada para transformar la *E. coli* S17-1 Δ pir a la resistencia a la carbenicilina, y la transferencia conjugacional del plásmido a la *S. typhimurium* de (Nal^R, Strep^R) se realizó según los procedimientos estándar (*de Lorenzo y Timmis, 1994*). Los exconjugantes que habían integrado el plásmido suicida por recombinación homóloga fueron seleccionados por la resistencia al ácido nadilíxico y a la carbenicilina, y protegidos para la sensibilidad a la estreptomina. Tales clones fueron crecidos en LB a OD600 de aproximadamente 0,5 y los alícuotas se colocaron en placas en LB que contienen 250 μ g/ml de estreptomina para seleccionar por las colonias que habían perdido el plásmido integrado y habían sufrido intercambio alélico. Los clones resistentes a la estreptomina pero sensibles a la carbenicilina se usaron para el análisis ulterior. La protección de los mutantes con una delección dentro del locus del sseD fue realizada por PCR usando los cebadores sseD-For (5'-GAA GGA TCC ACT CCA TCT CCC TC-3') y sseD-Rev (5'-GAA GGA TCC ATT TGC TCT ATT TCT TGC-3'). La amplificación de ADN de clones que contienen el alelo de sseD de tipo natural resultó en un producto de PCR de 560 bp, el uso del ADN de los clones que albergan un alelo del sseD con una delección interna resultó en un producto de PCR de 220 bp. La integridad de los clones que albergan la delección del sseD fue además confirmada por análisis Southern del locus del sseD. Finalmente, el locus del sseD que contiene la delección interna en marco se pasó a un ambiente de cepa fresca de *S. typhimurium* a través de la transducción de P22 (*Maloy et al., 1996*) y la cepa resultante se nombró MvP338.

Construcción de una delección en marco en sscB, cepa mutante MvP339

Una delección de 128 bp entre el codón 32 y 160 de sscB se generó. Un fragmento de 3kb de Bg/II de plásmido p5-2 fue ligado en el sitio de BamHI de pBluescript KS+ para generar el plásmido p5-70. El plásmido p5-70 fue linearizado por digestión con NcoI que corta una vez dentro del gen sscB. Los cebadores sscB-del-1 (5'-ATG GGA TCC GAG ATT CGC CAG AAT GCG CAA-3') y sscB-del-2 (5'-ATG GGA TCC ACT GGC ATA AAC GGT TTC CCG-3') fueron diseñados para introducir sitios BamHI. PCR se realizó usando p5-70 linearizado como plantilla de ADN. La polimerasa *TaqPlus* (*Stratagene*) se usó según las instrucciones del fabricante. Las reacciones de volumen de 100 μ l fueron fijadas usando 10 μ l de tampón de 10 x *TaqPlus Precision* que contiene cloruro de magnesio, 0,8 μ l de 100 mM de dNTPs, 250 ng de plantilla de ADN (p5-70 linearizado), 250 ng de cada cebador y 5 U de polimerasa de ADN *TaqPlus*. PCR se realizó durante 35 ciclos de: 95°C durante 1 minuto, 60°C durante 1 minuto, 72°C durante 6 minutos. Entonces un paso final de 72°C durante 10 minutos fue agregado. 10 μ l de la reacción PCR fue analizada. Un producto del tamaño esperado fue recuperado, digerido por BamHI, autoligado, y la mezcla de la ligación fue usada para transformar *E. coli* DH5 α a la resistencia a la carbenicilina. Los plásmidos se aislaron de los transformantes y la integridad del inserto y la delección fueron analizadas por análisis de restricción y secuenciación de ADN. El inserto de una construcción confirmada se aisló después de la digestión con XbaI y KpnI y ligado al vector pKAS32 pNI digerido por XbaI/K.. La construcción resultante fue usada para transformar la *E. coli* S17-1 Δ pir a la resistencia a la carbenicilina, y la transferencia conjugacional del plásmido a la *S. typhimurium* (Nal^R, Strep^R) se realizó según los procedimientos estándar (*de Lorenzo y Timmis, 1994*). Los exconjugantes que habían integrado el plásmido suicida por recombinación homóloga fueron seleccionados a través de la resistencia al ácido nadilíxico y a la carbenicilina, y protegidos para la sensibilidad a la estreptomina. Tales clones fueron crecidos en LB a OD600 de aproximadamente 0,5 y los alícuotas se colocaron en placas en LB que contienen 250 μ g/ml de estreptomina para seleccionar por colonias que habían perdido el plásmido integrado y habían sufrido intercambio alélico. Los clones resistentes a la estreptomina pero sensibles a la carbenicilina se usaron para el análisis ulterior. La protección de los mutantes con una delección dentro del locus sseC fue realizada por PCR que usa los cebadores sscB-For (5'-ATT GGA TCC TGA CGT AAA TCA TTA TCA -3') y sscB-Rev (5'-ATT GGA TCC TTA AGC AAT AAG TGA ATC -3'). La amplificación de ADN de clones que contienen el alelo de sscB de tipo natural resultó en un producto de PCR de 480 bp, el uso de ADN de clones que albergan un alelo del sscB con una delección interna resultó en un producto de PCR de 100 bp. La integridad de los clones que albergan la delección del sseC fue además confirmada por análisis de manchado Southern del locus del sscB. Finalmente, el locus del sscB que contiene la delección en marco interna se pasó a un ambiente de cepa fresca de *S. typhimurium* a través de la transducción P22 (*Maloy et al., 1996*) y la cepa resultante se nombró MvP339.

Construcción de una mutación de delección en el gen sseC

En un acercamiento ulterior la secuencia completa del gen sseC cromosomal fue suprimida por el reemplazo alélico con una copia suprimida del gen. La delección se construyó en un plásmido suicida pCVD442 (Donnenberg *et al.*, 1991). Primero, dos fragmentos de ADN que flanquean el gen sseC (fragmento A, que porta sitios artificiales Sall y XbaI en sus extremos 5' y 3', respectivamente; y un fragmento B, que porta los sitios artificiales XbaI y SacI en sus extremos 5' y 3', respectivamente, fueron amplificados por PCR. Los oligonucleótidos usados para PCR fueron: 1.) sseDelfor1 GCTGTCGACTTGTAAGTGAGTGAGCAAG (el nucleótido 3' corresponde a 941 bp en la secuencia incluida en la Fig. 21 A); 2.) sseCDelrev2 GGATCTAGATTTTAGCTCCTGTCAGAAAG (el nucleótido 3' corresponde a 2585 bp en la secuencia incluida, el oligo liga a la cadena inversa); 3.) sseCDelfor2 GGATCTAGATCTGAGGATAAAAATATGG (el nucleótido 3' corresponde a 4078 bp en la secuencia incluida); 4.) sseCDelrev1 GCTGAGCTCTGCCGCTGACGGA-ATATG (el nucleótido 3' corresponde a 5592 bp en la secuencia incluida, el oligo liga a la cadena inversa). Los fragmentos de PCR resultantes se fundieron juntos por la vía del sitio XbaI. El fragmento resultante fue cortado con Sall y SacI y clonado en pCVD442 cortado con Sall y SacI. El plásmido resultante se introdujo en *S. Typhimurium* NCTC12023 por la conjugación y los integrantes cromosómicos del plásmido en el locus del sseC se seleccionaron por medio del marcador para la resistencia de ampicilina codificado por el plásmido. En un segundo paso, los clones que habían perdido el plásmido se protegieron para la pérdida de la resistencia a la ampicilina. Los clones resultantes se probaron para la delección cromosomal del gen sseC por PCR, y la delección de un fragmento de 1455 bp que comprende un marco de lectura abierto del sseC entero, fueron confirmadas. Esta cepa mutante de Δ sseC se nombró III-57 Δ sseC.

Construcción de un mutante doble sseC-aroA

Para construir un mutante doble el cual puede servir como un prototipo para una vacuna atenuada viva, el marcador sseC:aphT (Km^r) de MvP103 fue transferido a través de la transducción de fago P22 en *S. typhimurium* SL7207 (hisG46 DEL407 [aroA544:Tn10], Tc^R) una cepa que porta una delección estable en el gen aroA.

Ejemplo 3

*La invasión y el crecimiento intracelular en el cultivo del tejido**Replicación intramacrófaga de cepas mutantes*

Varias cepas las cuales son defectuosas en su habilidad de replicarse dentro de las líneas celulares macrófagas y similares a macrófagos se han probado, como la supervivencia del macrófago y la replicación se piensa que representen un aspecto importante de la patogénesis de la *Salmonella en vivo* (Fields *et al.*, 1986). Se ha reportado previamente que varias cepas mutantes SPI2 no eran defectuosas para la supervivencia o la replicación dentro de los macrófagos RAW (Hensel *et al.*, 1997b) sino que los experimentos subsiguientes han revelado que algunos mutantes SPI2 pueden mostrarse que tienen un defecto de replicación si los cultivos bacterianos de fase estacionaria se airean opsonizados con suero de ratón normal (vea también artículo chaperón: Cirillo *et al.*, 1998). El incremento en cfu para las cepas diferentes en macrófagos RAW en un periodo de 16 horas se muestra en la Fig. 3. Los defectos de la replicación se observaron para cepas que portan mutaciones en ssaV (codificando un componente del mecanismo de secreción), sseB y sseC y en menor extensión para las cepas que portan las mutaciones en sseE. La complementación parcial de este defecto se logró con cepas de plásmidos que albergan que portan copias funcionales de sseB y sseC, HH103 y MvP103 [psseC], respectivamente. La habilidad de las cepas mutantes SPI2 de replicarse dentro de la línea de la célula macrófaga J 774.1 (Fig. 4 A) y en macrófagos peritoneales producidos como respuesta de periodato de ratones C3H/HeN (Fig. 4 B) también se ha probado. Los defectos de replicación similares de *S. typhimurium* que portan transposón o mutaciones no polares en genes SPI2 se observaron, sin tener en cuenta el tipo de célula fagocita examinada, aunque las células peritoneales dadas como respuesta tenían una actividad antimicrobiana superior comparadas a cualquier línea de células.

Ensayos de supervivencia de macrófago

Las células RAW 264.7 (ECACC 91062702), una línea de la célula similar al macrófago murino, fueron cultivadas en el medio Eagle's modificado de Dulbecco (DMEM) que contiene 10% de suero de feto de ternero (SFT) y 2 mM de glutamina a 37°C en 5% de CO₂. Las cepas de *S. typhimurium* fueron crecidas en LB a la fase estacionaria y diluidas a un OD₆₀₀ de 0,1 y opsonizadas por 20 minutos en DMEM que contiene 10% de suero de ratón normal. Las bacterias se centrifugaron entonces en macrófagos sembrados en 24 placas de cultivo de tejido sano a una multiplicidad de infección de aproximadamente 1:10 y se incubaron por 30 minutos. A continuación de la Infección, los macrófagos se lavaron dos veces con PBS para quitar las bacterias extracelulares e incubadas por 90 minutos (2 horas después de la infección) o 16 horas en un medio que contiene gentamicina (12 µg/ml). Los macrófagos infectados se lavaron dos veces con PBS y se diluyeron con 1% de Triton X-100 por 10 minutos y los alícuotas apropiados y las diluciones se colocaron en placas en agar LB para contar los cfu.

La supervivencia de las cepas opsonizadas de *S. typhimurium* en las células J774.1 (Ralph *et al.*, 1975) o en células exudadas peritoneales murinas C3H/HeN (de Charles River Laboratories, Wilmington, MA) fue esencialmente determinada como se describió por (DeGroot *et al.* 1997), pero sin la adición del interferón γ . En resumen, las células peritoneales cosechadas en PBS con 10% de suero de feto de ternero inactivado por calor 4 días después de la inyección intraperitoneal de 5 mM de periodato de sodio (Sigma, St. Louis, MO) se colocaron bien al fondo de 96 placas de microtítulo (Becton-Dickinson, Franklin Lakes, NJ) y se les permitió adherirse por 2 horas. Las células no adherentes se enjuagaron con un medio pre calentado que contiene 10% de suero de feto de ternero inactivado por calor. En estudios anteriores, nosotros hemos establecido que más del 95% de las células que permanecen después de este procedimiento son macrófagos. La *S. typhimurium* de los cultivos aireados toda la noche fue opsonizada con suero de ratón normal y centrifugada en las células adherentes en un efector a la proporción seleccionada de 1:10. A las bacterias se les permitió internalizar por 15 minutos, y se lavaron con un medio que contiene 6 $\mu\text{g/ml}$ de gentamicina para matar las bacterias extracelulares. A las 0 horas y 20 horas, las células fueron diluidas con PBS que contiene 0,5% de deoxicolato (Sigma, St. Louis, MO), con la colocación en placas de las diluciones en serie para contar las unidades formadas en colonias.

Ejemplo 4

Evaluación de la seguridad en el modelo de ratón de la *S. typhimurium* de la Salmonelosis

Pruebas de virulencia con cepas que portan las mutaciones no polares

El análisis de la secuencia de ADN sugirió que los genes *sse* podrían codificar proteínas efectoras del sistema de secreción, pero aparte de un posible efecto polar de una inserción de transposón en *sscA* ninguna cepa que porta mutaciones en estos genes se recuperó en el filtrado de STM original para los genes de virulencia de *S. typhimurium* que usan mutagénesis mTn5 (Hensel *et al.*, 1995), y sus papeles en la virulencia eran poco claros. Para salir de dudas, las cepas que portan mutaciones no polares en *sseC*, *sseD* y *sseEsscB* (Fig. 1) se han construido y se han sometido a las pruebas de virulencia. La Tabla 4 muestra que todos los ratones inoculados con cepas que portan las mutaciones *sseC* y *sseD* sobrevivieron a una dosis de 1×10^4 cfu, tres órdenes de magnitud mayor que el LD50 de la cepa del tipo natural, la cual es menor de 10 cfu cuando la vacuna es administrada por la ruta i.p. (Buchmeier *et al.*, 1993; Shea *et al.* 1996). Las mismas cepas que contienen un plásmido que porta el alelo del tipo natural correspondiente también se inocularon en los ratones a una dosis de 1×10^4 cfu. Ningún ratón sobrevivió estas infecciones, lo cual muestra que cada mutación puede ser complementada por la presencia de una copia funcional de cada gen, y que cada uno de estos genes juega un papel importante en la virulencia de la *Salmonella*. Las cepas que portan las mutaciones no polares en *sseEsscB* causaron infecciones letales cuando aproximadamente 1×10^4 de células de cada cepa se inocularon en los ratones por la ruta i.p. (Tabla 4) y se analizaron en más detalle por un ensayo de competencia con la cepa de tipo natural en infecciones mixtas (cinco ratones por prueba) para determinar si ellas se atenuaron en virulencia. El índice de competencia, definido como la proporción del rendimiento de salida del mutante a las bacterias del tipo natural, dividido por la proporción de la entrada del mutante a las bacterias del tipo natural, muestra que el mutante *sseEsscB* no era significativamente diferente al de una cepa totalmente virulenta que porta un marcador de resistencia a los antibióticos, lo cual implica que este gen no juega un papel significativo en la infección de *Salmonella* sistémica del ratón.

TABLA 4

Virulencia de las cepas de *S. Typhimurium* en ratones

Cepa	Genotipo	Supervivencia del ratón después de la inoculación ^a con cepas bacterianas	Supervivencia del ratón después de la inoculación ^b con mutante más plásmido complementario	Índice de competencia <i>in vivo</i>
NCTC12023	Tipo natural	0/5	n.d.	0,98 ^b
MvP101	$\Delta sseD::aphT$	5/5	n.d.	> 0,1
MvP102	$\Delta sseEsscB::aphT$	4/4	n.d.	0,79
MvP103	<i>sseC::aphT</i>	5/5	0/5	> 0,1 oral > 0,1 i.p.

^a Ratones inoculados intraperitonealmente. con 1×10^4 de células de cada cepa

^b Resultado de la competencia entre la cepa de tipo natural NCTC12023 y un mutante mTn5 identificado en el filtrado STM

Ejemplo 5

Vacunación con cepas MvP103 y MvP101 de *S. typhimurium* sseC::aphT, y ΔsseD::aphT

5 *Cepas que portan mutaciones no polares como portadoras de vacuna viva*

Para confirmar la conveniencia de los mutantes MvP101 y MvP103 como portadores de la vacuna viva sus niveles de atenuación fueron evaluados determinando los LD₅₀ después de la inoculación oral en ratones. Grupos de 10 ratones se alimentaron con las diluciones de cepas MvP101, MvP103 o del tipo natural de cepa parental NCTCNCTC12023 y los animales muertos fueron registrados dentro de un periodo de 10 días post infección. Los resultados obtenidos demostraron que ambos mutantes son muy atenuados cuando se dan oralmente a los ratones de BALB/c (LD₅₀ sobre 10⁹) cuando se comparan con la cepa parenteral (LD₅₀ = 6.9 x 10⁵ CFU). Después de la inoculación intraperitoneal los LD₅₀ de la *S. typhimurium* NCTC12023 de tipo natural en BALB/c es 6 de bacterias, y los LD₅₀ de MvP103 en BALB/c es 2,77 x 10⁶ después de la inoculación intraperitoneal. La mutación puede ser complementada por psseC, pero ninguna determinación LD₅₀ para la cepa mutante complementada fue realizada. LD₅₀ de MvP101 en BALB/c es 3,54 x 10⁶ después de la inoculación intraperitoneal. Una complementación parcial por el plásmido p5-K 1 fue posible. Un LD₅₀ intraperitoneal para MvP101 [p5-K1] de 8,45 x 10² fue determinado. (Descripción de p5-K1: un fragmento de 3,2 kb PstI de p5-2 que contiene sseC'sseDsseEsscBsseF' fue subclonado en un vector de clonación de número de copias bajo pWSK29).

20 *Determinación del LD₅₀*

Dosis en el rango de 10⁵ a 10⁹ CFU de *S. typhimurium* NCTCNCTC12023 (tipo natural) o los mutantes MvP103 y MvP101 se inocularon oralmente en grupos de 10 ratones y los supervivientes se registraron sobre 10 días de LD₅₀ de *S. typhimurium* del tipo natural y las cepas mutantes MvP101 y MvP103 después de la infección intraperitoneal fueron determinadas por inoculación de dosis en el rango de 10¹ a 10⁷ CFU en los grupos de 5 ratones BALB/c hembras de 6 a 8 semanas de edad. La supervivencia se registró sobre un periodo de tres semanas. La dosis de las cepas de provocación fue calculada por el método de Reed y Muench (*Reed y Muench, 1938*).

30 *Protocolos de inmunización*

Para la vacunación, las bacterias fueron crecidas durante la noche hasta que alcanzaron la fase de registro media. Entonces, ellas fueron cosechadas por centrifugación (3,000 x g) y resuspendidas en 5% de bicarbonato de sodio. Los ratones se inmunizaron cuatro veces a intervalos de 1 5 días alimentándolos delicadamente con la suspensión bacteriana (10⁹ CFU por ratón) en un volumen de aproximadamente 30 μl. Los ratones de control se vacunaron con el portador, carente de plásmido.

Ensayo de citotoxicidad

Las células del bazo de los ratones se obtuvieron 14 días después de la última inmunización y 2x10⁶ células efectoras fueron reestimuladas *in vitro* durante 5 días en un medio completo complementado con 20 U/ml de rIL-2 y 20 μM de péptido βGP1 (β-gal p876-884, TPHPARIGL), los cuales abarcan el epítipo β-galH inmunodominante restringido por H-2L^d. Después de la reestimulación, el ensayo se realizó usando el método de incorporación de [³H]-timidina. En resumen, 2x10⁶ de células P815 por ml fueron etiquetadas con [³H]-timidina por 4 horas en un medio completo o en un medio completo complementado con 20 μM de péptido βGP1 y usadas como células seleccionadas. A continuación del lavado, se incubaron 2x10⁵ selecciones etiquetadas con diluciones en serie de células efectoras en 200 μl del medio completo por 4 horas a 37°C. Las células se cosecharon y la dilución específica fue determinada como sigue:

50 [(c.p.m. retenidos en ausencia de efectores) – (c.p.m retenidos experimentalmente en presencia de efectores)/
c.p.m. retenidos en ausencia de efectores] x 100.

Ejemplo 6

55 *Evaluación de la respuesta inmunológica inducida*

Inducción de las respuestas inmunológicas mucosas después de la vacunación oral

60 Para lograr la protección contra los patógenos mucosos que usan portadores de *Salmonella* viva, la estimulación de una respuesta mucosa eficaz es altamente deseable.

Por consiguiente, la presencia de anticuerpos específicos β-gal en lavados intestinales de ratones inmunizados con MvP101, MvP103 o SL7207 que portan pAH97 se investigó 52 días después de la inmunización. Como es mostrado en la Fig. 5., la inmunización con todos los tres portadores estimula la producción de cantidades significantes de IgA β-gal específica y, en menor grado, favorece la transudación de IgG de antígeno específico en el lumen intestinal. Ningunas diferencias significantes estadísticamente se observaron entre las respuestas a los clones recombinantes mucosos diferentes.

Respuestas inmunológicas celulares activadas después de la inmunización oral con mutantes sseC y sseD que expresan β -gal

Para evaluar la eficacia de las respuestas de las células T antígeno específicas generadas en ratones inmunizados, las células del bazo se enriquecieron en células CD4+T y se reestimularon *in vitro* durante cuatro días con β -gal. Como es mostrado en la Fig. 6, aunque las células del bazo enriquecidas con el antígeno específico CD4+ se generaron después de la vacunación con los tres portadores, MvP1 03 y MvP101 fueron significativamente más eficaces que SL7207 (P 0,05) al activar la respuesta inmunológica celular específica. En contraste, las células aisladas de ratones inmunizados con el portador solo fallaron al proliferar en la presencia de β -gal.

Para investigar el tipo Th de respuesta inmunológica activada por la inmunización, el contenido de IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6 y IL-10 fue medido en los fluidos sobrenadantes de las células reestimuladas. Los resultados demostraron que un patrón de respuesta Th1 predominante fue inducido en ratones inmunizados con todos los portadores. La IFN- γ fue la única citoquina con niveles aumentados significativamente en comparación con aquéllos observados en los sobrenadantes de las células del bazo aisladas de los ratones inmunizados con portadores sin plásmido (Fig. 7). Interesantemente, de acuerdo con los patrones isotipo de IgG, los niveles de IFN- γ detectados en los sobrenadantes de las células de ratones inmunizados con MvP103 [pAH97] fueron significativamente más altos (P 0,05) que aquéllos de los animales que reciben MvP101 [pAH97] o SL7207 [pAH97] (Fig. 7).

*Respuestas de anticuerpo antígeno específico generadas en ratones inmunizados oralmente con portadores de vacuna *S. typhimurium* atenuada que expresan el antígeno β -gal modelo*

Los grupos de ratones se inmunizaron con las cepas recombinantes MvP101 [pAH97] y MvP103 [pAH97]. Para estimar la eficacia de los prototipos otro grupo se vacunó con la cepa portadora SL7207 [pAH97] bien establecida. Las habilidades de los portadores diferentes de inducir una respuesta humoral sistémica fueron determinadas midiendo el título de los anticuerpos específicos β -gal en el suero de los ratones vacunados. Como es mostrado en la Fig. 8, los títulos significantes de IgG específicos β -gal y los anticuerpos IgM se detectaron en el día 30 en todos los animales vacunados. En contraste con los títulos de IgM los cuales alcanzan una meseta en el día 30, los títulos de IgG aumentaron continuamente hasta el día 52 de la inmunización cuando el experimento fue concluido. Aunque todos los portadores probados exhiben una actuación excelente, el mutante MvP1 03 fue el más eficaz en inducir anticuerpos IgG anti β -gal (P 0,05). Ningunos niveles significantes de IgA específico β -gal se descubrieron en ratones inmunizados con cualquiera de los tres clones recombinantes (datos no mostrados).

Para determinar la distribución de las subclases de IgG anti- β -gal, las muestras de suero se analizaron para los niveles específicos de IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3. Los resultados mostrados en la Fig. 9 demuestran que el isotipo de IgG específico β -gal principal presente en los sueros de todos los ratones inmunizados era el IgG2, sugiriendo una respuesta de Th1 predominante. Interesantemente, una concentración más baja de IgG1 (P 0,05) se observó en los ratones inmunizados con MvP103 que en aquéllos que recibieron MvP101 y SL7202, indicando un patrón de respuesta similar en los animales inmunizados con los últimos dos portadores.

Colección de muestras

Las muestras de suero fueron recogidas en puntos de tiempo diferentes y monitoreados para la presencia de los anticuerpos β -gal específicos. Al día 52 después de la inmunización, las purgas intestinales fueron obtenidas enjuagando el pequeño intestino con 2 ml de PBS complementados con 50 mM de EDTA, 0,1% albúmina de suero bovino y 0,1 mg/ml de inhibidor de tripsina de soja (*Sigma*). Entonces, las purgas fueron centrifugadas (10 minutos a 600 x g) para remover los restos, los sobrenadantes fueron removidos y se complementaron con fluoruro de fenilmetilsulfonilo (10 mM) y NaN₃, y guardados a -20°C.

Ensayo de anticuerpos

Los títulos de anticuerpo fueron determinados por un ensayo de inmunosorbentes unidos por enzima (ELISA). Brevemente, 96 placas sanas de ensayo Nunc-Inmuno MaxiSorp™ (*Nunc, Roskilde, Dinamarca*) se cubrieron con 50 μ l de β -gal sano (5 μ g/ml) en tampón de recubrimiento (0,1 M de Na₂HPO₄, pH 9,0). Después de la incubación de noche a 4°C, las placas se bloquearon con 10% de FCS en PBS por 1 hora a 37°C. Las diluciones dobles en serie de suero en FCS-PBS se agregaron (100 μ l/sano y las placas se incubaron por 2 horas a 37°C. Después de cuatro lavados con PBS al 0.05% de Tween 20, los anticuerpos secundarios se agregaron: IgG de anti ratón de cabra específico de cadena γ biotilataada, IgM de anti ratón de cabra específico de cadena μ , anticuerpos IgA de anti ratón de cabra específico de cadena α (*Sigma, St. Louis, MO*) o, para determinar las subclases IgG, los IgG1, IgG2a, IgG2b y IgG3 de anti ratón de rata combinada con biotina (*Pharmingen*) y las placas además se incubaron por 2 horas a 37°C. Después de cuatro lavados, 100 μ l de estreptavidina combinada con peroxidasa (*Pharmingen, St. Diego, CA*) se agregaron a cada sano y las placas se incubaron a temperatura ambiente por 1 hora. Después de cuatro lavados, las reacciones se desarrollaron usando ABTS [2,2'-azino-bis-(ácido 3-etibenzotiazolina-6-sulfúrico)] en 0,1 M de tampón de citratofosfato (pH 4,35) que contiene 0,01% de H₂O₂. Los títulos finales se expresaron como el recíproco del log₂ de la última dilución la cual dio una densidad óptica en 405 nm, 0,1 unidad sobre los valores de los controles negativos después de una incubación de 30 minutos.

ES 2 313 792 T3

Para determinar la concentración de Ig total presente en el lavado intestinal, diluciones en serie de las muestras correspondientes se incubaron en placas de microtítulo que se habían cubierto con Ig anti ratón de cabra, IgM y IgA como anticuerpos de captura (100 µg/sano, *Sigma*) y las diluciones en serie de ratón IgG, IgM y IgA (*Sigma*) purificadas fueron usadas para generar curvas estándar. La detección de Ig antígeno específico se realizó como se describió anteriormente.

Inducción de respuestas CTL antígeno específicas en ratones oralmente inmunizados con las cepas portadoras que expresan β-gal

La estimulación de respuestas restringidas de clase I de CPH son particularmente importantes para la protección contra muchos agentes patógenos y tumores intracelulares. Se ha mostrado que CD8 + CTL antígeno específico puede generarse tanto *in vitro* como *in vivo* después de la inmunización con el spp de la *Salmonella* recombinante que expresan antígenos heterólogos. Por consiguiente, nosotros lo consideramos importante para determinar si los portadores probados también eran capaces de activar una respuesta CTL β-gal específica. Las células del bazo fueron recolectadas de ratones vacunados con cualquiera MvP101 [pAH97], MvP103 [pAH97] o SL7207 [pAH97] al día 52 de la inmunización y reestimuladas *in vitro* con células de bazo singénicas pulsadas por βGP1 durante 5 días. Como es mostrado en la Fig. 10, las células del bazo de ratones inmunizados con cualquiera de las tres construcciones indujeron la lisis significativa de células designadas cargadas con β-GP1 comparadas con los controles descargados. Las respuestas más eficaces se observaron usando la cepa portadora MvP103. La lisis fue mediada a través de células CD8 + T ya que la actividad citotóxica fue completamente abrogada cuando las células efectoras CD8 + T se agotaron (datos no mostrados).

Determinación de la citoquina

Los sobrenadantes del cultivo fueron colectados de las células proliferantes en los días 2 y 4, y guardados a -70°C. La determinación de IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 y IFN-γ fue realizada por ELISA específico. En resumen, 96 placas de microtítulo sano se cubrieron toda la noche a 4°C con IL-2 mAb (clon JESG-1A12) anti ratón de rata purificado, anti IL-4 mAb (clon 11B11), anti IL-5 mAb (clon TRFK5), anti IL-6 mAb (clon MP5-20F3), anti IL-10 mAb (clon JES5-2A5), y anti IFN-γ mAb (clon R4-6A2) (*Pharmingen*). Después de tres lavados, las placas se bloquearon y las diluciones dobles de fluidos sobrenadantes se agregaron. Una curva estándar se generó para cada citocina usando murina recombinante IL-2 (rIL-2), rIL-4, rIL-5, rIL-6, rIFN-γ, rIL-10 (*Pharmingen*). Las placas se incubaron además a 4°C toda la noche. Después de lavar, 100 µl/sano de anticuerpos monoclonales IL-2 (clon JES6-5H4), IL-4 (clon BVD6-24G2), IL-5 (clon TRFK4), IL-6 (clon MP5-32C11), IL-10 (clon SXC-1) y INF-γ (clon XMG1.2) de antirratón de rata biotinizados se agregaron y se incubaron por 45 minutos a temperatura ambiente. Después de seis lavados, la estreptavidina y la peroxidasa combinadas se agregaron y se incubaron por 30 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, las placas se desarrollaron usando ABTS.

Agotamiento de las células del bazo CD8

Los subconjuntos celulares CD8+ se agotaron usando *MiniMACS Magnetics Ly-2 Microbeads* según las instrucciones del fabricante (*Miltenyi Biotec*). Las preparaciones celulares agotadas contenían 1% de células CD8 +.

Análisis FACScan

Aproximadamente 5x10⁵ de células se incubaron en tampón de manchado (PBS complementado con 2% de FCS y 0,1% de azida de sodio) con el anticuerpo o la combinación de anticuerpos deseados por 30 minutos a 4°C. Después de los lavados, las células se analizaron en un FACScan (*Becton Dickinson*). Los anticuerpos monoclonales usados anti CD4 y anti CD8 (clones H129.19 y 53-6.7; *Pharmingen*) se conjugaron por FITC.

Ejemplo 7

Proliferación celular

Ensayo de proliferación celular

Las suspensiones de célula de bazo se enriquecieron por células CD4 + T usando *MiniMACS Magnetic Ly-2 y Microcuentas* IgG de anti ratón de cabra indirectos según las instrucciones del fabricante (*Miltenyi Biotec GmbH, Alemania*). Las preparaciones celulares contuvieron > 65% de células CD4+. Las células se ajustaron a 2 x 10⁶ células/ml en un medio completo complementado con 20 U/ml de rIL-2 de ratón (*Pharmingen*), sembradas en 100 µl/sano en una placa de fondo llano de microtítulo 96 sano (*Nunc, Roskilde, Dinamarca*) e incubadas durante cuatro días en presencia de concentraciones diferentes de β-gal soluble. Durante el final de 18 horas de cultivo 1 µCi de [³H]-timidina (*Amersham International, Amersham, Reino Unido*) fue añadido por sano. Las células se cosecharon en filtros de papel usando a un cosechador celular y la [³H]-timidina incorporada en el ADN de las células proliferantes fue determinada en un contador de centelleo de β.

Ejemplo 8

Caracterización de los genes *ssr* y construcción y caracterización de las cepas mutantes MvP284, MvP320 y MvP333 de *S. typhimurium*

Homología de dos genes reguladores componentes *ssrA* y *ssrB* de SPI2 con otras proteínas bacterianas

El *ssrA* del gen SPI2 codifica una proteína similar a los componentes sensores de dos sistemas reguladores componentes bacterianos como se ha descrito antes (Ochman *et al.*, 1996). Para la consistencia con la nomenclatura de genes de virulencia SPI2 (Hensel *et al.*, 1997b; Valdivia y Falkow, 1997), este gen se nombra *ssrA*. Secuencia abajo del *ssrA*, un MLA con capacidad de codificar para una proteína de 24,3 kDa se identificó. Este gen comparte una similitud significativa con una familia de genes que codifican los activadores transcripcionales similares al DegU del *Bacillus subtilis*, UvrY de *E. coli* y BvgA de *Bordetella pertussis*. Por consiguiente, es probable que la proteína actúe como el componente regulador del sistema del *ssr* y el gen se nombró *ssrB*.

Regulación inversa de SPI1 y SPI2

La expresión de los sistemas de secreción del tipo III de SPI1 y SPI2 son estrechamente regulados por las condiciones ambientales. Mientras el SPI1 es inducido durante la fase estacionaria previa/registro tardío después del crecimiento en un medio rico de alta osmolaridad y que limita la concentración de O₂ (oxígeno), ninguna inducción de expresión del gen SPI2 fue observada. En contraste, después del crecimiento en un medio mínimo con cantidades limitantes de Mg²⁺ (8 μM) la fusión de *ssaB::luc* fue muy expresada mientras la fusión de *sipC::lacZ* no fue expresada. La expresión de la fusión de *ssaB::luc* es dependiente de la función de SsrA/B, ya que no hay ninguna expresión en la cepa P8G12 del ambiente de *ssrB* negativa (Hensel *et al.*, 1998). La expresión de la fusión de *sipC::lacZ* es dependiente de HilA, el regulador transcripcional de SPI1. Nosotros también observamos que una mutación en *ssrB* afecta la expresión de la fusión de *ipC::lacZ*. Esto indica que el SPI2 tiene un efecto regulador en la expresión de los genes SPI1.

Las cepas bacterianas que albergan una fusión de *luc* al *ssaB* en la SPI2 (cepa MvP131) y una fusión de *lacZ* al *sipC* en la SPI1 (cepa MvP239) fueron crecidas bajo las condiciones previamente mostradas para inducir la expresión del gen SPI. Las bacterias fueron crecidas durante toda la noche en un medio mínimo que contiene 8 μM de Mg²⁺ o durante toda la noche en un caldo de LB que contiene 1% de NaCl (LB 1% de NaCl). La actividad de *luc* de la cepa MvP131 y la actividad de β-galactosidasa de la cepa MvP239 fueron determinadas. Como un control, ambas fusiones reporteras se ensayaron en el ambiente de la cepa *ssrB* negativa de P8G12.

La expresión de los niveles de fusiones del gen reportero *lacZ* a los genes SPI se ensayó como se describe en Miller, 1992.

Construcción y análisis de la fusión del gen reportero *sseA*

Un fragmento de 1,1 kb de SmaI/HincII de p5-4 fue subclonado en pGPL01, un vector suicida para la generación de fusiones de *luc* (Gunn y Miller, 1996). La construcción resultante, en la cual 1,0 kb secuencia arriba y 112 bp de *sseA* es transcripcionalmente fusionado al *luc* fue usada para transformar la *E. coli* de S17-1 λpir, y la transferencia conjugacional a la *S. typhimurium* fue realizada como es descrito previamente (Gunn y Miller, 1996). Las cepas que habían integrado la fusión del gen reportero en el cromosoma por recombinación homóloga fueron confirmadas por PCR y el análisis de hibridación Southern. Seguidamente, la fusión fue pasada a través de la transducción de P22 al tipo natural y los varios ambientes de la cepa mutante con inserciones de mTn5 en los genes SPI1 o SPI2 (Maloy *et al.*, 1996). Como un control, una cepa fue construida albergando una integración cromosomal de pLB02, un plásmido suicida sin una fusión promotora al gen *luc* (Gunn y Miller, 1996). Para el análisis de expresión de las cepas fueron crecidas por 16 horas en un medio mínimo con ventilación. Los alícuotas de los cultivos bacterianos fueron lisados y la actividad de la luciferasa fue determinada usando un equipo de ensayo de luciferasa según el protocolo del fabricante (Boehringer Mannheim). La detección del fotón se realizó en un contador Microplaca de centelleo/luminiscencia (Wallac, Turku). Todos los ensayos se hicieron en triplicado, y replicados en ocasiones independientes.

La expresión de *sseA* es dependiente de SsrAB

Para establecer si los genes del *sse* son parte del sistema de secreción de SPI2, la expresión de la fusión de un gen reportero *sseA::luc*, integrada por recombinación homóloga en el cromosoma de las cepas mutantes SPI2 diferentes, se ha investigado (Fig. 11). La actividad transcripcional de *sseA* en un ambiente de tipo natural durante el crecimiento en un medio mínimo fue dramáticamente reducida por la desactivación del sistema de dos componentes SPI2. Las inserciones de transposón en *ssrA* (cepa mutante P3F4) y *ssrB* (cepa mutante de P8G12), que codifican el componente sensor y el activador transcripcional, respectivamente, resultaron en la expresión reducida 250 a 300 veces de *sseA*. La desactivación de *hilA*, el activador transcripcional de SPI1 (Bajaj *et al.*, 1996), no tuvo efecto en la expresión del gen *sseA*. Las inserciones de transposón en dos genes que codifican componentes del mecanismo de secreción tipo III de SPI2 (*ssaJ::mTn5* y *ssaT::mTn5*; cepas mutantes P11D10 y P9B7; Shea *et al.*, 1996) tampoco tenían ninguna significación. Estos datos muestran que el SsrA/B se requiere para la expresión del *sseA*, pero que *hilA* no lo es.

La expresión de los genes SPI2 dentro de los macrófagos es dependiente del SsrA/B

La presencia de la *S. typhimurium* dentro de las células eucarióticas (macrófagos) induce la expresión de los genes SPI2 como es indicado por el análisis de las fusiones al *ssaB* y *ssaH*. Esta expresión es dependiente del sistema regulador de dos componente SsrA/B codificados por SPI2.

La estirpe celular de la estirpe de macrófago murino J744 se usó para este experimento. Los macrófagos se infectaron a una multiplicidad de infección de 10 bacterias por macrófago con MvP131 (fusión de *luc* al *ssaB*), MvP266 (fusión de *luc* de *ssaH*) y MvP244 (fusión de *luc* al *ssaB* en un ambiente negativo de *ssrB*). Las bacterias extracelulares fueron matadas por la adición de gentamicina (20 µg/ml). En varios puntos de tiempo, los macrófagos fueron lisados por la adición de 0,1% de Triton X-100, las bacterias intracelulares fueron enumeradas en diluciones en serie de revestimiento sobre las placas de agar LB. Un alícuota ulterior de las bacterias fue recuperado y la actividad de la luciferasa fue determinada. Las actividades de la luciferasa expresaron una emisión ligera relativa por bacteria.

*Efectos de una mutación en *ssrB* en la proteína efectora secretada de SPI1 SipC*

El análisis de las proteínas secretadas en el medio de crecimiento por la cepa mutante MvP320 de SPI2 de la *S. typhimurium* (mutación no polar en *a*, Fig. 12) reveló la ausencia o la reducción fuerte en las cantidades de las proteínas efectoras secretadas SPI1 (Hensel *et al.*, 1997b). Estos mutantes de SPI2 también están reducidos en su habilidad de invadir las células epiteliales cultivadas o los macrófagos cultivados (Hensel *et al.*, 1997b). Para examinar este fenómeno en mayor detalle, nosotros expresamos el recombinante SipC (rSipC) y levantamos anticuerpos contra el rSipC en conejos. En las prueba de manchado Western, el antisuero contra rSipC reaccionó con una proteína de 42 kDa de los precipitados sobrenadantes del cultivo de la cepa de tipo natural NCTC12023 de *S. typhimurium*. Ninguna reacción se observó con los sobrenadantes de los cultivos de EE638, una cepa deficiente en SipC (Hueck *et al.*, 1995). Además, en la prueba de manchado Western el SipC no pudo detectarse en los sobrenadantes del cultivo de los MvP320 mutantes de SPI2. Sin embargo, el SipC se detectó en los sobrenadantes del cultivo de otros mutantes de SPI2 como P2D6 (*ssaV::mTn5*), P9B6 (*ssaV::m Tn5*) y NPssa V (*ssaV::aphT*) (Deiwick *et al.*, 1998). La detección por el antisuero de SipC en los sobrenadantes del cultivo de varias cepas estuvo de acuerdo con la presencia o ausencia de SipC cuando se detectó por SDS-PAGE. Además fue analizado si la ausencia de SipC en sobrenadantes del cultivo de cepas mutantes de SPI2 era debida a la secreción defectuosa de SipC por medio del sistema de secreción del tipo III o redujo la síntesis de SipC en estas cepas. El antisuero contra el rSipC fue usado para detectar SipC en los gránulos de los cultivos crecidos bajo condiciones de inducción para la expresión de los genes SPI1 (es decir la fase estacionaria, alta osmolaridad, oxígeno bajo) (Bajaj *et al.*, 1996). El análisis de tipo natural y las cepas que portan varias mutaciones en los genes SPI1 y SPI2 indicó cantidades altamente reducidas de SipC en los mutantes con una mutación no polar en *ssrB*. Sin embargo, SipC fue detectado en niveles comparables a aquéllos observados en los gránulos de cultivos de tipo natural y en las cepas mutantes P2D6, P9B6 y NPssa V de SPI2. El efecto en la síntesis de SipC no es debido a las tasas de crecimiento reducido o a los niveles de proteína reducidos en los mutantes de SPI2, ya que ambos parámetros eran comparables para el tipo natural y los mutantes de SPI2.

*Efectos de una mutación en el gen de SPI2 *ssrB* en la expresión de genes SPI1*

Para ensayar el efecto de las mutaciones de SPI2 en la expresión de los genes SPI1, las fusiones previamente caracterizadas de *lacZ* a varios genes SPI1 (Bajaj *et al.*, 1995; Bajaj *et al.*, 1996) fueron transducidas en el mutante MvP320 de SPI2 y en varios mutantes de SPI1 para generar un juego de cepas de fusión reporteras. La expresión de la β-galactosidasa reportera en cultivos crecidos bajo condiciones que inducen para la expresión de SPI1 (vea arriba) se ensayó. Una inserción de Tn en *hila* (P4H2) redujo la expresión de *prgK* así como del *sipC*, mientras que una inserción en *spaRS* (P6E11) sólo afectó la expresión de *sipC*. Algunas cepas mutantes con una mutación en *ssrB* del gen SPI2 que codifica a los componentes del sistema regulador de dos componentes mostraron una expresión reducida de fusiones reporteras a *prgK* y a *sipC* (Fig. 11). Los efectos en la expresión de ambos genes fueron similares. Otro cepas mutantes con inserciones de Tn en *ssaV* (P2D6, P9B6), así como el NPssaV mutante que alberga inserciones no polares en *ssaV*, tuvieron niveles de expresión de *prgK* y *sipC* comparables al de las fusiones reporteras correspondientes en un ambiente genético de tipo natural. El análisis de las fusiones del *lacZ* a *prgH* y *invF* revelaron un efecto similar en la expresión como es mostrado para el *prgK* y *sipC*.

*Una mutación en el gen de SPI2 *ssrB* afecta la expresión del *hila* regulador de SPI1*

El análisis de las fusiones reporteras al *sipC* y *prgK* indicó que esa expresión de genes en dos operones diferentes de SPI1 puede ser afectada por las mutaciones de SPI2, sugiriendo que estas mutaciones afectan otros genes SPI1 involucrados en la regulación de *sipC* y *prgK*. Se ha demostrado previamente que la expresión de los genes SPI1 está bajo el control del activador transcripcional Hila (Bajaj *et al.*, 1995; Bajaj *et al.*, 1996). La expresión de *hila* por consiguiente se analizó en presencia de una mutación de SPI2 en *ssrB*. La MvP320 cepa mutante de SPI2 había disminuido grandemente los niveles de expresión del *hila*. De nuevo, niveles muy bajos de expresión de *hila* se observaron en mutantes que tenían niveles reducidos de expresión de *prgK* y de *sipC*. Para analizar si el

efecto de la mutación de SPI2 en la expresión de sipC resultó de la expresión reducida de hilA, nosotros a continuación realizamos experimentos de complementación en varias cepas mutantes que albergan el pVV135 (expresión constitutiva de hilA) (Bajaj et al., 1996) o pVV214 (expresión de hilA del promotor nativo) (Bajaj et al., 1995). En acuerdo con un estudio anterior (Bajaj et al., 1995), la mutación hilA de la cepa P4H2 fue complementada por pVV214. Sin embargo, la expresión del sipC o no se restauró en la cepa mutante MvP320 que alberga el pVV 135 o el pVV214.

Construcción de las cepas MvP284 y MvP320 de *S. typhimurium* mutantes de *ssrA* y *ssrB*

- MvP284 mutante, *ssrA*. El gen *ssrA* (Fig. 12) fue subclonado del clon del fago λ 2 de plásmido p2-2 derivado en un fragmento de 5,7 kb de BamHI en pUC18 como se indicó en la Tabla 1. Un fragmento de 1,6 kb se recuperó después de la digestión de HindIII y de EcoRV de p2-2 y subclonado en pBluescript II KS + digerido por HindIII/HincII. La construcción resultante nombrada p2-20 fue digerida con HincII y defosforilada con fosfatasa alcalina. El casete de aphT se aisló como se describió anteriormente y ligado al plásmido linearizado p2-20 en la misma orientación en el único sitio de HincII. Después de la transformación de *E. coli* XL-1 Blue y la selección contra la kanamicina y la carbenicilina (50 μ g/ml de cada una) un clon ha sido escogido y el plásmido albergante se aisló. Este plásmido fue nombrado p2-21 y su identidad demostrada por medio del análisis de restricción. El p2-21 fue además digerido con KpnI y XbaI, un fragmento de 2,5 kb se aisló y se ligó a pKAS32 digerido por KpnI/XbaI. Este plásmido fue electroporado en *E. coli* CC 118 λ pir y los transformantes seleccionados a la kanamicina y la carbenicilina (50 μ g/ml cada una). Como se hizo antes, un clon fue escogido, su plásmido con el fragmento de ADN concordante en pKAS32, nombrado p2-22, aislado y confirmado por el análisis de restricción. El plásmido p2-22 fue electroporado en *E. coli* S17-1 λ pir y transferido en NCTC12023 de *S. typhimurium* (resistente a la estreptomycinina) por combinación como se ha descrito previamente (de Lorenzo y Timmis, 1994). Los exconjugantes en los cuales el gen *ssrA* había sido reemplazado por el gen clonado afectado por la inserción del casete de aphT fue seleccionado para su crecimiento en placas de agar de un medio mínimo de glucosa M9 + 1 (Maloy et al., 1996) y su resistencia a la kanamicina y a la carbenicilina (100 μ g/ml). Los exconjugantes resultantes finalmente mostraron tener un fenotipo negativo de lactosa y ser sensibles a la kanamicina y a la estreptomycinina. Los clones seleccionados fueron además examinados por análisis de Southern. Para excluir las posibles mutaciones que se podrían haber desarrollado durante el procedimiento de clonación el alelo de *ssrA* mutado fue transferido en un ambiente de *Salmonella* fresca por la transducción de P22 (descrito por Maloy et al., 1996). La cepa MvP284 resultante de *Salmonella* se examinó para la presencia del casete de resistencia dentro del gen del *ssrA* por el uso de los cebadores *ssrA*For (5'- AAG GAA TTC AAC AGG CAA CTG GAG G-3') y *ssrA*-Rev (5- CTG CCC TCG CGA AAA TTA AGA TAA TA -3'). La amplificación de ADN de clones que contienen el alelo de *ssrA* de tipo natural resultó en un producto PCR de 2.800 bp, el uso de ADN de los clones que albergan un alelo del *ssrA* afectado por el casete de aphT resultó en un producto de PCR de 3.750 bp. La cepa MvP320 resultante de *Salmonella* se examinó para la presencia del casete de resistencia dentro del gen *ssrB* por el uso del análisis de hibridación Southern del ADN total de los exconjugantes.
- MvP320 mutante, *ssrB*. El gen *ssrB* (Fig. 12) fue subclonado del clon del fago λ 1 de plásmido p1-6 derivado en un fragmento de 4,8 kb de amHI-PstI/B en pT7-Blue como se indicó en la Tabla 1. Un fragmento de 1,7 kb se recuperó después de la digestión de BamHI y HincII de p1-6 y subclonado en pBluescript II KS + digerido por BamHI/HincII. La construcción resultante nombrada p1-20 fue digerida con EcoRV y defosforilada con fosfatasa alcalina. El casete de aphT se aisló como se describió anteriormente y ligado al plásmido linearizado p1-20 en la misma orientación en el único sitio de EcoRV. Después de la transformación de *E. coli* XL-1 Blue y la selección contra la kanamicina y la carbenicilina (50 μ g/ml de cada una) un clon ha sido escogido y el plásmido huésped se aisló. Este plásmido fue nombrado p1-21 y su identidad confirmada por análisis de restricción. El p1-21 fue además digerido con KpnI y XbaI, un fragmento de 2, 5 kb se aisló y ligó a pKAS32 digerido por KpnI/XbaI. Este plásmido fue electroporado en *E. coli* CC118 λ pir y las bacterias transformadas seleccionadas a la kanamicina y la carbenicilina (50 μ g/ml de cada una) se realizaron. Como se hizo antes, un clon fue escogido, su plásmido con el fragmento de ADN concordante en pKAS32, nombrado p1-22, aislado y confirmado por análisis de restricción. El plásmido p1-22 fue electroporado en *E. coli* E. S17-1 λ pir y transferido en NCTC12023 de *S. typhimurium* (resistente a la estreptomycinina) por conjugación como se ha descrito previamente (de Lorenzo y Timmis, 1994). Los exconjugantes en los cuales el gen *ssrB* había sido reemplazado por el gen clonado desestabilizado por la inserción del casete de aphT fue seleccionado por su crecimiento en placas de agar de medio mínimo de glucosa M9 + (Maloy et al., 1996) y su resistencia a la kanamicina y a la carbenicilina (100 μ g/ml). Los exconjugantes resultantes mostraron finalmente que tienen un fenotipo negativo de lactosa y que son sensibles a la kanamicina y a la estreptomycinina. Los clones seleccionados fueron además examinados por análisis del manchado de Southern. Para excluir las posibles mutaciones que se podrían haber desarrollado durante el procedimiento de clonación el alelo *ssrB* mutado se ha transferido en un ambiente de *Salmonella* fresca por la transducción de P22 (descrito por Maloy et al., 1996). El muestreo de los mutantes con una inserción del casete de aphT dentro del sitio del *ssrB* fue realizado por PCR usando los cebadores *ssrB*-For (5'- CTT AAT TTT CGC GAG GG -3') y *ssrB*-Rev (5'- GGA CGC CCC TGG TTA ATA -3'). La amplificación de ADN de clones que contienen el alelo de *ssrB* de tipo natural resultó en un producto PCR de 660 bp, el uso de ADN de los clones que albergan un alelo del *ssrB* desestabilizado por la inserción

ES 2 313 792 T3

del casete de aphT resultó en un producto PCR de 1.600 bp. La cepa MvP320 resultante de *Salmonella* se examinó para la presencia del casete de resistencia dentro del gen *ssrB* por el uso del análisis de hibridación Southern del ADN total de los ex conjugantes.

5

Construcción de la cepa mutante MvP340 que porta una delección en marco en *ssrA*

Una delección de 407 codones entre el codón 44 y el 451 de *ssrB* se generó. El plásmido p2-2 fue digerido por BamHI y KpnI, un fragmento de 3,7 kb fue recuperado y subclonado en pBluescript KS + para generar p2-50. El plásmido p2-50 fue linearizado por digestión con PstI el cual corta una vez dentro del fragmento del gen subclonado *ssrA*. Los cebadores *ssrA*-del-1 (5'-GGT CTG CAG GAT TTT TCA CGC ATC GCG TC -3') y *ssrB*-del-2 (5'-GGT CTG CAG AAC CAT TGA TAT ATA AGC TGC -3') fueron diseñados para introducir sitios PstI. PCR se realizó usando p2-50 linearizado como plantilla de ADN. La polimerasa TaqPlus (*Stratagene*) se usó según las instrucciones del fabricante. Las reacciones de volumen de 100 μ l fueron fijadas usando 10 μ l de tampón 10 x TaqPlus Precision que contiene cloruro de magnesio, 0,8 μ l de 100 nM de dNTPs, 250 ng de plantilla de ADN (linearizado p2-50), 250 ng de cada cebador y 5 U de polimerasa de ADN TaqPlus. PCR se realizó durante 35 ciclos a 95°C durante 1 minuto, 60°C durante 1 minuto, 72°C durante 6 minutos. Entonces un paso final de 72°C durante 10 minutos fue agregado. 10 μ l de la reacción PCR se analizaron. Un producto del tamaño esperado fue recuperado, digerido por PstI, autoligado, y la mezcla de la ligación fue usada para transformar *E. coli* DH5 α a la resistencia a la carbenicilina. Los plásmidos se aislaron de los transformantes y la integridad de la inserción y la delección fueron analizadas por el análisis de restricción y la secuenciación de ADN. La inserción de una construcción confirmada se aisló después de la digestión con XbaI y KpnI y ligada al vector pKAS32 digerido por XbaI/KpnI. La construcción resultante fue usada para transformar *E. coli* S17-1 λ pir a la resistencia a la carbenicilina, y la transferencia conjugacional del plásmido a la *S. typhimurium* (NaI^R, Strep^R) se realizó según los procedimientos estándar (*de Lorenzo y Timmis, 1994*). Los exconjugantes que habían integrado el plásmido suicida por recombinación homóloga fueron seleccionados por la resistencia al ácido nadifíxico y a la carbenicilina, y protegidos para la sensibilidad a la estreptomina. Tales clones fueron crecidos en LB a OD600 de aproximadamente 0,5 y los alícuotas se colocaron en placas LB que contienen 250 μ g/ml de estreptomina para seleccionar por colonias las cuales habían perdido el plásmido integrado y habían sufrido intercambio alélico. Los clones resistentes a la estreptomina pero sensibles a la carbenicilina se usaron para el análisis ulterior. El filtrado de los mutantes con una delección dentro del sitio de *ssrA* fue realizado por PCR usando los cebadores *ssrA*-F o (5'-AAG GAA TTC AAC AGG CAA CTG GAG G-3') y *ssrA*-Rev (5'-CTG CCC TCG CGA AAA TTA AGA TAA TA -3'). La amplificación de clones de ADN que contienen el alelo *ssrA* de tipo natural resultó en un producto PCR de 2,800 bp, el uso de los clones de ADN que albergan un alelo *ssrA* con una delección interna resultó en un producto PCR de 1.580 bp. La integridad de los clones que albergan la delección de *ssrA* fue además confirmada por el análisis Southern del locus del *ssrA*. Finalmente, el locus del *ssrA* que contiene la delección en marco interna se pasó a un ambiente de la cepa fresca de *S. typhimurium* por transducción de P22 (*Maloy et al., 1996*) y la cepa resultante se nombró MvP340.

Hibridación Southern

El ADN genómico de la *Salmonella* se preparó ADN como se describió previamente (*Hensel et al., 1997*). Para el análisis de hibridación Southern, el ADN genómico fue digerido con EcoRI o EcoRV, fraccionado en 0,6% de geles de agarosa y transferido a las membranas Hybond N+ (*Amersham, Braunschweig*). Varias sondas que corresponden a la región *ssrA* y *ssrB* se obtuvieron como fragmentos de restricción de la inserción subclonada de λ 1 y λ 2.

Ejemplo 9

50 Evaluación de la seguridad de la cepa MvP320 de *S. typhimurium*

Para los ensayos de la competencia entre el *S. typhimurium* de tipo natural y la cepa mutante MvP320, las bacterias fueron crecidas en LB a una densidad óptica a 600 nm de 0,4 - 0,6. Los cultivos se diluyeron y los alícuotas de las dos cultivos se mezclaron para formar un inóculo que contiene cantidades iguales de ambas cepas. La proporción de ambas cepas fue determinada por diluciones de revestimiento en placas de LB que contienen antibióticos selectivos para las cepas individuales. Un inóculo de aproximadamente 10⁴ unidades que forman colonia (cfu) fue usado para infectar los ratones BALB/c hembras viejas de 6 a 8 semanas (*Charles River Breeders, Wiga*) por inyección en la cavidad peritoneal. A varios puntos de tiempo después de la infección los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical y la carga bacteriana del hígado y del bazo fue determinada por revestimiento de homogenatos del tejido usando el dispositivo de recubrimiento espiral "WASP" (*Meinrup, Löhden*). El plaqueo se realizó usando placas LB conteniendo 50 μ g/ml de kanamicina o 100 μ g/ml de ácido nadifíxico para seleccionar las cepas mutantes o el tipo natural, respectivamente.

La cepa MvP320 que alberga el casete de gen aphT en *ssrB* se recuperó en por lo menos en números 1.000 veces más bajos que la cepa del tipo natural de *S. typhimurium*. Estos datos indican que *ssrB* contribuye significativamente a las infecciones sistémicas de *S. typhimurium* en el modelo de ratón de la salmonelosis.

Análisis estadístico de todos los experimentos

La importancia estadística entre las muestras apareadas fue determinada por la prueba *t* de Student. La importancia de los resultados obtenidos fue determinada usando el software *statgraphic plus* para Windows 2,0 (*Statistical Graphic Corp.*).

Ejemplo 10

Caracterización del Promotor de P_{ssaE} inducible in vivo (Promotor B, Fig. 24 B)

El promotor el cual se localiza secuencia arriba del *ssaE* (*P_{ssaE}*, anteriormente nombrado Promotor B) fue mostrado para ser regulado por el locus del *ssrAB*. Un fragmento de ADN que comprende nucleótido 800 a 120 (800-1.205) en la secuencia incluida (Fig.21 A) fue mostrado para conferir regulación dependiente de *ssrB* sobre la expresión de un gen reportero (*gfp*) combinado al promotor. El fragmento de ADN fue clonado en un plásmido de copia baja delante del gen *gfp*. Como se ha mostrado previamente para otras construcciones de gen reportero, la inducción de la expresión de *P_{ssaE}* (800-1,205) se observó en un medio mínimo de magnesio (*Deiwick et al., 1999*) y fue dependiente en la presencia de un alelo de tipo natural cromosomal de *ssrB*. Un fragmento más corto de ADN, que comprende nucleótido 923 a 1205 (923-1,205) en la secuencia incluida, no confirió regulación en la expresión de *gfp*. Sin embargo, la expresión era reducida comparada al fragmento de *P_{ssaE}* (800-1205) el y no era inducida en el medio mínimo de magnesio ni era ello dependiente en *ssrB*. Así, el fragmento *PssaE* (800-1205) comprende al promotor activo y las secuencias reguladoras, probablemente incluyendo un sitio de unión *SsrB*.

Descripción de los dibujos

Fig. 1. Mapa de la Isla 2 de la Patogenicidad de la *Salmonella* (A) que indica las posiciones de las mutaciones en las cepas MvP101, MvP102, y MvP103 (B). Un mapa de la restricción parcial de la región genómica se muestra, y las posiciones de las inserciones del plásmido pertinentes para este trabajo se indican (C). B, BamHI,; C, ClaI,; E, EcoRI,; P, PstI,; V, EcoRV,; S, SmaI; los números de acceso a la base de datos EMBL se indican para las secuencias en (A).

Fig. 2a. La alineación de la secuencia de aminoácido de SseB deducida a EspA de EPEC (*Elliot et al., 1998*). El algoritmo Clustal W del programa MacVector 6,0 fue usado para construir las alineaciones.. Los residuos de aminoácido similares se embalan, los residuos idénticos se embalan y se oscurecen.

Fig. 2b. La alineación de la secuencia de aminoácido SseC deducida a EspD de EPEC (*Elliot et al., 1998*), YopB de *Yersinia enterocolitica* (*Hakansson et al., 1993*), y PepB de *Pseudomonas aeruginosa* (*Hauser et al., 1998*). El algoritmo ClustalW del programa MacVector 6.0 fue usado para construir las alineaciones. Las posiciones en donde por lo menos tres residuos de aminoácido son similares se embalan, en donde por lo menos tres residuos son idénticos se embalan y se oscurecen.

Fig. 3. La acumulación intracelular de los mutantes SP12 de *S. typhimurium* en macrófagos 264,7 de RAW. A continuación de la opsonización y la infección, los macrófagos fueron lisados y cultivados para la enumeración de las bacterias intracelulares (gentamicina protegida) a 2 horas y 16 horas después de la infección. Los valores mostrados representan el aumento de pliegue calculados como una proporción de las bacterias intracelulares entre las 2 horas y las 16 horas después de la infección. La infección se realizó en triplicado para cada cepa y el error estándar del promedio se muestra.

Fig. 4. La supervivencia intracelular y la repetición de la *S. typhimurium* mutante SP12 en (A) células J774.1 y (B) los periodatos sacados de macrófagos peritoneales de ratones C3H/HeN. Después de la opsonización y la internalización, los fagocitos fueron lisados y cultivados para la enumeración de las bacterias intracelulares viables en el tiempo de 0 horas. Los valores muestran la proporción de este inóculo intracelular al representante viable a 20 horas $\pm$ el error estándar del promedio. Las muestras se procesaron en triplicado, y cada experimento fue realizado por lo menos dos veces.

Fig. 5. Los anticuerpos específicos β -gal en los lavados intestinales de los ratones oralmente inmunizados con o MvP101[pAH97], MvP103 [pAH97], SL7207 [pAH97] o MvP101 al día 52 después de la inmunización. Los resultados se expresan como el porcentaje de la subclase Ig total correspondiente presente en el lavado intestinal, el SEM es indicado por líneas verticales. Niveles significantes de antígeno IgM específico no pudieron ser detectados en cualquiera de los grupos. Los resultados obtenidos con MvP103 y SL7207 (no mostrados)fueron similares a aquéllos para MvP101.

Fig. 6. La respuesta proliferativa específica β -gal de las células del bazo enriquecidas CD4+ de ratones oralmente inmunizados con o MvP101 [pAH97], MvP103 [pAH97], SL7207 [pAH97] o MvP101. Las células fueron reestimuladas *in vitro* durante una incubación al día 4 con diferentes concentraciones de β -gal soluble. Los valores se expresan como cpm promedio de triplicados; el SEM fue en todos los casos menor que el 10%. Los valores del ambiente obtenidos de los sanos sin el antígeno estimulante se sustrajeron. Los resultados obtenidos con MvP103 y SL7207 (no mostrados) eran similares a aquéllos obtenidos con MvP101.

Fig. 7. IFN- γ presente en los sobrenadantes de las células del bazo CD4+ enriquecido de los ratones oralmente inmunizados con o MvP101 [pAH97], MvP103 [pAH97], SL7207 [pAH97] o MvP101 sin plásmido al día 2 y 4 de cultivo. Las células del bazo de los ratones se aislaron al día 52 después de la inmunización, y las poblaciones de CD4+ enriquecidas fueron reestimuladas *in vitro* durante cuatro días en presencia de β -gal soluble (20 μ g/ml). La producción de IFN- γ fue determinada por ELISA, los resultados representan los promedios de tres determinaciones. El SEM es indicado por líneas verticales, resultados similares se obtuvieron usando cualquiera de los portadores sin plásmido (no mostrados). Ninguna diferencia significativa con los grupos de control se observó cuando IL- 2, IL-4, IL-5, IL-6 y IL-10 se probaron (no mostrados).

Fig. 8. Cinética de IgG del suero β -gal específico (símbolos cerrados) y las respuestas anticuerpo IgM (símbolos abiertos) en ratones (n = 5) después de la inmunización oral con o MvP101 [pAH97] (triángulo), MvP103 [pAH97] (círculo), SL7207 [pAH97] (cuadrado) o MvP101 sin plásmido (diamante). Los resultados se expresan como el log2 recíproco del promedio geométrico del punto extremo del título (GMT), el SEM fue en todos los casos menor que el 10%. Resultados similares se obtuvieron usando cualquiera de los portadores sin plásmido (no mostrado), las inmunizaciones son indicadas por flechas.

Fig. 9. Perfiles de las subclases de los anticuerpos IgG β -gal específicos presentes en el suero de los ratones (n = 5) oralmente inmunizados con o MvP101 [pAH97], MvP103 [pAH97], SL7207 [pAH97] o MvP101 sin plásmido al día 52 después de la inmunización. Los resultados se expresaron como ng/ml, el SEM es indicado por líneas verticales. Resultados similares se obtuvieron usando cualquiera de los portadores sin plásmido (no mostrados).

Fig. 10. Reconocimiento del epítipo β GP1 restringido por CPH de clase I por linfocitos cebados *in vivo* en ratones por vacunación oral con o MvP101 [pAH97], MvP103 [pAH97], SL7207 [pAH97] o MvP101 sin plásmido. Las células del bazo de los ratones inmunizados fueron reestimuladas *in vitro* cinco días en presencia de 20 μ M de β GP1. Al final del cultivo, los linfocitos se probaron en un ensayo de liberación de [3 H]-timidina usando P815 (símbolos abiertos) y P815 cargado de β GP1 (símbolos cerrados) como blancos. Los resultados son valores promedio de sanos triplicados (uno fuera de tres experimentos independientes se muestra) y fueron expresados como: [(cpm retenido en l ausencia de efectores) - (cpm retenido experimentalmente en presencia de efectores)/cpm retenido en ausencia de efectores] x 100; SEM fueron más bajos que el 5% de los valores. Resultados similares se obtuvieron usando cualquiera de los portadores sin plásmido (no mostrados).

Fig. 11. Expresión de una fusión de sseA::luc en cepas mTn5 de tipo natural y mutantes de *S typhimurium*.

Fig. 12. Mapa de la Isla 2 de Patogenicidad de la *Salmonella* (A) que indica las posiciones de las mutaciones en las cepas MvP284 y MvP320 (B). Un mapa de restricción parcial de la región genómica se muestra, y la posición de las inserciones de plásmidos pertinentes para este trabajo se indica (C). B, *Bam*HI; C, *Cla*I; H, *Hind*III; P, *Pst*I; V, *Sma*I; *Eco*RV; II, *Hinc*II.

Fig. 13. Modelo para la organización transcripcional de los genes de virulencia SPI2. Este modelo está basado en la observación de la dirección transcripcional de los genes SPI2, caracterización de las actividades del promotor.

Fig. 14 muestra el principio de cómo las mutaciones que tienen una calidad diferente de atenuación pueden generarse. Como es mostrado en A, la desactivación de un gen efector como sse resulta en un grado bajo de atenuación. Como es mostrado en B, la desactivación adicional de un gen localizado fuera del locus de SPI2 como aroA resulta un grado mediano de atenuación. Por la mutación insercional con un efecto polar todos los genes en un grupo policistrónico son afectados lo cual resulta en un grado alto de atenuación, como es mostrado en C. Como es mostrado en D, la desactivación de un gen regulador tal como srrB resulta en una atenuación suprema.

Fig. 15 muestra el principio de la mutación insercional por el ejemplo de la mutación insercional en un gen de virulencia. Casetes diferentes tales como SMC, GEC, TC y/o el casete de invertasa pueden ser insertados en un gen de virulencia clonado, produciendo así un gen de virulencia desactivado el cual puede introducirse en una célula por recombinación homóloga usando un casete de gen de virulencia.

Fig. 16 ilustra el casete marcador selectivo.

Fig. 17 ilustra el casete de expresión de gen y la inducción del mismo en un sistema de dos fases. El casete de expresión de gen comprende un promotor, opcionalmente un casete de gen que comprenden una o más unidades de expresión y opcionalmente uno o más terminadores transcripcionales para las unidades de la expresión y/o una secuencia 5' transcrita al casete de expresión de gen.

Fig. 18 muestra los requisitos estructurales de la unidad de expresión de gen para la entrega de antígenos heterólogos en varios compartimientos, es decir, secuencias accesorias que dirigen la selección del producto de la expresión.

Fig. 19 muestra un casete transactivador en un sistema de una fase y en un sistema de dos fases.

Fig. 20 muestra los modos diferentes de expresión del gen como realizados por la combinación de secuencias accesorias diferentes y/o casetes en un sistema de una fase y en un sistema de dos fases.

ES 2 313 792 T3

Fig. 21 A muestra la secuencia genómica de una región del locus de SPI2 de *Salmonella* que comprende las secuencias completas de los genes ssaE a ssal y las secuencias parciales de ssaD y ssaJ (cf. Fig. 12).

Fig. 21 B muestra la secuencia de nucleótidos de una región del locus de SPI2 de la *Salmonella* que comprende las secuencias codificadas para el ssrA y ssrB.

Figs. 22 A-Q muestran cada una la secuencia nucleótida del gen respectivo indicado.

Figs. 23 A-Q muestran cada una la secuencia de aminoácido del polipéptido respectivo indicado.

Figs. 24 A, B muestran cada una, una secuencia nucleótida comprendiendo un promotor inducible *in vivo*.

Listado de secuencias

SEQ ID NO: 1	región genómica	ácido nucleico	FIG 21 A
SEQ ID NO: 2	región genómica	ácido nucleico	FIG 21 B
SEQ ID NO: 3	ssaA	ácido nucleico	FIG 22 A
SEQ ID NO: 4	ssaA	producto de traslación	FIG 23 A
SEQ ID NO: 5	ssaB	ácido nucleico	FIG 22 B
SEQ ID NO: 6	ssaB	producto de traslación	FIG 23 B
SEQ ID NO: 7	ssaC	ácido nucleico	FIG 22 C
SEQ ID NO: 8	ssaC	producto de traslación	FIG 23 C
SEQ ID NO: 9	ssaD	ácido nucleico	FIG 22 D
SEQ ID NO: 10	ssaD	producto de traslación	
SEQ ID NO: 11	ssaD	proteína	FIG 23 D
SEQ ID NO: 12	ssaE	ácido nucleico	FIG 22 E
SEQ ID NO: 13	ssaE	producto de traslación	FIG 23 E
SEQ ID NO: 14	ssaF	ácido nucleico	FIG 22 F
SEQ ID NO: 15	ssaF	producto de traslación	FIG 23 F
SEQ ID NO: 16	ssaG	ácido nucleico	FIG 22 G
SEQ ID NO: 17	ssaG	producto de traslación	FIG 23 G
SEQ ID NO: 18	sscA	ácido nucleico	FIG 22 H
SEQ ID NO: 19	sscA	producto de traslación	FIG 23 H
SEQ ID NO: 20	sscB	ácido nucleico	FIG 22 I
SEQ ID NO: 21	sscB	producto de traslación	FIG 23 I
SEQ ID NO: 22	ssaD	ácido nucleico	FIG 22 J
SEQ ID NO: 23	ssaD	producto de traslación	FIG 23 J
SEQ ID NO: 24	ssaE	ácido nucleico	FIG 22 K
SEQ ID NO: 25	ssaE	producto de traslación	FIG 23 K
SEQ ID NO: 26	ssaG	ácido nucleico	FIG 22 L

ES 2 313 792 T3

	SEQ ID NO: 27	ssaG	producto de traslación	FIG 23 L
	SEQ ID NO: 28	ssaH	ácido nucleico	FIG 22 M
5	SEQ ID NO: 29	ssaH	producto de traslación	FIG 23 M
	SEQ ID NO: 30	ssal	ácido nucleico	FIG 22 N
	SEQ ID NO: 31	ssal	producto de traslación	FIG 23 N
10	SEQ ID NO: 32	ssaJ	ácido nucleico	FIG 22 O
	SEQ ID NO: 33	ssaJ	producto de traslación	FIG 23 O
	SEQ ID NO: 34	ssrA	ácido nucleico	FIG 22 P
15	SEQ ID NO: 35	ssrA	producto de traslación	FIG 23 P
	SEQ ID NO: 36	ssrB	ácido nucleico	FIG 22 Q
	SEQ ID NO: 37	ssrB	producto de traslación	FIG 23 Q
20	SEQ ID NO: 38	Promotor A2	ácido nucleico	FIG 24 A
	SEQ ID NO: 39	Promotor B	ácido nucleico	FIG 24 B
	SEQ ID NO: 40	Esp A	proteína	FIG 2 A
25	SEQ ID NO: 41	Esp D	proteína	FIG 2B
	SEQ ID NO: 42	Yop B	proteína	FIG 2B
	SEQ ID NO: 43	Pep B	proteína	FIG 2B
30	SEQ ID NO: 44	D89	ácido nucleico	página 33
	SEQ ID NO: 45	D90	ácido nucleico	página 33
	SEQ ID NO: 46	D91	ácido nucleico	página 33
35	SEQ ID NO: 47	D92	ácido nucleico	página 33
	SEQ ID NO: 48	E25	ácido nucleico	página 41
	SEQ ID NO: 49	E28	ácido nucleico	página 41
40	SEQ ID NO: 50	E6	ácido nucleico	página 42
	SEQ ID NO: 51	E4	ácido nucleico	página 43
	SEQ ID NO: 52	sseC-dell	ácido nucleico	página 44
45	SEQ ID NO: 53	sseE-dell	ácido nucleico	página 44
	SEQ ID NO: 54	sseC-For	ácido nucleico	página 45
	SEQ ID NO: 55	sseC-Rev	ácido nucleico	página 45
50	SEQ ID NO: 56	sseD-del1	ácido nucleico	página 45
	SEQ ID NO: 57	sseD-del2	ácido nucleico	página 45
	SEQ ID NO: 58	sseD-For	ácido nucleico	página 46
55	SEQ ID NO: 59	sseD-Rev	ácido nucleico	página 46
	SEQ ID NO: 60	sscB-del1	ácido nucleico	página 47
	SEQ ID NO: 61	sscB-del2	ácido nucleico	página 47
60	SEQ ID NO: 62	sscB-For	ácido nucleico	página 47
	SEQ ID NO: 63	sscB-Rev	ácido nucleico	páginas 47/48
	SEQ ID NO: 64	ssrA-For	ácido nucleico	página 66
65	SEQ ID NO: 65	ssrA-Rev	ácido nucleico	página 66
	SEQ ID NO: 66	ssrB-For	ácido nucleico	página 67

	SEQ ID NO: 67	ssrB-Rev	ácido nucleico	página 67
	SEQ ID NO: 68	ssrA-del1	ácido nucleico	página 67
5	SEQ ID NO: 69	ssrB-del2	ácido nucleico	página 68

Bibliografía

- 10 • **Bajaj, V., Lucas, R. L., Hwang, C., Lee, C. A. (1996).** Co-ordinate regulation of *Salmonella typhimurium* invasion genes by environmental and regulatory factors is mediated by control of expression. *Mol. Microbiol.* 22: 703-714.
- 15 • **Bajaj, V., Hwang, C., Lee, C. A. (1995).** hilA is a novel ompR/toxR family member that activates the expression of *Salmonella typhimurium* invasion genes. *Mol. Microbiol.* 18: 715-727.
- **Baudry, B., Kaczorek, M. and Sansonetti, P. J. (1988)** Nucleotid sequence of the invasion plásmido antigen B and C genes (ipaB and ipaC) of *Shigella flexneri*. *Microb Pathog* 4: 345-357.
- 20 • **Bogdanove, A. J., Beer, S. V., Bonas, U., Boucher, C. A., Collmer, A., Coplin, D. L., Cornelis, G. R., Huang, H.-C., Hutcheson, S. W., Panopoulos, N. J., and van Gijsegem, F. (1996)** Unified nomenclature for broadly conserved hrp genes of phytopathogenic bacteria. *Mol Microbiol* 20: 681-683.
- 25 • **Buchmeier, N. A., Lipps, C. J., So, M. Y. H., Heffron, F. (1993)** Recombination-deficient mutants of *Salmonella typhimurium* are avirulent and sensitive to the oxidative burst of macrophages. *Mol. Microbiol.* 7: 933-936.
- **Chang, A. C. and Cohen, S. N. (1978).** Construcción and characterization of amplifiable multicopy ADN cloning vehicles derived from the P15A cryptic miniplasmid. *J Bacteriol* 134: 1141-1156.
- 30 • **Cirillo, D. M., Valdivia, R. H., Monack, D. M., Falkow, S. (1998)** Macrófago-dependent induction of the *Salmonella* patogenicity island 2 type III secretion system and its role in intracellular survival. *Mol. Microbiol.* 30: 175-88.
- 35 • **Cirillo, J. D., Stover, C. K., Bloom, B. R., Jacobs, W. R. Jr., Barletta, R. G. (1995).** Bacterial vaccine vectors and bacillus Calmette-Guerin. *Clin. Infect. Dis.* 20: 1001-1009.
- 40 • **DeGroote, M. A., Ochsner, U. A., Shiloh, M. U., Nathan, C., McCord, J. M., Dinauer, M. C., Libby, S. J., Vazquez-Torres, A., Xu, Y., and Fang, F. C. (1997)** Periplasmic superoxide dismutase protects *Salmonella* from products of phagocyte NADPH-oxidase and nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 13997-14001.
- **de Lorenzo, V. and Timmis, K. N. (1994).** Analysis and construction of stable phenotypes in Gram-negative bacteria with Tn5- and Tn10-derived minitransposons. *Methods Enzymol.* 235, 386-405.
- 45 • **Devereux, J., Haeblerli, P., and Smithies, O. (1984)** A comprehensive set of sequence analysis programs for the VAX. *Ácido nucleicos Res* 12: 387-395.
- **Deiwick, J., Nikolaus, T., Erdogan, S., Hensel, M. (1999).** Environmental regulation of *Salmonella* patogenicity island 2 gene expression. *Mol. Microbiol.* 31: 1759-1773.
- 50 • **Deiwick, J., Nikolaus, T., Shea, J. E., Gleeson, C., Holden, D. W., Hensel, M. (1998).** Mutations in SPI2 genes affecting transcription of SPI1 genes and resistance to anti-microbial agents. *J. Bacteriol.* 180: 4775-4780.
- 55 • **Donnenberg, M. S., and Kaper, J. B. (1991)** Construction of an eaedeletionmutant of enteropathogenic *Escherichia coli* using a positive-selection suicide vector. *Infect Immun* 59: 4310-4317.
- **Elliot, S. J., Wainwright, L. A., McDaniel, T. K., Jarvis, K. G., Deng, Y. K., Lai, L. C., McNamara, B. P., Donnenberg, M. S., and Kaper, J. B. (1998)** The complete sequence of the locus of enterocyte affacement (LEE) from enteropathogenic *Escherichia coli* E2348/69. *Mol Microbiol* 28: 1-4.
- 60 • **Fields, P. I., Swanson, R. V., Haidaris, C. G., and Heffron, F. (1986)** Mutants of *Salmonella typhimurium* that cannot survive within the macrophage are avirulent. *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 5189-5193.
- 65 • **Forsberg, A., Pavitt, G. D. and Higgins, C. F. (1994).** Use of transcripcional fusions to monitor gene expression: a cautionary tale. *J. Bacteriol.* 176: 2128-2132.
- **Galán, J. E., Ginocchio, C. and Costeas, P. (1992).** Molecular and functional characterization of the *Salmonella* invasion gene invA: homology of InvA to members of a new protein family. *J. Bacteriol.* 174: 4338-4349.

• **Gentschev, I., Glaser, I., Goebel, W., McKeever, D. J., Musoke, A., and Heussler, V. T. (1998)** Delivery of the p67 sporozoite antigen of *Theileria parva* by using recombinant *Salmonella dublin*: secretion of the product enhances specific antibody responses in cattle. *Infect Immun* 66: 2060-2064.

5 • **Gunn, J. S., Miller, S. I. (1996)**. PhoP-Pho Q activates transcription of pmrAB, encoding a two-component regulatory system involved in *Salmonella typhimurium* antimicrobial peptide resistance. *J. Bacteriol.* 178: 6857-6864.

10 • **Hakansson, S., Schesser, K., Persson, C., Galyov, E. E., Rosqvist, R., Homble, F., and Wolf Watz, H. (1996)** The YopB protein of *Yersinia pseudotuberculosis* is essential for the translocation of Yop effector proteins across the target cell plasma membrane and displays a contact-dependent membrane disrupting activity. *EMBO J* 15: 5812-5823.

15 • **Harlow, E., Lane, D. (1988)**. Antibodies: A laboratory manual. *Cold Spring Harbour Laboratory Press*, Cold Spring Harbour, New York.

• **Hauser, A. R., Fleiszig, S., Kang, P. J., Mostov, K., and Engel, J. N. (1998)** Defects in type III secretion correlate with internalization of *Pseudomonas aeruginosa* by epithelial cells. *Infect Immun* 66: 1413-1420.

20 • **Heithoff, D. M., Sinsheimer, R. L., Low, D. A., and Mahan, M. J. (1999)** An essential role for ADN adenine methylation in bacterial virulence. *Science* 284: 967-970.

25 • **Hensel, M., Nikolaus, T., Egelseer, C. (1999)**. Molecular and functional analysis indicates a mosaic structure of *Salmonella* Pathogenicity Island 2. *Mol. Microbiol.* 31: 489-98.

• **Hensel, M., Shea, J. E., Bäuml, A. J., Gleeson, C., and Holden, D. W. (1997a)** Analysis of the boundaries of *Salmonella* pathogenicity island 2 and the corresponding chromosomal region of *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* 179: 1105-1111.

30 • **Hensel, M., Shea, J. E., Raupach, B., Monack, D., Falkow, S., Gleeson, C., and Holden, D. W. (1997b)** Functional analysis of ssaJ and the ssaK/U operon, 13 genes encoding components of the type III secretion apparatus of *Salmonella* pathogenicity island 2. *Mol Microbiol* 24: 155-167.

35 • **Hensel, M., Shea, J. E., Gleeson, C., Jones, M. D., Dalton, E., Holden, D. W. (1995)**. Simultaneous identification of bacterial virulence genes by negative selection. *Science* 269: 400-403.

40 • **Herrero, M., de Lorenzo, V., and Timmis, K. N. (1990)** Transposon vectors containing non-antibiotic resistance selection markers for cloning and stable chromosomal insertion of foreign genes in gram-negative bacteria. *J Bacteriol* 172: 6557-6567.

• **Hess, J., Dietrich, G., Gentschev, I., Miko, D., Goebel, W., and Kaufmann, S. H. (1997a)** Protection against murine listeriosis by an attenuated recombinant *Salmonella typhimurium* vaccine strain that secretes the naturally somatic antigen superoxide dismutase. *Infect Immun* 65: 1286-1292.

45 • **Hess, J., Gentschev, I., Miko, D., Welzel, M., Ladel, C., Goebel, W., and Kaufmann, S. H. (1996)** Superior efficacy of secreted over somatic antigen display in recombinant *Salmonella* vaccine induced protection against listeriosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 1458-1463.

50 • **Hess, J., Miko, D., Gentschev, I., Dietrich, G., Goebel, W., Mollenkopf, H. J., Ladel, C., and Kaufmann, S. H. (1997b)** Modulation of antigen display by attenuated *Salmonella typhimurium* strains and its impact on protective immunity against listeriosis. *Behring Inst Mitt* 160-171.

55 • **Hofmann, K. and Stoffel, W. (1993)**. TMbase - a database of membrane spanning proteins segments. *Biol Chem Hoppe-Seyler* 347: 166.

• **Holtel, A., Timmis, K. N., Ramos, J. L. (1992)**. Upstream binding sequences of the XylR activator protein and integration host factor in the xy/S gene promoter region of the Pseudomonas TOL plasmid. *Nucleic. Acids. Res.* 20: 1755-1762.

60 • **Hueck, C. J. (1998)**. Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62: 379-433.

• **Hueck, C. J., Hantman, M. J., Bajaj, V., Johnston, C., Lee, C. A., Miller, S. I. (1995)**. *Salmonella typhimurium* secreted invasion determinants are homologous to Shigella Ipa proteins. *Mol. Microbiol.* 18: 479-490.

65 • **Kaniga, K., Tucker, S., Trollinger, D., Galán, J. E. (1995)**. Homologs of the Shigella IpaB and IpaC invasins are required for *Salmonella typhimurium* entry into cultured epithelial cells. *J. Bacteriol.* 177: 3965-3971.

- **Kuwajima, G., Kawagishi, I., Homma, M., Asaka, J., Kondo, E., and Macnab, R. M. (1989)** Export of an N-terminal fragment of *Escherichia coli* flagellin by a flagellum-specific pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 4953-4957.
- 5 • **Laemmli, U. K. (1970).** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- **Macnab, R. M. (1996)** Flagella and motility. In *Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology. F. C. Neidhardt, *et al.* (eds.). Washington, D.C.: *ASM Press*, pp. 123-145.
- 10 • **Maloy, S. R., Steward, V. L. and Taylor, R. K. (1996).** Genetic analysis of pathogenic bacteria, Cold Spring Harbor, New York: *Cold Spring Harbor Laboratory Press*.
- **Miller, J. H. (1992).** A short course in bacteria genetics. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, Cold Spring Harbor, New York.
- 15 • **Miller, S. I., Kukral, A. M., and Mekalanos, J. J. (1989)** A two component regulatory system (phoP and phoQ) controls *Salmonella typhimurium* virulence. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 5054-5058.
- 20 • **Miller, V. L., Mekalanos, J. J. (1988).** A novel suicide vector and its use in construction of inversion mutations: osmoregulation of outer membrane proteins and virulence determinants in *Vibrio cholerae* requires toxR. *J. Bacteriol.* 170, 2575-2583.
- **Minamino, T., and Macnab, R. M. (1999)** Components of the *Salmonella* flagellar export apparatus and classification of export substrates. *J Bacteriol* 181: 1388-1394.
- 25 • **Monack, D. M., Raupach, B., Hromockyj, A. E., and Falkow, S. (1996)** *Salmonella typhimurium* invasion induces apoptosis in infected macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 9833-9838.
- **O'Callaghan, D., Charbit, A. (1990).** High efficiency transformation of *Salmonella typhimurium* and *Salmonella typhi* by electroporation. *Mol. Gen. Genet.* 223:156-158.
- 30 • **Ochman, H., Soncini, F. C., Solomon, F., Groisman, E. A. (1996).** Identification of a pathogenicity island required for *Salmonella* survival in host cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 7800-7804.
- 35 • **Orr, N., Galen, J. E., and Levine, M. M. (1999)** Expression and immunogenicity of a mutant diphtheria toxin molecule, CRM197, and its fragments in *Salmonella typhi* vaccine strain CVD 908-htrA. *Infect Immun* 67: 4290-4294.
- 40 • **Pallen, M. J., Dougan, G., and Frankel, G. (1997)** Coiled-coil domains in proteins secreted by type III secretion systems. *Mol Microbiol* 25: 423-425.
- **Ralph, P., Prichard, J., and Cohn, M. (1975).** Reticulum cell sarcoma: and effector cell in antibody-dependent cell mediated immunity. *J. Immunol.* 114: 898-905.
- 45 • **Reed, L. J., Muench, H. (1938).** A simple method of estimating fifty per cent end points. *Am. J. Hyg.* 27:493-497.
- **Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. (1989).** Molecular cloning: a laboratory manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, Cold Spring Harbor, New York.
- 50 • **Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A. R. (1977)** ADN sequence with chain terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 74: 5463-5467.
- 55 • **Schmitt, C. K., Darnell, S. C., and O'Brien, A. D. (1996)** The attenuated phenotype of a *Salmonella typhimurium* flgM mutant is related to expression of FlhC flagellin. *J Bacteriol* 178: 2911-2915.
- **Shea, J. E., Hensel, M., Gleeson, C., Holden, D. W. (1996).** Identification of a virulence locus encoding a second type III secretion system in *Salmonella typhimurium*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 2593-2597.
- 60 • **Skorupski, K. and Taylor, R. K. (1996).** Positive selection vectors for allelic exchange. *Gene* 169: 47-52. **Valdivia, R. H., and Falkow, S. (1997)** Fluorescence-based isolation of bacterial genes expressed within host cells. *Science* 277: 2007-2011.
- 65 • **Valentine, P. J., Devore, B. P., and Heffron, F. (1998)** Identification of three highly attenuated *Salmonella typhimurium* mutants that are more immunogenic and protective in mice than a prototypical aroA mutant. *Infect Immun* 66:3378-3383.

• **Wattiau, P., Bernier, B., Deslée, P., Michiels, T., and Cornelis, G. R. (1994)** Individual chaperons required for Yop secretion by Yersinia. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 10493-10497.

• **Yanisch-Perron, C., Vieira, J. and Messing, J. (1985).** *Gene* 33, 103-119.

• **Young, G. M., Schmiel, D. H., and Miller, V. L. (1999)** A new pathway for the secretion of virulence factors by bacteria: the flagellar export apparatus functions as a protein-secretion system. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 6456-6461.

• **Zhu, N., Liggitt, D., Liu, Y., Debs, R. (1993).** Systemic gene expression after intravenous ADN delivery into adult mice. *Science* 261: 209-211.

Referencias citadas en la descripción

Este listado de referencias citadas por el solicitante tiene como único fin la conveniencia del lector. No forma parte del documento de la Patente Europea. Aunque se ha puesto gran cuidado en la compilación de las referencias, no pueden excluirse errores u omisiones y la OEP rechaza cualquier responsabilidad en este sentido.

Documentos de patentes citados en la descripción

• WO 9617951 A

• EP 9906514 W

• EP 98116827 A

Literatura no relacionada con patentes citada en la descripción

• **HENSEL et al. *Mol. Microbiol.*, 1997, vol. 24, 155-167.**

• **OCHMAN et al. *Proc. Natl. Acad Sci. USA*, 1996, vol. 93, 7800-7804.**

• **VALENTINE. *Infection Immun.*, 1998, vol. 66, 3378-3383.**

• **SAMBROOK et al. *Molecular Cloning, A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press*, 1989, 1.101-1.104.**

• **SOUTHERN. *J. Mol. Biol.*, 1975, vol. 98, 503-517.**

• **BAJAJ, V.; LUCAS, R. L.; HWANG, C.; LEE, C. A.** Co-ordinate regulation of *Salmonella typhimurium* invasion genes by environmental and regulatory factors is mediated by control of expression. *Mol. Microbiol.*, 1996, vol. 22, 703-714.

• **BAJAJ, V.; HWANG, C.; LEE, C. A.** hilA is a novel ompR/toxR family member that activates the expression of *Salmonella typhimurium* invasion genes. *Mol. Microbiol.*, 1995, vol. 18, 715-727.

• **BAUDRY, B.; KACZOREK, M.; SANSONETTI, P. J.** Nucleotide sequence of the invasion plasmid antigen B and C genes (ipaB and ipaC) of *Shigella flexneri*. *Microb Pathog*, 1988, vol. 4, 345-357.

• **BOGDANOVE, A. J.; BEER, S. V.; BONAS, U.; BOUCHER, C. A.; COLLMER, A.; COPLIN, D. L.; CORNELIS, G. R.; HUANG, H.-C.; HUTCHESON, S. W.; PANOPOULOS, N. J.** Unified nomenclature for broadly conserved hrp genes of phytopathogenic bacteria. *Mol Microbiol*, 1996, vol. 20, 681-683.

• **BUCHMEIER, N. A.; LIPPS, C. J.; SO, M. Y. H.; HEFFRON, F.** Recombination-deficient mutants of *Salmonella typhimurium* are avirulent and sensitive to the oxidative burst of macrophages. *Mol. Microbiol.*, 1993, vol. 7, 933-936 .

• **CHANG, A. C.; COHEN, S. N.** Construction and characterization of amplifiable multicopy DNA cloning vehicles derived from the P15A cryptic miniplasmid. *J Bacteriol*, 1978, vol. 134, 1141-1156.

• **CIRILLO, D. M.; VALDIVIA, R. H.; MONACK, D. M.; FALKOW, S.** Macrophage-dependent induction of the *Salmonella* pathogenicity island 2 type III secretion system and its role in intracellular survival. *Mol. Microbiol.*, 1998, vol. 30, 175-88.

• **CIRILLO, J. D.; STOVER, C. K.; BLOOM, B. R.; JACOBS, W. R. JR.; BARLETTA, R. G.** Bacterial vaccine vectors and bacillus Calmette-Guerin. *Clin. Infect. Dis.*, 1995, vol. 20, 1001-1009.

- **DEGROOTE, M. A.; OCHSNER, U. A.; SHILOH, M. U.; NATHAN, C.; MCCORD, J. M.; DINAUER, M. C.; LIBBY, S. J.; VAZQUEZ-TORRES, A.; XU, Y.; FANG, F. C.** Periplasmic superoxide dismutase protects *Salmonella* from products of phagocyte NADPH-oxidase and nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, vol. 94, 13997-14001.
- **DE LORENZO, V.; TIMMIS, K. N.** Analysis and construction of stable phenotypes in Gram-negative bacteria with Tn5-and Tn10-derived minitransposons. *Methods Enzymol.*, 1994, vol. 235, 386-405.
- **DEVEREUX, J.; HAEBERLI, P.; SMITHIES, O.** A comprehensive set of sequence analysis programs for the VAX. *Nucleic Acids Res*, 1984, vol. 12, 387-395.
- **DEIWICK, J.; NIKOLAUS, T.; ERDOGAN, S.; HENSEL, M.** Environmental regulation of *Salmonella* pathogenicity island 2 gene expression. *Mol. Microbiol.*, 1999, vol. 31, 1759-1773.
- **DEIWICK, J.; NIKOLAUS, T.; SHEA, J. E.; GLEESON, C.; HOLDEN, D. W.; HENSEL, M.** Mutations in SPI2 genes affecting transcription of SPI1 genes and resistance to anti-microbial agents. *J. Bacteriol.*, 1998, vol. 180, 4775-4780.
- **DONNENBERG, M. S.; KAPER, J. B.** Construction of an eae deletion mutant of enteropathogenic *Escherichia coli* using a positive-selection suicide vector. *Infect Immun*, 1991, vol. 59, 4310-4317.
- **ELLIOT, S. J.; WAINWRIGHT, L. A.; MCDANIEL, T. K.; JARVIS, K. G.; DENG, Y. K.; LAI, L. C.; MCNAMARA, B. P.; DONNENBERG, M. S.; KAPER, J. B.** The complete sequence of the locus of enterocyte affacement (LEE) from enteropathogenic *Escherichia coli* E2348/69. *Mol Microbiol*, 1998, vol. 28, 1-4.
- **FIELDS, P. I.; SWANSON, R. V.; HAIDARIS, C. G.; HEFFRON, F.** Mutants of *Salmonella typhimurium* that cannot survive within the macrophage are avirulent. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1986, vol. 83, 5189-5193.
- **FORSBERG, A.; PAVITT, G. D.; HIGGINS, C. F.** Use of transcriptional fusions to monitor gene expression: a cautionary tale. *J. Bacteriol.*, 1994, vol. 176, 2128-2132.
- **GALÁN, J. E.; GINOCCHIO, C.; COSTEAS, P.** Molecular and functional characterization of the *Salmonella* invasion gene invA: homology of InvA to members of a new protein family. *J. Bacteriol.*, 1992, vol. 174, 4338-4349.
- **GENTSCHKEV, I.; GLASER, I.; GOEBEL, W.; MCKEEVER, D. J.; MUSOKE, A.; HEUSSLER, V. T.** Delivery of the p67 sporozoite antigen of *Theileria parva* by using recombinant *Salmonella dublin*: secretion of the product enhances specific antibody responses in cattle. *Infect Immun*, 1998, vol. 66, 2060-2064.
- **GUNN, J. S.; MILLER, S. I.** PhoP-Pho Q activates transcription of pmrAB, encoding a two-component regulatory system involved in *Salmonella typhimurium* antimicrobial peptide resistance. *J. Bacteriol.*, 1996, vol. 178, 6857-6864.
- **HAKANSSON, S.; SCHESSER, K.; PERSSON, C.; GALYOV, E. E.; ROSQVIST, R.; HOMBLE, F.; WOLF WATZ, H.** The YopB protein of *Yersinia pseudotuberculosis* is essential for the translocation of Yop effector proteins across the target cell plasma membrane and displays a contact-dependent membrane disrupting activity. *EMBO J*, 1996, vol. 15, 5812-5823.
- **Antibodies: A laboratory manual. HARLOW, E.; LANE, D.** Antibodies: A laboratory manual. *Cold Spring Harbour Laboratory Press*, 1988.
- **HAUSER, A. R.; FLEISZIG, S.; KANG, P. J.; MOSTOV, K.; ENGEL, J. N.** Defects in type III secretion correlate with internalization of *Pseudomonas aeruginosa* by epithelial cells. *Infect Immun*, 1998, vol. 66, 1413-1420.
- **HEITHOFF, D. M.; SINSHEIMER, R. L.; LOW, D. A.; MAHAN, M. J.** An essential role for DNA adenine methylation in bacterial virulence. *Science*, 1999, vol. 284, 967-970.
- **HENSEL, M.; NIKOLAUS, T.; EGELSEER, C.** Molecular and functional analysis indicates a mosaic structure of *Salmonella* Pathogenicity Island 2. *Mol. Microbiol.*, 1999, vol. 31, 489-98.
- **HENSEL, M.; SHEA, J. E.; BÄUMLER, A. J.; GLEESON, C.; HOLDEN, D. W.** Analysis of the boundaries of *Salmonella* pathogenicity island 2 and the corresponding chromosomal region of *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol*, 1997, vol. 179, 1105-1111.
- **HENSEL, M.; SHEA, J. E.; RAUPACH, B.; MONACK, D.; FALKOW, S.; GLEESON, C.; HOLDEN, D. W.** Functional analysis of ssaJ and the ssaK/U operon, 13 genes encoding components of the type III secretion apparatus of *Salmonella* pathogenicity island 2. *Mol Microbiol*, 1997, vol. 24, 155-167.

• **HENSEL, M.; SHEA, J. E.; GLEESON, C.; JONES, M. D.; DALTON, E.; HOLDEN, D. W.** Simultaneous identification of bacterial virulence genes by negative selection. *Science*, 1995, vol. 269, 400-403.

5 • **HERRERO, M.; DE LORENZO, V.; TIMMIS, K. N.** Transposon vectors containing non-antibiotic resistance selection markers for cloning and stable chromosomal insertion of foreign genes in gram-negative bacteria. *J Bacteriol*, 1990, vol. 172, 6557-6567.

10 • **HESS, J.; DIETRICH, G.; GENTSCHEV, I.; MIKO, D.; GOEBEL, W.; KAUFMANN, S. H.** Protection against murine listeriosis by an attenuated recombinant *Salmonella typhimurium* vaccine strain that secretes the naturally somatic antigen superoxide dismutase. *Infect Immun*, 1997, vol. 65, 1286-1292.

15 • **HESS, J.; GENTSCHEV, I.; MIKO, D.; WELZEL, M.; LADEL, C.; GOEBEL, W.; KAUFMANN, S. H.** Superior efficacy of secreted over somatic antigen display in recombinant *Salmonella vaccine* induced protection against listeriosis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, vol. 93, 1458-1463.

• **HESS, J.; MIKO, D.; GENTSCHEV, I.; DIETRICH, G.; GOEBEL, W.; MOLLENKOPF, H. J.; LADEL, C.; KAUFMANN, S. H.** Modulation of antigen display by attenuated *Salmonella typhimurium* strains and its impact on protective immunity against listeriosis. *Behring Inst Mitt*, 1997, 160-171.

20 • **HOFMANN, K.; STOFFEL, W.** TMbase - a database of membrane spanning proteins segments. *Biol Chem Hoppe-Seyler*, 1993, vol. 347, 166.

25 • **HOLTEL, A.; TIMMIS, K. N.; RAMOS, J. L.** Upstream binding sequences of the XyIR activator protein and integration host factor in the xy/S gene promoter region of the Pseudomonas TOL plasmid. *Nucleic. Acids. Res.*, 1992, vol. 20, 1755-1762.

30 • **HUECK, C. J.** Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 1998, vol. 62, 379-43.

REIVINDICACIONES

1. Un portador para la presentación de un antígeno a un huésped cuyo portador es una célula gram-negativa atenuada que comprende el locus SPI2 del gen, en donde por lo menos uno de los genes efectores sseA de, sseC, el sseD, sseE, sseF y sseG es desactivado y/o en donde el gen chaperón sscB es desactivado y/o en donde por lo menos uno de los genes del aparato de secreción ssaE, ssaG y ssaH es desactivado y en donde dicha desactivación resulta en una atenuación/reducción de la virulencia comparada al tipo natural de dichas células, en donde la célula comprende por lo menos una molécula heteróloga de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica para dicho antígeno, en donde dicha célula es capaz de expresar la molécula de ácido nucleico o capaz de causar la expresión de la molécula de ácido nucleico en una célula seleccionada.
2. La célula gram-negativa atenuada según la reivindicación 1, en donde dicha célula es una célula enterobacteriana, en particular, una célula de *Salmonella*, una célula de *Shigella* o una célula de *Vibrio*.
3. La célula según la reivindicación 1 ó 2, en donde por lo menos un gen adicional localizado fuera del locus de SPI2 es desactivada, en donde la desactivación produce una atenuación/reducción adicional de virulencia comparada al tipo natural.
4. La célula según la reivindicación 3, en donde dicho gen adicional comprende un gen aro, particularmente el aroA.
5. El portador según cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 4, en donde dicha molécula de ácido nucleico comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica para un antígeno de una bacteria o antígeno viral o a un antígeno de tumor, preferentemente para un antígeno de *Helicobacter pylori*, *Chlamydia pneumoniae*, *Borrelia burgdorferi*, *Nanobacteria*, *Hepatitis virus*, virus de papiloma humano o virus *Herpes*.
6. El portador según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde dicha molécula de ácido nucleico es insertada en el locus de SPI2.
7. El portador según la reivindicación 6, en donde dicha molécula de ácido nucleico es insertada en un gen sse, particularmente en el gen sseC, sseD y sseE.
8. El portador según cualquiera de las Reivindicaciones precedentes, en donde dicha inserción es una inserción no polar.
9. El portador según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde dicha molécula de ácido nucleico comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica para por lo menos un polipéptido o un péptido que seleccionan y/o un dominio inmunoestimulador.
10. El portador según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde dicha molécula de ácido nucleico codifica para una proteína de fusión.
11. Un portador para la presentación de un antígeno a un huésped, en donde dicho portador es una célula gram-negativa atenuada que comprende al locus de SPI2, **caracterizado** por una falta de por lo menos un polipéptido SPI2, en donde dicha falta resulta en una atenuación/reducción de la virulencia comparado al tipo natural de dicha célula, además **caracterizado** por la presencia de por lo menos un péptido heterólogo o polipéptido con propiedades inmunogénicas.
12. Una composición farmacéutica, que comprende como agente activo una vacuna viviente protectora inmunológicamente, la cual es una portadora según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, opcionalmente junto con diluentes, portadores y/o adyuvantes aceptables farmacéuticamente.
13. La composición según la reivindicación 12 la cual es conveniente para la administración a una superficie mucosa o por medio de la ruta parenteral.
14. Un método para la preparación de una vacuna viviente, que comprende el suministro de una célula gram-negativa viviente que comprende el locus de SPI2 y que desactiva por lo menos un gen del locus de SPI2 para obtener una célula gram-negativa atenuada, que además comprende por lo menos una inserción de una molécula de ácido nucleico heterólogo que codifica para un antígeno para obtener un portador según cualquiera de una de las reivindicaciones 1 a 11, opcionalmente junto con diluentes, portadores y/o adyuvantes aceptables farmacéuticamente.
15. Un método para la detección de un portador según cualquiera de una de las reivindicaciones 1 a 11, que comprende proporcionar una muestra que contiene dicha célula y detectar la desactivación de un gen seleccionado de cualquiera de sseA, sseC, sseD, sseE, sseF, sseG, sscB, ssaE, ssaG y ssaH cuya desactivación no está presente en el tipo natural.

16. Un método para establecer una biblioteca de portadores atenuados para la presentación de un antígeno a un huésped, que comprende obtener por lo menos a dos portadores según cualquiera de una de las reivindicaciones 1 a 11, que determina (a) la patogenicidad de dichas células y la relación de la patogenicidad de dichas células, y (b) que determina el efecto de dicha presentación del antígeno en dicho portador y que determina la relación de los efectos causados por dichas células.

17. El método de la reivindicación 16, en donde el efecto de la presentación del antígeno está determinada en el nivel humoral, celular y/o mucoso.

18. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 16 ó 17 que además comprende determinar la inmunogenicidad de dichas células y determinar la relación de la inmunogenicidad de dichas células, en donde dicha determinación opcionalmente es una determinación de la inmunogenicidad humoral, celular y/o mucosa.

19. El uso de un portador según cualquiera de una de las reivindicaciones 1 a 11 para la preparación de un fármaco para el tratamiento preventivo o terapéutico de una enfermedad aguda o crónica causada esencialmente por una bacteria o virus o para la preparación de un fármaco para el tratamiento preventivo o terapéutico de un tumor.

20. El uso de una molécula de ácido nucleico o un vector, que comprende una secuencia de ácido nucleico

a) de la secuencia de ácido nucleico de una de las Figs. 21 A, B,

b) de un alelo de la secuencia de ácido nucleico de una de las Figs. 21 A, B, o

c) de una secuencia de ácido nucleico la cual bajo condiciones severas hibridizan con la secuencia de ácido nucleico de una de las Figs. 21 A, B, para la preparación de un portador para la presentación de un antígeno a un huésped como se definió en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11.

21. El uso según la reivindicación 20, en donde dicha secuencia de ácido nucleico comprende

a) la secuencia de ácido nucleico de una de las Figs. 22 A-Q,

b) una secuencia de ácido nucleico que corresponde a la secuencia de ácido nucleico de una de las Figs. 22 A-Q, dentro de la degeneración del código genético, o

c) de una secuencia de ácido nucleico que bajo condiciones severas hibridiza con la secuencia de ácido nucleico de una de las Figs. 22 A-Q.

22. El uso según la reivindicación 20 ó 21, en donde por lo menos una región codificadora de dicha molécula de ácido nucleico se suprime funcionalmente.

23. El uso según una cualquiera de las reivindicaciones 20 ó 22, en donde dicha molécula de ácido nucleico tiene insertado por lo menos un casete de inserción para la inserción mediada por transposón o fago.

24. El uso según una cualquiera de las reivindicaciones 20 a 23, en donde por lo menos una molécula de ácido nucleico heteróloga que codifica para un polipéptido o péptido es insertada o suprimida-insertada en dicha molécula de ácido nucleico, en donde dicha molécula de ácido nucleico heterólogo preferentemente codifica para un antígeno bacteriano o viral u homólogo de los mismos.

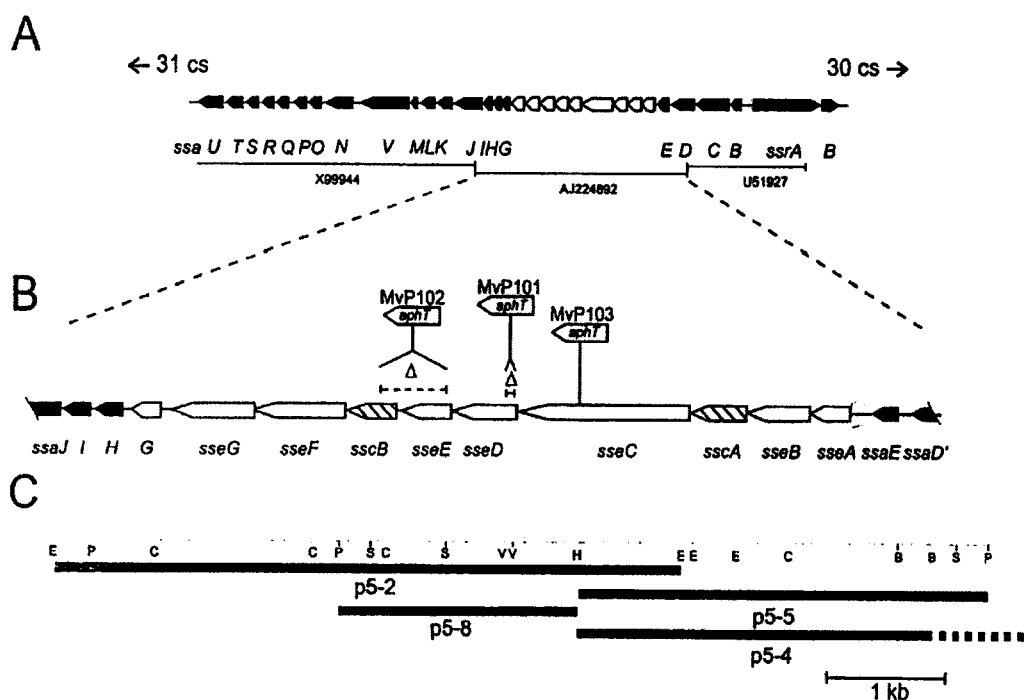
25. El uso según la reivindicación 24, en donde dicha molécula de ácido nucleico heterólogo comprende por lo menos un casete de expresión de un gen, opcionalmente con por lo menos un casete transactivador, un casete marcador selectivo, un casete de invertasa o combinación de los mismos.

26. El uso según una cualquiera de las reivindicaciones 23 a 25, en donde dicha molécula de ácido nucleico heterólogo comprende por lo menos una secuencia de ácido nucleico que codifica para un polipéptido o péptido seleccionado y/o un dominio immunoestimulante.

27. El uso del locus SPI2 de *Salmonella* para la preparación de un portador para la presentación de un antígeno a un huésped como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11.

28. El uso de un locus de gen de virulencia de una célula gram-negativa para la preparación de un portador para la presentación de un antígeno a un huésped como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11.

Fig. 1: posición de mutaciones en MvP101, MvP102 y MvP103



Alineamiento de SseB con EspA

SseB 1 MS SGN - ILWG S QNP IV FKN - - S FQ V S N A D T G S Q D D L S Q Q N P F A E G Y G V L 46
EspA 1 M D T S T T A S V A S A N A S T S T S M A Y D L Q S M S K D D - V I D D L F N K L G V F Q A A I L M F 49

SseB 47 L I L L M V I Q A I A N N K F I E V Q K N A E R A R N T Q E K S N E M D E V I A K A A K G - D A K T 95
EspA 50 A Y M Y Q A Q S D L S I A K F A D M N E A S K E S T T A Q K M A N L Y D A K I A D V Q S S S D K N A 99

SseB 96 K E E V T E D V I K Y M R D - - N O I L I I D G M T I D D Y M A K Y G D H G K L D K G G L Q A I K A A 143
EspA 100 K A Q L P D E V I S Y I N D P R N D I T I S G - - I D N I N A Q L G - - - - - A G D L Q T V K A A 141

SseB 144 L D N D A N R N T D L M S Q G Q I T I Q K M S Q E L N A V L T Q L T G L I S K W G E I S S M I A Q K 193
EspA 142 I S A K A N N L T T V N S Q L E I Q Q M S N T L N L L T S A R S D M Q S L Q Y R T I S G I S L G 191

SseB 194 T Y S 196
EspA 192 K 192

Fig. 2a

Fig. 2a

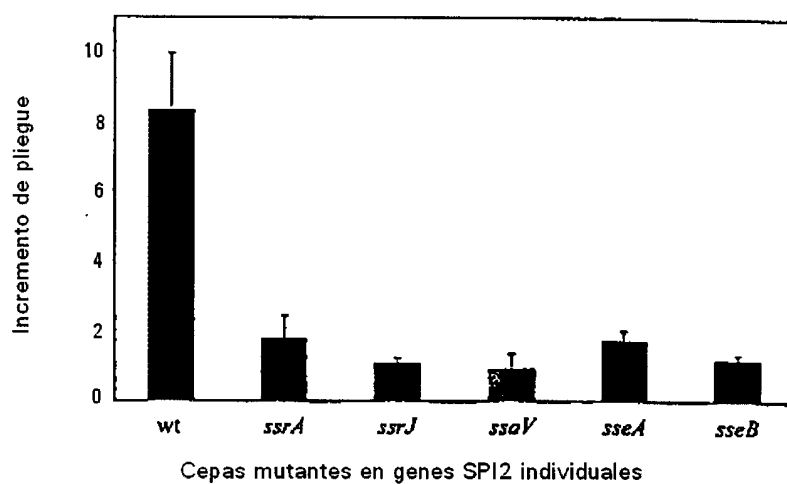


Fig.4B

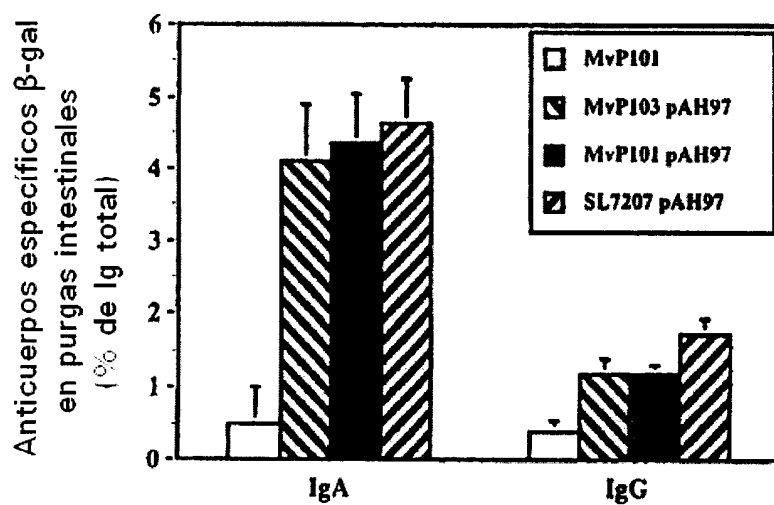
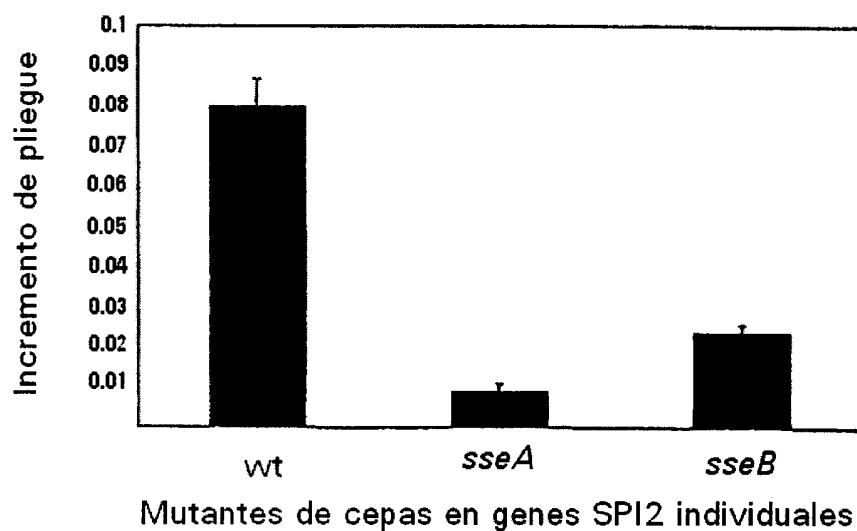


Fig.5

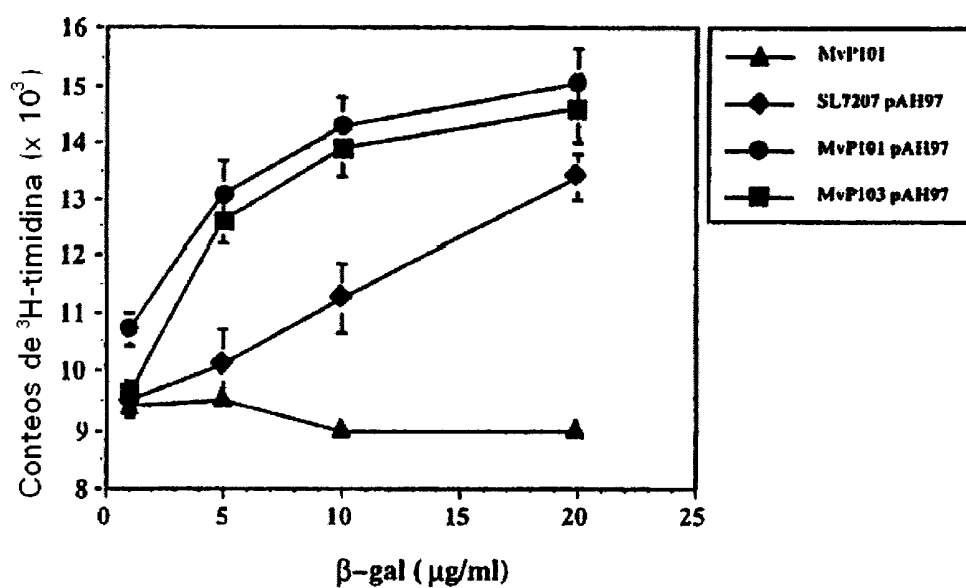


Fig. 6

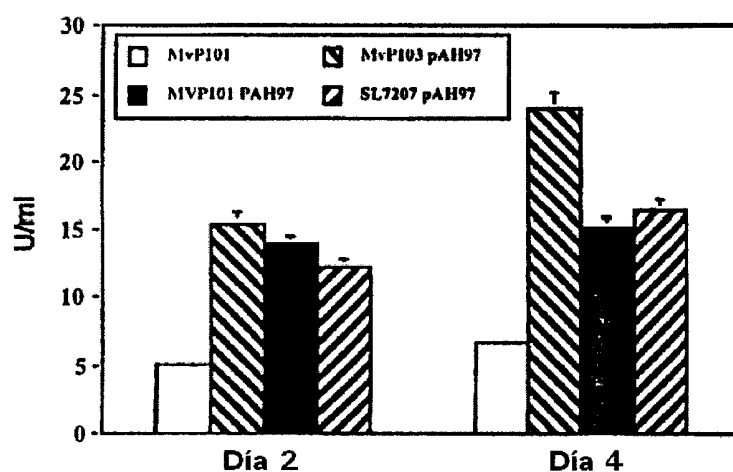


Fig. 7

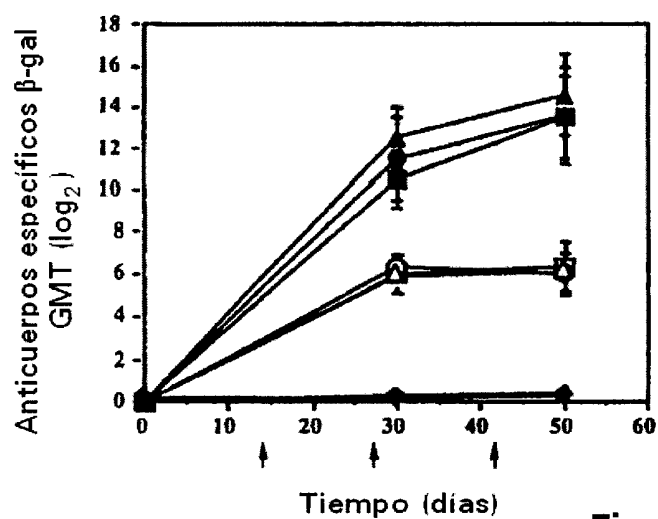


Fig. 8

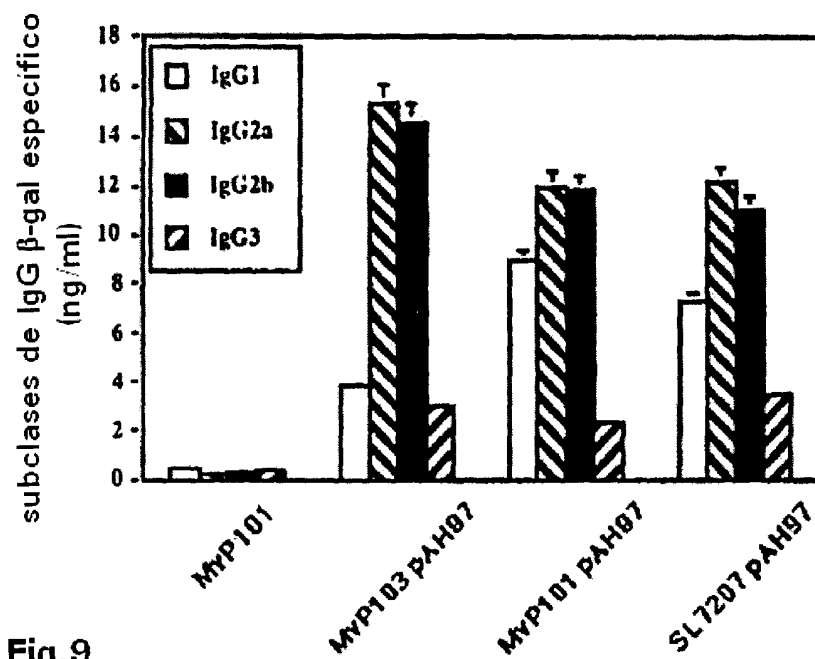


Fig.9

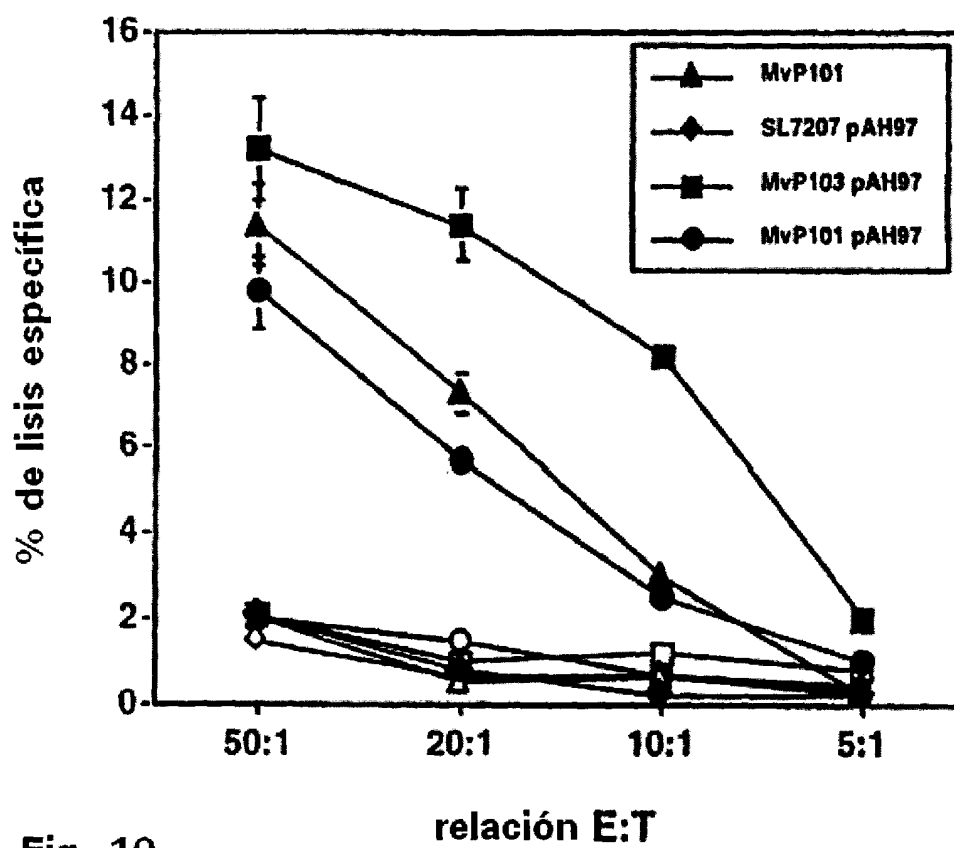
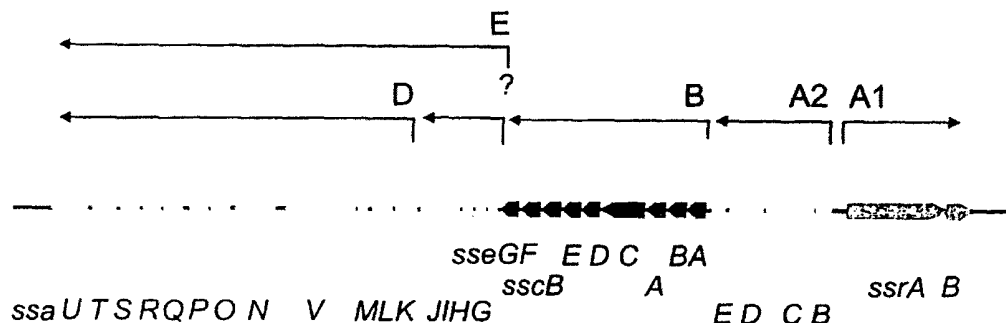


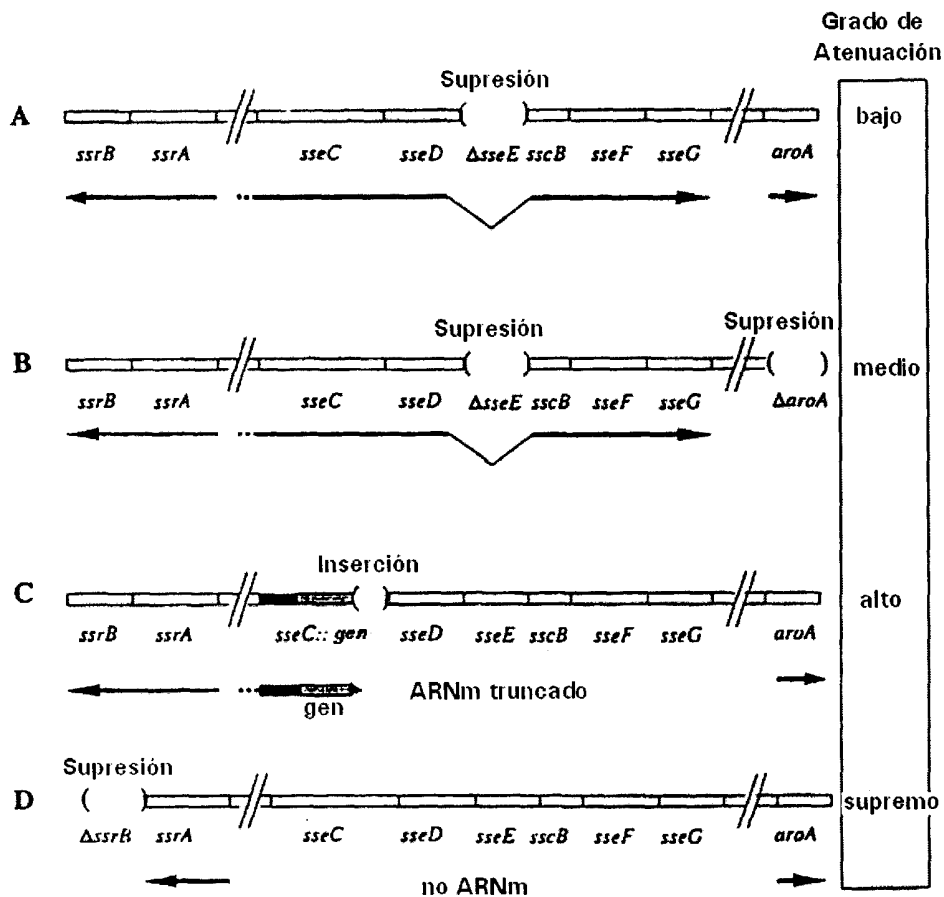
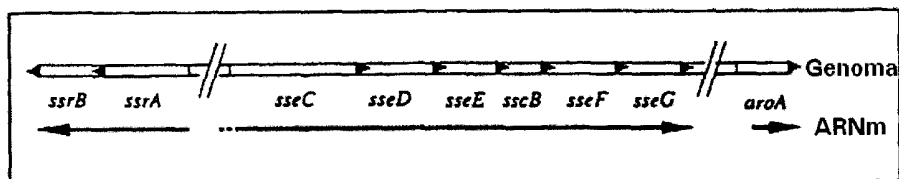
Fig. 10

Fig.13: Modelo para las unidades transcripcionales para genes de virulencia SPI2



Principio de Atenuación

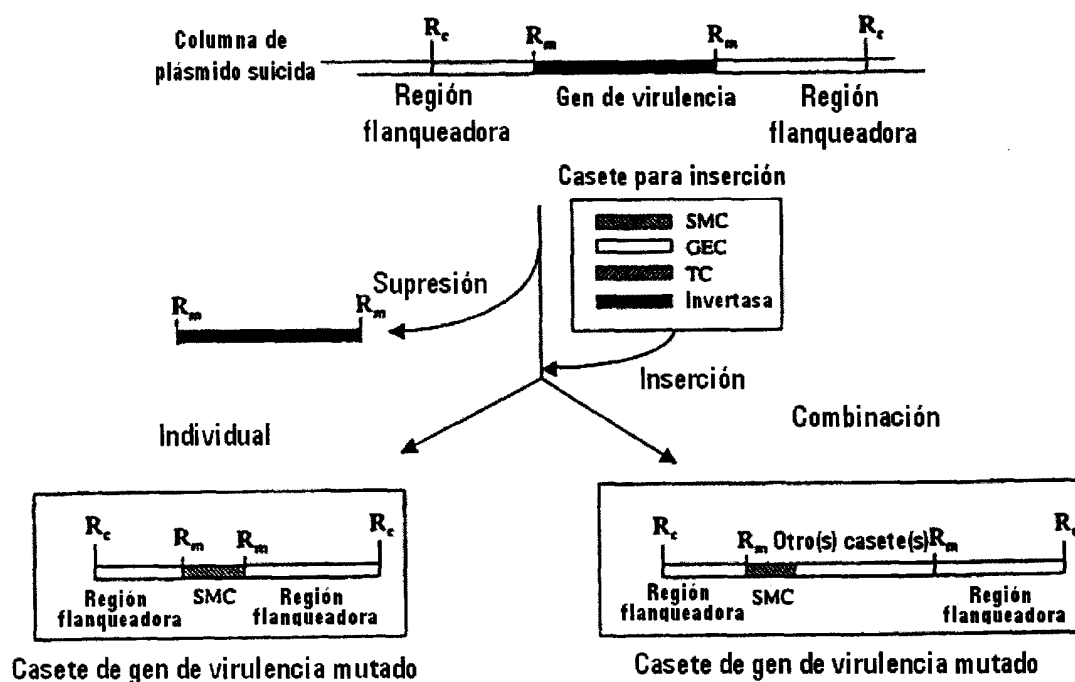
Instrucción esquemática para la generación de diferentes mutaciones con grado creciente de atenuación



Principio de mutación insercional

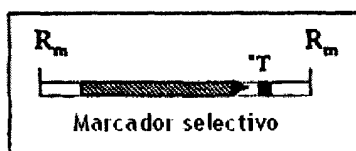
R_c = Sitios de restricción para clonar fragmentos de grupos de genes de virulencia

R_m = Sitios de restricción para mutación genética



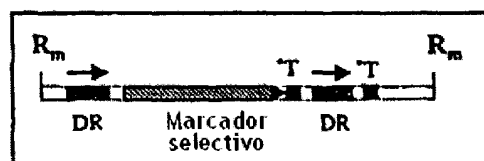
Casete marcador selectivo (CMS)

Casete marcador selectivo permanente



*T = Terminador transcripcional opcional si se requiere mutación insercional polar

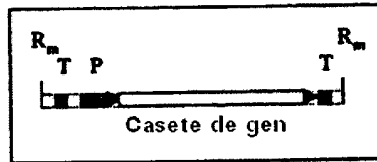
Casete marcador selectivo reversible



DR=Repetir directo

Casete de expresión de gen

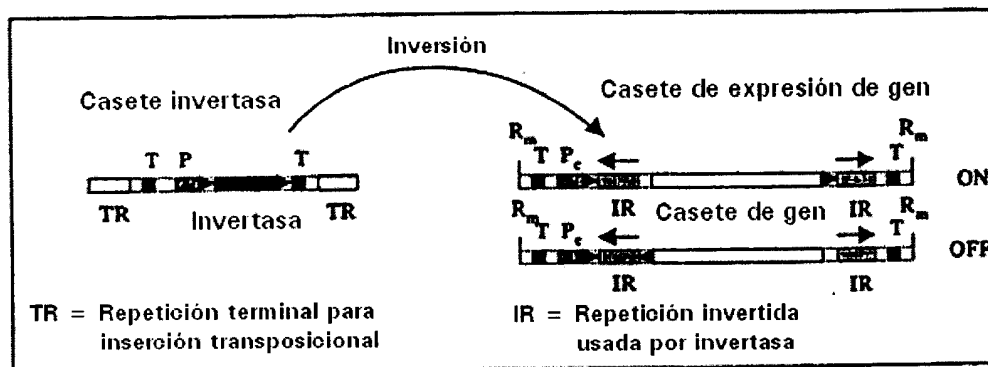
Sistema de una fase



P = Promotor consistente en
 - un promotor actuando constitutivamente en *Salmonella*, o
 - un promotor inducible in vivo de *Salmonella* u,
 - otro promotor.

T = Terminador transcripcional

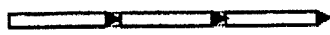
Sistema de dos fases



Casete de gen



Unidad de expresión de gen individual



Unidades de expresión de gen concatémico

Requerimientos estructurales de unidad de expresión de gen para la entrega de antígenos heterólogos en los diversos compartimentos de *Salmonella*

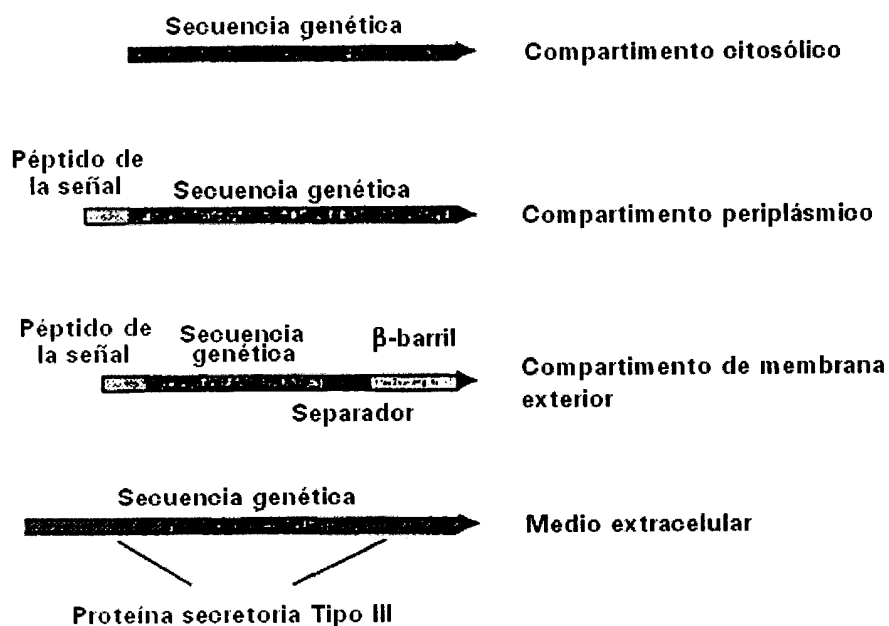


Fig. 20

P = Promotor consistente en:
 - un promotor que actúa constitutivamente en *Salmonella*, o
 - un promotor inducible in vivo de *Salmonella*, u
 - otro promotor

P = Promotor constitutivo

P_{ind} = Promotor inducible in vivo

P_{act} = Promotor activable

Modos de expresión de gen

Sistema de una fase

Sistema de dos fases

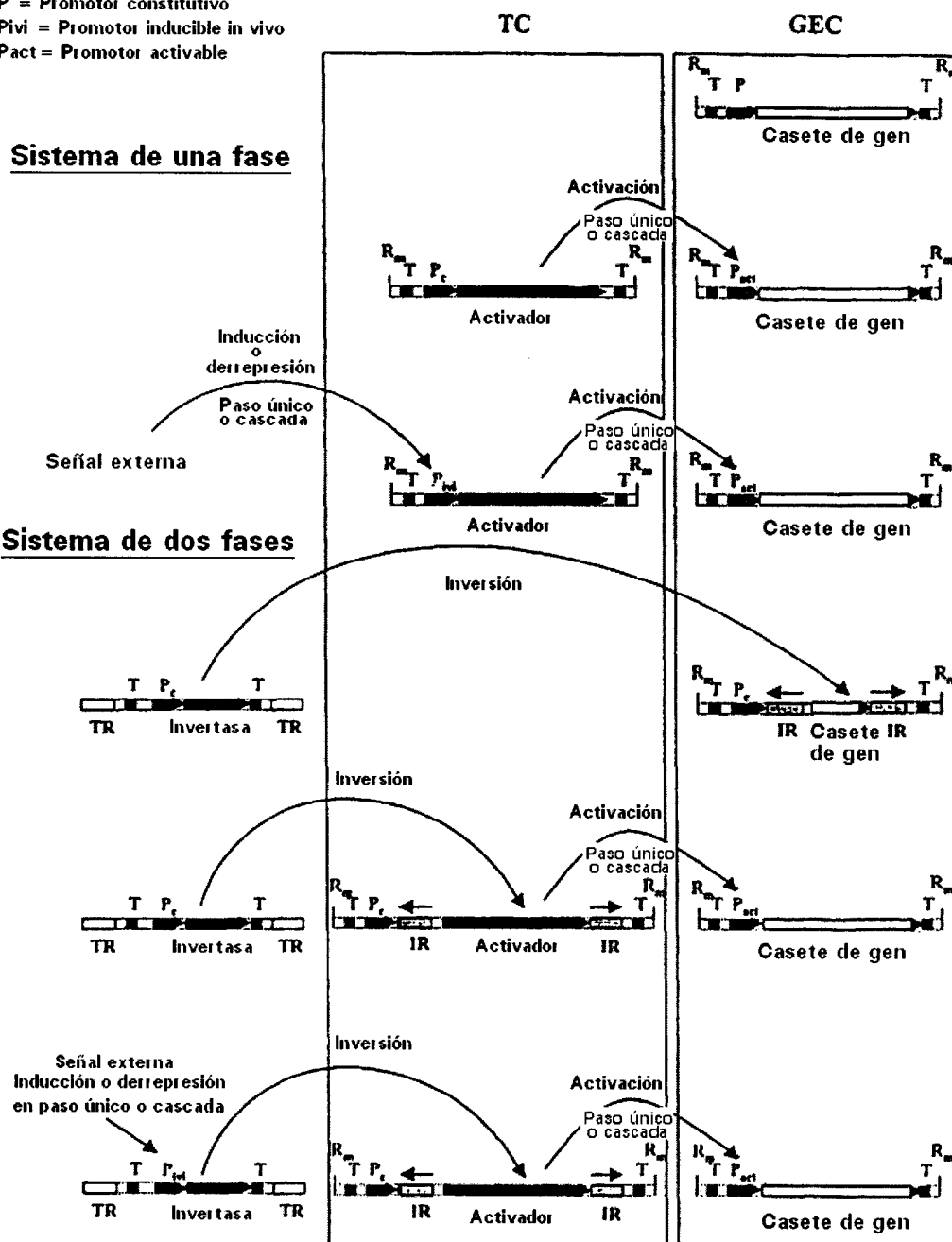


Figura 21

Fig. 21A

CTGCAGTTGTCCGGTTATTGCTCGTCAAGCGAACAGATGCAAAAGGTGAGAGCGACTCTCGAATCATGGGGGGTCATGTA
 TCGGGATGGTSTAATCTGTGATGACTTATTGGTACGAGAAGTGCAGGATGTTTTGATAAAAAATGGGTTACCCGCATGCTG
 AAGTATCCAGCGAAGGCCCGGGAGCGTGTTAATTCATGATGATATACAAATGGATCAGCAATGGCGCAAGGTTCAACCA
 TTACTTGCAGATATTTCCCGGTTATTGCACTGGCAGATTAGTCACTCTCATCAGTCTCAGGGGGATGATATTATTTCTGC
 GATAATAGAGAACGGTTTAGTGGGGCTTCTCAATGTTAGCCCAATGCGGCGCTCTTTTGTATCAGTGGTGTACTGGATG
 AATCTCATCAACGCATTTTGAAGAAACGTTAGCAGCATTAAAGAAAAAGGATCCCGCTCTTTCTTTAATTTATCAGGAT
 ATTGCGCTTCCCATGATGAAAGCAAGTATCTGCTGCGCCAGTGGCTGGCTTGTACAGAGTCCCATGGTAATTACTT
 ATTACTGACGAATAAGAGCGTTTACGTGTAGGGGCATTGTTACCCAATGGGGGAGAAATGTCCATCTGAGTGCCGATG
 TGGTAACGATTAAACATTATGATACTTTGATTAACTATCCATTAGATTTTAAAGTGGTGGAAAATGACAACTTTGACCCG
 GTTAGAAGATTTGCTGCTTCAATTCGCGTGAAGAGGCCAAAGGCATAATTTTACAATTAAGGGCTGCCGGGAAACAGTTAG
 AAGAGAACCAACGCAAGTTACAGGATCCGCAGCAATATCAGCAAAACACCTTATTGCTTGAAGCGATCCGAGCAGGCCGAA
 AATATCATCAACATTATTTATTATCGTTACCATAACAGCGCACTTGTAGTGAAGTGAAGCAAGAGTAAAGTAAAAATATCTT
 AGAGCCTATCCACCAGGCGTTAATTGGCGCAGCCAGTTTGGACACGGATAGCGCGCAAAACCCGAGCGTACACGTAGT
 ACGTGAGGTTTGTACTCGCTACGCTCGCCCTTGGGCGCGCGCTAGCGGCGTTCAAAACGCTAACGCGTTTGGCGAGCAC
 TGCCACGGTTCAAAATGGCAAGTAAATAGCCCTAATGGGATAGGCTCTTAGTTAGCACGTTAATTATCTATCTGTATAT
 GGAGGGGAATGATGATAAAGAAAAAGGCTGCGTTTAGTGAATATCTGTATTTAGAGCAAGTTACATGCAGCTAAATCAC
 TGTCTTAAAAAATTTACCAAATCCGGCTAAGGTGAGTCAACAGCTTGTCTGAAAGGGCAGAGAGCCCAAAATAGCAG
 AGAGACAGAGATTCTTCATAACCTATTTCCACAAGGCGCTTGGCGGGTTAACAGGAGGCCGAGAAGGATTTAAAGA
 AAATAGTAAGTTTGTAAACAACCTGAAGTACGACTGAAACAACCTAATGCTCAAGCCCCGGTGGAGATACCGTCAGGA
 AAAACAAAAAGGTAAAGCATAATGCTCTCAGGAAACATCTTATGGGGAAGTCAAAACCTATTGTGTTAAAAATAGCTT
 CGGCGTCAGCAACGCTGATACCGGAGCCAGGATGACTTATCCAGCAAAATCCGTTTGGCGAAGGGTATGGTGTTCG
 TTATCTCTTATGTTTATTCAGGCTATCGCAAATAATAAATTTATTGAAGTCCAGAAGAACGCTGAACGTGCCAGAAAT
 ACCCAGGAAAAGTCAAATGAGATGGATGAGGTGATTGCTAAAGCAGCCAAAGGGGATGCTAAACCAAAGAGGAGGTGCC
 TGAGGATGTAATTAATAACATGCGTGATAATGGTATTCTCATCGATGGTATGACCAATTGATGATTATATGGCTAAATATG
 GCGATCATGGGAAGCTGGATAAAGGTGGCTACAGGCGATCAAGCGGCTTTGGATAATGACGCCAACCGGAATACCGAT
 CTTATGAGTCAGGGGCAGATAACAATTCAAAAATGTCTCAGGAGCTTAACGCTGTCTTACCCAACTGACAGGGCTTAT
 CAGTAAGTGGGGGAAATTTCCAGTATGATAGCGCAGAAAACGTAATCATGAAAAAGACCCGACCTACAACAGGCACA
 TGACACGATGCGGTTTTTCCGGCGTGGCGGCTCGCTGCGTATGTTGTTGGATGACGATGTTACACAGCCGCTTAATATC
 TGTATCGCTATGCCACGCGAGCTTATGGAGGTAAAGAAATTCGCGCGCGCAGCGCGACTTTTTCAATTGCTGACGATATAT
 GATGCTGTGCTATTGACTACTGGTTTCGGTTAGGGGAATGCTGCCAGGCTCAAAACATTGGGGGGAAGCGATATAGCG
 TTATGGACGCGCGGCACAAATTAAGATTGATGCGCCGCGAGCGCCATGGGCGCGAGCGGAATGCTATCTCGCGTGTGATA
 ACGTCTGTTATGCAATCAAAGCGTTAAAGGCGGTGGTGGTATTTGCGGCGAGGTCAGTGAACATCAAATCTCCGACAG
 CGTGCAGAAAAGATGTTACAGCAACTTTCTGACAGGAGCTAAAAATGAATCGAATTCACAGTAATGCGACAGCGCCGCA
 GGAGTAACCGCTTAACACATCATCACTTAAGCAATGTCAGTTGCGTTTCTCGGGTTCTGCTGGGAAAGCGCCAGCATCG
 TGTGAATTTCTACTTTTGGCGATGGCAACGCCCGCTGCTGCTATCCGGGAAAATTAGTCTTCAGGAGGCAAGCAATGCGT
 TGAAGCAACTGCTTGATGCCGTACCCGGAATCATAAGCGTCCATCATTGCCCTGACTTTTTGACAGCAATCCCGCGGTT
 TTATCAATGATGATGACGTCATTAATACTCAACGCTTTTGGTAATAACGCTCAATCGTTATGCCAACAGCTTGAGCGGGC
 AACTGAGGTGCAAAATGCATTACGTAATAAGCAGGTAAAGGAGTATCAGGAGCAGATCCAGAAAGCGATAGAGCAGGAGG
 ATAAAGCGCGTAAAGCGGGTATTTTGGCGCTATTTTGTACTGGATTACCGGCATATTTGAAACCGTGATTGGCGCCTTA
 AAAGTTGTGAAGGTTTTCTGTCCGGAATCCCGCAGAAATGGCTAGCGCGTAGCTTATATGGCCGAGGTTGTGCAGG
 AATGGTTAAAGCCGAGCCGAAACGCGCAATGATGTGCGGTGCTGACCACGATACTGTACAGGCAATATTGACGTTGACAA
 GTAAGATTCAATTTGGTTGTGAAGCCGTGCGCTGGCACTGGATGTTTCCAGATTGGCCGTGCTTTTATGGCCAGGAGA
 GGTTTATCTGGCGCAGCTGCAAAAGTGCTTGACTCCGGTTTGGCGAGGAAAGTGGTTGAGCGTATGTTAGGTGCGAGGGA
 AGCAGAAATAGAGAGTTGGCTGAAAAGTTTGGCGAAGAAGTGAGCGAAGGTTTTTCCAAACAAATTTGAGCCGCTTGAAC
 GTGAAATGGCTATGGCGAATGAGATGGCAGAGGAGGCTGCGAGTTTTCTCGTAACGTAGAAAAATAATGACGCGAAGC
 GCGGGAAAAAGCTTTACGAAAGAGGGGGTGAAGCCATGGCAAAAGAAGCGGCAAAAGAAGCCCTGGAAAAATGTGTGCA
 AGAAGGTGGAAGTTCTCTGTTAAAAAATTCGTAATAAAGTTCTCTTCAATATGTTCAAAAAAATCCTGTATGCCTTAC
 TGAGGGATTGTTTCAATTAAGGCTTACAGGCTATCAGATGTGCAACCGAGGGCGCCAGTCAGATGAATACTGGCATGGTT
 AACACAGAAAAAGCGAAGATCGAAAAAGAAATAGAGCAATTAATACTCAGCAACGGTTTCTGGATTTCATAATGCAACA
 AACAGAAACCCAGAAAAAGATAGAACAAAAACGCTTAGAGGAGCTTTATAAGGGGACGGGTGCCGCGCTTAGAGATGTAT
 TAGATACCATTTGATCACTATAGTAGCTTACGGCGAGAATAGCTGGCTATCGCGCTTAATCTGAGGATAAAAAATATGGAA
 GCGAGTAACGTAGCACTGGTATTACCAGCGCCTTCTTGTAAACCTTCTTCCACTCCATCTCCCTCCGGGGAGGGAAT
 GGGTACTGAATCAATGCTTCTGTTATTTGATGATATCTGGATGAAGCTAATGGAGCTTGCCAAAAAGCTGCGCGATATCA
 TGCGCAGCTATAACGTAGAAAAACAACGCTGGCCTGGGAACTGCAAGTCAATGTTTACAGACGCAAAATGAAAACAATT
 GATGAAGCGTTTAGAGCATCAATGATTACTGCGGGTGGCGCAATGTTGTCGGGTGACTGACGATAGGATTAGGGGCGCT

AGGCGGGGAAACCGGTCTTATAGCGGGTCAAGCCGTAGGCCACACAGCTGGGGGCGTCATGGGCCTGGGGGCTGGTGTAG
 CGCAACGTCAAAGTGATCAAGATAAAGCGATTGCCGACCTGCAACAAAATGGGGCCCAATCTTATAATAAATCCCTGACG
 GAAATTATGGAGAAAGCAACTGAAATTATGCAGCAAATCATCGGCGTGGGGTCTCACTGGTCACGGTCTTGTCTGAAAT
 ACTCCGGGCATTAAACGAGGTAAACATGGTGAAGAAATAGAGCAATGGTTACGTCCGCATCAGGTGTTTACTGAGCCTGC
 ATATTTAGGGGAGACCGCCATATTACTTGGGCAGCAGTTTATATTATCGCCTTACCTGGTGATCTATCGTATTGAGGCAA
 AAGAAATGATTATTTGTGAGTTCAGGCGCCTGACGCCCGGGCAACCTCGACCACAGCAATTGTTTCACTTACTGGGACTT
 TTACGCGGGATATTTGTGCATCACCCGAGTTAACATGTTTAAAGATGTTGATAATCACCGACGTTCTGGATGAAAAAAA
 AGCCATGCTACGCAGGAAATTATTGCGCATCTGACAGTAATGGGAGCGACCTTTACACAGCTTGATGGCGATAACTGGA
 CAGTTTTATCCGCGAGCATCTTATCCAGCGACGTTTTTAAATGACCTTCCTGACGTAAATCATTATCACGTGAAAAATA
 CAATCAATAGGTATGATGATGAAAGAAGATCAGAAAAATAAAATACCCGAAGACATTCTGAAACAGCTATTATCCGTTGA
 TCCGGAACCGTTTATGCCAGTGGTTACGCCCTCATGGCAGGAGGGGGATTATTGCGCGCCGTAATCGATTTTATTGTTGGC
 TGGTGATGGCCAGCCATGGAGTTGGCGTGCCCATATTGCATTGGCTGGCACCTGGATGATGCTTAAAGAAATACAGGAG
 GCCATTAATTCTATGGACATGCCCTTGATGCTGGATGCCAGCCATCCAGAACCAGGTTTACCAAACGGCGCTGTGTCTCAA
 AATGATGGGGGAACCCGGTTGGCGAGAGGGCTTTTCAAACCGCAATCAAGATGAGTTATGCGGATGCCTCATGGAGTG
 AGATTGCCCAGAAATGCCCAAATAATGGTTGATACTCTTATTGCTTAAATAACAGAACGAAATATGAAATTCATATTCCG
 TCAGCGCAAGTAATATAGTCGATGGTAATAGTCTCTTCCGATATACAAGCAAGGAGGTATCGTTTCTCCCCCTGA
 AATTCCAGCGCTGGCACCCCGCAGCCCCCTGTCTGCTTACGCCCTGAACAAATAAGGCAGCAGAGGGATTATGCGATAC
 ATTTTATGCAATACACTATTCTGTGCGCTGGGTGGCAGCTGCTGTTTGGGTTATCGGTTGCTGCAGCGGTAATTTCTGGC
 GGGCAGGATTACCCATTGCTATTCTTGGCGGGCGCGCTCGTGATTGCTATTGGGGATGCTTGTGTGCGTATCATATA
 TTATCAATCGATATGTCAGCAAAAGGAGCCATTACAAACCGCAGTGAAGCTGATAGCGTTGCTCTGTGGTCAGTGCGCTGGCCT
 TAAATGTGGGCAAGTCTTAACTGCGCTAACACCCCTTGCTAATTGCTTTCTTTATTAATACGTTCAAGAAATCGCTATT
 TCTATGTTGGTTTTACCCCTACAGTTTCCACTGCCCGCGCTGAAAAATTTGCCGCTCTTTGGACATGGGGAGTGTAAT
 TACCTCCGTTAGCCTGACGGCGATAGGTGCGGTACTGGATTATTGCCTTGCCCGCCCTCTGGCGCAGATCAGGAAAAAT
 CTGTTGATGAACCTTCATGCCGATCCAGTGTGTTATTGGCGGAACAAATGGCAGCGCTCTGTCAATCTGCTACTACACCT
 GCACCTGCATTAATGGACAGTTCGTATCATACATCTCGGGGAGAACCATGAACCTGTTAGCCCAAATGCTCAGGTAGGA
 GGGCAACGTCCTGTTAACCGCGCTGAGGAATCACCTCCATGTCCTTCATTGCCACATCCGAAACCAATATGGAGAGTGG
 TAGAATAGGACCTCAACAAGGAAAAGAGCGGGTATTGGCCGGACTTGCGAAACGAGTGAAGAGTGTTCCTCAAAGGAA
 TTTTATGTTGGCAACCGTTATTTTGGGCGGACAGATTTTATGCTGTTCCGCTGGAATAGCATTAAACAGTGTAAAGTGT
 GGAGGCGCGCGCTCGTAGCCCTGGCAGGGATTGGCCTTGCTATTGCCATCGCGGATGTGCGCTGTCTTATCTACCATCA
 TAAACATCATTGCTTATGGCTCAGCAGAGTATAGGCAATGCCGTTTTTTATATTGCTAATTGTTTTCGCAATCAACGCA
 AAAGTATGGCGATTGCTAAAGCCGCTCCCTGGGCGGTAGATTAGCCTTAACCGCGACGGTAATGACTCATTCTACTGG
 AGTGGTAGTTTGGGACTACAGCCTCATTTATTAGAGCGTCTTAATGATATTACCTATGGACTAATGAGTTTTACTCGCTT
 CGGTATGGATGGGATGGCAATGACCGGTATGCAGGTGAGCAGCCCATATATCGTTTGTGGCTCAGGTAACGCCAGAAC
 AACGTGCGCGGAGTAAATCGTTTTTCAAGTATATACCGGATGTTTCAATTGCTTTCTAAATTTGCTATGTTGCCAGTATCCT
 TACGATGTATTTATTTAAGGAAAAGCATTATGGATATTGCACAATTAGTGGATATGCTCTCCACATGGCGCACCAGGC
 AGGCCAGGCCATTAAATGACAAAATGAATGGTAATGATTGCTCAACCCAGAATCGATGATTAAAGCGCAATTGCTTAC
 AGCAGTATTCTACATTTATTAATTACGAAAGTTCACTGATCAAAATGATCAAGGATATGCTTAGTGAATCATTGCTAAA
 ATCTGAAGTTATTAGCGCAGATGTTTCGACGGTTGCTGCTGGAATCATGTTTGGCGGCGTTAACCATAGCCTGATTTCCC
 AGGTACATGCCATGTTTACCAGCGCTAACGGTTATTGTTCCGGATAAAAAATTACAGTTGGTATGCTGCGCATTTATTGTTG
 GCGGGTTTAAATGAGCGCTAAAGCCGCGAAAATTTTATCGGATATAGATTGCGCAGAGGCTATGGCGCTGCGTCTGTT
 ATTTCTGCAACCAATGAGGGGTTGAAAATTGAATATTTCTGATATGAGCGTAGTGCTGTAAGCACTCAATCTTATGT
 AAAGTCTCTGCAAGCCGAGCCAGGAGCAAAATTAATTTTTTGAACAATTGCTGAAAGATGAAGCATCCACCAGTAACG
 CCAGTGCTTTATTACCGCAGGTTATGTTGACCAGACAAATGGATTATATGCAGTTAACGGTAGGCGTCGATTATCTTGCC
 AGAATATCAGGCGCAGCATCGCAAGCGCTTAATAAGCTGGATAACATGGCATGAAGGTTTCATCGTATAGTATTTCTTACT
 GTCCTTACGTTCTTTCTTACGGCATGTGATGTGGATCTTATCGCTCATTGCCAGAAGATGAAGCGAATCAAATGCTGGC
 ATTACTTATGCAGCATCATATTGATGCGGAAAAAAAACAGGAAGAGGATGGTGTAACTTACGTGTCGAGCAGTCGCAAT
 TTATTAATGCGGTTGAGCTACTTAGACTTAACGGTTATCCGCATAGGCAGTTTACAACGGCGGATAAGATGTTTCCGGCT
 AATCAGTTTAGTGGTATACCCCAAGGAAGACAGCAGAAGATTAAATTTTTTAAAGAACAAAGAATTGAAGGAATGCTGAG
 TCAGATGGAGGGCGTGATTAATGCAAAAGTGACCATGCGCTACCGACTTATGATGAGGGAAGTAACGCTTCTCCGAGCT
 CAGTTGCCGTATTTATAAAATATTACCTCAGGTCAATATGGAGGCTTTCCGGTAAAAATTAAAGATTTAATAGAGATG
 TCAATCCCTGGGTTGCAATACAGTAAGATTAGTATCTTGATGCAGCCTGCTGAATTC

Fig. 21B

AGCATTGACATAAAAACTTACAATTTGAAAAATTATTTATTAATAAACTGTTACGATGTTTTTACATCGCCATCTTATT
 AAAAAGTAATTGTAGTCATCGACTGGGTTATATATGAAGAAATTTATCTTCTAATGATAACACCATCGATTAACTTTCT
 GATGAAACTATATGTACTGCGATAGTGATCAAGTGCCAAAGATTTTGCAACAGGCAACTGGAGGGGAAGCATTATGAATTT
 GCTCAATCTCAAGAATACGCTGCAACATCTTTAGTAATCAGGCTAACTTTTTTATTTTTATTAAACAACAATAATTATTT
 GGCTGCTATCTGTGCTTACCGCAGCTTATATATCAATGGTTGAGAAACGGCAGCATATAATAGAGGATTTATCCGTTCTA
 TCCGAGATGAATATTGTACTAAGCAATCAACGGTTTGAAGAAGCTGAACGTGACGCTAAAAATTTAATGTATCAATGCTC
 ATTAGCGACTGAGATTCATACATAACGATATTTCCCTGAGGTGAGCCGGCATCTATCTGTGCGTCTTCAAATTGCACGC
 CGACGCTAAACGGAGAGAACGACCGTCTCTTTCTGCACTCCTCTGATATCGATGAAAAATAGCTTTCTGTCGCGATAGTTTT
 ATTTCTTAATCATAAAAAATGAGATTTCTGTTATTATCTACTGATAACCCCTTCAGATTATTCAACTCTACAGCCTTTAACGCG
 AAAAAGCTTTCTTTTATACCCAACCCATGCGGGGTTTTACTGGAGTGAACAGAAATACATAAACGGCAAAGGATGGCAGC
 CTTCCTTGGCGGTTGCGGATCAGCAAGGCGTATTTTTGAGGTGAGCGTTAAACTTCCCGATCTCATTACTAAGAGCCAC
 CTGCCATTAGATGATAGTATTGAGTATGGCTGGATCAAAACAACCACTTATTGCGGTTTTCTATACATCCCGCAAAAAAT
 ACGTACACAGTTAGAAAAATGAACGCTGCATGATGGATGGCAGCAAAATCCCGGATTTCTGATATTACGCACAACCTTGC
 ATGGCCCCGGATGGAGTCTGGTTACGCTGTACCCATACGGTAATCTACATAATCGCATCTTAAAAATTATCCTTCAACAA
 ATGCCCTTTTCAATTAACAGCATTGGTGTGATGACGTGCGCTTTTGTGCTGGTTACTACATCGCTCACTGGCCAAACCGTT
 ATGGCGTTTTGTGATGTCATTAAATAAAACCGCAACTGCACCGCTGAGCACACGTTTACCAGCACACGACTGGATGAAT
 TAGATAGTATTGCGGTGCTTTTAAACCACTGCTTGATACTCTACAAGTCCAATACGACAATCTGAAAAACAAAGTCGCA
 GAGCGCACCCAGGCGCTAAATGAAGCAAAAAACGCGCTGAGCGAGCTAACAAACGTAAAAGCATTCATCTTACGGTAAT
 AAGTCATGAGTTACGTACTCCGATGAATGGCGTACTCCGTGCAATTGAATTATTACAAACCACCCCTTTAAACATAGAGC
 AACAAAGGATTAGCTGATACCGCCAGAAATGTACACTGTCTTTGTTAGCTATTATTAATAATCTGCTGGATTTTTACCGC
 ATCGAGTCTGGTCATTTCACATTACATATGGAAGAAACAGCGTTACTGCCGTTACTGGACAGGCAATGCAAAACCATCCA
 GGGCCAGCGCAAGCAAAAACTGTCATTACGTACTTTTGTGCTGAGTCAACATGTCCCTCTCTATTTTATACCGCACGTA
 TCCGTTTACGGCAAAATTTGGTTAATTTACTCGGGAACGCGTAAATTTACGAAACCGGAGGGATACGCTGACGGTC
 AAGCGTCATGAGGAACAATTAATATTTCTGGTTAGCGATAGCGGTAAAGGGATTGAAATACAGCAGCAGTCTCAAATCTT
 TACTGCTTTTTATCAAGCAGACCAAATTCGAAGGTACAGGAATTGGACTGACTATTGCGTCAAGCCTGGCTAAAAATGA
 TGGGCGGTAACTGACACTAAAAAGTGTCCTCCGGGGTTGGAACCTGTGTCTCGCTAGTATTACCTTACAAGAATACCAG
 CCGCTCAACCAATTAAGGGGACGCTGTCAAGCGCGTTCTGCTGTCATCGGCAACTGGCTTGTGTTGGGGAATACGCGGTGA
 ACCACCCACAGCAAAATGCGCTTCTCAACG CAGAGCTTTTGTATTTCTCCGAAAACTCTACGACCTGGCGCAACAGT
 TAATATTGTGTACACCAAAATATGCCAGTAATAAATAATTTGTTACCACCTGGCAGTTGCAGATTCTTTTGGTTGATGAT
 GCCGATATTAAATCGGGATATCATCGGCAAAATGCTTGTGAGCTGGGCCAACACGTCATATTGCGCGCAGTAGTAACGA
 GGCTCTGACTTTATCAACAGCAGCGATTGATTTAGTACTGATTGACATTAGAATGCCAGAAATAGATGGTATTGAAT
 GTGTACGATTATGGCATGATGAGCCGAATAATTTAGATCCTGACTGCATGTTTGTGGCACTATCCGCTAGCGTAGCGACA
 GAAGATATTTCATCGTTGTAAAAAAATGGGATTTCATCATTACATTACAAAACAGTGACATTGGCTACCTTAGCTCGCTA
 CATCAGTATTGCCGAGAAATACCAACTTTTACGAATATAGAGCTACAGGAGCAGGATCCGAGTCCGTGCTCAGCGCTAC
 TGGCGACAGATGATATGGTCATTAAATAGCAAGATTTCCAATCACTGGACCTCTTGTGCTGGCTGATATTGAAAAATGCCGTA
 TCGGCTGGAGAAAAATCGATCAGTTAATTCACACATTAAGGGCTGTTTAGGTCAAATAGGGCAGACTGAATTGGTATG
 CTATGTCATAGACATTGAGAATCGCGTAAAAATGGGGAAAAATCATCGCGCTGGAGGAACTAACCGACTTACGCCAGAAAA
 TACGTATGATCTTCAAAAACCTACACCATTACTTAATATTATCTTAATTTTCGCGAGGGCAGCAAAATGAAAGAATATAAG
 ATCTTATTAGTAGACGATCATGAAATCATATTAAACGGCATTATGAATGCCCTTATTACCCTGGCCTCATTTTAAAAATGT
 AGAGCATGTTAAAAATGGTCTTGAGGTTTATAATGCCTGTTGTGCATACGAGCCTGACATACTTATCCTTGATCTTAGTC
 TACCTGGCATCAATGGCCTGGATATCATTCCCTCAATTACATCAGCGTTGGCCAGCAATGAATATTCTGGTTTACACAGCA
 TACCAACAAGAGTATATGACCATTAAAACTTTAGCCGAGGTGCTAATGGCTATGTTTTAAAAAAGCAGTAGTCAGCAAGT
 TCTGTTAGCGGCATTGCAACAGTAGCAGTAACAAAGCGTTACATTGACCCAACGTTGAATCGGGAAGCTATCTTGGCTG
 AATTAAACGCTGACACGACCAATCATCAACTGCTTACTTTGCGCGAGCGTCAGGTTCTTAAACTTATTGACGAGGGGTAT
 ACCAATCATGGGATCAGCGAAAAGCTACATATCAGTATAAAAAACGTCGAAACACACCGGATGAATATGATGAGAAAGCT
 ACAGGTTTCAATAAGTGACAGAGTTACTTAACTGTGCCGAAAGATGAGGTTAATAGAGTATTAACAGGGGCGTCCGATG
 GTATTAAGCATTGGTCATATTTGATGAGCCTTACGCCACGAGTATTGCTCATCATCGACAAAATCCATACGGATGCCC
 TGGTATGCCGACCATTTATCACTACCTTAGTCTTCAATTTGATCATGATATAGTAGAATCCCTTATTTAACGGGCTTTA
 CCATGTCGTATTCTATCGGCGAATTTGCCAGACTATGCGGTATCAATGCCGCCAGCTAAGGGCATGGCAGCGACGCTAT

G

Figura 22

Fig. 22A

sseA

ATGATGATAAAGAAAAAGGCTGCGTTTGTGAATATCGTGATTTAGAGCAAAGTTACATGCAGCTAAATCACTGTCTTAA
 AAAATTTACCAAATCCGGGCTAAGGTGAGTCAACAGCTTGTGAAAGGGCAGAGAGCCCCAAAAATAGCAGAGAGACAG
 AGAGTATTCTTCATAACCTATTTCCACAAGGCGTTGCCGGGGTTAACCAGGAGGCCGAGAAGGATTTAAAGAAAAATAGTA
 AGTTTGTTTAAACAACCTTGAAGTACGACTGAAACAACCTTAATGCTCAAGCCCCGCTGGAGATACCGTCAGGAAAAACAAA
 AAGGTAA

Fig. 22B

sseB

ATGCTTTCAGGAAACATCTTATGGGGAAGTCAAAACCCTATTGTGTTTAAAAATAGCTTCGGCGTCAGCAACGCTGATAC
 CGGGAGCCAGGATGACTTATCCAGCAAATCCGTTTGCCGAAGGGTATGGTGTTTTGCTTATTCTCCTTATGGTTATTC
 AGGCTATCGCAAATAATAAATTTATTGAAGTCCAGAAGAAGCGTGAACGTGCCAGAAATACCCAGGAAAAGTCAAATGAG
 ATGGATGAGGTGATTGCTAAAGCAGCCAAAGGGGATGCTAAAACCAAAGAGGAGGTGCCCTGAGGATGTAATTAATAACAT
 GCGTGATAATGGTATTCTCATCGATGGTATGACCATTTGATGATTATATGGCTAAATATGGCGATCATGGGAAGCTGGATA
 AAGGTGGCCTACAGGCGATCAAAGCGGCTTTGGATAATGACGCCAACCCGAATACCGATCTTATGAGTCAGGGGCAGATA
 ACAATTCAAAAAATGTCTCAGGAGCTTAACGCTGTCCTTACCCAAGTACAGGGCTTATCAGTAAGTGGGGGAAATTTTC
 CAGTATGATAGCGCAGAAAACGTACTCATGA

Fig. 22C

sseC

ATGAATCGAATTCACAGTAATAGCGACAGCGCCGAGGAGTAACCGCCTTAACACATCATCACTTAAGCAATGTCAGTTG
 CGTTTCCTCGGGTTCGCTGGGAAAGCGCCAGCATCGTGTGAATTTACTTTTGGCGATGGCAACGCCGCGTGTCTGCTAT
 CCGGAAAAATTAGTCTTCAGGAGCAAGCAATGCGTTGAAGCAACTGCTTGATGCCGTACCCGGAATCATAGCGTCCA
 TCATTGCGCTGACTTTTTCAGACCAATCCCGCGGTTTTATCAATGATGATGACGTCATTAATACTCAACGCTCTTTGGTAA
 TAACGCTCAATCGTTATGCCAACAGCTTGAGCGGGCAACTGAGGTGCAAAATGCATTACGTAATAAGCAGGTAAAGGAGT
 ATCAGGAGCAGATCCAGAAAGCGATAGAGCAGGAGGATAAAGCGCGTAAAGCGGGTATTTTGGCGCTATTTTGAAGTGG
 ATTACCGGCATATTTGAAACCGTGATTGGCGCCTTAAAGTTGTGGAAGGTTTCTGTCCGGAATCCCGCAGAAATGGC
 TAGCGGCGTAGCTTATATGGCCGAGGTTGTGAGGAATGGTTAAAGCCGGAGCCGAAACGGCAATGATGTGCGGTGCTG
 ACCACGATACCTGTGAGGCAATTATTGACGTGACAAGTAAGATTCAATTTGGTTGTGAAGCCGTCGCGCTGGCACTGGAT
 GTTTTCAGATTGGCCGTGCTTTTATGGCGACGAGAGGTTTATCTGGCGCAGCTGCAAAAGTGTCTGACTCCGCTTTTGG
 CGAGGAAGTGGTTGAGCGTATGGTAGGTGCGGGGAAGCAGAAATAGAGGAGTTGGCTGAAAAGTTTGGCGAAGAAAGTGA
 GCGAAAGTTTTTCCAAACAATTTGAGCCGCTTGAACGTGAAATGGCTATGGCGAATGAGATGGCAGAGGAGGCTGCCGAG
 TTTTCTCGTAACGTAGAAAATAATATGACGCGAAGCGCGGGAAGAAAGCTTTACGAAAGAGGGGGTGAAGCCATGGCAAA
 AGAAGCGGCAGAAAGAGCCCTGGAAAAATGTGTGCAAGAAGGTGGAAAGTTCTGTAAAAAAATTCGTAATAAAGTTC
 TCTTCAATATGTTCAAAAAATCCTGTATGCTTACTGAGGGATTGTTTCAATTAAGGCTTACAGGCTATCAGATGTGCA
 ACCGAGGGGCCAGTCAGATGAATACTGGCATGGTTAACACAGAAAAAGCGAAGATCGAAAAGAAAATAGAGCAATTAAT
 AACTCAGCAACGGTTTCTGGATTTCATAATGCAACAAACAGAAAAACAGAAAAAGATAGAAACAAAACGCTTAGAGGAGC
 TTTATAAGGGGACGGGTGCCGCGCTTAGAGATGTATTAGATACCATTGATCACTATAGTAGCGTTACAGGCGAGAATAGCT
 GGCTATCGCGCTTAA

Fig. 22D

sseD

ATGGGTACTGAATCAATGCTTCTGTTATTTGATGATATCTGGATGAAGCTAATGGAGCTTGCCAAAAAGCTGCGCGATAT
 CATGCGCAGCTATAACGTAGAAAAACAACGCTGGCCTGGGAACGCAAGTCAATGTTTTACAGACCGCAATGAAAACAA
 TTGATGAAGCGTTTAGAGCATCAATGATTACTGCGGGTGGCGCAATGTTGTGCGGTGTACTGACGATAGGATTAGGGGCC
 GTAGGCGGGGAAACCGGCTTTATAGCGGGTCAAGCCGTAGGCCACACAGCTGGGGGCGTCATGGGCTTGGGGCTGGTGT
 AGCGCAACGTCAAAAGTGATCAAGATAAAGCGATTGCCGACCTGCAACAAAATGGGGCCCAATCTTATAATAAATCCCTGA
 CGGAAATTATGGAGAAAGCAACTGAAATTATGCAGCAAATCATCGGCGTGGGGTCTCACTGGTCACGGTTCTTGCTGAA
 ATACTCCGGCATTAAACGAGGTAA

Fig. 22E

sseE

ATGGTGCAAGAAATAGAGCAATGGTTACGTCGGCATCAGGTGTTTACTGAGCCTGCATATTTAGGGGAGACCGCCATATT
 ACTTGGGCAGCAGTTTATATTATCGCCTTACCTGGTGATCTATCGTATTGAGGCAAAAGAAATGATTATTTGTGAGTTCA
 GCGCCTGACGCCCCGGGCAACCTCGACCACAGCAATTGTTTCACTTACTGGGACTTTTACGCGGGATATTTGTGCATCAC
 CCGCAGTTAACATGTTTAAAGATGTTGATAATCACCGACGTTCTGGATGAAAAAAGCCATGCTACGCGAGGAAATTATT
 GCGCATCCTGACAGTAATGGGAGCGACCTTTACACAGCTTGATGGCGATAACTGGACAGTTTATCCGCCGAGCATCTTA
 TCCAGCGACGTTTTTAA

Fig. 22F

sseF

ATGAAAAATTCATATTCCTCAGCGGCAAGTAATATAGTCGATGGTAATAGTCCTCCTTCCGATATACAAGCGAAGGAGGT
 ATCGTTTCTCCCTCGAAATTCAGCGCCTGGCACCCCGCAGCCCCCTGTGCTGCTTACGCCTGAACAAATAAGGCAGC
 AGAGGGATTATGCGATACATTTTATGCAATACACTATTCTGTCGCTGGGTGCGACAGTCGTGTTGGGTATCGGTTGCT
 GCAGCGGTAATTTCTGGCGGGGCGAGGATTACCCATTGCTATTCTTGGCGGGGCGGCGCTCGTGATTGCTATTGGGGATGC
 TTGCTGTGCGTATCATAATTATCAATCGATATGTGAGCAAAAGGAGCCATTACAAACCGCCAGTGATAGCGTTGCTCTTG
 TGGTCAGTGCCTGGCCTTAAATGTGGGGCAAGTCTTAACTGCGCTAACACCCTTGCTAATTGCTTTCTTTATTAATA
 CGTTCAGGAATCGCTATTTCTATGTTGGTTTACCCTACAGTTTCCACTGCCCGCGGCTGAAAATATTGCGGCCTCTTT
 GGACATGGGGAGTGTAATTACCTCCGTTAGCCTGACGGCGATAGGTGCGGTACTGGATTATTGCCTTGCCCCCCTCTG
 GCGACGATCAGGAAAATCTGTTGATGAACCTTCATGCCGATCCAGTGTGTTATTGGCGGAACAAATGGCAGCGCTCTGT
 CAATCTGCTACTACACCTGCACCTGCATTAATGGACAGTTCGTATCATACATCTCGGGGAGAACCATGA

Fig. 22G

sseG

ATGAAACCTGTTAGCCCAAATGCTCAGGTAGGAGGGCAACGTCCTGTTAACGCGCCTGAGGAATCACCTCCATGTCCTTC
 ATTGCCACATCCGGAACCAATATGGAGAGTGGTAGAATAGGACCTCAACAAGGAAAAGAGCGGTTATTGGCCGGACTTG
 CGAAACGAGTGATAGAGTGTTTCCAAAAGAAATTTTAGTTGGCAAACGGTTATTTGGGCGGACAGATTTTATGCTGT
 TCCGCTGGAATAGCATTACAGTGCTAAGTGGTGGAGGCGCGCGCTCGTAGCCCTGGCAGGGATTGGCCTTGCTATTGC
 CATCGCGGATGTCGCTGTCTTATCTACCATCATAAACATCATTTGCCTATGGCTCAGCAGATATAGGCAATGCCGTTT
 TTTATATTGCTAATTGTTTCCGCAATCAACGCAAAAGTATGGCGATTGCTAAAGCCGTCTCCCTGGGCGGTAGATTAGCC
 TTAACCGCGACGGTAATGACTCATTCTACTGGAGTGGTAGTTTGGGACTACAGCCTCATTATTAGAGCGTCTTAATGA
 TATTACCTATGGACTAATGAGTTTACTCGCTTCGGTATGGATGGGATGGCAATGACCGGTATGCAGGTGAGCAGCCCAT
 TATATCGTTTGTGCTCAGGTAACGCCAGAACACGTGCGCCGGAGTAA

Fig. 22H

sscA

ATGAAAAAGACCCGACCCTACAACAGGCACATGACACGATGCGGTTTTTCCGGCGTGGCGGCTCGCTGCGTATGTTGTT
 GGATGACGATGTTACACAGCCGCTTAATACTCTGTATCGCTATGCCAGCAGCTTATGGAGGTAAAAGAATTGCGCGGCG
 CAGCGCGACTTTTTCAATTGCTGACGATATATGATGCTCGTGGTCATTTGACTACTGGTTTCCGGTTAGGGGAATGCTGCCAG
 GCTCAAAAACATTGGGGGAAGCGATATACGCTTATGGACGCGCGGCACAAATTAAGATTGATGCGCGCAGGCGCCATG
 GGCCGCGAGCGGAATGCTATCTCGCGTGTGATAACGTCTGTTATGCAATCAAAGCGTTAAAGGCCGTGGTGCCTATTGCG
 GCGAGGTGAGTGAACATCAAATCTCCGACAGCGTGCAAAAAGATGTTACAGCAACTTCTGACAGGAGCTAA

Fig. 22I

sscB

ATGATGATGAAAGAAGATCAGAAAAATAAAATACCCGAAGACATTCTGAAACAGCTATTATCCGTTGATCCGGAACCGT
 TTATGCCAGTGGTTACGCCTCATGGCAGGAGGGGATTATTCGCGCGCGGTAATCGATTTTAGTTGGCTGGTGATGGCCC
 AGCCATGGAGTTGGCGTGCCCATATTGCATTGGCTGGCACCTGGATGATGCTTAAAGAATACACGACGGCCATTAATTC
 TATGGACATGCCTTGATGCTGGATGCCAGCCATCCAGAACCGGTTTACCAAACGGGCGTCTGTCTCAAAATGATGGGGGA
 ACCCGGTTTGGCGAGAGAGGCTTTTCAAACCGCAATCAAGATGAGTTATGCGGATGCCTCATGGAGTGAGATTGCCAGA
 ATGCCCAAATAATGGTTGATACTCTTATTGCTTAA

Fig. 22J

ssaD

ATGGCATATCTCATGGTTAATCAAAGAGTTCCTGGAAAATACGTTTTTTAGGTACGTTTTACAAGGCCGGGAAGTATG
 GCTGAATGAAGGTAACCTGTCACCTGGGGGAGAAAGGATGCGATATTGTATTCCGCTGGCTATAAATGAAAAATTATTC
 TGAGAGAACAGGCAGATAGTTTATTTGTTGATGCCGGGAAAGCCAGAGTTAGAGTTAATGGCCGCAGATTTAATCCAAAT
 AAGCCGCTACCATCCAGTGGGGTTTTGCAGGTTGCCGGAGTGGCTATCGCGTTTGGTAAACAGGATGTGTAACTTGCTGA
 TTATCAAATACCCGTTTTCCAGATCAGGGTACTGGTGGTTGGCTGGCGTATTCTTGATTTTCATCGGTGGAATGGGTGTCC
 TGTTAAGTATTAGTGGTCAGCCTGAAACGGTAAATGACTTACCTTTGCCGGTTAAGTTTTATTAGACAAAAGCAATATT
 CATTATGTGCGGGCGCAATGGAAAGAAGATGGCAGCCTGCAGTTGTCCGGTTATTGCTCGTCAAGCGAACAGATGCAAAA
 GGTGAGAGCGACTCTCGAATCATGGGGGTCATGTATCGGGATGGTGAATCTGTGATGACTTATTGGTACGAGAAGTGC
 AGGATGTTTTGATAAAAAATGGGTTACCCGCATGCTGAAGTATCCAGCGAAGGGCCGGGAGCGTGTAAATTCATGATGAT
 ATACAAATGGATCAGCAATGGCGCAAGGTTCAACCATTAAGTGCAGATATCCCGGGTTATTGCACTGGCAGATTAGTCA
 CTCTCATCAGTCTCAGGGGGATGATATTATTTCTGCGATAATAGAGAACGGTTTAGTGGGGCTTGTCAATGTAGCCCAA
 TGGCGCGCTCTTTTGTATCAGTGGTGTACTGGATGAATCTCATCAACGCATTTTGCAGAAACGTTAGCAGCATTAAAG
 AAAAAGGATCCCGCTCTTTCTTTAATTTATCAGGATATTGCGCCTTCCCATGATGAAAGCAAGTATCTGCCCTGCGCCAGT
 GGCTGGCTTTGTACAGAGTCCCATGGTAATTACTTATTACTGACGAATAAAGAGCGTTTACGTGTAGGGGCATTGTTAC
 CCAATGGGGGAGAAATTGTCCATCTGAGTGCCGATGTGGTAACGATTAAACATTATGATACTTTGATTAAGTATCCATTA
 GATTTTAAGTGA

Fig. 22K

ssaE

ATGACAACCTTTGACCCGGTTAGAAGATTGCTGCTTCATTCCGCTGAAGAGGCCAAAGGCATAATTTTACAATTAAGGGC
 TGCCCGGAAACAGTTAGAAGAGAACACCGCAAGTTACAGGATCCGCAGCAATATCAGCAAAACACCTTATTGCTTGAGG
 CGATCGAGCAGGCCGAAATATCATCAACATTATTTATTATCGTTACCATAACAGCGCACTTGTAGTGAGTGAGCAAGAG
 TAA

Fig. 22L

ssaG

ATGGATATTGCACAATTAGTGGATATGCTCTCCACATGGCGCACCAGGCAGGCCAGGCCATTATGACAAAATGAATGG
 TAATGATTTGCTCAACCCAGAATCGATGATTAAAGCGCAATTTGCCCTTACAGCAGTATTCTACATTTATTAATTACGAAA
 GTTCACTGATCAAATGATCAAGGATATGCTTAGTGGAAATCATTGCTAAAAATCTGA

Fig. 22M

ssaH

ATGTTTGGCGGGCGTTAACCATAGCCTGATTTCCAGGTACATGCGATGTTACCAGCGCTAACGGTTATTGTTCCGGATAA
 AAAATTACAGTTGGTATGCTGGCATTATTGTTGGCGGGTTTAAATGAGCCGCTAAAAGCCGCGAAAAATTTATCGGATA
 TAGATTTGCCAGAGGCTATGGCGCTGCGTCTGTTATTTCTGCACCAAATGAGGGGTTTGAAAAATGA

Fig. 22N

ssaI

ATGAGCGTAGTGCTGTAAGCACTCAATCTTATGTAAAGTCCTCTGCAGAACCGAGCCAGGAGCAAATTAATTTTTTTGA
 ACAATTGCTGAAAGATGAAGCATCCACAGTAACGCCAGTGCTTTATTACCGCAGGTATGTTGACCAGACAAATGGATT
 ATATGCAGTTAACGGTAGGCGTCGATTATCTTGCCAGAATATCAGGCGCAGCATCGCAAGCGCTTAATAAGCTGGATAAC
 ATGGCATGA

Fig. 22O

ssaJ

ATGAAGGTTTCATCGTATAGTATTTCTTACTGTCTTACGTTCTTTCTTACGGCATGTGATGTGGATCTTTATCGCTCATT
 GCCAGAAGATGAAGCGAATCAAATGCTGGCATTACTTATGCAGCATCATATTGATGCGGAAAAAAACAGGAAGAGGATG
 GTGTAACCTTACGTGTCGAGCAGTCGCAGTTTATTAATGCGGTTGAGCTACTTAGACTTAACGGTTATCCGCATAGGCAG
 TTTACAACGGCGGATAAGATGTTTCCGGCTAATCAGTTAGTGGTATCACCCAGGAAGAACAGCAGAAGATTAATTTTTT
 AAAAGAACAAGAATTGAAGGAATGCTGAGTCAGATGGAGGGCGTGATTAATGCAAAAGTGACCATTTGCCCTACCGACTT
 ATGATGACGGAAGTAACGCTTCTCCGAGCTCAGTTGCCGTATTATATAAAATATTACCTCAGGTCAATATGGAGGCTTT
 CGGGTAAAAATTAAGATTTAATAGAGATGTCAATCCCTGGGTTGCAATACAGTAAGATTAGTATCTTGATGCAGCCTGC
 TGAATTCAGAATGGTAGCTGACGTACCCGCGAGACAAACATTCTGGATTATGGACGTTATCAACGCCAATAAAGGGAAGG
 TGGTGAAGTGGTTGATGAAATACCTTTATCCGTTGATTTATCGTTGACAGGACTGTTATTAGGAGTGGGCATCCTGATC
 GGCTATTTTTGCCTGAGACGCCGTTTTTGA

Fig. 22P

ssrA

ATGAATTTGCTCAATCTCAAGAATACGCTGCAAAACATCTTTAGTAATCAGGCTAACTTTTTTATTTTATTAACAACAAT
 AATTATTTGGCTGCTATCTGTGCTTACCGCAGCTTATATATCAATGGTTCAGAAACGGCAGCATATAATAGAGGATTAT
 CCGTTCTATCCGAGATGAATATTGTACTAAGCAATCAACGGTTTTGAAGAAGCTGAACGTGACGCTAAAAATTTAATGTAT
 CAATGCTCATTAGCGACTGAGATTCATCATAAAGATATTTCCCTGAGGTGAGCCGGCATCTATCTGTGCGTCTTCAAA
 TTGCACGCCGACGCTAAACGGAGAGAAGCACCGTCTCTTTCTGCAGTCCCTCGATATCGATGAAAATAGCTTTCTGTCGG
 ATAGTTTTTATTCTTAATCATAAAAATGAGATTTCGTTATTATCTACTGATAACCCCTTCAGATTATCCAACCTCTACAGCCT
 TTAACGCGAAAAAGCTTTCCCTTTATACCCAACCCATGCCGGGTTTTACTGGAGTGAACCAGAATACATAAACGGCAAAGG
 ATGGCACGCTTCCGTTGCGGTTGCCGATCAGCAAGGCGTATTTTTGAGGTGACGGTTAACTTCCCGATCTCATTACTA
 AGAGCCACCTGCCATTAGATGATAGTATTCGAGTATGGCTGGATCAAAACAACCACCTATTGCGGTTTTCATACATCCCG
 CAAAAATACGTACACAGTTAGAAAATGTAACGCTGCATGATGGATGGCAGCAAATTCGGGATTTCTGATATTACGCAC
 AACCTTGATGGCCCCGGATGGAGTCTGGTTACGCTGTACCCATACGGTAATCTACATAATCGCATCTTAAAAATTATCC
 TTCAACAAATCCCTTTACATTAACAGCATTTGGTGTGATGACGTCCGCTTTTTGCTGGTTACTACATCGCTCACTGGCC
 AAACCGTTATGGCGTTTTTTCGATGTCTTAATAAAACCGCAACTGCACCGCTGAGCACACGTTTACCAGCACACGACT
 GGATGAATTAGATAGTATTGCGGTTGCTTTTAAACCACTGCTTGATACTCTACAAGTCCAATACGACAATCTGGAAAACA
 AAGTCGCAGAGCGCACCCAGGCGCTAAATGAAGCAAAAAACCGCTGAGCGAGCTAACAAACGTAAGCATTATCTTT
 ACGGTAATAAGTCATGAGTTACGTACTCCGATGAATGGCGTACTCGGTGCAATTGAATTATTACAAACCAACCCCTTTAA
 CATAGAGCAACAAGGATTAGCTGATACCGCAGAAATGTACACTGTCTTTGTTAGCTATTATTAATAATCTGCTGGATT
 TTTACGCATCGAGTCTGGTCATTTACATTACATATGGAAGAAACAGCGTTACTGCCGTTACTGGACCAGGCAATGCAA
 ACCATCCAGGGGCCAGCGCAAAGCAAAAACTGTCTTACGTACTTTTTCGGTCAACATGTCCCTCTCTATTTTCATAC
 CGACAGTATCCGTTTACGGCAAATTTGGTTAATTTACTCGGGAACCGGTAATAATTTACGAAACCGGAGGGATACGTC
 TGACGGTCAAGCGTCATGAGGAACAATTAATATTTCTGGTTAGCGATAGCGGTAAAGGGATTGAAATACAGCAGCAGTCT
 CAAATCTTTACTGCTTTTTATCAAGCAGACACAAATTCGCAAGGTACAGGAATTGGACTGACTATTGCGTCAAGCCTGGC
 TAAATGATGGGCGGTAACTCTGACACTAAAAGTGTCCCCGGGGTTGGAACCTGTGTCTCGCTAGTATTACCTTACAAG
 AATACCAGCCGCTCAACCAATTAAGGGACGCTGTGAGCGCGCTTCTGCCTGCATCGGCAACTGGCTTGTGGGGAATA
 CGCGGTGAACCAACCCAGCAAAATGCGCTTCTCAACGCAGAGCTTTTGTATTCTCCGGAACCTACAGCCTGGC
 GCAACAGTTAATATTGTGTACACCAAAATATGCCAGTAATAAATAATTTGTTACCACCTGGCAGTTGCAGATTCTTTTGG
 TTGATGATGCCGATATTAATCGGGATATCATCGGCAAAATGCTTGTGAGCCTGGGCCAACACGTCACTATTGCCGCCAGT
 AGTAACGAGGCTCTGACTTTATCACAACAGCAGCGATTTCGATTAGTACTGATTGACATTAGAATGCCAGAAATAGATGG
 TATTGAATGTGTACGATTATGGCATGATGAGCCGAATAATTTAGATCCTGACTGCATGTTTGTGGCACTATCCGCTAGCG
 TAGCGACAGAAGATATTCATCGTTGTAAAAAAATGGGATTTCATTACATTACAAAACAGTGACATTGGCTACCTTA
 GCTCGTACATCAGTATTGCGCGAGAATACCAACTTTTACGAAATATAGAGCTACAGGAGCAGGATCCGAGTCCGCTGCTC
 AGCGCTACTGGCGACAGATGATATGGTCATTAAATAGCAAGATTTTCCAATCACTGGACCTCTTGCTGGCTGATATTGAAA
 ATGCCGTATCGGCTGGAGAAAAATCGATCAGTTAATTCACACATTAAAAGGCTGTTTAGGTCAAATAGGGCAGACTGAA
 TTGGTATGCTATGTCATAGACATTGAGAATCGCGTAAAAATGGGGAAAAATCATCGCGCTGGAGGAACCTAACCGACTTACG
 CCAGAAAAATACGTATGATCTTCAAAAACTACACCTTACTTAA

Fig. 22Q

ssrB

ATGAAAGAATATAAGATCTTATTAGTAGACGATCATGAAATCATCATTAAACGGCATTATGAATGCCTTATTACCTTGGCC
 TCATTTTAAATTTGTAGAGCATGTTAAAAATGGTCTTGAGGTTTATAATGCCTGTTGTGCATACGAGCCTGACATACTTA
 TCCTTGATCTTAGTCTACCTGGCATCAATGGCCTGGATATCATTCCTCAATTACATCAGCGTTGGCCAGCAATGAATATT
 CTGGTTTACACAGCATACCAACAAGAGTATATGACCATTAAACTTTAGCCGAGGTGCTAATGGCTATGTTTTAAAAAG
 CAGTAGTCAGCAAGTTCTGTTAGCGGCATTGCAAAACAGTAGCAGTAAACAAGCGTTACATTGACCCAAACGTTGAATCGGG
 AAGCTATCCTGGCTGAATTAACGCTGACACGACCAATCATCAACTGCTTACTTTGCGCGAGCGTCAGGTTCTTAAACTT
 ATTGACGAGGGGTATACCAATCATGGGATCAGCGAAAAGCTACATATCAGTATAAAAACCGTCGAAACACACCCGATGAA
 TATGATGAGAAAGCTACAGGTTCAAAAGTGACAGAGTTACTTAACTGTGCCGAAGAATGAGGTTAATAGAGTATTAA

Figura 23

Fig. 23A

SseA

MMIKKKAFFSEYRDLEQSYMQLNHCLKKFHQIRAKVSQQLAERAESPKNRSRETESILHNLFPQGVAGVNGEAKDLKKIV
 SLFKQLEVLRLKQLNAQAPVEIPSGKTKR

Fig. 23B

SseB

MSSGNILWGSQNPPIVFKNSFGVSNADTGSQDDLSQQNPFAEGYGVLLILLMVIQAIANNKFIEVQKNAERARNTQEKSNEMDEVIKAAKGDAKTKEEVPEDVIKMRDNGILIDGMTIDDYMAKYGDHGKLDKGGLOAIKAALDNDANRNTDLMSQGGITIQKMSQELNAVLTLTGLISKWGEISSMIAQKTYT

Fig. 23C

SseC

MNRIHSNSDSAAGVTALTHHLSNVSCVSSGSLGKRQHRVNSTFGDGNAACLLSGKISLQEASNALKQLDAVPGNHKRP
SLPDFLQTNPAVLSMMMTSLILNVFGNNAQSLCQQLERATEVQNALRNKQVKEYQEQIQKAEQEDKARKAGIFGAIFDW
ITGIFETVIGALKVVEGFLSGNPAEMASGVAYMAAGCAGMVKAGAEATAMCGADHDTCAIIDVTSTKIQFGCEAVALLD
VFQIGRAFMATRGLSGAAAKVLD SGFGEEVVERVMVGAGEAEIEELAEKFGEVSEFSKQFEPLEREMAMANEMAEAAE
FSRNVENNMTRSAGKSFTKEGVKAMAKEAAKEALEKCVQEGGKFLKKFRNKVLFNMPKKILYALLRDCSFKGLQAIRCA
TEGASQMNTGMVNTAKAKIEKKIEQLITQQRFLDFIMQQTENQKKIEQKRLEELYKGTGAALRDVLDITIDHYSSVQARIA
GYRA

Fig. 23D

SseD

MEASNVALVLPAPSLTTPSSTPSPSGEGMGTESMLLLFDDIWMKLMELAKKLRDIMRSYNVEKQRLAWELQVNVLTQTMK
TIDEAFRASMITAGGAMLSGVLITIGLAVGGETGLIAGQAVGHTAGGVMGLGAGVAQRQSDQDKAIADLQONGAQSYNKS
LTEIMEKATEIMQIIGVGSSLVTVLAEILRALTR

Fig. 23E

SseE

MVQEIEQWLRRHQVFTEPAYLGETAILLGQQFILSPYLVIYRIEAKEMIIICEFRRLTPGQPRPQOLFHLGLLGRGIFVHH
PQLTCLKMLIITDVLDEKKAMLRRLRLTLTMGATFTQLDGDNWTVLSAEHLIQRFF

Fig. 23F

SseF

MKIHIPSAASNIVDGNPSPPSDIQAKEVSFPPPEIPAPGTPAAPVLLTPEQIRQORDYAIHFMQYTIRALGATVVFGLSVA
AAVISGGAGLPAILAGALVIAIGDACCAYHNYQSICQKEPLQTSASDVALVVSALALKCGASLNCANTLANCLSLLI
RSGIAISMLVLPLQFPLPAAENIASLDMGSVITSVSLTAIGAVLDYCLARPSGDDQENSVDLHADPSVLLAEQMAALC
QSATTTPAPALMDSSDHTSRGEP

Fig. 23G

SseG

MKPVSPNAQVGGQRPVNAPEESPPCPSLPHPETNMESGRIGPQQGKERVLAGLAKRVIECFPKEIFSWQTVILGGQILCC
SAGIALTVLSGGGAPLVALAGIGLAIAIADVACLIYHHKHLPMHDSIGNAVFYIANCFANQRKSMIAKAVSLGGRLA
LTATVMTHSYWSGLGLQPHLLERLNDITYGLMSFTFRGMDGMAMTGMQVSSPLYRLLAQVTPEQRAPE

Fig. 23H

SsaA

MKKDPTLQQAHDTRFFRRGGSRLMLLDDDVTPQPLNTLYRYATQLMEVKEFAGAARLFQLLTIYDAWSFDYWFRLGECCQ
AQKHWEATYAYGRAAQIKIDAPQAPWAAAECYLACDNVCYAIKALKAVVRICGEVSEHQILRQRAEKMLQQLSDRS

Fig. 23I

SsaB

MMMKEDQKNKIPEDILKQLLSVDPETVYASGYASWQEGDYSSRAVIDFSWLVMQPSWRAHIALAGTWMLKEYTTAINF
YGHALMLDASHPEPVYQTVGCLKMMGEPLAREAFQTAIKMSYADASWSEIRQNAQIMVDTLIA

Fig. 23J

SsaD

MAYLMVNPCKSSWKIRFLGHVLOGREVWLNENGLSLGEGKCDICPLAINEKIILREQADSLFVDAGKARVRVNGRRFNPN
KPLPSSGVLQVAGVAIAFGKQDCELADYQIPVSRSGYWLAGVFLIFIGMGVLLSISGQPETVNDLPLRVKFLLDKSN
HYVRAQWKEDGSLQLSGYCSSSEMQKVRALESWGVMYRDGVICDDLVRVQDVLIKMGYPHAEVSSSEGGPSVLIHDD
IQMDQQRKVPQLLADIPGLLHWQISHSHSQSGDDIISAIENGLVGLVNVSPMRRSFVISGVLDESHORILQETLAALK
KKDPALSLIYQDIAPSHDESKYLPAPVAGFVQSRHGNVLLLTNKERLRVGALLPNGGEIVHLSADVVTIKHYDTLINYPL
DFK

Fig. 23K

SsaE

MTTLTRLEDLLLHSREEAKGIILQLRAARKQLEENNGKLQDPQQYQONTLLLEATEQAENIINIITYRYHNSALVVSEQE

Fig. 23L

SsaG

MDIAQLVDMLSHMAHQAGQAINDKMNGNDLLNPESMIKAQFALQQYSTFINYESSLIKMIKDMLSGIIAKI

Fig. 23M

SsaH

MFAGVNHSLISQVHAMPLALTIVPDKKLQLVCLALLLAGINEPLKAAKILSDIDLPEAMALRLLFPAPNEGFEN

Fig. 23N

SsaI

MSVVPVSTQSYVKSSAEPSEQINFFEQLLKDEASTSNASALLPQVMLTRQMDYMQLTVGVDYLARISGAASQALNKLDN
MA

Fig. 23O

SsaJ

MKVHRIVFLTVLTFFLTACDVLRYSLPEDEANQMLALLMQHHIDAEEKQEEDGVTLRVEQSQFINAVELLRLNGYPHRQ
FTTADKMFPANQLVVSPOEEQKINFLKEQRIEGMLSQMEGVINAKVTIALPTYDEGSNASPSSVAVFIKYSPOVNMFAF
RVKIKDLIEMSIPLQYSKISILMQPAEFMVADVPARQTFWIMDVINANKGVVKWLMKYPYPLMLS LTGLLLGVGILI
GYFCLRRRF

Fig. 23P

SsaA

MNLLNLKNTLQTSLVIRLTFLLTTIIWLLSVLTAAYISMVQKRQHIIEDLSVLSEMNIIVLSNQRFEAEERDAQNLMY
QCSLATEIHNIDIFPEVSRHLSVGPSNCTPTLNGEKHRLFLQSSDIDENSFRDSFILNHKNEISLLSTDNPSDYSTLQP
LTRKSFPLYPTHAGFYWSEPEYINGKGWHAASVAVADQQGVFFVTVKLPDLITKSHLPLDSDIRVWLDQNNHLLPFSYTP
QKIRTQLENVTLHDGWQQIPGFLILRTTLHGPGWSLVTLYPYGNLHNRIKIILOQIPFTLTALVLMTSAPFCWLLHRS
LA KPLWRPFVDVINKTATAPLSTRPAQRLELDSIAGAFNQLLDTLQVQYDNLENKVAERTQALNEAKKRAERANKRKS
IHL TVISHELRTPMNGVLGAIELLQTTPLNIEQQGLADTARNCTLSLLAIINNLLDFSRIESGHFTLHMEETALLPLLDQAMQ
TIQGPASQKSLRFTVFGQHVPLYFHTDSIRLRQILVNLGNVKTETGGIRLTVKRHEEQILFLVSDSGKGIEIQQQS
QIFTAFYQADTNSQGTGIGLTIASSLAKMMGGNLTLKSVPGVGTCSVLVPLQEQYQPPQPIKGTLSAPFCLHRQLACWGI
RGEPPHQONALLNAELLYFSGKLYDLAQQLILCTPNMPVINNLLPPWQLQILLVDDADINRDIIGKMLVSLGQHV
TIAAS SNEALTL SQQRFDLVLDIRMPEIDGIECVRLWHDEFNNLDPDCMFVALSASVATEDIHRCKKNGIHHYITKPV
TLATL ARYSISAAEQLLRNIELQEODPSRCSALLATDDMVINSKIFQSLDLLLADIENAVSAGEKIDQLIHTLKGCLGQIGQTE
LVCYVIDIENRVKMGKIIALEELTDLRQKIRMI FKNYITIT

Fig. 23Q

SsrB

MKEYKILLVDDHEIIINGIMNALLPWPBFKIVEHVKNGLVYNACCAYEPDILILDLSLPGINGLDIIPQLHQRNPFAMNI
LVYTAYQOEYMTIKTLAAGANGYVLKSSSQVLLAALQTVAVNKRYYDPTLNREAILAELNADTTNHQLTLRERQVLKL
IDEGYTNHGISEKLHISIKTVETHRMNMMRKLVHVKVTELLNCARRMRLIEY

Figura 24

Fig. 24A

Promotor A2

GCTTCCCTCCAGTTGCCTGTTGCAAAATCTTTGGCACTTGATCACTATCGCAGTACATATAGTTTCATCAGAAGATTAAT
CGATGGTGTATCATTAGGAAGATAAATTTCTTCATATATAACCCAGTCGATGACTACAATTACTTTTTAATAAGATGGC
GATGTAAAAACATCGTAACAGTTTATTTAATAAAATAATTTTCAAATTGTAAGTTTTATGTCAATGCTGAAAAATGTAAT
TGTGAATTTATCGGAAAATCCGAATGATAGAAATCGCCTGTGACAAGGTATATGTAGACAGCATCTGTATTTGTACAAGA
AGAGATAGTCGAAATAAATGTGAATCAGGCTTTTACGGATGTGGTTGTGAGCGAATTTGATAGAAAC

Fig. 24B

Promotor B

TAAAAATATCTTAGAGCCTATCCCACCAGGCGTTAATTGGCGCAGCCAGTTTGGACACGGATAGCGCGCAAAAACCGCAG
CGTACACGTAGTAGGTGAGGTTTGACTCGCTACGCTCGCCCTTCGGGCCGCGCTAGCGGCGTTCAAAACGCTAACGCGT
TTTGGCGAGCACTGCCAGGTTCAAAATGGCAAGTAAATAGCCTAATGGGATAGGCTCTTAGTTAGCACGTTAATTATC
TATCGTGTATATGGAGGGGAAT

ES 2 313 792 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Creatogen Biosciences GmbH
5 <120> Sistema Portador para Vacunas
<130> 19130pwo sistema portador
<140> PCT/EP99/06514
<141> 1999-09-03
10 <150> EP98116827.1
<151> 1998-09-04
<160> 52
<170> PatentIn Ver. 2.1
15 <210> 1
<211> 8457
<212> DNA
20 <213> *Salmonella*

25

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 313 792 T3

<400> 1

5 ctgcagttgt ccggttattg ctcgtaagc gaacagatgc aaaaggtgag agcgactctc 60
gaatcatggg ggggtcatgta tcgggatggg gtaatctgtg atgacttatt ggtacgagaa 120
gtgcaggatg ttttgataaa aatgggttac ccgcatgctg aagtatccag cgaaggcccg 180
gggagcgtgt taattcatga tgatatacaa atggatcagc aatggcgcaa ggttcaacca 240
ttacttgtag atattcccggt gttattgcac tggcagatta gtcactctca tcagtctcag 300
gggatgata ttatttctgc gataatagag aacgggttag tggggcttgt caatgttagc 360
ccaatgcccc gctcttttgt tatcagtggt gtactggatg aatctcatca acgcattttg 420
10 caagaaacgt tagcagcatt aaagaaaaag gatcccgctc tttctttaat ttatcaggat 480
attgcgcctt cccatgatga aagcaagtat ctgcttgcgc cagtggctgg ctttgtacag 540
agtcgccatg gtaattactt attactgacg aataaagagc gtttacgtgt aggggcattg 600
ttaccatag ggggagaaat tgcctatctg agtgccgatg tggtaacgat taacattat 660
gatactttga ttaactatcc attagatttt aagtgagtgg aaaatgacaa ctttgaccgg 720
15 gttagaagat ttgctgcttc attcgcgtga agagcccaaa ggcatatatt tacaattaa 780
ggctgcccgg aaacagttag aagagaacaa cggcaagtta caggatccgc agcaatatca 840
gcaaaaacac ttattgcttg aagcgatcga gcaggccgaa aatatcatca acattattta 900
ttatcgttac cataacagcg cacttgtagt gagtggagca gagttaaata aaaatatctt 960
agagcctatc ccaccagcgg ttaattggcg cagccagttt ggacacggat agcgcgcaaa 1020
aaccgcagcg tacacgtagt acgtgaggtt tgactcgtca cgtcgcctt tcgggcccgc 1080
20 gctagcggcg ttcaaaacgc taacgcggtt tggcgagcac tgcccaggtt caaaatggca 1140
agtaaaatag cctaattgga taggctctta gttagcaggt taattatcta tcgtgtatat 1200
ggaggggaat gatgataaag aaaaaggctg cgtttagtga atatcgtgat ttagagcaaa 1260
gttacatgca gctaatacac tgccttaaaa aatttcacca aatccgggct aaggtgagtc 1320
aacagcttgc tgaaagggca gagagcccca aaaatagcag agagacagag agtattcttc 1380
25 ataacctatt tccacaagcg gttgccgggg ttaaccagga ggccgagaa gatttaaga 1440
aaatagtaa gttgtttaaa caacttgaag tacgactgaa acaacttaat gctcaagccc 1500
cgttgaggat accgtcagga aaaaacaaaa ggtaaagcat aatgtcttca ggaacatct 1560
tatggggaag tcaaaacctt attgtgttta aaaatagctt cggcgctcagc aacgctgata 1620
ccgggagcca ggtatgctta tcccagcaaa atccgtttgc cgaagggtat ggtgttttgc 1680
ttattctcct tatggttatt caggctatcg caaataataa atttattgaa gtccagaaga 1740
30 acgctgaacg tgccagaaat acccaggaaa agtcaaatga gatggatgag gtgattgcta 1800
aagcagccaa aggggatgct aaaaccaaag agggaggtgc tgaggatgta attaaatata 1860
tgcgatgata tggatttctc atcgatggta tgaccattga tgattatatg gctaaatatg 1920
gcgatcatgg gaagctggat aaagggtggc tacaggcgat caaagcggtt ttggataatg 1980
acgccaaccc gaataccgat cttatgagtc aggggcagat aacaattcaa aaaatgtctc 2040
35 aggaagctta cgtctgctct acccaactga cagggtctat cagtaagtgg ggggaaattt 2100
ccagtatgat agcgcagaaa acgtactcat gaaaaagac ccgaccctac aacaggcaca 2160
tgacacgatg cggtttttcc ggcgtggcgg ctgcgtgcgt atgttgttgg atgacgatgt 2220
tacaacagcg ctttaacttc tgtatcgcta tgccacgag cttatggagg taaaagaatt 2280
cgccggcgca ggcgactttt ttcaattgct gacgatatat gatgcctggt catttgacta 2340
40 ctggtttcgg ttaggggaat gctgccagcg tcaaaaacat tgggggggag cgatatacgc 2400
ttatggagcg cgccgacaaa ttaagattga tgcgcccag gcgccatggg ccgcagcgga 2460
atgctatctc gcgtgtgata acgtctgtta tgcaatcaaa gcgttaaaag ccgtggtgag 2520
tatttgccgc gaggtcagtg aacatcaaat tctccgacag cgtgcagaaa agatgttata 2580
gcaacttctt gacagggagc aaaaatgaat cgaattcaca gtaatagcga cagcgccgca 2640
ggagttaacc ccttaacaca tcatcactta agcaatgtca gttgcgttcc ctccgggttcg 2700
45 ctgggaaagc gccagcatcg tgtgaattct acttttggcg atggcaacgc cgcgtgtctg 2760
ctatccggga aaattagctt tcaggaggca agcaatgcgt tgaagcaact gcttgatgcc 2820
gtaccgggaa atcataagcg tccatcattg cctgactttt tgcagacca tcccgggtt 2880
ttatcaatga tgatgacgct attaatctc aacgtctttg gtaataacgc tcaatcgta 2940
tgccaacagc ttgagcgggc aactgaggtg caaaatgcat tacgtaataa gcaggtaaa 3000
gagtatcagg agcagatcca gaaagcgata gagcaggagg ataaagcgcg taaagcgggt 3060
atttttggcg ctatttttga ctggattacc ggcataattt aaaccggtat tggcgctta 3120
50 aaagtgtgag aaggttttct gtccggaaat cccgcagaaa tggctagcgg cgtagcttat 3180
atggcccgag gttgtgcagg aatgggttaa gccggagccc aaacgggcat gatgtcgggt 3240
gctgaccacg atacctgtca ggcaattatt gacgtgacaa gtaagattca atttggttgt 3300
gaagccgtcg cgtggcact ggatgttttc cagattggcc gtgcttttat ggcgacgaga 3360
ggtttatctg gcgcagctgc aaaaagtgtt gactccggtt ttggcgagga agtggttag 3420
cgtatgtag gtgcagggga agcagaaata gaggagttag ctgaaaagtt tggcgaaga 3480
55 gtgagcgaag gtttttccaa acaatttgag ccgcttgaa gtgaaatggc tatggcgaat 3540
gagatggcag aggaagctgc cgaattttct cgtaacgtag aaaaataat gacgcgaagc 3600
gcgggaaaaa gctttacgaa agagggggtg aaagccatgg caaaagaagc ggcgaaga 3660
gcctgggaaa aatgtgtgca agaaggtgga aagttctgt taaaaaatt ccgtaataaa 3720
gttctcttca atatgttcaa aaaaatcctg tatgccttat tgagggattg ttcatttaaa 3780
ggcttacagg ctatcagatg tgcaaccgag ggcgccagtc agatgaatac tggcatggtt 3840
60 aacacagaaa aagcgaagat cgaagagaaa atagagcaat taataactca gcaacgggtt 3900
ctggatttca taatgcaaca acagaaaaa cagaaaaaag tagaataaaa acgcttagag 3960
gagctttata aggggacggg tgccgcgctt agagatgtat tagataccat tgatcactat 4020
agtagcgttc aggcgagaat agctggctat cgcgcttaat ctgaggataa aaatatgga 4080
gcgaataacg tagcattggt attaccagcg ccttcttgt taacaccttc ttccactcca 4140
tctccctcgg gggaggggaa gggtagctga tcaatgcttc tgttatttga tgatacttg 4200
atgaagctaa tggagcttgc caaaaagctg cgcgatatca tgcgcagcta taacgtagaa 4260
65 aaacaacggc tggcctggga actgcaagtc aatgttttac agacgcaaat gaaaacaatt 4320

ES 2 313 792 T3

gatgaagcgt ttagagcatc aatgattact gcgggtggcg caatgttgc ggggtactg 438(
 acgatagcat taggggcgt aggcgggaa accggtctta tagcgggtca agccgtagcg 444(
 cacacagctg ggggcgtcat gggcctgggg gctgtgttag cgcaacgtca aagtgtatca 450(
 gataaagcga ttgcgcacct gcaacaaaat ggggcccaat cttataataa atccctgacg 456(
 5 gaaattatgg agaaagcaac tgaattatg cagcaaatca tcggcgtggg gtctgcactg 462(
 gtcacggttc ttgctgaat actccgggca ttaacgaggt aaacatggtg caagaaatag 468(
 agcaatggtt acgtcggcat caggtgttta ctgagcctgc atatttaggg gagaccgcca 474(
 tattacttgg gcagcagttt atattatcgc cttacctggt gatctatcgt attgaggcaa 480(
 aagaaatgat tatttgttag ttccggcgcc tgacgcccg gcaacctcga ccacagcaat 486(
 10 tgtttcaatt actgggactt ttacgcggga tatttgtgca tcacccgcag ttaacatgtt 492(
 taaagatgtt gataatcacc gacgttctgg atgaaaaaaa agccatgcta cgcaggaaat 498(
 tattgcgcat cctgacagta atgggagcga cctttacaca gcttgatggc gataactgga 504(
 cagttttatc gcgcgagcat cttatccagc gacgttttta aatgaccttc ctgacgtaaa 510(
 tcattatcac gtgaaaaata caatcaatag gtatgatgat gaaagaagat cagaaaaata 516(
 aaatacccca agacattctg aaacagctat tatccgttga tccggaacc gtttatgcca 522(
 15 gtggttacgc ctcatggcag gagggggatt attcgcgcgc cgtatcagat tttagtggc 528(
 tggtagatgg ccagccatgg agttggcgtg cccatattgc attggctggc acctggatga 534(
 tgcttaaga atacacgacg gccattaatt tctatggaca tgcttgatg ctggatgcca 540(
 gccatccaga accggtttac caaacgggcg tctgtctcaa aatgatgggg gaacccgggt 546(
 tgccgagaga ggcttttcaa accgcaatca agatgagtta tgccgatgccc tcatggagt 552(
 20 agattcgcca gaatgcgcaa ataattggtt atactcttat tgcctaaata acagaacgaa 558(
 atatgaaaat tcatattccg tcagcggcaa gtaatatagt cgatggtaat agtccctctt 564(
 ccgatataca agcgaaggag gtatcgtttc cccccctga aattccagcg cctggcacc 570(
 ccgcagcccc tgtgctgctt acgcctgaac aaataaggca gcagagggat tatgcgatac 576(
 attttatga atacactatt cgtgcgctgg gtgcgacagt cgtgtttggg ttatcggtt 582(
 25 ctgcagcggg aatttctggc ggggcaggat taaccttgc tattcttgcg ggggcggcg 588(
 tcgtgattgc tattggggat gcttgcgtg cgtatcataa ttatcaatcg atatgtcagc 594(
 aaaaggagcc attacaaacc gccagtata gcgttgcctt tgtggtcagt gcgctggcct 600(
 taaaatgtgg ggcaagtctt aactgcgcta acacccctgc taattgtctt tctttattaa 606(
 tacgttcagg aatcgctatt tctatgttgg ttttaccctt acagtttcca ctgcccgcg 612(
 ctgaaaatat tgggctctt ttggacatgg ggagtgaat tacctccgtt agcctgaagg 618(
 30 cgataggtgc ggtactggat tattgccttg cccgcccttc tggcgacgat caggaaaatt 624(
 ctgttgatga acttcatgcc gatccagtg tgttattggc ggaacaaatg gcagcgctct 630(
 gtcaatctgc tactacacct gcacctgcat taatggacag ttctgatcat acatctcggg 636(
 gagaaccatg aaacctgttc gcccaaatgc tcaggtagga gggcaacgtc ctgttaacgc 642(
 gcctgaggaa tcacctccat gtccttcatt gccacatccg gaaaccaata tggagagtgg 648(
 35 taagaatagg cctcaacaag gaaaagagcg ggtattggcc ggacttgcca aacgagtgat 654(
 agagtgtttt ccaaaagaaa tttttagtgg gcaaacgggt attttggggc gacagatttt 660(
 atgctgttcc gctggaatag cattaacagt gctaagtggg ggaggcgccg cgctcgtagc 666(
 cctggcaggg attggccttg ctattgccat cgcggtgtc gcctgtctta tctaccatca 672(
 taaacatcat ttgcctatgg ctacagcag tataggcaat gccgtttttt atattgctaa 678(
 40 ttgtttcgcc aatcaacgca aaagtatggc gattgctaaa gccgtctccc tggcggttag 684(
 attagcctta accgcgacgg taatgactca ttcatactgg agtggtagtt tgggactaca 690(
 gccctattta tttagagctc ttaatgatat tacctatgga ctaatgagtt ttactcgtt 696(
 cggtaggtat gggatggcaa tgaccggtat gcaggtcagc agcccattat atcgtttgct 702(
 ggctcaggta acgcagaac aacgtgcgcc ggagtaatcg ttttcaggta tataccggat 708(
 45 gtctcattgt tctcaaatct tgctatgttg ccagtatcct tacgatgat ttattttaag 714(
 gaaaagcatt atggatatgg cacaattagt ggaatgtctc tcccacatgg cgcaccaggc 720(
 agccagggcc attaatgaca aaatgaatgg taatgatttg ctcaaccag aatcgatgat 726(
 taaagcgcaa ttgaccttac agcagtatct tacatttatt aattacgaaa gttcactgat 732(
 caaaatgatc aaggatatgc ttagtggaat cattgctaaa atctgaagtt attagcgacg 738(
 atgttcgacg gttgtctgtg gaaatcatgt ttgcggcggt taaccatagc ctgatttccc 744(
 50 aggtacatgc gatgttacca gcgctaacgg ttattgttcc ggataaaaaa ttacagttag 750(
 tatgtctgac atattgttg gcgggtttta atgagccgct aaaagccgcg aaaattttat 756(
 cggatataga ttggccagag gctatggcgc tgcgtctgtt atttctgca ccaaatgagg 762(
 ggtttgaaaa ttgaatattt ctgatatgag cgtagtgcct gtaagcactc aatcttatgt 768(
 aaagtctctt gcagaaccga gccaggagca aattaatatt tttgaacaat tgcgtaaaga 774(
 55 tgaagcatcc accagtaacg ccagtgtctt attaccgcag gttatgttga ccagacaaat 780(
 ggatttatat cagtttaacgg taggcgtcga ttatcttgcc agaatatcag gcgcagcatc 786(
 gcaagcgctt aataagctgg ataacatggc atgaagggtc atcgtatagt atttcttact 792(
 gtccttacgt tctttcttac ggcattgtat gtggatcttt atcgtctatt gccagaagat 798(
 gaagcgaatc aaatgctggc attacttatg cagcatcata ttgatgcgga aaaaaaacag 804(
 gaagaggatg gtgtaacctt acgtgtcgag cagtcgcagt ttattaatgc ggttgagcta 810(
 60 cttagactta acggttatcc gcataggcag tttacaacgg cggataagat gtttccggct 816(
 aatcagttag tggatcacc ccagggaaga cagcagaaga ttaattttt aaaagaacaa 822(
 agaattgaag gaatgctgag tcagatggag ggcgtgatta atgcaaaagt gaccattgag 828(
 ctaccgactt atgatgaggg aagtaacgct tctccgagct cagttgcgct atttataaaa 834(
 tattcacctc aggtcaatat ggaggccttt cgggtaaaaa ttaagattt aatagagatg 840(
 65 tcaatccctg ggttgcaata cagtaagatt agtatcttga tgcagcctgc tgaattc 8457

ES 2 313 792 T3

<211> 3921

<212> ADN

<213> *Salmonella*

5

<400> 2

```

10      agcattgaca taaaaactta caatttgaaa aattatztat taaataaact gttacgatgt 60
      ttttacatcg ccatcttatt aaaaagtaat ttagtgcac gactgggtta tatatgaaga 120
      aatttatctt cctaattgata acaccatcga ttaattctct gatgaaacta tatgtactgc 180
      gatagtgtac aagtgcacaa gattttgcaa caggcaactg gagggaagca ttatgaattt 240
      gctcaatctc aagaatcacg tgcaaacatc tttagtaate aggctaactt ttttattttt 300
      attaacaaca ataattattt ggctgctatc tgtgcttacc gcagcttata tatcaatggt 360
      tcagaaacgg cagcatataa tagaggattt atccgttcta tccgagatga atattgtact 420
      aagcaatcaa cggtttgaaq aagctgaacg tgacgctaaa aatttaattg atcaatgctc 480
15      attagcgact gagattcatc ataacgatat ttccctgag gtgagccggc atctatctgt 540
      cggctcttca aattgcacgc cgacgctaaa cggagagaag caccgtctct ttctgcagtc 600
      ctctgatatc gatgaaaaa gctttcgtcg cgatagtttt attcttaate aaaaaatga 660
      gatttcgtta ttatctactg ataacccttc agattattca actctacagc ctttaacgcg 720
      aaaaagcttt cctttatacc caaccatgc cgggttttac tggagtgaac cagaatacat 780
20      aaacggcaaa ggatggcacg ctccggttgc ggttgcgat cagcaaggcg tattttttga 840
      ggtgacggtt aaacttcccg atctcattac taagagccac ctgccattag atgatagtat 900
      tcgagtatgg ctggatcaaa acaaccactt attgccgtt tcatacatcc cgcaaaaaat 960
      acgtacacag ttagaaaatg taacgctgca tgatggatgg cagcaaatcc cgggatttct 1020
      gatattacgc acaaccttgc atggcccggt atggagtctg gttacgctgt accatacgg 1080
      taatctacat aatcgcatct taaaaattat ccttcaacaa atcccttta cattaacagc 1140
25      attggtgttg atgacgtcgg ctttttgcgt gttactacat cgtcactgg ccaaaccgtt 1200
      atggcggttt gtcgatgtca ttaataaaac cgcaactgca ccgctgagca cacgtttacc 1260
      agcacaacga ctggatgaat tagatagtat tgccgggtgt ttaaccaac tgcttgatc 1320
      tctacaagtc caatacgaca atctggaaaa caaagtgcga gagcgacccc aggcgctaaa 1380
      tgaagcaaaa aaacgcgctg agcgagctaa caaacgtaaa agcattcatc ttacggtaat 1440
30      aagtcagtga ttacgtactc cgatgaatgg cgtactcggg gcaattgaat tattacaaac 1500
      caccctctta aacatagagc aacaaggatt agctgatacc gccagaaatt gtacactgtc 1560
      tttgttagct attattaata atctgctgga tttttcacgc atcagagtctg gtcatttcac 1620
      attacatatg gaagaaacag cgttactgcc gttactggac caggcaatgc aaacctacca 1680
      ggggcccagc gaaagcaaaa aactgtcatt acgtactttt gtcggctaac atgtccctct 1740
35      ctattttcat accgacagta tccgttttac gcaaattttg gtttaattac tcgggaacgc 1800
      ggtaaaaatt accgaaacgg gagggatagc tctgacggtc aagcgtcatg aggaacaatt 1860
      aatatttctg qtagcgata gcggtaaagg gattgaaata cagcagcagt ctcaaatctt 1920
      tactgctttt tatcaagcag acacaatttc gcaaggtaca ggaattggac tgactattgc 1980
      gtcaagcctg gctaaaaatg tgggcggtta tctgacacta aaaagtgtcc ccgggggttg 2040
      aacctgtgtc tcgctagtat tacccttaca agaataccag ccgcctcaac caattaaagg 2100
40      gacgtgtgca ggcgcgttct gcctgcacg gcaactggct tgctggggaa tacgcggtga 2160
      accaccccac cagcaaaaatg cgtttctcaa cgcaagcgtt ttgtatttct ccggaaaaat 2220
      ctacgacctg ggcgaacagt taatattgtg tacaccaaat atgccagtaa taaataattt 2280
      gttaccaccc tggcagttgc agattctttt ggttgatgat gccgatatta atcgggatat 2340
      catcggcaaa atgcttgtca gcctgggcca acacgtcact attgccgcca gtagtaacga 2400
45      ggctctgact ttatcacaac agcagcgatt cgatttagta ctgattgaca ttagaatgcc 2460
      agaaatagat ggtattgaat gtgtacgatt atggcatgat gagccgaata atttagatcc 2520
      tgactgcatg tttgtggcac tatccgctag cgtagcgaca gaagatattc atcgttgtaa 2580
      aaaaaatggg attcatcatt acattacaaa accagtgaac ttggctacct tagctcgcta 2640
      catcagtatt gccgcagaat accaactttt acgaaatata gagctacagg agcaggatcc 2700
      gagtcgtctg tcagcgctac tggcgacaga tgatatggtc attaatagca agattttcca 2760
50      atcactggac ctcttgctgg ctgatattga aaatgccgta tcggctggag aaaaaatcga 2820
      tcagttaatt cacacattaa aaggctgttt aggtcaata gggcagactg aattggatg 2880
      ctatgtcata gacattgaga atcgctgaaa aatggggaaa atcatcgcg tcggaggaact 2940
      aaccgactta cgccagaaaa tacgtatgat cttcaaaaac tacaccatta cttaatatta 3000
      tcttaatttt cgcgagggca gcaaaatgaa agaataaag atcttattag tagacgatca 3060
55      tgaaatcatc attaacggca ttatgaatgc cttattacc ttgacctatt ttaaaattgt 3120
      agagcatggt aaaaatggtc ttgaggttta taatgcctgt tgtgcatacg agcctgacat 3180
      acttatcttt gatcttagtc tacctggcat caatggcctg gatatttc ctcaattaca 3240
      tcagcgttgg ccagcaatga atattctggt ttacacagca taccaacaag agtatatgac 3300
      cattaaaact ttaccccgag gtgctaatgg ctatgtttta aaagcagta gtcagcaagt 3360
      tctgttagcg gcaattgcaa cagtagcagt aaacaagcgt tacattgacc caacgttga 3420
60      tcggggaact atctcgctg aattaaacgc tgacacgacc aatcatcaac tgcttacttt 3480
      ggcgagcgt caggttctta aacttattga cggggggtat accaatcatg ggatcagcga 3540
      aaagctacat atcagtataa aaaccgtcga aacacaccgg atgaatatga tgagaaagct 3600
      acaggttcat aaagtacagc agttacttaa ctgtgcccga agaattgaggt taatagagta 3660
      ttaacacagg gcgtccgatg gtattaagca ttggtcatat ttgtatgagc cttacgccac 3720
      gcagtattgc tcatcatcga caaaatccat acggatgccc tgggtatgccc caccatttat 3780
65      cactacctta gtcttctatt gatcatgata tagtagaat cccttattta acgggcttta 3840
      ccatgtcgtg ttctatcgcc gaatttgcca gactatgcgg tatcaatgcc gccacgctaa 3900
      gggcatggca gcgacgctat g
      3921

```

ES 2 313 792 T3

<210> 3
 <211> 327
 <212> ADN
 5 <213> *Salmonella*
 <220>
 <221> exón
 10 <222> (1)..(324)
 <400> 3

15 atg atg ata aag aaa aag gct gcg ttt agt gaa tat cgt gat tta gag 48
 caa agt tac atg cag cta aat cac tgt ctt aaa aaa ttt cac caa atc 96
 cgg gct aag gtg agt caa cag ctt gct gaa agg gca gag agc ccc aaa 144
 20 aat agc aga gag aca gag agt att ctt cat aac cta ttt cca caa ggc 192
 gtt gcc ggg gtt aac cag gag gcc gag aag gat tta aag aaa ata gta 240
 agt ttg ttt aaa caa ctt gaa gta cga ctg aaa caa ctt aat gct caa 288
 25 gcc ccg gtg gag ata ccg tca gga aaa aca aaa agg taa 327

<210> 4
 30 <211> 591
 <212> ADN
 <213> *Salmonella*
 35 <220>
 <221> exón
 <222> (1)..(588)
 40 <400> 4

 atg tct tca gga aac atc tta tgg gga agt caa aac cct att gtg ttt 48
 45 aaa aat agc ttc ggc gtc agc aac gct gat acc ggg agc cag gat gac 96
 tta tcc cag caa aat ccg ttt gcc gaa ggg tat ggt gtt ttg ctt att 144
 ctc ctt atg gtt att cag gct atc gca aat aat aaa ttt att gaa gtc 192
 50 cag aag aac gct gaa cgt gcc aga aat acc cag gaa aag tca aat gag 240
 atg gat gag gtg att gct aaa gca gcc aaa ggg gat gct aaa acc aaa 288
 55 gag gag gtg cct gag gat gta att aaa tac atg cgt gat aat ggt att 336
 ctc atc gat ggt atg acc att gat gat tat atg gct aaa tat ggc gat 384
 cat ggg aag ctg gat aaa ggt ggc cta cag gcg atc aaa gcg gct ttg 432
 60 gat aat gac gcc aac cgg aat acc gat ctt atg agt cag ggg cag ata 480
 aca att caa aaa atg tct cag gag ctt aac gct gtc ctt acc caa ctg 528
 65 aca ggg ctt atc agt aag tgg ggg gaa att tcc agt atg ata gcg cag 576
 aaa acg tac tca tga 591

ES 2 313 792 T3

<210> 5

<211> 1455

<212> ADN

5 <213> *Salmonella*

<220>

<221> exón

10 <222> (1)..(1452)

<400> 5

```

15      atg aat cga att cac agt aat agc gac agc gcc gca gga gta acc gcc   48
      tta aca cat cat cac tta agc aat gtc agt tgc gtt tcc tcg ggt tcg   96
      ctg gga aag cgc cag cat cgt gtg aat tct act ttt ggc gat ggc aac  144
20      gcc gcg tgt ctg cta tcc ggg aaa att agt ctt cag gag gca agc aat  192
      gcg ttg aag caa ctg ctt gat gcc gta ccc gga aat cat aag cgt cca  240
      tca ttg cct gac ttt ttg cag acc aat ccc gcg gtt tta tca atg atg   288
25      atg acg tca tta ata ctc aac gtc ttt ggt aat aac gct caa tcg tta  336
      tgc caa cag ctt gag cgg gca act gag gtg caa aat gca tta cgt aat  384
30      aag cag gta aag gag tat cag gag cag atc cag aaa gcg ata gag cag  432

```

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 313 792 T3

gag gat aaa gcg cgt aaa gcg ggt att ttt ggc gct att ttt gac tgg 480
 att acc ggc ata ttt gaa acc gtg att ggc gcc tta aaa gtt gtg gaa 528
 5 ggt ttt ctg tcc gga aat ccc gca gaa atg gct agc ggc gta gct tat 576
 atg gcc gca ggt tgt gca gga atg gtt aaa gcc gga gcc gaa acg gca 624
 10 atg atg tgc ggt gct gac cac gat acc tgt cag gca att att gac gtg 672
 aca agt aag att caa ttt ggt tgt gaa gcc gtc gcg ctg gca ctg gat 720
 gtt ttc cag att ggc cgt gct ttt atg gcg acg aga ggt tta tct ggc 768
 15 gca gct gca aaa gtg ctt gac tcc ggt ttt ggc gag gaa gtg gtt gag 816
 cgt atg gta ggt gca ggg gaa gca gaa ata gag gag ttg gct gaa aag 864
 ttt ggc gaa gaa gtg agc gaa agt ttt tcc aaa caa ttt gag ccg ctt 912
 20 gaa cgt gaa atg gct atg gcg aat gag atg gca gag gag gct gcc gag 960
 ttt tct cgt aac gta gaa aat aat atg acg cga agc gcg gga aaa agc 1008
 25 ttt acg aaa gag ggg gtg aaa gcc atg gca aaa gaa gcg gca aaa gaa 1056
 gcc ctg gaa aaa tgt gtg caa gaa ggt gga aag ttc ctg tta aaa aaa 1104
 ttc cgt aat aaa gtt ctc ttc aat atg ttc aaa aaa atc ctg tat gcc 1152
 30 tta ctg agg gat tgt tca ttt aaa ggc tta cag gct atc aga tgt gca 1200
 acc gag ggc gcc agt cag atg aat act ggc atg gtt aac aca gaa aaa 1248
 35 gcg aag atc gaa aag aaa ata gag caa tta ata act cag caa cgg ttt 1296
 ctg gat ttc ata atg caa caa aca gaa aac cag aaa aag ata gaa caa 1344
 aaa cgc tta gag gag ctt tat aag ggg acg ggt gcc gcg ctt aga gat 1392
 40 gta tta gat acc att gat cac tat agt agc gtt cag gcg aga ata gct 1440
 ggc tat cgc gct taa 1455

45
 <210> 6
 <211> 504
 <212> ADN
 50 <213> *Salmonella*
 <220>
 <221> exón
 55 <222> (1)..(501)

60

65

ES 2 313 792 T3

<400> 6

```

5      atg ggt act gaa tca atg ctt ctg tta ttt gat gat atc tgg atg aag   48
      cta atg gag ctt gcc aaa aag ctg cgc gat atc atg cgc agc tat aac   96
      gta gaa aaa caa cgg ctg gcc tgg gaa ctg caa gtc aat gtt tta cag  144
10     acg caa atg aaa aca att gat gaa gcg ttt aga gca tca atg att act  192
      gcg ggt ggc gca atg ttg tcg ggt gta ctg acg ata gga tta ggg gcc  240
15     gta ggc ggg gaa acc ggt ctt ata gcg ggt caa gcc gta ggc cac aca  288
      gct ggg ggc gtc atg ggc ctg ggg gct ggt gta gcg caa cgt caa agt  336
      gat caa gat aaa gcg att gcc gac ctg caa caa aat ggg gcc caa tct  384
20     tat aat aaa tcc ctg acg gaa att atg gag aaa gca act gaa att atg  432
      cag caa atc atc ggc gtg ggg tcg tca ctg gtc acg gtt ctt gct gaa  480
25     ata ctc cgg gca tta acg agg taa                                504

```

<210> 7

30 <211> 195

<212> PRT

<213> *Salmonella*

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 313 792 T3

<400> 7

5 Met Glu Ala Ser Asn Val Ala Leu Val Leu Pro Ala Pro Ser Leu Leu
1 5 10 15

Thr Pro Ser Ser Thr Pro Ser Pro Ser Gly Glu Gly Met Gly Thr Glu
20 25 30

10 Ser Met Leu Leu Leu Phe Asp Asp Ile Trp Met Lys Leu Met Glu Leu
35 40 45

15 Ala Lys Lys Leu Arg Asp Ile Met Arg Ser Tyr Asn Val Glu Lys Gln
50 55 60

Arg Leu Ala Trp Glu Leu Gln Val Asn Val Leu Gln Thr Gln Met Lys
65 70 75 80

20 Thr Ile Asp Glu Ala Phe Arg Ala Ser Met Ile Thr Ala Gly Gly Ala
85 90 95

25 Met Leu Ser Gly Val Leu Thr Ile Gly Leu Gly Ala Val Gly Gly Glu
100 105 110

Thr Gly Leu Ile Ala Gly Gln Ala Val Gly His Thr Ala Gly Gly Val
115 120 125

30 Met Gly Leu Gly Ala Gly Val Ala Gln Arg Gln Ser Asp Gln Asp Lys
130 135 140

35 Ala Ile Ala Asp Leu Gln Gln Asn Gly Ala Gln Ser Tyr Asn Lys Ser
145 150 155 160

Leu Thr Glu Ile Met Glu Lys Ala Thr Glu Ile Met Gln Gln Ile Ile
165 170 175

40 Gly Val Gly Ser Ser Leu Val Thr Val Leu Ala Glu Ile Leu Arg Ala
180 185 190

<210> 8

45 <211> 417

<212> ADN

<213> *Salmonella*

<220>

50 <221> exón

<222> (1)..(414)

55

60

65

ES 2 313 792 T3

<400> 8

```

5      atg gtg caa gaa ata gag caa tgg tta cgt cgg cat cag gtg ttt act   48
      gag cct gca tat tta ggg gag acc gcc ata tta ctt ggg cag cag ttt   96
      ata tta tcg cct tac ctg gtg atc tat cgt att gag gca aaa gaa atg   144
10     att att tgt gag ttc agg cgc ctg acg ccc ggg caa cct cga cca cag   192
      caa ttg ttt cac tta ctg gga ctt tta cgc ggg ata ttt gtg cat cac   240
      ccg cag tta aca tgt tta aag atg ttg ata atc acc gac gtt ctg gat   288
15     gaa aaa aaa gcc atg cta cgc agg aaa tta ttg cgc atc ctg aca gta   336
      atg gga gcg acc ttt aca cag ctt gat ggc gat aac tgg aca gtt tta   384
20     tcc gcc gag cat ctt atc cag cga cgt ttt taa                       417

```

<210> 9

<211> 789

25 <212> ADN

<213> *Salmonella*

<220>

<221> exón

30 <222> (1)..(786)

<400> 9

```

35     atg aaa att cat att ccg tca gcg gca agt aat ata gtc gat ggt aat   48
      agt cct cct tcc gat ata caa gcg aag gag gta tcg ttt cct ccc cct   96
      gaa att cca gcg cct ggc acc ccc gca gcc cct gtg ctg ctt acg cct   144
40     gaa caa ata agg cag cag agg gat tat gcg ata cat ttt atg caa tac   192
      act att cgt gcg ctg ggt gcg aca gtc gtg ttt ggg tta tcg gtt gct   240
45     gca gcg gta att tct ggc ggg gca gga tta ccc att gct att ctt gcg   288
      ggg gcg gcg ctc gtg att gct att ggg gat gct tgc tgt gcg tat cat   336
      aat tat caa tcg ata tgt cag caa aag gag cca tta' caa acc gcc agt   384
50     gat agc gtt gct ctt gtg gtc agt gcg ctg gcc tta aaa tgt ggg gca   432
      agt ctt aac tgc gct aac acc ctt gct aat tgt ctt tct tta tta ata   480
55     cgt tca gga atc gct att tct atg ttg gtt tta ccc cta cag ttt cca   528
      ctg ccc gcg gct gaa aat att gcg gcc tct ttg gac atg ggg agt gta   576
      att acc tcc gtt agc ctg acg gcg ata ggt gcg gta ctg gat tat tgc   624
60     ctt gcc cgc ccc tct ggc gac gat cag gaa aat tct gtt gat gaa ctt   672
      cat gcc gat ccc agt gtg tta ttg gcg gaa caa atg gca gcg ctc tgt   720
65     caa tct gct act aca cct gca cct gca tta atg gac agt tct gat cat   768
      aca tct cgg gga gaa cca tga                                           789

```

ES 2 313 792 T3

<210> 10
 <211> 690
 <212> ADN
 5 <213> *Salmonella*
 <220>
 <221> exón
 10 <222> (1)..(687)
 <400> 10

15 atg aaa cct gtt agc cca aat gct cag gta gga ggg caa cgt cct gtt 48
 aac gcg cct gag gaa tca cct cca tgt cct tca ttg cca cat ccg gaa 96
 20 acc aat atg gag agt ggt aga ata gga cct caa caa gga aaa gag cgg 144
 gta ttg gcc gga ctt gcg aaa cga gtg ata gag tgt ttt cca aaa gaa 192
 att ttt agt tgg caa acg gtt att ttg ggc gga cag att tta tgc tgt 240
 25 tcc gct gga ata gca tta aca gtg cta agt ggt gga ggc gcg ccg ctc 288
 gta gcc ctg gca ggg att ggc ctt gct att gcc atc gcg gat gtc gcc 336
 30 tgt ctt atc tac cat cat aaa cat cat ttg cct atg gct cac gac agt 384
 ata ggc aat gcc gtt ttt tat att gct aat tgt ttc gcc aat caa cgc 432
 aaa agt atg gcg att gct aaa gcc gtc tcc ctg ggc ggt aga tta gcc 480
 35 tta acc gcg acg gta atg act cat tca tac tgg agt ggt agt ttg gga 528
 cta cag cct cat tta tta gag cgt ctt aat gat att acc tat gga cta 576
 atg agt ttt act cgc ttc ggt atg gat ggg atg gca atg acc ggt atg 624
 40 cag gtc agc agc cca tta tat cgt ttg ctg gct cag gta acg cca gaa 672
 caa cgt gcg ccg gag taa 690

45
 <210> 11
 <211> 474
 50 <212> ADN
 <213> *Salmonella*
 <220>
 <221> exón
 55 <222> (1)..(471)

60
 65

ES 2 313 792 T3

<400> 11

```

    atg aaa aaa gac ccg acc cta caa cag gca cat gac acg atg cgg ttt   48
5   ttc cgg cgt ggc ggc tcg ctg cgt atg ttg ttg gat gac gat gtt aca   96
    cag ccg ctt aat act ctg tat cgc tat gcc acg cag ctt atg gag gta   144
10  aaa gaa ttc gcc ggc gca gcg cga ctt ttt caa ttg ctg acg ata tat   192
    gat gcc tgg tca ttt gac tac tgg ttt cgg tta ggg gaa tgc tgc cag   240
    gct caa aaa cat tgg ggg gaa gcg ata tac gct tat gga cgc gcg gca   288
15  caa att aag att gat gcg ccg cag gcg cca tgg gcc gca gcg gaa tgc   336
    tat ctc gcg tgt gat aac gtc tgt tat gca atc aaa gcg tta aag gcc   384
20  gtg gtg cgt att tgc ggc gag gtc agt gaa cat caa att ctc cga cag   432
    cgt gca gaa aag atg tta cag caa ctt tct gac agg agc taa           474

```

<210> 12

<211> 435

<212> ADN

<213> *Salmonella*

<220>

<221> exón

<222> (1)..(432)

<400> 12

```

    atg atg atg aaa gaa gat cag aaa aat aaa ata ccc gaa gac att ctg   48
40  aaa cag cta tta tcc gtt gat ccg gaa acc gtt tat gcc agt ggt tac   96
    gcc tca tgg cag gag ggg gat tat tcg cgc gcc gta atc gat ttt agt   144
    tgg ctg gtg atg gcc cag cca tgg agt tgg cgt gcc cat att gca ttg   192
45  gct ggc acc tgg atg atg ctt aaa gaa tac acg acg gcc att aat ttc   240
    tat gga cat gcc ttg atg ctg gat gcc agc cat cca gaa ccg gtt tac   288
50  caa acg ggc gtc tgt ctc aaa atg atg ggg gaa ccc ggg ttg gcg aga   336
    gag gct ttt caa acc gca atc aag atg agt tat gcg gat gcc tca tgg   384
    agt gag att cgc cag aat gcg caa ata atg gtt gat act ctt att gct   432
55  taa                                                                435

```

<210> 13

<211> 1212

<212> ADN

<213> *Salmonella*

<220>

<221> exón

<222> (1)..(1209)

ES 2 313 792 T3

<400> 13

```

5      atg gca tat ctc atg gtt aat cca aag agt tcc tgg aaa ata cgt ttt   48
      tta ggt cac gtt tta caa ggc cgg gaa gta tgg ctg aat gaa ggt aac   96
      ctg tca ctg ggg gag aag gga tgc gat att tgt att ccg ctg gct ata  144
10     aat gaa aaa att att ctg aga gaa cag gca gat agt tta ttt gtt gat   192
      gcc ggg aaa gcc aga gtt aga gtt aat ggc cgc aga ttt aat cca aat   240
      aag ccg cta cca tcc agt ggg gtt ttg cag gtt gcg gga gtg gct atc   288
15     gcg ttt ggt aaa cag gat tgt gaa ctt gct gat tat caa ata ccc gtt   336
      tcc aga tca ggg tac tgg tgg ttg gct gcc gta ttc ttg att ttc atc   384
20     ggt gga atg ggt gtc ctg tta agt att agt ggt cag cct gaa acg gta   432
      aat gac tta cct ttg cgg gtt aag ttt tta tta gac aaa agc aat att   480
      cat tat gtg cgg gcg caa tgg aaa gaa gat gcc agc ctg cag ttg tcc   528
25     ggt tat tgc tgc tca agc gaa cag atg caa aag gtg aga gcg act ctc   576
      gaa tca tgg ggg gtc atg tat cgg gat ggt gta atc tgt gat gac tta   624
30     ttg gta cga gaa gtg cag gat gtt ttg ata aaa atg ggt tac ccg cat   672
      gct gaa gta tcc agc gaa ggg ccg ggg agc gtg tta att cat gat gat   720
      ata caa atg gat cag caa tgg cgc aag gtt caa cca tta ctt gca gat   768
35     att ccc ggg tta ttg cac tgg cag att agt cac tct cat cag tct cag   816
      ggg gat gat att att tct gcg ata ata gag aac ggt tta gtg ggg ctt   864
      gtc aat gtt agc cca atg cgg cgc tct ttt gtt atc agt ggt gta ctg   912
40     gat gaa tct cat caa cgc att ttg caa gaa acg tta gca gca tta aag   960
      aaa aag gat ccc gct ctt tct tta att tat cag gat att gcg cct tcc  1008
      cat gat gaa agc aag tat ctg cct gcg cca gtg gct ggc ttt gta cag  1056
45     agt cgc cat ggt aat tac tta tta ctg acg aat aaa gag cgt tta cgt  1104
      gta ggg gca ttg tta ccc aat ggg gga gaa att gtc cat ctg agt gcc  1152
50     gat gtg gta acg att aaa cat tat gat act ttg att aac tat cca tta  1200
      gat ttt aag tga                                     1212

```

55

<210> 14

<211> 243

<212> ADN

60

<213> *Salmonella*

<220>

<221> exón

65

<222> (1)..(240)

ES 2 313 792 T3

<400> 14

```

    atg aca act ttg acc cgg tta gaa gat ttg ctg ctt cat tcg cgt gaa   48
5   gag gcc aaa ggc ata att tta caa tta agg gct gcc cgg aaa cag tta   96
    gaa gag aac aac ggc aag tta cag gat ccg cag caa tat cag caa aac  144
    acc tta ttg ctt gaa gcg atc gag cag gcc gaa aat atc atc aac att  192
10  att tat tat cgt tac cat aac agc gca ctt gta gtg agt gag caa gag  240
    taa                                     243

```

15

<210> 15

<211> 216

<212> ADN

20 <213> *Salmonella*

<220>

<221> exón

<222> (1)..(213)

25

<400> 15

```

    atg gat att gca caa tta gtg gat atg ctc tcc cac atg gcg cac cag   48
30  gca ggc cag gcc att aat gac aaa atg aat ggt aat gat ttg ctc aac   96
    cca gaa tcg atg att aaa gcg caa ttt gcc tta cag cag tat tct aca  144
35  ttt att aat tac gaa agt tca ctg atc aaa atg atc aag gat atg ctt  192
    agt gga atc att gct aaa atc tga                                     216

```

40 <210> 16

<211> 228

<212> ADN

<213> *Salmonella*

45

<220>

<221> exón

<222> (1)..(225)

50

<400> 16

```

    atg ttt gcg ggc gtt aac cat agc ctg att tcc cag gta cat gcg atg   48
55  tta cca gcg cta acg gtt att gtt ccg gat aaa aaa tta cag ttg gta   96
    tgt ctg gca tta ttg ttg gcg ggt tta aat gag ccg cta aaa gcc gcg  144
    aaa att tta tcg gat ata gat ttg cca gag gct atg gcg ctg cgt ctg  192
60  tta ttt cct gca cca aat gag ggg ttt gaa aat tga                                     228

```

65 <210> 17

<211> 249

<212> ADN

ES 2 313 792 T3

<213> *Salmonella*
 <220>
 <221> exón
 5 <222> (1)..(246)

 <400> 17

 10 atg agc gta gtg cct gta agc act caa tct tat gta aag tcc tct gca 48
 gaa ccg agc cag gag caa att aat ttt ttt gaa caa ttg ctg aaa gat 96
 gaa gca tcc acc agt aac gcc agt gct tta tta ccg cag gtt atg ttg 144
 15 acc aga caa atg gat tat atg cag tta acg gta ggc gtc gat tat ctt 192
 gcc aga ata tca ggc gca gca tcc caa gcg ctt aat aag ctg gat aac 240
 atg gca tga 249
 20 <210> 18
 <211> 750
 <212> ADN
 25 <213> *Salmonella*
 <220>
 <221> exón
 <222> (1)..(747)
 30 <400> 18
 atg aag gtt cat cgt ata gta ttt ctt act gtc ctt acg ttc ttt ctt 48
 35 acg gca tgt gat gtg gat ctt tat cgc tca ttg cca gaa gat gaa gcg 96
 aat caa atg ctg gca tta ctt atg cag cat cat att gat gcg gaa aaa 144
 aaa cag gaa gag gat ggt gta acc tta cgt gtc gag cag tcc cag ttt 192
 40 att aat gcg gtt gag cta ctt aga ctt aac ggt tat ccg cat agg cag 240
 ttt aca acg gcg gat aag atg ttt ccg gct aat cag tta gtg gta tca 288
 45 ccc cag gaa gaa cag cag aag att aat ttt tta aaa gaa caa aga att 336
 gaa gga atg ctg agt cag atg gag ggc gtg att aat gca aaa gtg acc 384
 50 att gcg cta ccg act tat gat gag gga agt aac gct tct ccg agc tca 432
 gtt gcc gta ttt ata aaa tat tca cct cag gtc aat atg gag gcc ttt 480
 cgg gta aaa att aaa gat tta ata gag atg tca atc cct ggg ttg caa 528
 55 tac agt aag att agt atc ttg atg cag cct gct gaa ttc aga atg gta 576
 gct gac gta ccc gcg aga caa aca ttc tgg att atg gac gtt atc aac 624
 gcc aat aaa ggg aag gtg gtg aag tgg ttg atg aaa tac cct tat ccg 672
 60 ttg atg tta tcc ttg aca gga ctg tta tta gga gtg ggc atc ctg atc 720
 ggc tat ttt tgc ctg aga cgc cgt ttt tga 750
 65 <210> 19
 <211> 2763
 <212> ADN

ES 2 313 792 T3

<213> *Salmonella*

<220>

<221> exón

5 <222> (1)..(2760)

<400> 19

```

10      atg aat ttg ctc aat ctc aag aat acg ctg caa aca tct tta gta atc   48
      agg cta act ttt tta ttt tta tta aca aca ata att att tgg ctg cta   96
      tct gtg ctt acc gca gct tat ata tca atg gtt cag aaa cgg cag cat  144
15      ata ata gag gat tta tcc gtt cta tcc gag atg aat att gta cta agc   192
      aat caa cgg ttt gaa gaa gct gaa cgt gac gct aaa aat tta atg tat   240
      caa tgc tca tta gcg act gag att cat cat aac gat att ttc cct gag   288
20      gtg agc cgg cat cta tct gtc ggt cct tca aat tgc acg ccg acg cta   336
      aac gga gag aag cac cgt ctc ttt ctg cag tcc tct gat atc gat gaa   384
25      aat agc ttt cgt cgc gat agt ttt att ctt aat cat aaa aat gag att   432
      tcg tta tta tct act gat aac cct tca gat tat tca act cta cag cct   480
      tta acg cga aaa agc ttt cct tta tac cca acc cat gcc ggg ttt tac   528
30      tgg agt gaa cca gaa tac ata aac ggc aaa gga tgg cac gct tcc gtt   576
      gcg gtt gcc gat cag caa ggc gta ttt ttt gag gtg acg gtt aaa ctt   624
35      ccc gat ctc att act aag agc cac ctg cca tta gat gat agt att cga   672
      gta tgg ctg gat caa aac aac cac tta ttg ccg ttt tca tac atc ccg   720
      caa aaa ata cgt aca cag tta gaa aat gta acg ctg cat gat gga tgg   768
40      cag caa att ccc gga ttt ctg ata tta cgc aca acc ttg cat ggc ccc   816
      gga tgg agt ctg gtt acg ctg tac cca tac ggt aat cta cat aat cgc   864
45      atc tta aaa att atc ctt caa caa atc ccc ttt aca tta aca gca ttg   912
      gtg ttg atg acg tcg gct ttt tgc tgg tta cta cat cgc tca ctg gcc   960
      aaa ccg tta tgg cgt ttt gtc gat gtc att aat aaa acc gca act gca  1008
50      ccg ctg agc aca cgt tta cca gca caa cga ctg gat gaa tta gat agt  1056
      att gcc ggt gct ttt aac caa ctg ctt gat act cta caa gtc caa tac  1104
      gac aat ctg gaa aac aaa gtc gca gag cgc acc cag gcg cta aat gaa  1152
55      gca aaa aaa cgc gct gag cga gct aac aaa cgt aaa agc att cat ctt  1200
      acg gta ata agt cat gag tta cgt act ccg atg aat ggc gta ctc ggt  1248
60      gca att gaa tta tta caa acc acc cct tta aac ata gag caa caa gga  1296
      tta gct gat acc gcc aga aat tgt aca ctg tct ttg tta gct att att  1344
      aat aat ctg ctg gat ttt tca cgc atc gag tct ggt cat ttc aca tta  1392
65      cat atg gaa gaa aca gcg tta ctg ccg tta ctg gac cag gca atg caa  1440

```

ES 2 313 792 T3

acc atc cag ggg cca gcg caa agc aaa aaa ctg tca tta cgt act ttt 1488

gtc ggt caa cat gtc cct ctg tat ttt cat acc gac agt atc cgt tta 1536

5 cgg caa att ttg gtt aat tta ctg ggg aac gcg gta aaa ttt acc gaa 1584

acc gga ggg ata cgt ctg acg gtc aag cgt cat gag gaa caa tta ata 1632

10 ttt ctg gtt agc gat agc ggt aaa ggg att gaa ata cag cag cag tct 1680

caa atc ttt act gct ttt tat caa gca gac aca aat tgc caa ggt aca 1728

gga att gga ctg act att gcg tca agc ctg gct aaa atg atg ggc ggt 1776

15 aat ctg aca cta aaa agt gtc ccc ggg gtt gga acc tgt gtc tgc cta 1824

gta tta ccc tta caa gaa tac cag ccg cct caa cca att aaa ggg acg 1872

ctg tca gcg ccg ttc tgc ctg cat ccg caa ctg gct tgc tgg gga ata 1920

20 cgc ggt gaa cca ccc cac cag caa aat gcg ctt ctg aac gca gag ctt 1968

ttg tat ttc tcc gga aaa ctg tac gac ctg gcg caa cag tta ata ttg 2016

25 tgt aca cca aat atg cca gta ata aat aat ttg tta cca ccc tgg cag 2064

ttg cag att ctt ttg gtt gat gat gcc gat att aat ccg gat atc atc 2112

ggc aaa atg ctt gtc agc ctg ggc caa cac gtc act att gcc gcc agt 2160

30 agt aac gag gct ctg act tta tca caa cag cag cga ttc gat tta gta 2208

ctg att gac att aga atg cca gaa ata gat ggt att gaa tgt gta cga 2256

35 tta tgg cat gat gag ccg aat aat tta gat cct gac tgc atg ttt gtg 2304

gca cta tcc gct agc gta gcg aca gaa gat att cat cgt tgt aaa aaa 2352

aat ggg att cat cat tac att aca aaa cca gtg aca ttg gct acc tta 2400

40 gct cgc tac atc agt att gcc gca gaa tac caa ctt tta cga aat ata 2448

gag cta cag gag cag gat ccg agt cgc tgc tca gcg cta ctg gcg aca 2496

gat gat atg gtc att aat agc aag att ttc caa tca ctg gac ctg ttg 2544

45 ctg gct gat att gaa aat gcc gta tgc gct gga gaa aaa atc gat cag 2592

tta att cac aca tta aaa ggc tgt tta ggt caa ata ggg cag act gaa 2640

50 ttg gta tgc tat gtc ata gac att gag aat cgc gta aaa atg ggg aaa 2688

atc atc gcg ctg gag gaa cta acc gac tta cgc cag aaa ata cgt atg 2736

atc ttc aaa aac tac acc att act taa 2763

55

<210> 20

<211> 639

60 <212> ADN

<213> *Salmonella*

<220>

<221> exón

65 <222> (1)..(636)

ES 2 313 792 T3

<400> 20

```

5      atg aaa gaa tat aag atc tta tta gta gac gat cat gaa atc atc att  48
      aac ggc att atg aat gcc tta tta ccc tgg cct cat ttt aaa att gta  96
      gag cat gtt aaa aat ggt ctt gag gtt tat aat gcc tgt tgt gca tac  144
10     gag cct gac ata ctt atc ctt gat ctt agt cta cct ggc atc aat ggc  192
      ctg gat atc att cct caa tta cat cag cgt tgg cca gca atg aat att  240
      ctg gtt tac aca gca tac caa caa gag tat atg acc att aaa act tta  288
15     gcc gca ggt gct aat ggc tat gtt tta aaa agc agt agt cag caa gtt  336
      ctg tta gcg gca ttg caa aca gta gca gta aac aag cgt tac att gac  384
      cca acg ttg aat cgg gaa gct atc ctg gct gaa tta aac gct gac acg  432
20     acc aat cat caa ctg ctt act ttg cgc gag cgt cag gtt ctt aaa ctt  480
      att gac gag ggg tat acc aat cat ggg atc agc gaa aag cta cat atc  528
25     agt ata aaa acc gtc gaa aca cac cgg atg aat atg atg aga aag cta  576
      cag gtt cat aaa gtg aca gag tta ctt aac tgt gcc cga aga atg agg  624
      tta ata gag tat taa  639
30

```

<210> 21

<211> 388

35 <212> ADN

<213> *Salmonella*

<400> 21

```

40
      gcttcctcc agttgcctgt tgcaaaatct ttggcacttg atcactatcg cagtacatat 60
      agtttcacga gaagattaat cgatggtggt atcattagga agataaattt cttcatatat 120
45     aacccagtcg atgactacaa ttacttttta ataagatggc gatgtaaaaa catcgtaaca 180
      gtttatTTAA taaataattt ttcaaatgtt aagtttttat gtcaatgctg aaaatgtaat 240
      tgtgaattta tcggaaaatc cgaatgatag aatcgccctgt gacaaggat atgtagacag 300
      catcctgata ttgtacaaga agagatagtc gaaataaatg tgaatcaggc tttttacgga 360
      tgtggttgtg agcgaatttg atagaaac 388
50

```

<210> 22

<211> 262

55 <212> ADN

<213> *Salmonella*

<400> 22

```

60
      taaaaaatatc ttagagccta tcccaccagg cggttaattgg cgcagccagt ttggacacgg 60
      atagcgcgca aaaaccgcag cgtacacgta gtacgtgagg tttagctcgc tacgctcgcc 120
65     cttcgggccc cgctagcgg cggtcaaaac gctaacgcgt tttggcgagc actgcccagg 180
      ttcaaaatgg caagtaaaat agcctaattg gataggctct tagttagcac gttaattatc 240
      tatcgtgtat atggagggga at 262

```

ES 2 313 792 T3

<210> 23
 <211> 192
 <212> PRT
 5 <213> EPEC
 <300>
 <303> Mol. Microbiol.
 10 <304> 28
 <306> 1-4
 <307> 1998
 15 <400> 23

20 Met Asp Thr Ser Thr Thr Ala Ser Val Ala Ser Ala Asn Ala Ser Thr
 1 5 10 15
 Ser Thr Ser Met Ala Tyr Asp Leu Gly Ser Met Ser Lys Asp Asp Val
 20 25 30
 25 Ile Asp Leu Phe Asn Lys Leu Gly Val Phe Gln Ala Ala Ile Leu Met
 35 40 45
 Phe Ala Tyr Met Tyr Gln Ala Gln Ser Asp Leu Ser Ile Ala Lys Phe
 50 55 60
 30 Ala Asp Met Asn Glu Ala Ser Lys Glu Ser Thr Thr Ala Gln Lys Met
 65 70 75 80
 Ala Asn Leu Val Asp Ala Lys Ile Ala Asp Val Gln Ser Ser Ser Asp
 35 85 90 95
 Lys Asn Ala Lys Ala Gln Leu Pro Asp Glu Val Ile Ser Tyr Ile Asn
 100 105 110
 40 Asp Pro Arg Asn Asp Ile Thr Ile Ser Gly Ile Asp Asn Ile Asn Ala
 115 120 125
 Gln Leu Gly Ala Gly Asp Leu Gln Thr Val Lys Ala Ala Ile Ser Ala
 45 130 135 140
 Lys Ala Asn Asn Leu Thr Thr Thr Val Asn Asn Ser Gln Leu Glu Ile
 145 150 155 160
 50 Gln Gln Met Ser Asn Thr Leu Asn Leu Leu Thr Ser Ala Arg Ser Asp
 165 170 175
 Met Gln Ser Leu Gln Tyr Arg Thr Ile Ser Gly Ile Ser Leu Gly Lys
 55 180 185 190

60 <210> 24
 <211> 380
 <212> PRT
 <213> EPEC
 65 <300>
 <303> Mol. Microbiol.
 <304> 28

ES 2 313 792 T3

<306> 1-4

<307> 1998

5 <400> 24

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

65

ES 2 313 792 T3

Val Val Thr Thr Leu Ala Asp Thr Phe Val Asp Asn Val Ala Ser Lys
275 280 285

5 Ile Ser Ala Val Ala Asn Gly Leu Thr Thr Ser Ser Arg Ser Ile Gly
290 295 300

Thr Thr Val Leu Asn Asn Asp Ala Ala Tyr Tyr Asn Val Leu Ser Gln
305 310 315 320

10 Val Ser Ala Phe Ala Val Glu Asn Leu Thr Arg Gln Ser Glu Tyr Leu
325 330 335

15 Ser Gln Ser Ala Lys Ala Glu Leu Glu Lys Ala Thr Leu Glu Leu Gln
340 345 350

Asn Gln Ala Asn Tyr Ile Gln Ser Ala Ser Gln Leu Met Ser Asp Ser
355 360 365

20 Ala Arg Val Asn Ile Arg Ile Val Ser Gly Arg Val
370 375 380

25 <210> 25
<211> 401
<212> PRT

30 <213> *Yersinia enterocolitica*
<300>
<301> Hakansson, S. Schesser, K. Persson, C. Galyov, E. E. Rosqvist, R. Homble, F. Wolf Watz, H.
<303> EMBO J.

35 <304> 15
<306> 5812-5823
<307> 1996

40

45

50

55

60

65

ES 2 313 792 T3

<400> 25

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

ES 2 313 792 T3

Lys Gln Ala Ala Glu Asp Gly Leu Ile Ser Gln Glu Ala Met Gln Val
 210 215 220
 5 Leu Gly Pro Ile Leu Thr Ala Ile Glu Val Ala Leu Thr Val Val Ser
 225 230 235 240
 Thr Val Met Thr Phe Gly Gly Ser Ala Leu Lys Cys Leu Ala Asp Ile
 245 250 255
 10 Gly Ala Lys Leu Gly Ala Asn Thr Ala Ser Leu Ala Ala Lys Gly Ala
 260 265 270
 15 Glu Phe Ser Ala Lys Val Ala Gln Ile Ser Thr Gly Ile Ser Asn Thr
 275 280 285
 Val Gly Ser Ala Val Thr Lys Leu Gly Gly Ser Phe Gly Ser Leu Thr
 290 295 300
 20 Met Ser His Val Ile Arg Thr Gly Ser Gln Ala Thr Gln Val Ala Val
 305 310 315 320
 25 Gly Val Gly Ser Gly Ile Thr Gln Thr Ile Asn Asn Lys Lys Gln Ala
 325 330 335
 Asp Leu Gln His Asn Asn Ala Asp Leu Ala Leu Asn Lys Ala Asp Met
 340 345 350
 30 Ala Ala Leu Gln Ser Ile Ile Asp Arg Leu Lys Glu Glu Leu Ser His
 355 360 365
 35 Leu Ser Glu Ser His Arg Gln Val Met Glu Leu Ile Phe Gln Met Ile
 370 375 380
 Asn Ala Lys Gly Asp Met Leu His Asn Leu Ala Gly Arg Pro His Thr
 385 390 395 400
 40 Val

45 <210> 26
 <211> 390
 <212> PRT
 <213> *Pseudomonas aeruginosa*
 50 <300>
 <301> Hauser, A. R. Fleiszig, S. Kang, P. J. Mostov, K. Engel, J. N.
 <303> Infect. Immun.
 55 <304> 66
 <306> 1413-1420
 <307> 1998

60

65

ES 2 313 792 T3

<400> 26

5 Met Asn Pro Ile Thr Leu Glu Arg Ala Gly Leu Pro Tyr Gly Val Ala
1 5 10 15
Asp Ala Gly Asp Ile Pro Ala Leu Gly Arg Pro Val Ala Arg Asp Val
20 25 30
10 Glu Ser Leu Arg Val Glu Arg Leu Ala Ala Pro Ala Ala Ala Ser Ala
35 40 45
15 Ser Gly Thr Gly Val Ala Leu Thr Pro Pro Ser Ala Ala Ser Gln Gln
50 55 60
Arg Leu Glu Val Ala Asn Arg Ala Glu Ile Ala Ser Leu Val Gln Ala
65 70 75 80
20 Val Gly Glu Asp Ala Gly Leu Ala Arg Gln Val Val Leu Ala Gly Ala
85 90 95
25 Ser Thr Leu Leu Ser Ala Gly Leu Met Ser Pro Gln Ala Phe Glu Ile
100 105 110
30
35
40
45
50
55
60
65

ES 2 313 792 T3

Glu Leu Ala Lys Ile Thr Gly Glu Val Glu Asn Gln Gln Lys Lys Leu
 115 120 125
 Lys Leu Thr Glu Ile Glu Gln Ala Arg Lys Gln Asn Leu Gln Lys Met
 5 130 135 140
 Glu Asp Asn Gln Gln Lys Ile Arg Glu Ser Glu Glu Ala Ala Lys Glu
 145 150 155 160
 10 Ala Gln Lys Ser Gly Leu Ala Ala Lys Ile Phe Gly Trp Ile Ser Ala
 165 170 175
 Ile Ala Ser Ile Ile Val Gly Ala Ile Met Val Ala Thr Gly Val Gly
 15 180 185 190
 Ala Ala Ala Gly Ala Leu Met Ile Ala Gly Gly Val Met Gly Val Val
 195 200 205
 20 Ser Gln Ser Val Gln Gln Ala Ala Ala Asp Gly Leu Ile Ser Lys Glu
 210 215 220
 Val Met Glu Lys Leu Gly Pro Ala Leu Met Gly Ile Glu Ile Ala Val
 225 230 235 240
 25 Ala Leu Leu Ala Ala Val Val Ser Phe Gly Gly Ser Ala Val Gly Gly
 245 250 255
 Leu Ala Lys Leu Gly Ala Lys Ile Gly Gly Lys Ala Ala Glu Met Thr
 30 260 265 270
 Ala Ser Leu Ala Ser Lys Val Ala Asn Leu Gly Gly Lys Phe Gly Ser
 275 280 285
 35 Leu Ala Gly Gln Ser Leu Ser His Ser Leu Lys Leu Gly Val Gln Val
 290 295 300
 Ser Asp Leu Thr Leu Asp Val Ala Asn Gly Ala Ala Gln Ala Thr His
 305 310 315 320
 40 Ser Gly Phe Gln Ala Lys Ala Ala Asn Arg Gln Ala Asp Val Gln Glu
 325 330 335
 Ser Arg Ala Asp Leu Thr Thr Leu Gln Gly Val Ile Glu Arg Leu Lys
 340 345 350
 Glu Glu Leu Ser Arg Met Leu Glu Ala Phe Gln Glu Ile Met Glu Arg
 355 360 365
 50 Ile Phe Ala Met Leu Gln Ala Lys Gly Glu Thr Leu His Asn Leu Ser
 370 375 380
 Ser Arg Pro Ala Ala Ile
 55 385 390

60 <210> 27
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 65 <220>

ES 2 313 792 T3

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Precursor

<400> 27

5 tttttacgtg aagcggggtg 20

<210> 28

10 <211> 22

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Precursor

<400> 28

20 ggcattagcg gatgtctgac tg 22

<210> 29

<211> 22

25 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

30 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Precursor

<400> 29

35 caccaggaac cattttctct gg 22

<210> 30

<211> 23

40 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Precursor

45 <400> 30

 cagcgatgac gatattcgac aag 23

50 <210> 31

<211> 17

<212> ADN

55 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Precursor

60 <400> 31

 gaaatcccgc agaaatg 17

65 <210> 32

<211> 17

<212> ADN

ES 2 313 792 T3

	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia Artificial: Precursor	
5	<400> 32	
	aaggcgataa tataaac	17
10	<210> 33	
	<211> 17	
	<212> ADN	
15	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia Artificial: Precursor	
20	<400> 33	
	agagatgtat tagatac	17
25	<210> 34	
	<211> 17	
	<212> ADN	
30	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia Artificial: Precursor	
35	<400> 34	
	gcaataagag tatcaac	17
40	<210> 35	
	<211> 31	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
45	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia Artificial: Precursor	
	<400> 35	
50	gctaagcttc ggctcaaatt gtttgaaaa c	31
	<210> 36	
55	<211> 27	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
60	<223> Descripción de Secuencia Artificial: Precursor	
	<400> 36	
65	gctaagctta gagatgtatt agatacc	27

ES 2 313 792 T3

	<210> 37	
	<211> 23	
	<212> ADN	
5	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia Artificial: Precursor	
10	<400> 37	
	attggatccg caagcgcca gaa	23
15	<210> 38	
	<211> 23	
	<212> ADN	
20	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia Artificial: Precursor	
25	<400> 38	
	tatggatcct cagattaagc gcg	23
30	<210> 39	
	<211> 29	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
35	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia Artificial: Precursor	
40	<400> 39	
	atagaattcg gagggagatg gagtggaag	29
45	<210> 40	
	<211> 30	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
50	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia Artificial: Precursor	
55	<400> 40	
	atagaattcg aagataaagc gattgccgac	30
60	<210> 41	
	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
65	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia Artificial: Precursor	

ES 2 313 792 T3

	<400> 41	
	gaaggatcca ctccatctcc etc	23
5	<210> 42	
	<211> 27	
	<212> ADN	
10	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia Artificial: Precursor	
15	<400> 42	
	gaaggatcca ttgctctat ttcttgc	27
20	<210> 43	
	<211> 30	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
25	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia Artificial: Precursor	
30	<400> 43	
	atgggatccg agattcgcca gaatgcgcaa	30
35	<210> 44	
	<211> 30	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
40	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia Artificial: Precursor	
	<400> 44	
45	atgggatcca ctggcataaa cggtttccgg	30
	<210> 45	
50	<211> 27	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
55	<223> Descripción de Secuencia Artificial: Precursor	
	<400> 45	
60	attggatcct gacgtaaatc attatca	27
	<210> 46	
	<211> 27	
65	<212> ADN	

ES 2 313 792 T3

	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia Artificial: Precursor	
5	<400> 46	
	attggatcct taagcaataa gtgaatc	27
10	<210> 47	
	<211> 25	
	<212> ADN	
15	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia Artificial: Precursor	
20	<400> 47	
	aaggaattca acaggcaact ggagg	25
25	<210> 48	
	<211> 26	
	<212> ADN	
30	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia Artificial: Precursor	
35	<400> 48	
	ctgccctcgc gaaaattaag ataata	26
40	<210> 49	
	<211> 17	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
45	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia Artificial: Precursor	
	<400> 49	
50	cttatttttc gcgaggg	17
	<210> 50	
55	<211> 18	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
60	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia Artificial: Precursor	
	<400> 50	
65	ggacgcccct ggtaata	18

ES 2 313 792 T3

<210> 51
<211> 29
<212> ADN
5 <213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Precursor

10 <400> 51

ggctctgcagg atttttcacg catcgcgtc

29

15 <210> 52
<211> 30
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
20 <220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Precursor

25

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 313 792 T3

<400> 52

```

ggtctgcaga accattgata tataagctgc 30
ctgcagttgt ccggttattg ctctcaagc gaacagatgc aaaaggtgag agcgactctc 60
gaatcatggg ggggtcatgta tcgggatggg gtaatctgtg atgacttatt ggtacgagaa 120
gtgcaggatg ttttgataaa aatgggttac ccgcatgctg aagtatccag cgaagggccg 180
gggagcgtgt taattcatga tgatatacaa atggatcagc aatggcgcaa ggttcaacca 240
ttacttgcag atattcccggt gttattgcac tggcagatta gtcactctca tcagtcctcag 300
ggggatgata ttatttctgc gataatagag aacgggttag tggggcctgt caatgttagc 360
ccaatgcggc gctcttttgt tatcagtggt gtaactgagc aatctcatca acgcattttg 420
caagaaacgt tagcagcatt aaagaaaaag gatcccgctc tttctttaat ttatcaggat 480
attgcgcctt cccatgatga aagcaagtat ctgctgcgc cagtggctgg ctttgtacag 540
agtcgcctag gtaattactt attactgacg aataaagagc gtttacgtgt aggggcattg 600
ttaccaatg ggggagaaat tgtccatctg agtgcgcatg tggtaacgat taaacattat 660
gatactttga ttaactatcc attagatttt aagtgtgtgg aaaatgacaa ctttgaccgg 720
gttagaagat ttgctgcttc attcgcgtga agaggccaaa ggcataattt tacaattaag 780
ggctgcccgg aaacagttag aagagaacaa cggcaagtta caggatccgc agcaatatca 840
gcaaaacacc ttattgcttg aagcgatcga gcaggccgaa aatatcatca acattattta 900
ttatcgttac cataacagcg cactttagt gagttagcaa gagttaaaga aaaatatctt 960
agagcctatc ccaccagcg ttaattggcg cagccagttt ggacacggat agcgcgcaa 1020
aacgcgagcg tacacgtagt acgtgaggtt tgactcgcta cgctcgccct tcgggcccgc 1080
gctagcggcg ttcaaaacgc taacgcgttt tggcgagcac tggccaggtt caaaatggca 1140
agtaaatag cctaattggga taggctctta gttagcacgt taattatcta tcgtgtatat 1200
ggaggggaat gatgataaag aaaaaggctg cgtttagtga atatcgtgat ttagagcaaa 1260
gttacatgca gctaaatcac tgtcttaaaa aatttcacca aatccgggct aaggtgagtc 1320
aacagctttg tgaaggggca gagagcccca aaaatagcag agagacagag agtatctctc 1380
ataacctatt tccacaagcg gttgccgggg ttaaccagga gcccgagaag gatttaaaqa 1440

aaatagtaag tttgtttaaa caactgaag tacgactgaa acaacttaat gctcaagccc 1500
cgggtggagat accgtcagga aaaacaaaaa ggtaagcat aatgtcttca ggaaacatct 1560
tatggggaag tcaaaacccct attgtgttta aaaatagctt cggcgctcagc aacgtgata 1620
ccgggagcca ggatgactta tcccagcaaa atccgtttgc cgaagggtat ggtgttttgc 1680
ttatttctct tatggttatt caggctatcg caaataataa atttattgaa gtccagaaga 1740
acgtggaacg tgcagaatat acccaggaaa agtcaaatga gatggatgag gtgattgcta 1800
aagcagccaa aggggatgct aaaaccaaag aggaggtgcc tgaggatgta attaaataca 1860
tgctgataaa tggttatttc atcgatggta tgaccattga tgatttatg gctaaatatg 1920
gcgatcatgg gaagctggat aaaggtggcc tacagcgcat caaagcggct ttggataatg 1980
acgccaacgg gaataccgat cttatgagtc aggggcagat acaattcaa aaaatgtctc 2040
aggagcttaa cgctgtcctt acccaactga cagggtctat cagtaagtgg ggggaaattt 2100
ccagtatgat agcgagcaaaa acgtactcat gaaaaaagac ccgaccctac aacaggcaca 2160
tgacacgatg cgggttttcc ggctgtggcg ctgctgctgt atgttgttgg atgacgatgt 2220
tacacagccg ctttaatactc tgtatcgcta tgccacgcag cttatggagg taaaagaatt 2280
cgccggcgca gcgcgacttt ttcaattgct gacgatatat gatgcctggt catttgacta 2340
ctggtttcgg ttaggggaaat gctgccaggg tcaaaaacat tggggggaag cgatatacgc 2400
ttatggagcg gcggcacaaa ttaagattga tgcgcgcgag gcgccatggg ccgcaacgga 2460
atgctatctc gcgtgtgata acgtctgtta tgcaatcaaa gcgttaaaag ccgtggtgctg 2520
tatttgcggc gagggtcagt aacatcaaat tctccgacag cgtgcagaaa agatgttaca 2580
gcaacttctt gacagagact aaaaatgaat cgaattcaca gtaatagcga cagcgccgca 2640
ggagtaaccg ccttaacaca tcatcactta agcaatgtca gttgcgttct ctcgggttcg 2700
ctgggaaagc gcgcagatcg tgtgaattct acttttggcg atggcaacgc cgctgtctgt 2760
ctatccggga aaattagtct tcaggaggca agcaatgcgt tgaagcaact gcttgatgcc 2820
gtacccggaa atcataagcg tccatcattg cctgactttt tgcagaccaa tcccgcggtt 2880
ttatcaatga tgatgacgtc attaatactc aacgtcttgc gtaataacgc tcaatcgta 2940
tgccaacagc ttgagcgggc aactgaggtg caaaatgcat tacgtaataa gcaggtaaaq 3000
gagtatcagg agcagatcca gaaagcgata gagcaggagg ataaagcgcg taaagcgggt 3060
atttttggcg ctatttttga ctggattacc ggcatatttg aaaccgtgat tggcgccctta 3120
aaaagtttgg aaggttttct gtccggaaat cccgcagaaa tggctagcgg cgtagcttat 3180
atggccgagc gttgtgcagg aatggttaaa gccggagccg aaacggcaat gatgtcggtt 3240
gctgaccacg atacctgtca ggcaattatt gacgtgacaa gtaagattca atttggttgt 3300
gaagccgtcg cgctggcact ggtgttttcc cagattggcc gtgcttttat ggcgacgaga 3360
ggtttatctg gcgcagctgc aaaagtgcct gactccggtt ttggcgagga agtggttgag 3420
cgtatggtag gtgcagggga agcagaaaata gaggagttag ctgaaaagt ttggcgaaga 3480
gtgagcgaaa gtttttccaa acaatttgag ccgcttgaa gcgtaaatggc tatggcgaat 3540
gagatggcag aggaggtgc cgagttttct cgtaacgtag aaaataatat gacgcgaagc 3600
gcgggaaaaa gctttacgaa agaggggggtg aaagccatgg caaaagaaag gcgcaaaaga 3660
gccctggaaa aatgtgtgca agaaggtgga aagttcctgt taaaaaatt ccgtaataaa 3720
gttctcttca atatgttcaa aaaaatcctg tatgccttac tgagggattg ttcatttaaa 3780
ggcttacagg ctatcagatg tgcaaccgag ggcccgatgc agatgaatac tggcatggtt 3840
aacacagaaa aagcgaagat cgaagaaaga atagagcaat taataactca gcaacgggtt 3900
ctggatttca taattgcaaca aacagaaaac cagaaaaaga tagaacaana acgcttagag 3960
gagctttata aggggacggg tgcgcgctt agagatgtat tagataccat tgatcactat 4020

```

ES 2 313 792 T3

agtagcgctt aggcgagaa agctggctat cgcgcttaat ctgaggataa aaatatggaa 4080
 gcgagtaacg tagcactggt attaccagcg ccttccttgt taacaccttc ttccactcca 4140
 tctcctcccg gggagggaa gggtagctga tcaatgcttc tgttatttga tgatatctgg 4200
 atqaaqctaa tggagcttgc caaaaagctg cgcgatatca tgcgcagcta taacgtagaa 4260
 aaacaacggc tggcctggga actgcaagtc aatgttttac agacgcaaat gaaaacaatt 4320
 gatgaagcgt ttagagcatc aatgattact gcgggtggcg caatgttgct gggtgtactg 4380
 acgataggat taggggcccgt aggcggggaa accggtctta tagcgggtca agccgtaggc 4440
 cacacagctg gggcgctcat gggcctgggg gctggtgtag cgcaacgtca aagtgatcaa 4500
 gataaagcga ttgcccgcct gcaacaaaat ggggcccaat cttataataa atccctgacg 4560
 gaaattatgg agaaagcaac tgaaattatg cagcaaatca tcggcggtgg gtcgtcactg 4620
 gtcacgggtc ttgctgaaat actccgggca ttaacgaggt aaacatgggt caagaaatag 4680
 agcaatgggt acgtcggcat caggtgttta ctgagcctgc atatttaggg gagaccgcca 4740
 tattacttgg gcagcagttt atattatcgc ctacctcgtt gatctatcgt attgaggcaa 4800
 aagaaatgat tatttctgag ttacggcgcc tgacgcccgg gcaacctcga ccacagcaat 4860
 tgtttcactt actgggactt ttacgcggga tatttctgca tcaccgcag ttaacatggt 4920
 taaagatggt gataatcacc gacgttcttg atgaaaaaaa agccatgcta cgcaggaaat 4980
 tattgoccat cctgacagta atgggagcga cctttacaca gcttgatggc gataactgga 5040
 cagtttttat cgcgagcat cttatccagc gacgttttta aatgacctc ctgacgtaaa 5100
 tcattatcac agcgaagtag caatcaatag gtatgatgat gaaagaagat cagaaaaata 5160
 aaataccgga agacattctg aaacagctat tatccgttga tccggaaaacc gtttatgcca 5220
 gtggttacgc ctcatggcag gagggggatt attcgcgcgc cgtaatcgat tttagttggc 5280
 tgggtgatgg ccagccatgg agttggcgtg cccatattgc attggctggc acctgagta 5340
 tgcttaagca atacacagc gccattaat tctatggaca tgccttgatg ctggatgcca 5400
 gccatccaga accggtttac caaacgggcg tctgtctcaa aatgatgggg gaacccgggt 5460
 tggcgagaga ggcttttcaa accgcaatca agatgagtta tgcggatgcc tcatggagt 5520
 agattcggca gaatggcga ataatggtg atactcttat tgcctaaata acagaacgaa 5580
 atatgaaat tcataatccg tcagcgga gtaatatagt cgtggtaat agtccctctt 5640
 ccgatataca agcgaaggag gtatcgcttc ctcccctga aattccagcg cctggcacc 5700
 ccgcagcccc tgtgctgctt acgcctgaac aaataaggca gcagagggat tatgcgatac 5760
 attttatgca atacactatt cgtgcgctgg gtgcgacagt cgtgtttggg ttatcggttg 5820
 ctgcagcggt aatttctggc ggggcaggat taccatttgc tattcttgcg ggggcggcgc 5880
 tcgtgattgc tattggggat gcttgcgtg cgtatcataa ttatcaatgc atatgacg 5940
 aaaaggagcc attacaacc gccagtata gcgttgctct tgtggtcagt gcgctggcct 6000
 taaaatgtgg ggcaagtctt aactgcgcta acaccctgc taattgtctt tctttattaa 6060
 tacgttcagc aatcgctatt tctatgttg ttttaccctt acagtttcca ctgcccgcg 6120
 ctgaaaaat tgcggcctct ttggacatgg ggagtgaat tacctccgtt agcctgacgg 6180
 cgataggtag ggtactggat tattgcctt cccgcccctc tggcgacgag caggaaaatt 6240
 ctgttgatga acttcagtc gatccagtg tgttattggc ggaacaaatg gcagcgtctt 6300
 gtcaatctgc tactacacct gcacctgat taatggacag ttctgatcat acatctcggg 6360
 gagaaccatg aaacctgtta gcccaaatgc tcaggttaga gggcaacgct ctgttaacgc 6420
 gcctgaggaa tcacctccat gtccctcatt gccacatcc gaaaccaata tggagagtgg 6480
 tagaatagga cctcaacaag gaaaagagcg ggtattggcc ggacttgca aacgagtgat 6540
 agagtgtttt ccaaaagaaa tttttagttg gcaaacgggt attttggcg gacagatttt 6600
 atgctgttcc gctggaatag cattaacagt gctaagtggt ggggagcgcg cgctcgtagc 6660
 cctggcaggg attggccttg ctattgccat cgcggatgtc gcctgtctta tctaccatca 6720
 taaacatcat ttgcttatgg ctccagcagc tataggcaat gccgtttttt atattgctaa 6780
 ttgtttcgcc aatcaacgca aaagtatggc gattgtctaa gccgtctccc tgggcggtag 6840
 attagcctta accgcgacgg taatgactca ttcatactgg agtggtagt tgggactaca 6900
 gccctattta tttagagcgtc ttaatgatat tacctatgga ctaatgagtt ttactcgctt 6960
 cggtaggat gggatggcaa tgaccggat gcaggtcagc agccatttat atcggtttgt 7020
 ggctcaggtg aacgtagcgc aaagtgcgc ttctcaggt tttacggat tataccggat 7080
 gttcatgtct tctcaaat tgcctatgtt ccagtatcct tacgatgtat ttattttaag 7140
 gaaaagcatt atggatattg cacaattagt ggatagctc tcccacatgg cgcaccaggc 7200
 aggcagggcc attaatgaca aaatgaatgg taatgatttg ctcaaccag aatcgatgat 7260
 taaagcgcaa tttgccttac agcagtatc tacatttat aattacgaaa gttcactgat 7320
 caaaatgac aaggaatgc ttagtgaat cattgctaaa atctgaagt attagcgagc 7380
 atgttcgagc gttgctgctg gaaatcatgt ttgcgggcgt taaccatagc ctgatttccc 7440
 aggtacatgc gatgttacca gcgctaacgg ttattgttcc ggataaaaaa ttacagttgg 7500
 tatgtctggc attattgttg gcgggtttta atgagccgct aaaaqcccg aaaaattttat 7560
 cggatataga tttgccagag gctatggcgc tgcgtctggt atttctcgca ccaaatgagg 7620
 ggtttgaaaa ttgaatatgt ctgatagag cgtagtgcct gtaagcactc aatcttatgt 7680
 aaagtcctct gcagaaccga gccaggagca aattaatttt ttgaacaaat tgcgaaaaga 7740
 tgaagcatcc accagtaacg ccagtgcctt attaccgcag gttatgttga ccagacaaat 7800
 ggatttatgt cagttaacgg taggcgtcga ttatcttgcc agaatatcag gcgcagcatc 7860
 gcaagcgctt aataagctgg ataacatggc atgaaggttc atcgatatgt atttctactg 7920
 gtccttacgt tctttcttac ggcagtgtgat gtggatcttt atcgctcatt gccagaagat 7980
 gaagcgaatc aatgctggc attacttatg cagcatcata ttgatgcgga aaaaaaacag 8040
 gaagaggtg gtgtaacctt acgtgtcgag cagtgcagtt ttattaatgc ggttgagcta 8100
 cttagactta accggttatcc gcataggcag tttacaacgg cggataagat gtttccggct 8160
 aatcagttag ttgtatcacc ccaggaaaga cagcagaaga ttaatttttt aaaaagaaca 8220
 agaattgaa gaaatgctgag tcagatggag ggcgtgatta atgcaaaagt gaccattgag 8280
 ctaccgactt atgataggg aagtaacgct tctccgagct cagttgcgct atttataaaa 8340
 tattcacctc aggtcaatat ggagggcctt cgggtaaaaa ttaagatttt aatagagatg 8400
 tcaatccctg ggttgcaata cagtaagatt agtatcttga tgcagcctgc tgaatttc 8457

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Creatogen Biosciences GmbH
5 <120> Sistema portador para vacunas
<130> 19130pwo sistema portador
<140> PCT/EP99/06514
<141> 1999-09-03
10 <150> EP 98116827.1
<151> 1998-09-04
<160> 69
15 <170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1
<211> 8457
20 <212> ADN
<213> *Salmonella*

25

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 313 792 T3

<400> 1

5 ctgcagttgt ccggttattg ctcgtcaagc gaacagatgc aaaaggtgag agcgactctc 60
 gaatcatggg gggatcatga tcgggatggg gtaatctgtg atgacttatt ggtacgagaa 120
 gtgcaggatg ttttgataaa aatgggttac ccgcatgctg aagtatccag cgaagggccg 180
 gggagcgtgt taattcatga tgatatacaa atggatcagc aatggcgcaa ggttcaacca 240
 ttacttgtag atattcccg gttattgcac tggcagatta gtcactctca tcagtctcag 300
 10 ggggatgata ttatttctgc gataatagag aacggtttag tggggcttgt caatgttagc 360
 ccaatgcggc gctcttttgt tatcagtggt gtactggatg aatctcatca acgcattttg 420
 caagaaacgt tagcagcatt aaagaaaaag gatcccgcctc tttctttaat ttatcaggat 480
 attgcgcctt cccatgatga aagcaagtat ctgcctgcgc cagtggcttg ctttgtacag 540
 agtcgccatg gtaattactt attactgacg aataaagagc gtttacgtgt aggggcatg 600
 ttacccaatg ggggagaaat tgtccatctg agtgccgatg tggtaacga taaacattat 660
 15 gatactttga ttaactatcc attagatttt aagtgagtgg aaaatgacaa ctttgacccg 720
 gttagaagat ttgctgcttc attcgcgtga agaggccaaa ggcataattt tacaattaag 780
 ggctgcccg gaaacagtag aagagaacaa cggcaagtta caggatccgc agcaatatca 840
 gcaaaacacc ttattgcttg aagcgatcga gcaggccgaa aatatcatca acattattta 900
 ttatcgttac cataacagc cactttagt gagtgagcaa gagtaagta aaaatatctt 960
 20 agagcctatc ccaccagcg ttaattggcg cagccagttt ggacacggat agcgcgcaa 1020
 aaccgcagcg tacacgtagt acgtgaggtt tgaactcgta cgtcgcctt tcgggcccgc 1080
 gctagcggcg ttcaaaacgc taacgcgttt tggcgagcac tgcccagggt caaaatggca 1140
 agtaaaatag cctaattgga taggctctta gttagcacgt taattatcta tcgtgtatat 1200
 ggaggggaat gatgataaag aaaaaggctg cgtttagtga atatcgtagt ttagagcaaa 1260
 25 gttacatgca gctaaatcac tgtcttaaaa aatttcacca aatccgggct aaggtgagtc 1320
 aacagcttgc tgaaaggga gagagcccca aaaatagcag agagacagag agtattcttc 1380
 ataacctatt tccacaaggc gttgccgggg ttaaccagga ggcgagaaag gatttaaaga 1440
 aatagtaag tttgtttaaa caactgaag tacgactgaa acaacttaat gctcaagccc 1500
 cgggtggagat accgtcagga aaaaacaaaa ggtaaaagcat aatgtcttca ggaaacatct 1560
 30 tatggggaag tcaaaaccct attgtgttta aaaaatagctt cggcgtcagc aacgctgata 1620
 ccgggagcca ggaatgactta tcccagcaaa atccgtttgc cgaagggtat ggtgttttg 1680
 ttattctctt tatggttatt caggctatcg caaataataa atttattgaa gtccagaaga 1740
 acgctgaacg tgccagaaat acccaggaaa agtcaaatga gatggatgag gtgattgcta 1800
 aagcagccaa aggggatgct aaaacccaaag aggaggtgcc tgaggatgta attaaatata 1860
 35 tgctgtataa tgggtattctc atcgatggtg tgaccattga tgattatatg gctaaatatg 1920
 gcgacatgg gaagctggat aaaggtggcc tacaggcgat caaagcggct ttggataatg 1980
 acgccaaccg gaataaccgatt ctatgagtc aggggcaagat acaattcaa aaaatgtctc 2040
 aggagcttaa cgtgtctctt acccaactga cagggttat cagtaagtgg ggggaaattt 2100
 ccagtatgat agcgcagaaa acgtactcat gaaaaaagac ccgacctac aacaggcaca 2160
 40 tgacacgatg cgggttttcc ggctggcggt ctcgtgctg atgtgtgttg atgacgatgt 2220
 tacacagccg cttaatactc tgtatcgcta tggcacgag cttatggagg taaaagaatt 2280
 cgccggcgca gcgcgacttt ttcaattgct gacgatatat gatgcctggc catttgacta 2340
 ctggtttcgg ttagggggaat gctgccaggc tcaaaaacat tgggggggaa cgatatacgc 2400
 ttatcgacgc gcggcacaaa ttaagattga tgcgccgag cgcgccatgg ccgcagcgga 2460
 atgctatctc gcgtgtgata acgtctgtta tgcaatcaaa gcgttaaaag ccgtggtgcg 2520
 45 tatttgccgc gaggtcagtg aacatcaaat tctccgacag cgtgcagaaa agatgttaca 2580
 gcaactttct gacaggagct aaaaatgaat cgaattcaca gtaatagcga cagcgccgca 2640
 ggagtaaccg ccttaacaca tcatcactta agcaatgtca gttgcgtttc ctcggtttcg 2700
 ctgggaaagc gccagcatcg tgtgaattct acttttgccg atggcaacgc cgcgtgtctg 2760
 ctatccggga aaattagtct tcaggaggca agcaatgcgt tgaagcaact gcttgatgcc 2820
 50 gtacccggaa atcataagcg tccatcattg cctgactttt tgcagaccaa tcccgcggtt 2880
 ttatcaatga tgatgacgtc attaatactc aacgtctttg gtaataacgc tcaatcgcta 2940
 tgccaacagc ttgagcgggc aactgaggtg caaaatgcat tacgtaataa gcaggtaaaag 3000
 gagtatcagg agcagatcca gaaagcgata gagcaggagg ataaagcgcg taaagcggg 3060
 atttttggcg ctatttttga ctggattacc ggcataattt aaaccgtgat tggcgcttca 3120
 55 aaagtgtgag aaggtttctt gtcgggaaat cccgcagaaa tggctagcgg cgtagcttat 3180
 atggccgag gttgtgcagg aatggttaaa gccggagccg aaacggcaat gatgtgcgt 3240
 gctgaccacg atacctgca ggcaattatt gacgtgacaa gtaagattca atttggttgt 3300

ES 2 313 792 T3

5
 10
 15
 20
 25
 30
 35
 40
 45
 50
 55
 60

gaagccgctg cgctggcact ggatgttttc cagattggcc gtgcttttat ggcgacgaga 3360
 ggttttatctg gcgcagctgc aaaagtgcct gactccggtt ttggcgagga agtggttgag 3420
 cgtatggtag gtgcagggga agcagaaata gaggagttgg ctgaaaagt ttgcgaagaa 3480
 gtgagcgaaa gtttttccaa acaatttgag ccgcttgaac gtgaaatggc tatggcgaat 3540
 gagatggcag aggaggctgc cgagttttct cgtaacgtag aaaataatat gacgcgaagc 3600
 gcgggaaaaa gctttacgaa agagggggtg aaagccatgg caaaagaagc ggcaaaagaa 3660
 gccctgaaaa aatgtgtgca agaaggtgga aagttcctgt taaaaaatt ccgtaataaa 3720
 gttctcttca atatgttcaa aaaaatcctg tatgccttac tgagggattg ttcattttaa 3780
 ggcttacagg ctatcagatg tgcaaccgag ggcgccagtc agatgaatac tggcatggtt 3840
 aacacagaaa aagcgaagat cgaaaagaaa atagagcaat taataactca gcaacggttt 3900
 ctggatttca taatgcaaca aacagaaaac cagaaaaaga tagaacaana acgcttagag 3960
 gagctttata aggggacggg tgcccgctct agagatgtat tagataccat tgatcactat 4020
 agtagcgctt agcgaggaat agctggctat gcgccttaat ctgaggataa aaatatggaa 4080
 gcgagtaacg tagcactggt attaccagcg ccttccttgt taacaccttc tccactcca 4140
 tctccctccg gggagggaat gggtagtcaa tcaatgcttc tgtatttga tgatatctgg 4200
 atgaagctaa tggagcttgc caaaagctg cgcgatatca tgccgagcta taacgtagaa 4260
 aaacaacggc tggcctggga actgcaagtc aatgttttac agacgcaaat gaaaaaatt 4320
 gatgaagcgt tttagagcatc aatgattact gcgggtggcg caatgtgtgc ggggtgactg 4380
 acgataggat taggggctgt aggggggaa accggtctta tagcgggtca agccgtaggc 4440
 cacacagctg gggcgctcat gggcctgggg gctggttag cgcaacgcta aagtgtacaa 4500
 gataaagcga ttgccgacct gcaacaaaat ggggccaat cttataataa atccctgacg 4560
 gaaattatgg agaagcaac tgaaattatg cagcaaatca tcggcgtagg tgctgactctg 4620
 gtacaggttc ttgctgaat actccgggca ttaacgaggt aaacatgggt caagaaatag 4680
 agcaatggtt acgtcgcat caggtgttta ctgagcctgc atatttaggg gagaccgcca 4740
 tattacttgg gcagcagttt atattatcgc ctacctggt gatctatcgt attgaggcaa 4800
 aagaaatgat tatltgtgag ttacggcgcc tgacggccgg gcaacctcga ccacagcaat 4860
 tgtttcactt actgggactt ttacggcgga tatltgtgca tcaccgcag ttaacatggt 4920
 taaagatggt gataatcacc gacgttctgg atgaaaaaaa agccatgcta cgcaggaat 4980
 tattgcatc cctgacagta atgggagcga cctttacaca gcttgatggc gataactgga 5040
 cagttttatc cgccgagcat cttatccagc gacgttttta aatgaccttc ctgacgtaaa 5100
 tcattatcac gtgaaaataa caatcaatag gtatgatgat gaaagaagat cagaaaaata 5160
 aaatacccca agacattctg aaacagctat tatccgttga tccggaacc gtttatgcca 5220
 gtggttacgc ctcatggcag gagggggatt attcgcgcgc cgtaatcgat ttragggtgc 5280
 tggtagtggc ccagccatgg agttggcgctg cccatattgc attggctggc acctgtaga 5340
 tgcttaagaa atacacgacg gccattaat tctatggaca tgccctgatg ctggatgcca 5400
 gccatccaga accgggttac caaacgggcg tctgtctcaa aatgatgggg gaacccgggt 5460
 tggcgagaga ggccttttcaa accgcaatca agatgagtta tgccgatgcc tcatggagtg 5520
 agattcgcca gaatgcgcaa ataattggtt atactcttat tgcttaataa acagaacgaa 5580
 atatgaaaat tcatattccg tcagcgcgaa gtaatatagt cgtatgtaat agtcctcctt 5640
 ccgatataca agcgaaggag gtatcgtttc ctcccctga aattccagcg cctggcacc 5700
 ccgacgcccc tgtgctgctt acgcttgaac aaataaggca gcagagggat tatgcgatac 5760
 attttatgca atacactatt cgtgcgctgg gtgcgacagt cgtgtttggg ttatcggttg 5820
 ctgcagcggt aatttctgac ggggcaggat taccattgc tattcttgcg gggcgcgcg 5880
 tcgtgattgc tattggggat gcttgcctgt cgtatcataa ttatcaatcg atatgtcagc 5940
 aaaaggagcc attacaacc gccagtata gcgttgctct tgtggtcagt gcgctggcct 6000
 taaaatgtgg ggcaagtctt aactgcgcta acaccttgc taattgtctt tctttattaa 6060
 tacgtttcag aatcgctatt tctatgttgg ttttaccctt acagtttcca ctgcccgcg 6120
 ctgaaaaat tgcggcctct ttggacatgg ggagtgaat tacctccgtt agcctgacgg 6180
 cgatagggtg ggtactggat tattgccttg cccgccccct tggcgacgat caggaaaatt 6240
 ctgttgatga acttcatgcc gatcccagt tgttattggc ggaacaaatg gcagcgctct 6300
 gtcaatctgc tactacacct gcacctgcat taatggacag ttctgatcat acatctcggg 6360
 gagaaccatg aaacctgtta gcccaaatgc tcaggtagga gggcaacgta ctgttaacgc 6420
 gcctgaggaa tcacctccat gtccttcatt gccacatccg gaaaccaata tggagagtgg 6480
 tagaatagga cctcaacaag gaaaagagcg ggtattggcc ggaacttgcga aacgagtgat 6540
 agagtgtttt ccaaaagaaa ttttttagtt gcaaacggtt attttggggc gacagatttt 6600
 atgctgttcc gctggaatag cattaacagt gctaagtgtt ggaggcgcg cgctcgtagc 6660
 cctggcaggg attggccttg ctattgccat cgcggatgtc gcctgtctta tctaccatca 6720
 taaacatcat ttgcttatgg ctacgacag tataggcaat gccgtttttt atattgctaa 6780
 ttgtttcgcc aatcaacgca aaagtatggc gattgctaaa gccgtctccc tgggcggtag 6840
 attagcctta accgcgacgg taatgactca ttcatactgg agtggtatgt tgggactaca 6900
 gcctcattta tttagagcgtc ttaatgatat tacctatgga ctaatgagtt ttactcgctt 6960
 cggtatggat gggatggcaa tgaccgggat gcaggtcagc agccattat atcgtttgct 7020
 ggctcaggtt acgcccagaa aacgtgcgcc ggagtaatcg ttttcaggtt tataccggat 7080
 gttcattgct tcttaaaatt tgctatgttg ccagtatcct tacgatgat ttatttttaa 7140
 gaaaagcatt atggatatgt cacaaattag ggatatgctc tccacatgg cgaccaggc 7200

ES 2 313 792 T3

5 aggccaggcc attaatgaca aaatgaatgg taatgatttg ctcaaccag aatcgatgat 7260
 taaagcgcaa ttgctctac agcagtattc tacatttatt aattacgaaa gttcactgat 7320
 caaatgatac aaggatatgc ttagtggaat cattgctaaa atctgaagtt attagcgacg 7380
 atgttcgacg gttgctgctg gaaatcatgt ttgcgggctg taaccatagc ctgatttccc 7440
 aggtacatgc gatgttacca gcgctaacgg ttattgttcc ggataaaaaa ttacagttgg 7500
 tatgtctgac attattgttg gcgggtttaa atgagccgct aaaagccgag aaaattttat 7560
 cggatataga ttgcccagag gctatggcgc tgcgtctgtt atttcctgca ccaaatgagg 7620
 gggttgaaaa ttgaatattt ctgatatgag cgtagtgcct gtaagcactc aatcttatgt 7680
 10 aaagtcctct gcagaaccga gccaggagca aattaatttt ttgaaacaat tgctgaaaag 7740
 tgaagcatcc accagtaacg ccagtgcctt attaccgcag gttatgttga ccagacaaat 7800
 ggattatatg cagttaacgg taggcgtcga ttatcttgcc agaatatcag gcgcagcatc 7860

15 gcaagcgctt aataagctgg ataacatggc atgaaggctt atcgatatgt atttcttact 7920
 gtccttacgt tcttctctac ggcattgtgat gtggatcttt atcgctcatt gccagaagat 7980
 gaagcgatac aaatgctggc attacttatg cagcatcata ttgatgcgga aaaaaaacag 8040
 gaagaggatg gtgtaacctt acgtgtcgag cagtcgcagt ttattaatgc ggttgagcta 8100
 cttagactta acggttatcc gcataggcag ttacaacgg cggataagat gtttccggct 8160
 aatcagttag tggatcacc ccaggaagaa cagcagaaga ttaatttttt aaaagaacaa 8220
 20 agaattgaag gaatgctgag tcagatggag ggcgtgatta atgcaaaagt gaccattgag 8280
 ctaccgactt atgatgagg aagtaacgct tctccgagct cagttgccgt atttataaaa 8340
 tattcacctc aggtcaatat ggaggccttt cgggtaaaaa ttaagatttt aatagagatg 8400
 tcaatccctg ggttgcaata cagtaagatt agtatcttga tgcagcctgc tgaattc 8457

25 <210> 2
 <211> 3921
 <212> ADN
 30 <213> *Salmonella*

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 313 792 T3

<400> 2

```

5      agcattgaca taaaaaacta caatttgaaa aattatttat taaataaact gttacgatgt 60
      ttttacatcg ccatcttatt aaaaagtaat tgtagtcacg gactgggtta tatatgaaga 120
      aatttatctt cctaatagata acaccatcga ttaattcttct gatgaaacta tatgtactgc 180
      gatagtgtac aagtgcctaaa gattttgcaa caggcaactg gagggaagca ttatgaattt 240
      gctcaatctc aagaatacgc tgcaaacatc ttttagtaac aggctaactt ttttattttt 300
      attaacaaca ataattattt ggctgctatc tgtgcttacc gcagcttata tatcaatggt 360
10     tcagaaacgg cagcatataa tagaggattt atccgttcta tccgagatga atattgtact 420
      aagcaatcaa cgggttgaag aagctgaacg tgacgctaaa aatttaattgt atcaatgctc 480
      attagcgact gagattcatc ataacgatat tttccctgag gtgagccggc atctatctgt 540
      cggtccttca aattgcacgc cgacgctaaa cggagagaag caccgtctct tctgcacgtc 600
      ctctgatatc gatgaaaata gctttcgtcg cgatagtgtt attcttaatc ataaaaatga 660
      gatttcgtta ttatctactg ataacccttc agattattca actctacagc ctttaacgcg 720
15     aaaaagcttt cctttatacc caaccatgc cgggttttac tggagtgaac cagaatacat 780
      aaacggcaaa ggatggcacg cttccgttgc ggttgccgat cagcaaggcg tattttttga 840
      ggtgacgggt aaacttcccg atctcattac taagagccac ctgccattag atgatatgat 900
      tcgagtatgg ctggatcaaa acaaccactt attgcccgtt tcatacatcc cgcaaaaaat 960
      acgtacacag ttagaaaatg taacgctgca tgatggatgg cagcaaatcc ccgatttctt 1020
20     gatattacgc acaaccctgc atggcccggt atggagctcg gttacgctgt acccatcagg 1080
      taatctacat aatcgcatct taaaaattat ctttcaacaa atccccctta cattaacagc 1140
      attggtgttg atgacgtcgg ctttttgcgt gttactacat cgctcactgg ccaaacctgt 1200
      atggcgtttt gtcgatgtca ttaataaaac cgcaactgca ccgctgagca cacgtttacc 1260
      agcacaacga ctggatgaat tagatagtat tgccgggtgct ttaaccaaac tgcttgatac 1320
25     tctacaagtc caatacgaca atctggaaaa caaagtgcga gagcgcaacc aggcgtctaaa 1380
      tgaagcaaaa aaacgcgctg agcagagctaa caaacgtaaa agcatttcac ttacggtaat 1440
      aagtcagtga ttacgtactc cgatgaatgg cgtactcggg gcaattgaat tattacaaac 1500
      cacccttcta aacatagagc aacaaggatt agctgatacc gccagaaatt gtacactgtc 1560
      tttgttagct attattaata atctgctgga tttttcacgc atcgagtctg gtcattttac 1620
      attacatatg gaagaaacag cgttactgcc gttactggac caggcaatgc aaaccatcca 1680
30     ggggccagcg caaagcaaaa aactgtcatt acgtactttt gtcgggtcaac atgtccctct 1740
      ctattttcat accgcacgta tccgtttacg gcaaattttg gttaatttac tcgggaacgc 1800
      ggtaaaaatt accgaaacgc gagggatagc tctgacggtc aagcgtcatg aggaacaatt 1860
      aatatttctg gttagcgata gcggtaaaag gattgaaata cagcagcagt ctcaaatctt 1920
      tactgctttt tatcaagcag acacaaaatc gcaaggatca ggaattggac tgactattgc 1980
35     gtcaagcctg gctaaaaatg tgggcggtaa tctgacacta aaaagtgtcc ccggggttgg 2040
      aacctgtgtc tcgctagtat tacccttaca agaataccag ccgcctcaac caattaaagg 2100
      gacgctgtca gcgcggttct gcctgcacgc gcaactggct tgctggggaa tacgcggtga 2160
      accaccccac cagcaaaatg cgcttctcaa cgcagagctt ttgtatttct ccggaanaat 2220
      ctacgcactg gcgcacacgt taatattgtg tacaccaaat atgccagtaa taaataattt 2280
40     gttaccaccc tggcagttgc agattctttt ggttgatgat gccgatatta atcgggatat 2340
      catcgccaaa atgcttgtca gcctgggcca acacgtcact attgccgcca gtatgaacga 2400
      ggctctgcat ttatcaaac agcagcgatt cgatttagta ctgattgaca ttgaatgcc 2460
      agaaatagat ggtattgaat gtgtacgatt atggcatgat gagccgaata atttagatcc 2520
      tgactgcatg tttgtggcac tatccgctag cgtagcgaca gaagatattc atcgttgtaa 2580
45     aaaaaatggg attcacatt acattacaaa accagtgcga ttggctacct tagctcgcta 2640
      catcagttat gccgcagaat accaaacttt acgaaatata gagctacagg agcaggatcc 2700
      gagtgcctgc tcagcgctac tggcgacaga tgatatggtc attaatagca agattttcca 2760
      atcactggac ctcttgcgtg ctgatattga aaatgccgta tcggctggag aaaaaatcga 2820
      tcagttaatt cacacattaa aaggctgttt aggtcaaata gggcagactg aattggtatg 2880
50     ctatgtcata gacattgaga atcgcgtaaa aatggggaaa atcatcgcg tcggaggaat 2940
      aaccgactta cgccagaaaa tacgtatgat cttcaaaaac tacaccatta cttaatat 3000
      tcttaatttt cgcgaggcca gcaaaatgaa agaataaag atcttattag tagacgatca 3060
      tgaaatcatc attaacggca ttatgaatgc cttattacc tggcctcatt ttaaaattgt 3120
      agagcatggt aaaaatggct ttgaggttta taatgcctgt tgtgcatacg agcctgacat 3180
55     acttatcctt gatcttagtc tacctggcat caatggcctg gatattcatt ctcaattaca 3240
      tcagcggttg ccagcaatga atattctggt ttacacagca taccaacaag agtatatgac 3300
      cattaaaaat tttagccgag gtgctaattg ctatgtttta aaaagcagta gtcagcaagt 3360
      tctgttagcg gcattgcaaa cagtagcagt aaacaagcgt tacattgacc caacgttgaa 3420
      tcgggaagct atcctggctg aattaaacgc tgacacgacc aatcatcaac tgcttacttt 3480
60     gcgcgagcgt caggtttctta aacttattga cgaggggtat accaatcatg ggatcagcga 3540
      aaagctacat atcagtataa aaaccgtcga aacacaccgg atgaatatga tgagaaagct 3600
      acaggttcat aaagtgcacg agttacttaa ctgtgcccgga agaattgaggt taatagagta 3660
      ttaaccaggg gcgtccgatg gtattaaaga ttggtcatat ttgatgagc cttacgccac 3720
      gcagttatgc tcattatcga caaaatccat acggatgccc tggtagccgc caccatttat 3780
      cactacctta gtcttcattt gatcatgata tagtagaatc cccttattta acgggcttta 3840
65     ccatgtcgta ttctatcgcc gaatttgcca gactatgcgg tatcaatgcc gccacgctaa 3900
      gggcatggca gcgacgctat g                                     3921

```

ES 2 313 792 T3

<210> 3
 <211> 327
 <212> ADN
 5 <213> *Salmonella*
 <220>
 <221> CDS
 10 <222> (1)..(324)
 <400> 3

```

    atg atg ata aag aaa aag gct gcg ttt agt gaa tat cgt gat tta gag   48
    Met Met Ile Lys Lys Lys Ala Ala Phe Ser Glu Tyr Arg Asp Leu Glu
    1           5           10          15

    caa agt tac atg cag cta aat cac tgt ctt aaa aaa ttt cac caa atc   96
    Gln Ser Tyr Met Gln Leu Asn His Cys Leu Lys Lys Phe His Gln Ile
                20           25           30

    cgg gct aag gtg agt caa cag ctt gct gaa agg gca gag agc ccc aaa  144
    Arg Ala Lys Val Ser Gln Gln Leu Ala Glu Arg Ala Glu Ser Pro Lys
        35           40           45

    aat agc aga gag aca gag agt att ctt cat aac cta ttt cca caa ggc  192
    Asn Ser Arg Glu Thr Glu Ser Ile Leu His Asn Leu Phe Pro Gln Gly
        50           55           60

    gtt gcc ggg gtt aac cag gag gcc gag aag gat tta aag aaa ata gta  240
    Val Ala Gly Val Asn Gln Glu Ala Glu Lys Asp Leu Lys Lys Ile Val
        65           70           75           80

    agt ttg ttt aaa caa ctt gaa gta cga ctg aaa caa ctt aat gct caa  288
    Ser Leu Phe Lys Gln Leu Glu Val Arg Leu Lys Gln Leu Asn Ala Gln
                85           90           95

    gcc ccg gtg gag ata ccg tca gga aaa aca aaa agg taa             327
    Ala Pro Val Glu Ile Pro Ser Gly Lys Thr Lys Arg
        100           105
  
```

40 <210> 4
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> *Salmonella*
 45 <400> 4

```

    Met Met Ile Lys Lys Lys Ala Ala Phe Ser Glu Tyr Arg Asp Leu Glu
    1           5           10          15

    Gln Ser Tyr Met Gln Leu Asn His Cys Leu Lys Lys Phe His Gln Ile
        20           25           30

    Arg Ala Lys Val Ser Gln Gln Leu Ala Glu Arg Ala Glu Ser Pro Lys
        35           40           45

    Asn Ser Arg Glu Thr Glu Ser Ile Leu His Asn Leu Phe Pro Gln Gly
        50           55           60

    Val Ala Gly Val Asn Gln Glu Ala Glu Lys Asp Leu Lys Lys Ile Val
        65           70           75           80

    Ser Leu Phe Lys Gln Leu Glu Val Arg Leu Lys Gln Leu Asn Ala Gln
        85           90           95

    Ala Pro Val Glu Ile Pro Ser Gly Lys Thr Lys Arg
        100           105
  
```

ES 2 313 792 T3

<210> 5

<211> 591

<212> ADN

5 <213> *Salmonella*

<220>

<221> CDS

10 <222> (1)..(588)

<400> 5

```

15      atg tct tca gga aac atc tta tgg gga agt caa aac cct att gtg ttt   48
      Met Ser Ser Gly Asn Ile Leu Trp Gly Ser Gln Asn Pro Ile Val Phe
          1             5             10             15

20      aaa aat agc ttc ggc gtc agc aac gct gat acc ggg agc cag gat gac   96
      Lys Asn Ser Phe Gly Val Ser Asn Ala Asp Thr Gly Ser Gln Asp Asp
          20             25             30

      tta tcc cag caa aat ccg ttt gcc gaa ggg tat ggt gtt ttg ctt att   144

25      Leu Ser Gln Gln Asn Pro Phe Ala Glu Gly Tyr Gly Val Leu Leu Ile
          35             40             45

      ctc ctt atg gtt att cag gct atc gca aat aat aaa ttt att gaa gtc   192
      Leu Leu Met Val Ile Gln Ala Ile Ala Asn Asn Lys Phe Ile Glu Val
          50             55             60

30      cag aag aac gct gaa cgt gcc aga aat acc cag gaa aag tca aat gag   240
      Gln Lys Asn Ala Glu Arg Ala Arg Asn Thr Gln Glu Lys Ser Asn Glu
          65             70             75             80

35      atg gat gag gtg att gct aaa gca gcc aaa ggg gat gct aaa acc aaa   288
      Met Asp Glu Val Ile Ala Lys Ala Ala Lys Gly Asp Ala Lys Thr Lys
          85             90             95

40      gag gag gtg cct gag gat gta att aaa tac atg cgt gat aat ggt att   336
      Glu Glu Val Pro Glu Asp Val Ile Lys Tyr Met Arg Asp Asn Gly Ile
          100            105            110

45      ctc atc gat ggt atg acc att gat gat tat atg gct aaa tat ggc gat   384
      Leu Ile Asp Gly Met Thr Ile Asp Asp Tyr Met Ala Lys Tyr Gly Asp
          115            120            125

      cat ggg aag ctg gat aaa ggt ggc cta cag gcg atc aaa gcg gct ttg   432
      His Gly Lys Leu Asp Lys Gly Gly Leu Gln Ala Ile Lys Ala Ala Leu
          130            135            140

50      gat aat gac gcc aac cgg aat acc gat ctt atg agt cag ggg cag ata   480
      Asp Asn Asp Ala Asn Arg Asn Thr Asp Leu Met Ser Gln Gly Gln Ile
          145            150            155            160

55      aca att caa aaa atg tct cag gag ctt aac gct gtc ctt acc caa ctg   528
      Thr Ile Gln Lys Met Ser Gln Glu Leu Asn Ala Val Leu Thr Gln Leu
          165            170            175

60      aca ggg ctt atc agt aag tgg ggg gaa att tcc agt atg ata gcg cag   576
      Thr Gly Leu Ile Ser Lys Trp Gly Glu Ile Ser Ser Met Ile Ala Gln
          180            185            190

      aaa acg tac tca tga   591
65      Lys Thr Tyr Ser
          195

```

ES 2 313 792 T3

<210> 6

<211> 196

<212> PRT

5 <213> *Salmonella*

<400> 6

10

Met Ser Ser Gly Asn Ile Leu Trp Gly Ser Gln Asn Pro Ile Val Phe
1 5 10 15

15

Lys Asn Ser Phe Gly Val Ser Asn Ala Asp Thr Gly Ser Gln Asp Asp
20 25 30
Leu Ser Gln Gln Asn Pro Phe Ala Glu Gly Tyr Gly Val Leu Leu Ile
35 40 45

20

Leu Leu Met Val Ile Gln Ala Ile Ala Asn Asn Lys Phe Ile Glu Val
50 55 60

25

Gln Lys Asn Ala Glu Arg Ala Arg Asn Thr Gln Glu Lys Ser Asn Glu
65 70 75 80

Met Asp Glu Val Ile Ala Lys Ala Ala Lys Gly Asp Ala Lys Thr Lys
85 90 95

30

Glu Glu Val Pro Glu Asp Val Ile Lys Tyr Met Arg Asp Asn Gly Ile
100 105 110

Leu Ile Asp Gly Met Thr Ile Asp Asp Tyr Met Ala Lys Tyr Gly Asp
115 120 125

35

His Gly Lys Leu Asp Lys Gly Gly Leu Gln Ala Ile Lys Ala Ala Leu
130 135 140

40

Asp Asn Asp Ala Asn Arg Asn Thr Asp Leu Met Ser Gln Gly Gln Ile
145 150 155 160

Thr Ile Gln Lys Met Ser Gln Glu Leu Asn Ala Val Leu Thr Gln Leu
165 170 175

45

Thr Gly Leu Ile Ser Lys Trp Gly Glu Ile Ser Ser Met Ile Ala Gln
180 185 190

Lys Thr Tyr Ser
195

50

<210> 7

<211> 1455

55 <212> ADN

<213> *Salmonella*

<220>

<221> CDS

60

<222> (1)..(1452)

65

ES 2 313 792 T3

<400> 7

```

5      atg aat cga att cac agt aat agc gac agc gcc gca gga gta acc gcc   48
      Met Asn Arg Ile His Ser Asn Ser Asp Ser Ala Ala Gly Val Thr Ala
        1             5             10             15

      tta aca cat cat cac tta agc aat gtc agt tgc gtt tcc tcg ggt tcg   96
      Leu Thr His His His Leu Ser Asn Val Ser Cys Val Ser Ser Gly Ser
    10              20              25              30

      ctg gga aag cgc cag cat cgt gtg aat tct act ttt ggc gat ggc aac   144
      Leu Gly Lys Arg Gln His Arg Val Asn Ser Thr Phe Gly Asp Gly Asn
        35              40              45

    15      gcc gcg tgt ctg cta tcc ggg aaa att agt ctt cag gag gca agc aat   192
      Ala Ala Cys Leu Leu Ser Gly Lys Ile Ser Leu Gln Glu Ala Ser Asn
        50              55              60

    20      gcg ttg aag caa ctg ctt gat gcc gta ccc gga aat cat aag cgt cca   240
      Ala Leu Lys Gln Leu Leu Asp Ala Val Pro Gly Asn His Lys Arg Pro
        65              70              75              80

      tca ttg cct gac ttt ttg cag acc aat ccc gcg gtt tta tca atg atg   288
    25      Ser Leu Pro Asp Phe Leu Gln Thr Asn Pro Ala Val Leu Ser Met Met
        85              90              95

      atg acg tca tta ata ctc aac gtc ttt ggt aat aac gct caa tcg tta   336
      Met Thr Ser Leu Ile Leu Asn Val Phe Gly Asn Asn Ala Gln Ser Leu
        100             105             110

    30      tgc caa cag ctt gag cgg gca act gag gtg caa aat gca tta cgt aat   384
      Cys Gln Gln Leu Glu Arg Ala Thr Glu Val Gln Asn Ala Leu Arg Asn
        115             120             125

    35      aag cag gta aag gag tat cag gag cag atc cag aaa gcg ata gag cag   432
      Lys Gln Val Lys Glu Tyr Gln Glu Gln Ile Gln Lys Ala Ile Glu Gln
        130             135             140

      gag gat aaa gcg cgt aaa gcg ggt att ttt ggc gct att ttt gac tgg   480
    40      Glu Asp Lys Ala Arg Lys Ala Gly Ile Phe Gly Ala Ile Phe Asp Trp
        145             150             155             160

      att acc ggc ata ttt gaa acc gtg att ggc gcc tta aaa gtt gtg gaa   528
    45      Ile Thr Gly Ile Phe Glu Thr Val Ile Gly Ala Leu Lys Val Val Glu
        165             170             175

      ggt ttt ctg tcc gga aat ccc gca gaa atg gct agc gcc gta gct tat   576
      Gly Phe Leu Ser Gly Asn Pro Ala Glu Met Ala Ser Gly Val Ala Tyr
        180             185             190

    50      atg gcc gca ggt tgt gca gga atg gtt aaa gcc gga gcc gaa acg gca   624
      Met Ala Ala Gly Cys Ala Gly Met Val Lys Ala Gly Ala Glu Thr Ala
        195             200             205

      atg atg tgc ggt gct gac cac gat acc tgt cag gca att att gac gtg   672
    55      Met Met Cys Gly Ala Asp His Asp Thr Cys Gln Ala Ile Ile Asp Val
        210             215             220

      aca agt aag att caa ttt ggt tgt gaa gcc gtc gcg ctg gca ctg gat   720

```

ES 2 313 792 T3

Thr Ser Lys Ile Gln Phe Gly Cys Glu Ala Val Ala Leu Ala Leu Asp
 225 230 235 240
 5 gtt ttc cag att ggc cgt gct ttt atg gcg acg aga ggt tta tct ggc 768
 Val Phe Gln Ile Gly Arg Ala Phe Met Ala Thr Arg Gly Leu Ser Gly
 245 250 255
 10 gca gct gca aaa gtg ctt gac tcc ggt ttt ggc gag gaa gtg gtt gag 816
 Ala Ala Ala Lys Val Leu Asp Ser Gly Phe Gly Glu Glu Val Val Glu
 260 265 270
 15 cgt atg gta ggt gca ggg gaa gca gaa ata gag gag ttg gct gaa aag 864
 Arg Met Val Gly Ala Gly Glu Ala Glu Ile Glu Glu Leu Ala Glu Lys
 275 280 285
 20 ttt ggc gaa gaa gtg agc gaa agt ttt tcc aaa caa ttt gag ccg ctt 912
 Phe Gly Glu Glu Val Ser Glu Ser Phe Ser Lys Gln Phe Glu Pro Leu
 290 295 300
 25 gaa cgt gaa atg gct atg gcg aat gag atg gca gag gag gct gcc gag 960
 Glu Arg Glu Met Ala Met Ala Asn Glu Met Ala Glu Glu Ala Ala Glu
 305 310 315 320
 30 ttt tct cgt aac gta gaa aat aat atg acg cga agc gcg gga aaa agc 1008
 Phe Ser Arg Asn Val Glu Asn Asn Met Thr Arg Ser Ala Gly Lys Ser
 325 330 335
 35 ttt acg aaa gag ggg gtg aaa gcc atg gca aaa gaa gcg gca aaa gaa 1056
 Phe Thr Lys Gly Val Lys Ala Met Ala Lys Glu Ala Ala Lys Glu
 340 345 350
 40 gcc ctg gaa aaa tgt gtg caa gaa ggt gga aag ttc ctg tta aaa aaa 1104
 Ala Leu Glu Lys Cys Val Gln Glu Gly Gly Lys Phe Leu Leu Lys Lys
 355 360 365
 45 ttc cgt aat aaa gtt ctc ttc aat atg ttc aaa aaa atc ctg tat gcc 1152
 Phe Arg Asn Lys Val Leu Phe Asn Met Phe Lys Lys Ile Leu Tyr Ala
 370 375 380
 50 tta ctg agg gat tgt tca ttt aaa ggc tta cag gct atc aga tgt gca 1200
 Leu Leu Arg Asp Cys Ser Phe Lys Gly Leu Gln Ala Ile Arg Cys Ala
 385 390 395 400
 55 acc gag ggc gcc agt cag atg aat act ggc atg gtt aac aca gaa aaa 1248
 Thr Glu Gly Ala Ser Gln Met Asn Thr Gly Met Val Asn Thr Glu Lys
 405 410 415
 60 gcg aag atc gaa aag aaa ata gag caa tta ata act cag caa cgg ttt 1296
 Ala Lys Ile Glu Lys Lys Ile Glu Gln Leu Ile Thr Gln Gln Arg Phe
 420 425 430
 65 ctg gat ttc ata atg caa caa aca gaa aac cag aaa aag ata gaa caa 1344
 Leu Asp Phe Ile Met Gln Gln Thr Glu Asn Gln Lys Lys Ile Glu Gln
 435 440 445
 70 aaa cgc tta gag gag ctt tat aag ggg acg ggt gcc gcg ctt aga gat 1392
 Lys Arg Leu Glu Glu Leu Tyr Lys Lys Gly Thr Gly Ala Ala Leu Arg Asp
 450 455 460
 75 gta tta gat acc att gat cac tat agt agc gtt cag gcg aga ata gct 1440
 Val Leu Asp Thr Ile Asp His Tyr Ser Ser Val Gln Ala Arg Ile Ala
 465 470 475 480
 80 ggc tat cgc gct taa 1455
 Gly Tyr Arg Ala

ES 2 313 792 T3

<210> 8

<211> 484

<212> PRT

5 <213> *Salmonella*

<400> 8

10

Met Asn Arg Ile His Ser Asn Ser Asp Ser Ala Ala Gly Val Thr Ala
1 5 10 15

15

Leu Thr His His His Leu Ser Asn Val Ser Cys Val Ser Ser Gly Ser
20 25 30

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 313 792 T3

Leu Gly Lys Arg Gln His Arg Val Asn Ser Thr Phe Gly Asp Gly Asn
 35 40 45
 Ala Ala Cys Leu Leu Ser Gly Lys Ile Ser Leu Gln Glu Ala Ser Asn
 5 50 55 60
 Ala Leu Lys Gln Leu Leu Asp Ala Val Pro Gly Asn His Lys Arg Pro
 65 70 75 80
 Ser Leu Pro Asp Phe Leu Gln Thr Asn Pro Ala Val Leu Ser Met Met
 10 85 90 95
 Met Thr Ser Leu Ile Leu Asn Val Phe Gly Asn Asn Ala Gln Ser Leu
 100 105 110
 Cys Gln Gln Leu Glu Arg Ala Thr Glu Val Gln Asn Ala Leu Arg Asn
 15 115 120 125
 Lys Gln Val Lys Glu Tyr Gln Glu Gln Ile Gln Lys Ala Ile Glu Gln
 130 135 140
 Glu Asp Lys Ala Arg Lys Ala Gly Ile Phe Gly Ala Ile Phe Asp Trp
 20 145 150 155 160
 Ile Thr Gly Ile Phe Glu Thr Val Ile Gly Ala Leu Lys Val Val Glu
 165 170 175
 Gly Phe Leu Ser Gly Asn Pro Ala Glu Met Ala Ser Gly Val Ala Tyr
 25 180 185 190
 Met Ala Ala Gly Cys Ala Gly Met Val Lys Ala Gly Ala Glu Thr Ala
 30 195 200 205
 Met Met Cys Gly Ala Asp His Asp Thr Cys Gln Ala Ile Ile Asp Val
 210 215 220
 Thr Ser Lys Ile Gln Phe Gly Cys Glu Ala Val Ala Leu Ala Leu Asp
 35 225 230 235 240
 Val Phe Gln Ile Gly Arg Ala Phe Met Ala Thr Arg Gly Leu Ser Gly
 245 250 255
 Ala Ala Ala Lys Val Leu Asp Ser Gly Phe Gly Glu Glu Val Val Glu
 40 260 265 270
 Arg Met Val Gly Ala Gly Glu Ala Glu Ile Glu Glu Leu Ala Glu Lys
 275 280 285
 Phe Gly Glu Glu Val Ser Glu Ser Phe Ser Lys Gln Phe Glu Pro Leu
 45 290 295 300
 Glu Arg Glu Met Ala Met Ala Asn Glu Met Ala Glu Glu Ala Ala Glu
 305 310 315 320
 Phe Ser Arg Asn Val Glu Asn Asn Met Thr Arg Ser Ala Gly Lys Ser
 50 325 330 335
 Phe Thr Lys Glu Gly Val Lys Ala Met Ala Lys Glu Ala Ala Lys Glu
 340 345 350
 Ala Leu Glu Lys Cys Val Gln Glu Gly Gly Lys Phe Leu Leu Lys Lys
 55 355 360 365
 Phe Arg Asn Lys Val Leu Phe Asn Met Phe Lys Lys Ile Leu Tyr Ala
 60 370 375 380
 Leu Leu Arg Asp Cys Ser Phe Lys Gly Leu Gln Ala Ile Arg Cys Ala
 385 390 395 400

ES 2 313 792 T3

Thr Glu Gly Ala Ser Gln Met Asn Thr Gly Met Val Asn Thr Glu Lys
 405 410 415
 5 Ala Lys Ile Glu Lys Lys Ile Glu Gln Leu Ile Thr Gln Gln Arg Phe
 420 425 430
 Leu Asp Phe Ile Met Gln Gln Thr Glu Asn Gln Lys Lys Ile Glu Gln
 435 440 445
 10 Lys Arg Leu Glu Glu Leu Tyr Lys Gly Thr Gly Ala Ala Leu Arg Asp
 450 455 460
 Val Leu Asp Thr Ile Asp His Tyr Ser Ser Val Gln Ala Arg Ile Ala
 465 470 475 480
 Gly Tyr Arg Ala

20

<210> 9

<211> 504

25 <212> ADN

<213> *Salmonella*

<220>

30 <221> CDS

<222> (1)..(501)

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 313 792 T3

<400> 9

```

5      atg ggt act gaa tca atg ctt ctg tta ttt gat gat atc tgg atg aag 48
      Met Gly Thr Glu Ser Met Leu Leu Leu Phe Asp Asp Ile Trp Met Lys
        1           5           10           15

10     cta atg gag ctt gcc aaa aag ctg cgc gat atc atg cgc agc tat aac 96
      Leu Met Glu Leu Ala Lys Lys Leu Arg Asp Ile Met Arg Ser Tyr Asn
          20           25           30

15     gta gaa aaa caa cgg ctg gcc tgg gaa ctg caa gtc aat gtt tta cag 144
      Val Glu Lys Gln Arg Leu Ala Trp Glu Leu Gln Val Asn Val Leu Gln
        35           40           45

20     acg caa atg aaa aca att gat gaa gcg ttt aga gca tca atg att act 192
      Thr Gln Met Lys Thr Ile Asp Glu Ala Phe Arg Ala Ser Met Ile Thr
        50           55           60

25     gcg ggt ggc gca atg ttg tcg ggt gta ctg acg ata gga tta ggg gcc 240
      Ala Gly Gly Ala Met Leu Ser Gly Val Leu Thr Ile Gly Leu Gly Ala
        65           70           75           80

30     gta ggc ggg gaa acc ggt ctt ata gcg ggt caa gcc gta ggc cac aca 288
      Val Gly Gly Glu Thr Gly Leu Ile Ala Gly Gln Ala Val Gly His Thr
          85           90           95

35     gct ggg ggc gtc atg ggc ctg ggg gct ggt gta gcg caa cgt caa agt 336
      Ala Gly Gly Val Met Gly Leu Gly Ala Gly Val Ala Gln Arg Gln Ser
        100           105           110

40     gat caa gat aaa gcg att gcc gac ctg caa caa aat ggg gcc caa tct 384
      Asp Gln Asp Lys Ala Ile Ala Asp Leu Gln Gln Asn Gly Ala Gln Ser
        115           120           125

45     tat aat aaa tcc ctg acg gaa att atg gag aaa gca act gaa att atg 432
      Tyr Asn Lys Ser Leu Thr Glu Ile Met Glu Lys Ala Thr Glu Ile Met
        130           135           140

50     cag caa atc atc ggc gtg ggg tcg tca ctg gtc acg gtt ctt gct gaa 480
      Gln Gln Ile Ile Gly Val Gly Ser Ser Leu Val Thr Val Leu Ala Glu
        145           150           155           160

      ata ctc cgg gca tta acg agg taa 504
      Ile Leu Arg Ala Leu Thr Arg
          165

```

<210> 10

55 <211> 167

<212> PRT

<213> *Salmonella*

60

65

ES 2 313 792 T3

<400> 10

```

5      Met Gly Thr Glu Ser Met Leu Leu Leu Phe Asp Asp Ile Trp Met Lys
      1              5              10              15

10     Leu Met Glu Leu Ala Lys Lys Leu Arg Asp Ile Met Arg Ser Tyr Asn
      20              25              30

      Val Glu Lys Gln Arg Leu Ala Trp Glu Leu Gln Val Asn Val Leu Gln
      35              40              45

15     Thr Gln Met Lys Thr Ile Asp Glu Ala Phe Arg Ala Ser Met Ile Thr
      50              55              60

      Ala Gly Gly Ala Met Leu Ser Gly Val Leu Thr Ile Gly Leu Gly Ala
      65              70              75              80

20     Val Gly Gly Glu Thr Gly Leu Ile Ala Gly Gln Ala Val Gly His Thr
      85              90              95

      Ala Gly Gly Val Met Gly Leu Gly Ala Gly Val Ala Gln Arg Gln Ser
25     100              105              110

      Asp Gln Asp Lys Ala Ile Ala Asp Leu Gln Gln Asn Gly Ala Gln Ser
      115              120              125

30     Tyr Asn Lys Ser Leu Thr Glu Ile Met Glu Lys Ala Thr Glu Ile Met
      130              135              140

      Gln Gln Ile Ile Gly Val Gly Ser Ser Leu Val Thr Val Leu Ala Glu
35     145              150              155              160

      Ile Leu Arg Ala Leu Thr Arg
      165

```

<210> 11

<211> 195

<212> PRT

<213> *Salmonella*

50

55

60

65

ES 2 313 792 T3

<400> 11

```

5      Met Glu Ala Ser Asn Val Ala Leu Val Leu Pro Ala Pro Ser Leu Leu
      1          5          10          15

10     Thr Pro Ser Ser Thr Pro Ser Pro Ser Gly Glu Gly Met Gly Thr Glu
      20          25          30

15     Ser Met Leu Leu Leu Phe Asp Asp Ile Trp Met Lys Leu Met Glu Leu
      35          40          45

15     Ala Lys Lys Leu Arg Asp Ile Met Arg Ser Tyr Asn Val Glu Lys Gln
      50          55          60

20     Arg Leu Ala Trp Glu Leu Gln Val Asn Val Leu Gln Thr Gln Met Lys
      65          70          75          80

      Thr Ile Asp Glu Ala Phe Arg Ala Ser Met Ile Thr Ala Gly Gly Ala
      85          90          95

25     Met Leu Ser Gly Val Leu Thr Ile Gly Leu Gly Ala Val Gly Gly Glu
      100         105         110

      Thr Gly Leu Ile Ala Gly Gln Ala Val Gly His Thr Ala Gly Gly Val
      115         120         125

30     Met Gly Leu Gly Ala Gly Val Ala Gln Arg Gln Ser Asp Gln Asp Lys
      130         135         140

35     Ala Ile Ala Asp Leu Gln Gln Asn Gly Ala Gln Ser Tyr Asn Lys Ser
      145         150         155         160

      Leu Thr Glu Ile Met Glu Lys Ala Thr Glu Ile Met Gln Gln Ile Ile
      165         170         175

40     Gly Val Gly Ser Ser Leu Val Thr Val Leu Ala Glu Ile Leu Arg Ala
      180         185         190

      Leu Thr Arg
45         195

```

```

50 <210> 12
    <211> 417
    <212> ADN
    <213> Salmonella
55 <220>
    <221> CDS
    <222> (1)..(414)

```

60

65

ES 2 313 792 T3

<400> 12

```

5      atg gtg caa gaa ata gag caa tgg tta cgt cgg cat cag gtg ttt act   48
      Met Val Gln Glu Ile Glu Gln Trp Leu Arg Arg His Gln Val Phe Thr
        1           5           10          15

10     gag cct gca tat tta ggg gag acc gcc ata tta ctt ggg cag cag ttt   96
      Glu Pro Ala Tyr Leu Gly Glu Thr Ala Ile Leu Leu Gly Gln Gln Phe
          20           25           30

15     ata tta tcg cct tac ctg gtg atc tat cgt att gag gca aaa gaa atg   144
      Ile Leu Ser Pro Tyr Leu Val Ile Tyr Arg Ile Glu Ala Lys Glu Met
          35           40           45

20     att att tgt gag ttc agg cgc ctg acg ccc ggg caa cct cga cca cag   192
      Ile Ile Cys Glu Phe Arg Arg Leu Thr Pro Gly Gln Pro Arg Pro Gln
          50           55           60

25     caa ttg ttt cac tta ctg gga ctt tta cgc ggg ata ttt gtg cat cac   240
      Gln Leu Phe His Leu Leu Gly Leu Leu Arg Gly Ile Phe Val His His
          65           70           75           80

30     ccg cag tta aca tgt tta aag atg ttg ata atc acc gac gtt ctg gat   288
      Pro Gln Leu Thr Cys Leu Lys Met Leu Ile Ile Thr Asp Val Leu Asp
          85           90           95

35     gaa aaa aaa gcc atg cta cgc agg aaa tta ttg cgc atc ctg aca gta   336
      Glu Lys Lys Ala Met Leu Arg Arg Lys Leu Leu Arg Ile Leu Thr Val
          100          105          110

40     atg gga gcg acc ttt aca cag ctt gat ggc gat aac tgg aca gtt tta   384
      Met Gly Ala Thr Phe Thr Gln Leu Asp Gly Asp Asn Trp Thr Val Leu
          115          120          125

45     tcc gcc gag cat ctt atc cag cga cgt ttt taa   417
      Ser Ala Glu His Leu Ile Gln Arg Arg Phe
          130          135

```

<210> 13

<211> 138

<212> PRT

<213> *Salmonella*

<400> 13

```

55     Met Val Gln Glu Ile Glu Gln Trp Leu Arg Arg His Gln Val Phe Thr
        1           5           10          15

60     Glu Pro Ala Tyr Leu Gly Glu Thr Ala Ile Leu Leu Gly Gln Gln Phe
          20           25           30

65     Ile Leu Ser Pro Tyr Leu Val Ile Tyr Arg Ile Glu Ala Lys Glu Met
          35           40           45

70     Ile Ile Cys Glu Phe Arg Arg Leu Thr Pro Gly Gln Pro Arg Pro Gln
          50           55           60

```

ES 2 313 792 T3

Gln Leu Phe His Leu Leu Gly Leu Leu Arg Gly Ile Phe Val His His
65 70 75 80

5 Pro Gln Leu Thr Cys Leu Lys Met Leu Ile Ile Thr Asp Val Leu Asp
85 90 95

10 Glu Lys Lys Ala Met Leu Arg Arg Lys Leu Leu Arg Ile Leu Thr Val
100 105 110

Met Gly Ala Thr Phe Thr Gln Leu Asp Gly Asp Asn Trp Thr Val Leu
115 120 125

15 Ser Ala Glu His Leu Ile Gln Arg Arg Phe
130 135

20 <210> 14

<211> 789

<212> ADN

25 <213> *Salmonella*

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(786)

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 313 792 T3

<400> 14

```

5      atg aaa att cat att ccg tca gcg gca agt aat ata gtc gat ggt aat  48
      Met Lys Ile His Ile Pro Ser Ala Ala Ser Asn Ile Val Asp Gly Asn
        1           5           10          15

10     agt cct cct tcc gat ata caa gcg aag gag gta tcg ttt cct ccc cct  96
      Ser Pro Pro Ser Asp Ile Gln Ala Lys Glu Val Ser Phe Pro Pro Pro
        20          25          30

15     gaa att cca gcg cct ggc acc ccc gca gcc cct gtg ctg ctt acg cct  144
      Glu Ile Pro Ala Pro Gly Thr Pro Ala Ala Pro Val Leu Leu Thr Pro
        35          40          45

20     gaa caa ata agg cag cag agg gat tat gcg ata cat ttt atg caa tac  192
      Glu Gln Ile Arg Gln Gln Arg Asp Tyr Ala Ile His Phe Met Gln Tyr
        50          55          60

25     act att cgt gcg ctg ggt gcg aca gtc gtg ttt ggg tta tcg gtt gct  240
      Thr Ile Arg Ala Leu Gly Ala Thr Val Val Phe Gly Leu Ser Val Ala
        65          70          75          80

30     gca gcg gta att tct ggc ggg gca gga tta ccc att gct att ctt gcg  288
      Ala Ala Val Ile Ser Gly Gly Ala Gly Leu Pro Ile Ala Ile Leu Ala
        85          90          95

35     ggg gcg gcg ctc gtg att gct att ggg gat gct tgc tgt gcg tat cat  336
      Gly Ala Ala Leu Val Ile Ala Ile Gly Asp Ala Cys Cys Ala Tyr His
        100         105         110

40     aat tat caa tcg ata tgt cag caa aag gag cca tta caa acc gcc agt  384
      Asn Tyr Gln Ser Ile Cys Gln Gln Lys Glu Pro Leu Gln Thr Ala Ser
        115         120         125

45     gat agc gtt gct ctt gtg gtc agt gcg ctg gcc tta aaa tgt ggg gca  432
      Asp Ser Val Ala Leu Val Val Ser Ala Leu Ala Leu Lys Cys Gly Ala
        130         135         140

50     agt ctt aac tgc gct aac acc ctt gct aat tgt ctt tct tta tta ata  480
      Ser Leu Asn Cys Ala Asn Thr Leu Ala Asn Cys Leu Ser Leu Leu Ile
        145         150         155         160

55     cgt tca gga atc gct att tct atg ttg gtt tta ccc cta cag ttt cca  528
      Arg Ser Gly Ile Ala Ile Ser Met Leu Val Leu Pro Leu Gln Phe Pro
        165         170         175

60     ctg ccc gcg gct gaa aat att gcg gcc tct ttg gac atg ggg agt gta  576
      Leu Pro Ala Ala Glu Asn Ile Ala Ala Ser Leu Asp Met Gly Ser Val
        180         185         190

65     att acc tcc gtt agc ctg acg gcg ata ggt gcg gta ctg gat tat tgc  624
      Ile Thr Ser Val Ser Leu Thr Ala Ile Gly Ala Val Leu Asp Tyr Cys
        195         200         205

70     ctt gcc cgc ccc tct ggc gac gat cag gaa aat tct gtt gat gaa ctt  672
      Leu Ala Arg Pro Ser Gly Asp Asp Gln Glu Asn Ser Val Asp Glu Leu
        210         215         220

75     cat gcc gat ccc agt gtg tta ttg gcg gaa caa atg gca gcg ctc tgt  720
      His Ala Asp Pro Ser Val Leu Leu Ala Glu Gln Met Ala Ala Leu Cys
        225         230         235         240

80     caa tct gct act aca cct gca cct gca tta atg gac agt tct gat cat  768
      Gln Ser Ala Thr Thr Pro Ala Pro Ala Leu Met Asp Ser Ser Asp His
        245         250         255

85     aca tct ccg gga gaa cca tga  789
      Thr Ser Arg Gly Glu Pro
        260

```

ES 2 313 792 T3

<210> 15

<211> 262

<212> PRT

5 <213> *Salmonella*

<400> 15

```

10      Met Lys Ile His Ile Pro Ser Ala Ala Ser Asn Ile Val Asp Gly Asn
        1             5             10             15

      Ser Pro Pro Ser Asp Ile Gln Ala Lys Glu Val Ser Phe Pro Pro Pro
              20             25             30

15      Glu Ile Pro Ala Pro Gly Thr Pro Ala Ala Pro Val Leu Leu Thr Pro
              35             40             45

20      Glu Gln Ile Arg Gln Gln Arg Asp Tyr Ala Ile His Phe Met Gln Tyr
              50             55             60

      Thr Ile Arg Ala Leu Gly Ala Thr Val Val Phe Gly Leu Ser Val Ala
              65             70             75             80

25      Ala Ala Val Ile Ser Gly Gly Ala Gly Leu Pro Ile Ala Ile Leu Ala
              85             90             95

      Gly Ala Ala Leu Val Ile Ala Ile Gly Asp Ala Cys Cys Ala Tyr His
              100            105            110

30      Asn Tyr Gln Ser Ile Cys Gln Gln Lys Glu Pro Leu Gln Thr Ala Ser
              115            120            125

35      Asp Ser Val Ala Leu Val Val Ser Ala Leu Ala Leu Lys Cys Gly Ala
              130            135            140

      Ser Leu Asn Cys Ala Asn Thr Leu Ala Asn Cys Leu Ser Leu Leu Ile
              145            150            155            160

40      Arg Ser Gly Ile Ala Ile Ser Met Leu Val Leu Pro Leu Gln Phe Pro
              165            170            175

      Leu Pro Ala Ala Glu Asn Ile Ala Ala Ser Leu Asp Met Gly Ser Val
              180            185            190

45      Ile Thr Ser Val Ser Leu Thr Ala Ile Gly Ala Val Leu Asp Tyr Cys
              195            200            205

50      Leu Ala Arg Pro Ser Gly Asp Asp Gln Glu Asn Ser Val Asp Glu Leu
              210            215            220

      His Ala Asp Pro Ser Val Leu Leu Ala Glu Gln Met Ala Ala Leu Cys
              225            230            235            240

55      Gln Ser Ala Thr Thr Pro Ala Pro Ala Leu Met Asp Ser Ser Asp His
              245            250            255

      Thr Ser Arg Gly Glu Pro
              260

```

<210> 16

<211> 690

65 <212> ADN

<213> *Salmonella*

ES 2 313 792 T3

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(687)

5

<400> 16

```

10      atg aaa cct gtt agc cca aat gct cag gta gga ggg caa cgt cct gtt   48
      Met Lys Pro Val Ser Pro Asn Ala Gln Val Gly Gly Gln Arg Pro Val
        1           5           10           15

15      aac gcg cct gag gaa tca cct cca tgt cct tca ttg cca cat ccg gaa   96
      Asn Ala Pro Glu Glu Ser Pro Pro Cys Pro Ser Leu Pro His Pro Glu
                20           25           30

20      acc aat atg gag agt ggt aga ata gga cct caa caa gga aaa gag cgg   144
      Thr Asn Met Glu Ser Gly Arg Ile Gly Pro Gln Gln Gly Lys Glu Arg
                35           40           45

25      gta ttg gcc gga ctt gcg aaa cga gtg ata gag tgt ttt cca aaa gaa   192
      Val Leu Ala Gly Leu Ala Lys Arg Val Ile Glu Cys Phe Pro Lys Glu
                50           55           60

30      att ttt agt tgg caa acg gtt att ttg ggc gga cag att tta tgc tgt   240
      Ile Phe Ser Trp Gln Thr Val Ile Leu Gly Gly Gln Ile Leu Cys Cys
                65           70           75           80

35      tcc gct gga ata gca tta aca gtg cta agt ggt gga ggc gcg ccg ctc   288
      Ser Ala Gly Ile Ala Leu Thr Val Leu Ser Gly Gly Gly Ala Pro Leu
                85           90           95

40      gta gcc ctg gca ggg att ggc ctt gct att gcc atc gcg gat gtc gcc   336
      Val Ala Leu Ala Gly Ile Gly Leu Ala Ile Ala Ile Ala Asp Val Ala
                100          105          110

45      tgt ctt atc tac cat cat aaa cat cat ttg cct atg gct cac gac agt   384
      Cys Leu Ile Tyr His His Lys His His Leu Pro Met Ala His Asp Ser
                115          120          125

50      ata ggc aat gcc gtt ttt tat att gct aat tgt ttc gcc aat caa cgc   432
      Ile Gly Asn Ala Val Phe Tyr Ile Ala Asn Cys Phe Ala Asn Gln Arg
                130          135          140

55      aaa agt atg gcg att gct aaa gcc gtc tcc ctg ggc ggt aga tta gcc   480
      Lys Ser Met Ala Ile Ala Lys Ala Val Ser Leu Gly Gly Arg Leu Ala
                145          150          155          160

60      tta acc gcg acg gta atg act cat tca tac tgg agt ggt agt ttg gga   528
      Leu Thr Ala Thr Val Met Thr His Ser Tyr Trp Ser Gly Ser Leu Gly
                165          170          175

65      cta cag cct cat tta tta gag cgt ctt aat gat att acc tat gga cta   576
      Leu Gln Pro His Leu Leu Glu Arg Leu Asn Asp Ile Thr Tyr Gly Leu
                180          185          190

70      atg agt ttt act cgc ttc ggt atg gat ggg atg gca atg acc ggt atg   624
      Met Ser Phe Thr Arg Phe Gly Met Asp Gly Met Ala Met Thr Gly Met
                195          200          205

75      cag gtc agc agc cca tta tat cgt ttg ctg gct cag gta acg cca gaa   672
      Gln Val Ser Ser Pro Leu Tyr Arg Leu Leu Ala Gln Val Thr Pro Glu
                210          215          220

80      caa cgt gcg ccg gag taa   690
      Gln Arg Ala Pro Glu
                225

```

<210> 17

ES 2 313 792 T3

<211> 229

<212> PRT

<213> *Salmonella*

5

<400> 17

```

10      Met Lys Pro Val Ser Pro Asn Ala Gln Val Gly Gly Gln Arg Pro Val
        1           5           10           15

      Asn Ala Pro Glu Glu Ser Pro Pro Cys Pro Ser Leu Pro His Pro Glu
        20           25           30

15      Thr Asn Met Glu Ser Gly Arg Ile Gly Pro Gln Gln Gly Lys Glu Arg
        35           40           45

      Val Leu Ala Gly Leu Ala Lys Arg Val Ile Glu Cys Phe Pro Lys Glu
        50           55           60

20      Ile Phe Ser Trp Gln Thr Val Ile Leu Gly Gly Gln Ile Leu Cys Cys
        65           70           75           80

      Ser Ala Gly Ile Ala Leu Thr Val Leu Ser Gly Gly Gly Ala Pro Leu
        85           90           95

      Val Ala Leu Ala Gly Ile Gly Leu Ala Ile Ala Ile Ala Asp Val Ala
        100          105          110

30      Cys Leu Ile Tyr His His Lys His His Leu Pro Met Ala His Asp Ser
        115          120          125

      Ile Gly Asn Ala Val Phe Tyr Ile Ala Asn Cys Phe Ala Asn Gln Arg
        130          135          140

      Lys Ser Met Ala Ile Ala Lys Ala Val Ser Leu Gly Gly Arg Leu Ala
        145          150          155          160

40      Leu Thr Ala Thr Val Met Thr His Ser Tyr Trp Ser Gly Ser Leu Gly
        165          170          175

      Leu Gln Pro His Leu Leu Glu Arg Leu Asn Asp Ile Thr Tyr Gly Leu
        180          185          190

45      Met Ser Phe Thr Arg Phe Gly Met Asp Gly Met Ala Met Thr Gly Met
        195          200          205

      Gln Val Ser Ser Pro Leu Tyr Arg Leu Leu Ala Gln Val Thr Pro Glu
        210          215          220

      Gln Arg Ala Pro Glu
        225

```

55

<210> 18

<211> 474

<212> ADN

60

<213> *Salmonella*

<220>

<221> CDS

65

<222> (1)..(471)

ES 2 313 792 T3

<400> 18

```

5      atg aaa aaa gac ccg acc cta caa cag gca cat gac acg atg cgg ttt   48

      Met Lys Lys Asp Pro Thr Leu Gln Gln Ala His Asp Thr Met Arg Phe
      1      5      10      15
      ttc cgg cgt ggc ggc tcg ctg cgt atg ttg ttg gat gac gat gtt aca   96
10     Phe Arg Arg Gly Gly Ser Leu Arg Met Leu Leu Asp Asp Asp Val Thr
      20      25      30

      cag ccg ctt aat act ctg tat cgc tat gcc acg cag ctt atg gag gta   144
15     Gln Pro Leu Asn Thr Leu Tyr Arg Tyr Ala Thr Gln Leu Met Glu Val
      35      40      45

      aaa gaa ttc gcc ggc gca gcg cga ctt ttt caa ttg ctg acg ata tat   192
      Lys Glu Phe Ala Gly Ala Ala Arg Leu Phe Gln Leu Leu Thr Ile Tyr
      50      55      60

20     gat gcc tgg tca ttt gac tac tgg ttt cgg tta ggg gaa tgc tgc cag   240
      Asp Ala Trp Ser Phe Asp Tyr Trp Phe Arg Leu Gly Glu Cys Cys Gln
      65      70      75      80

25     gct caa aaa cat tgg ggg gaa gcg ata tac gct tat gga cgc gcg gca   288
      Ala Gln Lys His Trp Gly Glu Ala Ile Tyr Ala Tyr Gly Arg Ala Ala
      85      90      95

30     caa att aag att gat gcg ccg cag gcg cca tgg gcc gca gcg gaa tgc   336
      Gln Ile Lys Ile Asp Ala Pro Gln Ala Pro Trp Ala Ala Ala Glu Cys
      100     105     110

      tat ctc gcg tgt gat aac gtc tgt tat gca atc aaa gcg tta aag gcc   384
35     Tyr Leu Ala Cys Asp Asn Val Cys Tyr Ala Ile Lys Ala Leu Lys Ala
      115     120     125

      gtg gtg cgt att tgc ggc gag gtc agt gaa cat caa att ctc cga cag   432
40     Val Val Arg Ile Cys Gly Glu Val Ser Glu His Gln Ile Leu Arg Gln
      130     135     140

      cgt gca gaa aag atg tta cag caa ctt tct gac agg agc taa   474
      Arg Ala Glu Lys Met Leu Gln Gln Leu Ser Asp Arg Ser
      145     150     155

```

<210> 19

<211> 157

50 <212> PRT

<213> *Salmonella*

55

60

65

ES 2 313 792 T3

<400> 19

```

5      Met Lys Lys Asp Pro Thr Leu Gln Gln Ala His Asp Thr Met Arg Phe
      1           5           10           15
      Phe Arg Arg Gly Gly Ser Leu Arg Met Leu Leu Asp Asp Asp Val Thr
            20           25           30

10     Gln Pro Leu Asn Thr Leu Tyr Arg Tyr Ala Thr Gln Leu Met Glu Val
            35           40           45

      Lys Glu Phe Ala Gly Ala Ala Arg Leu Phe Gln Leu Leu Thr Ile Tyr
15           50           55           60

      Asp Ala Trp Ser Phe Asp Tyr Trp Phe Arg Leu Gly Glu Cys Cys Gln
      65           70           75           80

20     Ala Gln Lys His Trp Gly Glu Ala Ile Tyr Ala Tyr Gly Arg Ala Ala
            85           90           95

      Gln Ile Lys Ile Asp Ala Pro Gln Ala Pro Trp Ala Ala Ala Glu Cys
25           100          105          110

      Tyr Leu Ala Cys Asp Asn Val Cys Tyr Ala Ile Lys Ala Leu Lys Ala
            115          120          125

30     Val Val Arg Ile Cys Gly Glu Val Ser Glu His Gln Ile Leu Arg Gln
            130          135          140

      Arg Ala Glu Lys Met Leu Gln Gln Leu Ser Asp Arg Ser
35     145           150           155

```

```

40 <210> 20
    <211> 435
    <212> ADN
    <213> Salmonella
45 <220>
    <221> CDS
    <222> (1) .. (432)
50 <400> 20

```

```

55     atg atg atg aaa gaa gat cag aaa aat aaa ata ccc gaa gac att ctg   48
      Met Met Met Lys Glu Asp Gln Lys Asn Lys Ile Pro Glu Asp Ile Leu
        1           5           10           15

      aaa cag cta tta tcc gtt gat ccg gaa acc gtt tat gcc agt ggt tac   96
60     Lys Gln Leu Leu Ser Val Asp Pro Glu Thr Val Tyr Ala Ser Gly Tyr
            20           25           30

      gcc tca tgg cag gag ggg gat tat tcg cgc gcc gta atc gat ttt agt   144
65     Ala Ser Trp Gln Glu Gly Asp Tyr Ser Arg Ala Val Ile Asp Phe Ser

```

ES 2 313 792 T3

	35	40	45	
	tgg ctg gtg atg gcc cag cca tgg agt tgg cgt gcc cat att gca ttg	192		
5	Trp Leu Val Met Ala Gln Pro Trp Ser Trp Arg Ala His Ile Ala Leu			
	50 55 60			
	gct ggc acc tgg atg atg ctt aaa gaa tac acg acg gcc att aat ttc	240		
10	Ala Gly Thr Trp Met Met Leu Lys Glu Tyr Thr Thr Ala Ile Asn Phe			
	65 70 75 80			
	tat gga cat gcc ttg atg ctg gat gcc agc cat cca gaa ccg gtt tac	288		
	Tyr Gly His Ala Leu Met Leu Asp Ala Ser His Pro Glu Pro Val Tyr			
	85 90 95			
15	caa acg ggc gtc tgt ctc aaa atg atg ggg gaa ccc ggg ttg gcg aga	336		
	Gln Thr Gly Val Cys Leu Lys Met Met Gly Glu Pro Gly Leu Ala Arg			
	100 105 110			
	gag gct ttt caa acc gca atc aag atg agt tat gcg gat gcc tca tgg	384		
20	Glu Ala Phe Gln Thr Ala Ile Lys Met Ser Tyr Ala Asp Ala Ser Trp			
	115 120 125			
	agt gag att cgc cag aat gcg caa ata atg gtt gat act ctt att gct	432		
25	Ser Glu Ile Arg Gln Asn Ala Gln Ile Met Val Asp Thr Leu Ile Ala			
	130 135 140			
	taa	435		
30	<210> 21			
	<211> 144			
	<212> PRT			
35	<213> <i>Salmonella</i>			
	<400> 21			
40	Met Met Met Lys Glu Asp Gln Lys Asn Lys Ile Pro Glu Asp Ile Leu			
	1 5 10 15			
	Lys Gln Leu Leu Ser Val Asp Pro Glu Thr Val Tyr Ala Ser Gly Tyr			
45	20 25 30			
	Ala Ser Trp Gln Glu Gly Asp Tyr Ser Arg Ala Val Ile Asp Phe Ser			
	35 40 45			
50	Trp Leu Val Met Ala Gln Pro Trp Ser Trp Arg Ala His Ile Ala Leu			
	50 55 60			
	Ala Gly Thr Trp Met Met Leu Lys Glu Tyr Thr Thr Ala Ile Asn Phe			
	65 70 75 80			
55	Tyr Gly His Ala Leu Met Leu Asp Ala Ser His Pro Glu Pro Val Tyr			
	85 90 95			
60	Gln Thr Gly Val Cys Leu Lys Met Met Gly Glu Pro Gly Leu Ala Arg			
	100 105 110			
	Glu Ala Phe Gln Thr Ala Ile Lys Met Ser Tyr Ala Asp Ala Ser Trp			
	115 120 125			
65	Ser Glu Ile Arg Gln Asn Ala Gln Ile Met Val Asp Thr Leu Ile Ala			
	130 135 140			

ES 2 313 792 T3

<210> 22
<211> 1212
<212> ADN
5 <213> *Salmonella*
<220>
<221> CDS
10 <222> (1)..(1209)

<400> 22

15
atg gca tat ctc atg gtt aat cca aag agt tcc tgg aaa ata cgt ttt 48
Met Ala Tyr Leu Met Val Asn Pro Lys Ser Ser Trp Lys Ile Arg Phe
1 5 10 15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 313 792 T3

tta ggt cac gtt tta caa ggc cgg gaa gta tgg ctg aat gaa ggt aac 96
 Leu Gly His Val Leu Gln Gly Arg Glu Val Trp Leu Asn Glu Gly Asn
 20 25 30
 ctg tca ctg ggg gag aag gga tgc gat att tgt att ccg ctg gct ata 144
 Leu Ser Leu Gly Glu Lys Gly Cys Asp Ile Cys Ile Pro Leu Ala Ile
 35 40 45
 aat gaa aaa att att ctg aga gaa cag gca gat agt tta ttt gtt gat 192
 Asn Glu Lys Ile Ile Leu Arg Glu Gln Ala Asp Ser Leu Phe Val Asp
 50 55 60
 gcc ggg aaa gcc aga gtt aga gtt aat ggc cgc aga ttt aat cca aat 240
 Ala Gly Lys Ala Arg Val Arg Val Asn Gly Arg Arg Phe Asn Pro Asn
 65 70 75 80
 aag ccg cta cca tcc agt ggg gtt ttg cag gtt gcg gga gtg gct atc 288
 Lys Pro Leu Pro Ser Ser Gly Val Leu Gln Val Ala Gly Val Ala Ile
 85 90 95
 gcg ttt ggt aaa cag gat tgt gaa ctt gct gat tat caa ata ccc gtt 336
 Ala Phe Gly Lys Gln Asp Cys Glu Leu Ala Asp Tyr Gln Ile Pro Val
 100 105 110
 tcc aga tca ggg tac tgg tgg ttg gct ggc gta ttc ttg att ttc atc 384
 Ser Arg Ser Gly Tyr Trp Trp Leu Ala Gly Val Phe Leu Ile Phe Ile
 115 120 125
 ggt gga atg ggt gtc ctg tta agt att agt ggt cag cct gaa acg gta 432
 Gly Gly Met Gly Val Leu Leu Ser Ile Ser Gly Gln Pro Glu Thr Val
 130 135 140
 aat gac tta cct ttg cgg gtt aag ttt tta tta gac aaa agc aat att 480
 Asn Asp Leu Pro Leu Arg Val Lys Phe Leu Leu Asp Lys Ser Asn Ile
 145 150 155 160
 cat tat gtg cgg gcg caa tgg aaa gaa gat ggc agc ctg cag ttg tcc 528
 His Tyr Val Arg Ala Gln Trp Lys Glu Asp Gly Ser Leu Gln Leu Ser
 165 170 175
 ggt tat tgc tcg tca agc gaa cag atg caa aag gtg aga gcg act ctc 576
 Gly Tyr Cys Ser Ser Ser Glu Gln Met Gln Lys Val Arg Ala Thr Leu
 180 185 190
 gaa tca tgg ggg gtc atg tat cgg gat ggt gta atc tgt gat gac tta 624
 Glu Ser Trp Gly Val Met Tyr Arg Asp Gly Val Ile Cys Asp Asp Leu
 195 200 205
 ttg gta cga gaa gtg cag gat gtt ttg ata aaa atg ggt tac ccg cat 672
 Leu Val Arg Glu Val Gln Asp Val Leu Ile Lys Met Gly Tyr Pro His
 210 215 220
 gct gaa gta tcc agc gaa ggg ccg ggg agc gtg tta att cat gat gat 720
 Ala Glu Val Ser Ser Glu Gly Pro Gly Ser Val Leu Ile His Asp Asp
 225 230 235 240
 ata caa atg gat cag caa tgg cgc aag gtt caa cca tta ctt gca gat 768
 Ile Gln Met Asp Gln Gln Trp Arg Lys Val Gln Pro Leu Leu Ala Asp
 245 250 255
 att ccc ggg tta ttg cac tgg cag att agt cac tct cat¹ cag tct cag 816
 Ile Pro Gly Leu Leu His Trp Gln Ile Ser His Ser His Gln Ser Gln
 260 265 270
 ggg gat gat att att tct gcg ata ata gag aac ggt tta gtg ggg ctt 864
 Gly Asp Asp Ile Ile Ser Ala Ile Ile Glu Asn Gly Leu Val Gly Leu
 275 280 285
 gtc aat gtt agc cca atg cgg cgc tct ttt gtt atc agt ggt gta ctg 912
 Val Asn Val Ser Pro Met Arg Arg Ser Phe Val Ile Ser Gly Val Leu
 290 295 300
 gat gaa tct cat caa cgc att ttg caa gaa acg tta gca gca tta aag 960
 Asp Glu Ser His Gln Arg Ile Leu Gln Glu Thr Leu Ala Ala Leu Lys
 305 310 315 320
 aaa aag gat ccc gct ctt tct tta att tat cag gat att gcg cct tcc 1008

ES 2 313 792 T3

	Lys Lys Asp Pro Ala Leu Ser Leu Ile Tyr Gln Asp Ile Ala Pro Ser	
	325 330 335	
5	cat gat gaa agc aag tat ctg cct gcg cca gtg gct ggc ttt gta cag	1056
	His Asp Glu Ser Lys Tyr Leu Pro Ala Pro Val Ala Gly Phe Val Gln	
	340 345 350	
10	agt cgc cat ggt aat tac tta tta ctg acg aat aaa gag cgt tta cgt	1104
	Ser Arg His Gly Asn Tyr Leu Leu Leu Thr Asn Lys Glu Arg Leu Arg	
	355 360 365	
15	gta ggg gca ttg tta ccc aat ggg gga gaa att gtc cat ctg agt gcc	1152
	Val Gly Ala Leu Leu Pro Asn Gly Gly Glu Ile Val His Leu Ser Ala	
	370 375 380	
20	gat gtg gta acg att aaa cat tat gat act ttg att aac tat cca tta	1200
	Asp Val Val Thr Ile Lys His Tyr Asp Thr Leu Ile Asn Tyr Pro Leu	
	385 390 395 400	
25	gat ttt aag tga	1212
	Asp Phe Lys	

25 <210> 23
 <211> 403
 <212> PRT
 <213> *Salmonella*

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 313 792 T3

<400> 23

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

55

60

65

ES 2 313 792 T3

Ile Gln Met Asp Gln Gln Trp Arg Lys Val Gln Pro Leu Leu Ala Asp
245 250 255

5 Ile Pro Gly Leu Leu His Trp Gln Ile Ser His Ser His Gln Ser Gln
260 265 270

Gly Asp Asp Ile Ile Ser Ala Ile Ile Glu Asn Gly Leu Val Gly Leu
275 280 285

10 Val Asn Val Ser Pro Met Arg Arg Ser Phe Val Ile Ser Gly Val Leu
290 295 300

15 Asp Glu Ser His Gln Arg Ile Leu Gln Glu Thr Leu Ala Ala Leu Lys
305 310 315 320

Lys Lys Asp Pro Ala Leu Ser Leu Ile Tyr Gln Asp Ile Ala Pro Ser
325 330 335

20 His Asp Glu Ser Lys Tyr Leu Pro Ala Pro Val Ala Gly Phe Val Gln
340 345 350

25 Ser Arg His Gly Asn Tyr Leu Leu Leu Thr Asn Lys Glu Arg Leu Arg
355 360 365

Val Gly Ala Leu Leu Pro Asn Gly Gly Glu Ile Val His Leu Ser Ala
370 375 380

30 Asp Val Val Thr Ile Lys His Tyr Asp Thr Leu Ile Asn Tyr Pro Leu
385 390 395 400

Asp Phe Lys

35

<210> 24
40 <211> 243
<212> ADN
<213> *Salmonella*
<220>
45 <221> CDS
<222> (1)..(240)

50

55

60

65

ES 2 313 792 T3

<400> 24

```

5      atg aca act ttg acc cgg tta gaa gat ttg ctg ctt cat tcg cgt gaa   48
      Met Thr Thr Leu Thr Arg Leu Glu Asp Leu Leu Leu His Ser Arg Glu
        1           5           10           15

10     gag gcc aaa ggc ata att tta caa tta agg gct gcc cgg aaa cag tta   96
      Glu Ala Lys Gly Ile Ile Leu Gln Leu Arg Ala Ala Arg Lys Gln Leu
        20           25           30

15     gaa gag aac aac ggc aag tta cag gat ccg cag caa tat cag caa aac   144
      Glu Glu Asn Asn Gly Lys Leu Gln Asp Pro Gln Gln Tyr Gln Gln Asn
        35           40           45

20     acc tta ttg ctt gaa gcg atc gag cag gcc gaa aat atc atc aac att   192
      Thr Leu Leu Leu Glu Ala Ile Glu Gln Ala Glu Asn Ile Ile Asn Ile
        50           55           60

25     att tat tat cgt tac cat aac agc gca ctt gta gtg agt gag caa gag   240
      Ile Tyr Tyr Arg Tyr His Asn Ser Ala Leu Val Val Ser Glu Gln Glu
        65           70           75           80

      taa                                     243

```

<210> 25

<211> 80

<212> PRT

<213> *Salmonella*

<400> 25

```

40     Met Thr Thr Leu Thr Arg Leu Glu Asp Leu Leu Leu His Ser Arg Glu
        1           5           10           15

      Glu Ala Lys Gly Ile Ile Leu Gln Leu Arg Ala Ala Arg Lys Gln Leu
        20           25           30

45     Glu Glu Asn Asn Gly Lys Leu Gln Asp Pro Gln Gln Tyr Gln Gln Asn
        35           40           45

      Thr Leu Leu Leu Glu Ala Ile Glu Gln Ala Glu Asn Ile Ile Asn Ile
        50           55           60

50     Ile Tyr Tyr Arg Tyr His Asn Ser Ala Leu Val Val Ser Glu Gln Glu
        65           70           75           80

```

<210> 26

<211> 216

<212> ADN

<213> *Salmonella*

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(213)

ES 2 313 792 T3

<400> 26

```

5      atg gat att gca caa tta gtg gat atg ctc tcc cac atg gcg cac cag   48
      Met Asp Ile Ala Gln Leu Val Asp Met Leu Ser His Met Ala His Gln
        1           5           10          15

10     gca ggc cag gcc att aat gac aaa atg aat ggt aat gat ttg ctc aac   96
      Ala Gly Gln Ala Ile Asn Asp Lys Met Asn Gly Asn Asp Leu Leu Asn
          20           25           30

15     cca gaa tcg atg att aaa gcg caa ttt gcc tta cag cag tat tct aca   144
      Pro Glu Ser Met Ile Lys Ala Gln Phe Ala Leu Gln Gln Tyr Ser Thr
          35           40           45

20     ttt att aat tac gaa agt tca ctg atc aaa atg atc aag gat atg ctt   192
      Phe Ile Asn Tyr Glu Ser Ser Leu Ile Lys Met Ile Lys Asp Met Leu
          50           55           60

25     agt gga atc att gct aaa atc tga                                   216
      Ser Gly Ile Ile Ala Lys Ile
          65           70

```

25

<210> 27

<211> 71

30 <212> PRT

<213> *Salmonella*

35 <400> 27

```

40     Met Asp Ile Ala Gln Leu Val Asp Met Leu Ser His Met Ala His Gln
        1           5           10          15

      Ala Gly Gln Ala Ile Asn Asp Lys Met Asn Gly Asn Asp Leu Leu Asn
          20           25           30

45     Pro Glu Ser Met Ile Lys Ala Gln Phe Ala Leu Gln Gln Tyr Ser Thr
          35           40           45

      Phe Ile Asn Tyr Glu Ser Ser Leu Ile Lys Met Ile Lys Asp Met Leu
          50           55           60

50     Ser Gly Ile Ile Ala Lys Ile
        65           70

```

55

<210> 28

<211> 228

60 <212> ADN

<213> *Salmonella*

<220>

65 <221> CDS

<222> (1)..(225)

ES 2 313 792 T3

<400> 28

```

5      atg ttt gcg ggc gtt aac cat agc ctg att tcc cag gta cat gcg atg   48
      Met Phe Ala Gly Val Asn His Ser Leu Ile Ser Gln Val His Ala Met
        1             5             10             15

10     tta cca gcg cta acg gtt att gtt ccg gat aaa aaa tta cag ttg gta   96
      Leu Pro Ala Leu Thr Val Ile Val Pro Asp Lys Lys Leu Gln Leu Val
           20             25             30

15     tgt ctg gca tta ttg ttg gcg ggt tta aat gag ccg cta aaa gcc gcg   144

      Cys Leu Ala Leu Leu Leu Ala Gly Leu Asn Glu Pro Leu Lys Ala Ala
           35             40             45

20     aaa att tta tcg gat ata gat ttg cca gag gct atg gcg ctg cgt ctg   192
      Lys Ile Leu Ser Asp Ile Asp Leu Pro Glu Ala Met Ala Leu Arg Leu
           50             55             60

25     tta ttt cct gca cca aat gag ggg ttt gaa aat tga   228
      Leu Phe Pro Ala Pro Asn Glu Gly Phe Glu Asn
           65             70             75

```

30 <210> 29
 <211> 75
 <212> PRT
 <213> *Salmonella*
 35 <400> 29

```

40     Met Phe Ala Gly Val Asn His Ser Leu Ile Ser Gln Val His Ala Met
        1             5             10             15

45     Leu Pro Ala Leu Thr Val Ile Val Pro Asp Lys Lys Leu Gln Leu Val
           20             25             30

      Cys Leu Ala Leu Leu Leu Ala Gly Leu Asn Glu Pro Leu Lys Ala Ala
           35             40             45

50     Lys Ile Leu Ser Asp Ile Asp Leu Pro Glu Ala Met Ala Leu Arg Leu
           50             55             60

      Leu Phe Pro Ala Pro Asn Glu Gly Phe Glu Asn
           65             70             75

```

60 <210> 30
 <211> 249
 <212> ADN
 <213> *Salmonella*
 65 <220>
 <221> CDS

ES 2 313 792 T3

<222> (1)..(246)

<400> 30

5

```
atg agc gta gtg cct gta agc act caa tct tat gta aag tcc tct gca 48
Met Ser Val Val Pro Val Ser Thr Gln Ser Tyr Val Lys Ser Ser Ala
1 5 10 15
```

10

```
gaa ccg agc cag gag caa att aat ttt ttt gaa caa ttg ctg aaa gat 96
Glu Pro Ser Gln Glu Gln Ile Asn Phe Phe Glu Gln Leu Leu Lys Asp
20 25 30
```

15

```
gaa gca tcc acc agt aac gcc agt gct tta tta ccg cag gtt atg ttg 144
Glu Ala Ser Thr Ser Asn Ala Ser Ala Leu Leu Pro Gln Val Met Leu
35 40 45
```

20

```
acc aga caa atg gat tat atg cag tta acg gta ggc gtc gat tat ctt 192
Thr Arg Gln Met Asp Tyr Met Gln Leu Thr Val Gly Val Asp Tyr Leu
50 55 60
```

25

```
gcc aga ata tca ggc gca gca tcg caa gcg ctt aat aag ctg gat aac 240
Ala Arg Ile Ser Gly Ala Ala Ser Gln Ala Leu Asn Lys Leu Asp Asn
65 70 75 80
```

```
atg gca tga 249
Met Ala
```

30

<210> 31

<211> 82

<212> PRT

35 <213> *Salmonella*

<400> 31

40

```
Met Ser Val Val Pro Val Ser Thr Gln Ser Tyr Val Lys Ser Ser Ala
1 5 10 15
```

```
Glu Pro Ser Gln Glu Gln Ile Asn Phe Phe Glu Gln Leu Leu Lys Asp
20 25 30
```

45

```
Glu Ala Ser Thr Ser Asn Ala Ser Ala Leu Leu Pro Gln Val Met Leu
35 40 45
```

50

```
Thr Arg Gln Met Asp Tyr Met Gln Leu Thr Val Gly Val Asp Tyr Leu
50 55 60
```

```
Ala Arg Ile Ser Gly Ala Ala Ser Gln Ala Leu Asn Lys Leu Asp Asn
65 70 75 80
```

55

<210> 32

<211> 750

60

<212> ADN

<213> *Salmonella*

<220>

65

<221> CDS

<222> (1)..(747)

ES 2 313 792 T3

<400> 32

5	atg aag gtt cat cgt ata gta ttt ctt act gtc ctt acg ttc ttt ctt	48
	Met Lys Val His Arg Ile Val Phe Leu Thr Val Leu Thr Phe Phe Leu	
	1 5 10 15	
10	acg gca tgt gat gtg gat ctt tat cgc tca ttg cca gaa gat gaa gcg	96
	Thr Ala Cys Asp Val Asp Leu Tyr Arg Ser Leu Pro Glu Asp Glu Ala	
	20 25 30	
15	aat caa atg ctg gca tta ctt atg cag cat cat att gat gcg gaa aaa	144
	Asn Gln Met Leu Ala Leu Leu Met Gln His His Ile Asp Ala Glu Lys	
	35 40 45	
20	aaa cag gaa gag gat ggt gta acc tta cgt gtc gag cag tcg cag ttt	192
	Lys Gln Glu Glu Asp Gly Val Thr Leu Arg Val Glu Gln Ser Gln Phe	
	50 55 60	
25	att aat gcg gtt gag cta ctt aga ctt aac ggt tat ccg cat agg cag	240
	Ile Asn Ala Val Glu Leu Leu Arg Leu Asn Gly Tyr Pro His Arg Gln	
	65 70 75 80	
30	ttt aca acg gcg gat aag atg ttt ccg gct aat cag tta gtg gta tca	288
	Phe Thr Thr Ala Asp Lys Met Phe Pro Ala Asn Gln Leu Val Val Ser	
	85 90 95	
35	ccc cag gaa gaa cag cag aag att aat ttt tta aaa gaa caa aga att	336
	Pro Gln Glu Glu Gln Gln Lys Ile Asn Phe Leu Lys Glu Gln Arg Ile	
	100 105 110	
40	gaa gga atg ctg agt cag atg gag ggc gtg att aat gca aaa gtg acc	384
	Glu Gly Met Leu Ser Gln Met Glu Gly Val Ile Asn Ala Lys Val Thr	
	115 120 125	
45	att gcg cta ccg act tat gat gag gga agt aac gct tct ccg agc tca	432
	Ile Ala Leu Pro Thr Tyr Asp Glu Gly Ser Asn Ala Ser Pro Ser Ser	
	130 135 140	
50	gtt gcc gta ttt ata aaa tat tca cct cag gtc aat atg gag gcc ttt	480
	Val Ala Val Phe Ile Lys Tyr Ser Pro Gln Val Asn Met Glu Ala Phe	
	145 150 155 160	
55	cgg gta aaa att aaa gat tta ata gag atg tca atc cct ggg ttg caa	528
	Arg Val Lys Ile Lys Asp Leu Ile Glu Met Ser Ile Pro Gly Leu Gln	
	165 170 175	
60	tac agt aag att agt atc ttg atg cag cct gct gaa ttc aga atg gta	576
	Tyr Ser Lys Ile Ser Ile Leu Met Gln Pro Ala Glu Phe Arg Met Val	
	180 185 190	
65	gct gac gta ccc gcg aga caa aca ttc tgg att atg gac gtt atc aac	624
	Ala Asp Val Pro Ala Arg Gln Thr Phe Trp Ile Met Asp Val Ile Asn	
	195 200 205	
70	gcc aat aaa ggg aag gtg gtg aag tgg ttg atg aaa tac cct tat ccg	672
	Ala Asn Lys Gly Lys Val Val Lys Trp Leu Met Lys Tyr Pro Tyr Pro	
	210 215 220	
75	ttg atg tta tcg ttg aca gga ctg tta tta gga gtg ggc atc ctg atc	720
	Leu Met Leu Ser Leu Thr Gly Leu Leu Leu Gly Val Gly Ile Leu Ile	
	225 230 235 240	
80	ggc tat ttt tgc ctg aga cgc cgt ttt tga	750
	Gly Tyr Phe Cys Leu Arg Arg Arg Phe	
	245	

<210> 33

65 <211> 249

<212> PRT

<213> *Salmonella*

ES 2 313 792 T3

<400> 33

```

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

```

<210> 34

55 <211> 2763

<212> ADN

<213> *Salmonella*

<220>

60 <221> CDS

<222> (1)..(2760)

<400> 34

```

65 atg aat ttg ctc aat ctc aag aat acg ctg caa aca tct tta gta atc 48
Met Asn Leu Leu Asn Leu Lys Asn Thr Leu Gln Thr Ser Leu Val Ile

```

ES 2 313 792 T3

	1	5	10	15	
	agg cta act ttt tta ttt tta tta aca aca ata att att tgg ctg cta	96			
	Arg Leu Thr Phe Leu Phe Leu Leu Thr Thr Ile Ile Ile Trp Leu Leu				
5	20	25	30		
	tct gtg ctt acc gca gct tat ata tca atg gtt cag aaa cgg cag cat	144			
	Ser Val Leu Thr Ala Ala Tyr Ile Ser Met Val Gln Lys Arg Gln His				
	35	40	45		
10	ata ata gag gat tta tcc gtt cta tcc gag atg aat att gta cta agc	192			
	Ile Ile Glu Asp Leu Ser Val Leu Ser Glu Met Asn Ile Val Leu Ser				
	50	55	60		
	aat caa cgg ttt gaa gaa gct gaa cgt gac gct aaa aat tta atg tat	240			
	Asn Gln Arg Phe Glu Glu Ala Glu Arg Asp Ala Lys Asn Leu Met Tyr				
15	65	70	75	80	
	caa tgc tca tta gcg act gag att cat cat aac gat att ttc cct gag	288			
	Gln Cys Ser Leu Ala Thr Glu Ile His His Asn Asp Ile Phe Pro Glu				
	85	90	95		
20	gtg agc cgg cat cta tct gtc ggt cct tca aat tgc acg ccg acg cta	336			
	Val Ser Arg His Leu Ser Val Gly Pro Ser Asn Cys Thr Pro Thr Leu				
	100	105	110		
	aac gga gag aag cac cgt ctc ttt ctg cag tcc tct gat atc gat gaa	384			
	Asn Gly Glu Lys His Arg Leu Phe Leu Gln Ser Ser Asp Ile Asp Glu				
25	115	120	125		
	aat agc ttt cgt cgc gat agt ttt att ctt aat cat aaa aat gag att	432			
	Asn Ser Phe Arg Arg Asp Ser Phe Ile Leu Asn His Lys Asn Glu Ile				
	130	135	140		
30	tgc tta tta tct act gat aac cct tca gat tat tca act cta cag cct	480			
	Ser Leu Leu Ser Thr Asp Asn Pro Ser Asp Tyr Ser Thr Leu Gln Pro				
	145	150	155	160	
	tta acg cga aaa agc ttt cct tta tac cca acc cat gcc ggg ttt tac	528			
	Leu Thr Arg Lys Ser Phe Pro Leu Tyr Pro Thr His Ala Gly Phe Tyr				
35	165	170	175		
	tgg agt gaa cca gaa tac ata aac ggc aaa gga tgg cac gct tcc gtt	576			
	Trp Ser Glu Pro Glu Tyr Ile Asn Gly Lys Gly Trp His Ala Ser Val				
	180	185	190		
40	gcg gtt gcc gat cag caa ggc gta ttt ttt gag gtg acg gtt aaa ctt	624			
	Ala Val Ala Asp Gln Gln Gly Val Phe Phe Glu Val Thr Val Lys Leu				
	195	200	205		
	ccc gat ctc att act aag agc cac ctg cca tta gat gat agt att cga	672			
	Pro Asp Leu Ile Thr Lys Ser His Leu Pro Leu Asp Asp Ser Ile Arg				
45	210	215	220		
	gta tgg ctg gat caa aac aac cac tta ttg ccg ttt tca tac atc ccg	720			
	Val Trp Leu Asp Gln Asn Asn His Leu Leu Pro Phe Ser Tyr Ile Pro				
	225	230	235	240	
50	caa aaa ata cgt aca cag tta gaa aat gta acg ctg cat gat gga tgg	768			
	Gln Lys Ile Arg Thr Gln Leu Glu Asn Val Thr Leu His Asp Gly Trp				
	245	250	255		
	cag caa att ccc gga ttt ctg ata tta cgc aca acc ttg cat ggc ccc	816			
	Gln Gln Ile Pro Gly Phe Leu Ile Leu Arg Thr Thr Leu His Gly Pro				
55	260	265	270		
	gga tgg agt ctg gtt acg ctg tac cca tac ggt aat cta cat aat cgc	864			
	Gly Trp Ser Leu Val Thr Leu Tyr Pro Tyr Gly Asn Leu His Asn Arg				
	275	280	285		
60	atc tta aaa att atc ctt caa caa atc ccc ttt aca tta aca gca ttg	912			
	Ile Leu Lys Ile Ile Leu Gln Gln Ile Pro Phe Thr Leu Thr Ala Leu				
	290	295	300		
	gtg ttg atg acg tcg gct ttt tgc tgg tta cta cat cgc tca ctg gcc	960			
65	Val Leu Met Thr Ser Ala Phe Cys Trp Leu Leu His Arg Ser Leu Ala				

ES 2 313 792 T3

	305	310	315	320	
	aaa ccg tta tgg cgt ttt gtc gat gtc att aat aaa acc gca act gca				1008
	Lys Pro Leu Trp Arg Phe Val Asp Val Ile Asn Lys Thr Ala Thr Ala				
5		325	330	335	
	ccg ctg agc aca cgt tta cca gca caa cga ctg gat gaa tta gat agt				1056
	Pro Leu Ser Thr Arg Leu Pro Ala Gln Arg Leu Asp Glu Leu Asp Ser				
		340	345	350	
10	att gcc ggt gct ttt aac caa ctg ctt gat act cta caa gtc caa tac				1104
	Ile Ala Gly Ala Phe Asn Gln Leu Leu Asp Thr Leu Gln Val Gln Tyr				
		355	360	365	
	gac aat ctg gaa aac aaa gtc gca gag cgc acc cag cgc cta aat gaa				1152
15	Asp Asn Leu Glu Asn Lys Val Ala Glu Arg Thr Gln Ala Leu Asn Glu				
		370	375	380	
	gca aaa aaa cgc gct gag cga gct aac aaa cgt aaa agc att cat ctt				1200
	Ala Lys Lys Arg Ala Glu Arg Ala Asn Lys Arg Lys Ser Ile His Leu				
		385	390	395	400
20	acg gta ata agt cat gag tta cgt act ccg atg aat ggc gta ctc ggt				1248
	Thr Val Ile Ser His Glu Leu Arg Thr Pro Met Asn Gly Val Leu Gly				
		405	410	415	
	gca att gaa tta tta caa acc acc cct tta aac ata gag caa caa gga				1296
25	Ala Ile Glu Leu Leu Gln Thr Thr Pro Leu Asn Ile Glu Gln Gln Gly				
		420	425	430	
	tta gct gat acc gcc aga aat tgt aca ctg tct ttg tta gct att att				1344
	Leu Ala Asp Thr Ala Arg Asn Cys Thr Leu Ser Leu Leu Ala Ile Ile				
		435	440	445	
30	aat aat ctg ctg gat ttt tca cgc atc gag tct ggt cat ttc aca tta				1392
	Asn Asn Leu Leu Asp Phe Ser Arg Ile Glu Ser Gly His Phe Thr Leu				
		450	455	460	
	cat atg gaa gaa aca cgc tta ctg ccg tta ctg gac cag gca atg caa				1440
35	His Met Glu Glu Thr Ala Leu Leu Pro Leu Leu Asp Gln Ala Met Gln				
		465	470	475	480
	acc atc cag ggg cca cgc caa agc aaa aaa ctg tca tta cgt act ttt				1488
	Thr Ile Gln Gly Pro Ala Gln Ser Lys Lys Leu Ser Leu Arg Thr Phe				
		485	490	495	
40	gtc ggt caa cat gtc cct ctc tat ttt cat acc gac agt atc cgt tta				1536
	Val Gly Gln His Val Pro Leu Tyr Phe His Thr Asp Ser Ile Arg Leu				
		500	505	510	
	cgg caa att ttg gtt aat tta ctc ggg aac cgc gta aaa ttt acc gaa				1584
45	Arg Gln Ile Leu Val Asn Leu Leu Gly Asn Ala Val Lys Phe Thr Glu				
		515	520	525	
	acc gga ggg ata cgt ctg acg gtc aag cgt cat gag gaa caa tta ata				1632
	Thr Gly Gly Ile Arg Leu Thr Val Lys Arg His Glu Glu Gln Leu Ile				
		530	535	540	
50	ttt ctg gtt agc gat agc ggt aaa ggg att gaa ata cag cag cag tct				1680
	Phe Leu Val Ser Asp Ser Gly Lys Gly Ile Glu Ile Gln Gln Gln Ser				
		545	550	555	560
	caa atc ttt act gct ttt tat caa gca gac aca aat tcg caa ggt aca				1728
55	Gln Ile Phe Thr Ala Phe Tyr Gln Ala Asp Thr Asn Ser Gln Gly Thr				
		565	570	575	
	gga att gga ctg act att gcg tca agc ctg gct aaa atg atg ggc ggt				1776
	Gly Ile Gly Leu Thr Ile Ala Ser Ser Leu Ala Lys Met Met Gly Gly				
		580	585	590	
60	aat ctg aca cta aaa agt gtc ccc ggg gtt gga acc tgt gtc tcg cta				1824
	Asn Leu Thr Leu Lys Ser Val Pro Gly Val Gly Thr Cys Val Ser Leu				
		595	600	605	
	gta tta ccc tta caa gaa tac cag ccg cct caa cca att aaa ggg acg				1872
65	Val Leu Pro Leu Gln Glu Tyr Gln Pro Pro Gln Pro Ile Lys Gly Thr				

ES 2 313 792 T3

	610	615	620	
	ctg tca gcg ccg ttc tgc ctg cat cgg caa ctg gct tgc tgg gga ata			1920
	Leu Ser Ala Pro Phe Cys Leu His Arg Gln Leu Ala Cys Trp Gly Ile			
	625	630	635	640
5	cgc ggt gaa cca ccc cac cag caa aat gcg ctt ctc aac gca gag ctt			1968
	Arg Gly Glu Pro Pro His Gln Gln Asn Ala Leu Leu Asn Ala Glu Leu			
	645	650	655	
	ttg tat ttc tcc gga aaa ctc tac gac ctg gcg caa cag tta ata ttg			2016
10	Leu Tyr Phe Ser Gly Lys Leu Tyr Asp Leu Ala Gln Gln Leu Ile Leu			
	660	665	670	
	tgt aca cca aat atg cca gta ata aat aat ttg tta cca ccc tgg cag			2064
	Cys Thr Pro Asn Met Pro Val Ile Asn Asn Leu Leu Pro Pro Trp Gln			
	675	680	685	
15	ttg cag att ctt ttg gtt gat gat gcc gat att aat cgg gat atc atc			2112
	Leu Gln Ile Leu Leu Val Asp Asp Ala Asp Ile Asn Arg Asp Ile Ile			
	690	695	700	
	ggc aaa atg ctt gtc agc ctg ggc caa cac gtc act att gcc gcc agt			2160
20	Gly Lys Met Leu Val Ser Leu Gly Gln His Val Thr Ile Ala Ala Ser			
	705	710	715	720
	agt aac gag gct ctg act tta tca caa cag cag cga ttc gat tta gta			2208
	Ser Asn Glu Ala Leu Thr Leu Ser Gln Gln Gln Arg Phe Asp Leu Val			
	725	730	735	
25	ctg att gac att aga atg cca gaa ata gat ggt att gaa tgt gta cga			2256
	Leu Ile Asp Ile Arg Met Pro Glu Ile Asp Gly Ile Glu Cys Val Arg			
	740	745	750	
	tta tgg cat gat gag ccg aat aat tta gat cct gac tgc atg ttt gtg			2304
30	Leu Trp His Asp Glu Pro Asn Asn Leu Asp Pro Asp Cys Met Phe Val			
	755	760	765	
	gca cta tcc gct agc gta gcg aca gaa gat att cat cgt tgt aaa aaa			2352
35	Ala Leu Ser Ala Ser Val Ala Thr Glu Asp Ile His Arg Cys Lys Lys			
	770	775	780	
	aat ggg att cat cat tac att aca aaa cca gtg aca ttg gct acc tta			2400
	Asn Gly Ile His His Tyr Ile Thr Lys Pro Val Thr Leu Ala Thr Leu			
	785	790	795	800
40	gct cgc tac atc agt att gcc gca gaa tac caa ctt tta cga aat ata			2448
	Ala Arg Tyr Ile Ser Ile Ala Ala Glu Tyr Gln Leu Leu Arg Asn Ile			
	805	810	815	
	gag cta cag gag cag gat ccg agt cgc tgc tca gcg cta ctg gcg aca			2496
45	Glu Leu Gln Glu Gln Asp Pro Ser Arg Cys Ser Ala Leu Leu Ala Thr			
	820	825	830	
	gat gat atg gtc att aat agc aag att ttc caa tca ctg gac ctc ttg			2544
	Asp Asp Met Val Ile Asn Ser Lys Ile Phe Gln Ser Leu Asp Leu Leu			
	835	840	845	
50	ctg gct gat att gaa aat gcc gta tcg gct gga gaa aaa atc gat cag			2592
	Leu Ala Asp Ile Glu Asn Ala Val Ser Ala Gly Glu Lys Ile Asp Gln			
	850	855	860	
	tta att cac aca tta aaa ggc tgt tta ggt caa ata ggg cag act gaa			2640
55	Leu Ile His Thr Leu Lys Gly Cys Leu Gly Gln Ile Gly Gln Thr Glu			
	865	870	875	880
	ttg gta tgc tat gtc ata gac att gag aat cgc gta aaa atg ggg aaa			2688
	Leu Val Cys Tyr Val Ile Asp Ile Glu Asn Arg Val Lys Met Gly Lys			
	885	890	895	
60	atc atc gcg ctg gag gaa cta acc gac tta cgc cag aaa ata cgt atg			2736
	Ile Ile Ala Leu Glu Glu Leu Thr Asp Leu Arg Gln Lys Ile Arg Met			
	900	905	910	
	atc ttc aaa aac tac acc att act taa			2763
65	Ile Phe Lys Asn Tyr Thr Ile Thr			
	915	920		

ES 2 313 792 T3

<210> 35

<211> 920

<212> PRT

5 <213> *Salmonella*

<400> 35

10	Met Asn Leu Leu Asn Leu Lys Asn Thr Leu Gln Thr Ser Leu Val Ile
	1 5 10 15
	Arg Leu Thr Phe Leu Phe Leu Leu Thr Thr Ile Ile Ile Trp Leu Leu
	20 25 30
15	Ser Val Leu Thr Ala Ala Tyr Ile Ser Met Val Gln Lys Arg Gln His
	35 40 45
	Ile Ile Glu Asp Leu Ser Val Leu Ser Glu Met Asn Ile Val Leu Ser
20	50 55 60
	Asn Gln Arg Phe Glu Glu Ala Glu Arg Asp Ala Lys Asn Leu Met Tyr
	65 70 75 80
25	Gln Cys Ser Leu Ala Thr Glu Ile His His Asn Asp Ile Phe Pro Glu
	85 90 95
	Val Ser Arg His Leu Ser Val Gly Pro Ser Asn Cys Thr Pro Thr Leu
30	100 105 110
	Asn Gly Glu Lys His Arg Leu Phe Leu Gln Ser Ser Asp Ile Asp Glu
	115 120 125
	Asn Ser Phe Arg Arg Asp Ser Phe Ile Leu Asn His Lys Asn Glu Ile
35	130 135 140
	Ser Leu Leu Ser Thr Asp Asn Pro Ser Asp Tyr Ser Thr Leu Gln Pro
	145 150 155 160
	Leu Thr Arg Lys Ser Phe Pro Leu Tyr Pro Thr His Ala Gly Phe Tyr
40	165 170 175
	Trp Ser Glu Pro Glu Tyr Ile Asn Gly Lys Gly Trp His Ala Ser Val
	180 185 190
	Ala Val Ala Asp Gln Gln Gly Val Phe Phe Glu Val Thr Val Lys Leu
45	195 200 205
	Pro Asp Leu Ile Thr Lys Ser His Leu Pro Leu Asp Asp Ser Ile Arg
	210 215 220
	Val Trp Leu Asp Gln Asn Asn His Leu Leu Pro Phe Ser Tyr Ile Pro
50	225 230 235 240
	Gln Lys Ile Arg Thr Gln Leu Glu Asn Val Thr Leu His Asp Gly Trp
	245 250 255
55	Gln Gln Ile Pro Gly Phe Leu Ile Leu Arg Thr Thr Leu His Gly Pro
	260 265 270
	Gly Trp Ser Leu Val Thr Leu Tyr Pro Tyr Gly Asn Leu His Asn Arg
	275 280 285
60	Ile Leu Lys Ile Ile Leu Gln Gln Ile Pro Phe Thr Leu Thr Ala Leu
	290 295 300
	Val Leu Met Thr Ser Ala Phe Cys Trp Leu Leu His Arg Ser Leu Ala
	305 310 315 320
65	Lys Pro Leu Trp Arg Phe Val Asp Val Ile Asn Lys Thr Ala Thr Ala
	325 330 335

ES 2 313 792 T3

Pro Leu Ser Thr Arg Leu Pro Ala Gln Arg Leu Asp Glu Leu Asp Ser
 340 345 350
 Ile Ala Gly Ala Phe Asn Gln Leu Leu Asp Thr Leu Gln Val Gln Tyr
 355 360 365
 Asp Asn Leu Glu Asn Lys Val Ala Glu Arg Thr Gln Ala Leu Asn Glu
 370 375 380
 Ala Lys Lys Arg Ala Glu Arg Ala Asn Lys Arg Lys Ser Ile His Leu
 385 390 395 400
 Thr Val Ile Ser His Glu Leu Arg Thr Pro Met Asn Gly Val Leu Gly
 405 410 415
 Ala Ile Glu Leu Leu Gln Thr Thr Pro Leu Asn Ile Glu Gln Gln Gly
 420 425 430
 Leu Ala Asp Thr Ala Arg Asn Cys Thr Leu Ser Leu Leu Ala Ile Ile
 435 440 445
 Asn Asn Leu Leu Asp Phe Ser Arg Ile Glu Ser Gly His Phe Thr Leu
 450 455 460
 His Met Glu Glu Thr Ala Leu Leu Pro Leu Leu Asp Gln Ala Met Gln
 465 470 475 480
 Thr Ile Gln Gly Pro Ala Gln Ser Lys Lys Leu Ser Leu Arg Thr Phe
 485 490 495
 Val Gly Gln His Val Pro Leu Tyr Phe His Thr Asp Ser Ile Arg Leu
 500 505 510
 Arg Gln Ile Leu Val Asn Leu Leu Gly Asn Ala Val Lys Phe Thr Glu
 515 520 525
 Thr Gly Gly Ile Arg Leu Thr Val Lys Arg His Glu Glu Gln Leu Ile
 530 535 540
 Phe Leu Val Ser Asp Ser Gly Lys Gly Ile Glu Ile Gln Gln Gln Ser
 545 550 555 560
 Gln Ile Phe Thr Ala Phe Tyr Gln Ala Asp Thr Asn Ser Gln Gly Thr
 565 570 575
 Gly Ile Gly Leu Thr Ile Ala Ser Ser Leu Ala Lys Met Met Gly Gly
 580 585 590
 Asn Leu Thr Leu Lys Ser Val Pro Gly Val Gly Thr Cys Val Ser Leu
 595 600 605
 Val Leu Pro Leu Gln Glu Tyr Gln Pro Pro Gln Pro Ile Lys Gly Thr
 610 615 620
 Leu Ser Ala Pro Phe Cys Leu His Arg Gln Leu Ala Cys Trp Gly Ile
 625 630 635 640
 Arg Gly Glu Pro Pro His Gln Gln Asn Ala Leu Leu Asn Ala Glu Leu
 645 650 655
 Leu Tyr Phe Ser Gly Lys Leu Tyr Asp Leu Ala Gln Gln Leu Ile Leu
 660 665 670
 Cys Thr Pro Asn Met Pro Val Ile Asn Asn Leu Leu Pro Pro Trp Gln
 675 680 685
 Leu Gln Ile Leu Leu Val Asp Asp Ala Asp Ile Asn Arg Asp Ile Ile
 690 695 700
 Glv Lys Met Leu Val Ser Leu Glv Gln His Val Thr Ile Ala Ala Ser

ES 2 313 792 T3

	705	710	715	720
5	Ser Asn Glu Ala Leu Thr Leu Ser Gln Gln Gln Arg Phe Asp Leu Val	725	730	735
	Leu Ile Asp Ile Arg Met Pro Glu Ile Asp Gly Ile Glu Cys Val Arg	740	745	750
10	Leu Trp His Asp Glu Pro Asn Asn Leu Asp Pro Asp Cys Met Phe Val	755	760	765
	Ala Leu Ser Ala Ser Val Ala Thr Glu Asp Ile His Arg Cys Lys Lys	770	775	780
15	Asn Gly Ile His His Tyr Ile Thr Lys Pro Val Thr Leu Ala Thr Leu	785	790	795
	Ala Arg Tyr Ile Ser Ile Ala Ala Glu Tyr Gln Leu Leu Arg Asn Ile	805	810	815
20	Glu Leu Gln Glu Gln Asp Pro Ser Arg Cys Ser Ala Leu Leu Ala Thr	820	825	830
25	Asp Asp Met Val Ile Asn Ser Lys Ile Phe Gln Ser Leu Asp Leu Leu	835	840	845
30	Leu Ala Asp Ile Glu Asn Ala Val Ser Ala Gly Glu Lys Ile Asp Gln	850	855	860
	Leu Ile His Thr Leu Lys Gly Cys Leu Gly Gln Ile Gly Gln Thr Glu	865	870	875
35	Leu Val Cys Tyr Val Ile Asp Ile Glu Asn Arg Val Lys Met Gly Lys	885	890	895
40	Ile Ile Ala Leu Glu Glu Leu Thr Asp Leu Arg Gln Lys Ile Arg Met	900	905	910
	Ile Phe Lys Asn Tyr Thr Ile Thr	915	920	

45

<210> 36

<211> 639

50 <212> ADN

<213> *Salmonella*

<220>

<221> CDS

55 <222> (1)..(636)

60

65

ES 2 313 792 T3

<400> 36

```

5      atg aaa gaa tat aag atc tta tta gta gac gat cat gaa atc atc att 48
      Met Lys Glu Tyr Lys Ile Leu Leu Val Asp Asp His Glu Ile Ile Ile
        1           5           10           15

10     aac ggc att atg aat gcc tta tta ccc tgg cct cat ttt aaa att gta 96
      Asn Gly Ile Met Asn Ala Leu Leu Pro Trp Pro His Phe Lys Ile Val
        20           25           30

15     gag cat gtt aaa aat ggt ctt gag gtt tat aat gcc tgt tgt gca tac 144
      Glu His Val Lys Asn Gly Leu Glu Val Tyr Asn Ala Cys Cys Ala Tyr
        35           40           45

20     gag cct gac ata ctt atc ctt gat ctt agt cta cct ggc atc aat ggc 192
      Glu Pro Asp Ile Leu Ile Leu Asp Leu Ser Leu Pro Gly Ile Asn Gly
        50           55           60

25     ctg gat atc att cct caa tta cat cag cgt tgg cca gca atg aat att 240
      Leu Asp Ile Ile Pro Gln Leu His Gln Arg Trp Pro Ala Met Asn Ile
        65           70           75           80

30     ctg gtt tac aca gca tac caa caa gag tat atg acc att aaa act tta 288
      Leu Val Tyr Thr Ala Tyr Gln Gln Glu Tyr Met Thr Ile Lys Thr Leu
        85           90           95

35     gcc gca ggt gct aat ggc tat gtt tta aaa agc agt agt cag caa gtt 336
      Ala Ala Gly Ala Asn Gly Tyr Val Leu Lys Ser Ser Ser Gln Gln Val
        100          105          110

40     ctg tta gcg gca ttg caa aca gta gca gta aac aag cgt tac att gac 384
      Leu Leu Ala Ala Leu Gln Thr Val Ala Val Asn Lys Arg Tyr Ile Asp
        115          120          125

45     cca acg ttg aat cgg gaa gct atc ctg gct gaa tta aac gct gac acg 432
      Pro Thr Leu Asn Arg Glu Ala Ile Leu Ala Glu Leu Asn Ala Asp Thr
        130          135          140

50     acc aat cat caa ctg ctt act ttg cgc gag cgt cag gtt ctt aaa ctt 480
      Thr Asn His Gln Leu Leu Thr Leu Arg Glu Arg Gln Val Leu Lys Leu
        145          150          155          160

55     att gac gag ggg tat acc aat cat ggg atc agc gaa aag cta cat atc 528
      Ile Asp Glu Gly Tyr Thr Asn His Gly Ile Ser Glu Lys Leu His Ile
        165          170          175

60     agt ata aaa acc gtc gaa aca cac cgg atg aat atg atg aga aag cta 576
      Ser Ile Lys Thr Val Glu Thr His Arg Met Asn Met Met Arg Lys Leu
        180          185          190

65     cag gtt cat aaa gtg aca gag tta ctt aac tgt gcc cga aga atg agg 624
      Gln Val His Lys Val Thr Glu Leu Leu Asn Cys Ala Arg Arg Met Arg
        195          200          205

70     tta ata gag tat taa 639
      Leu Ile Glu Tyr
        210

```

<210> 37

<211> 212

65 <212> PRT

<213> *Salmonella*

ES 2 313 792 T3

<400> 37

```

5      Met Lys Glu Tyr Lys Ile Leu Leu Val Asp Asp His Glu Ile Ile Ile
      1           5           10           15

      Asn Gly Ile Met Asn Ala Leu Leu Pro Trp Pro His Phe Lys Ile Val
           20           25           30

10     Glu His Val Lys Asn Gly Leu Glu Val Tyr Asn Ala Cys Cys Ala Tyr
           35           40           45

      Glu Pro Asp Ile Leu Ile Leu Asp Leu Ser Leu Pro Gly Ile Asn Gly
           50           55           60

15     Leu Asp Ile Ile Pro Gln Leu His Gln Arg Trp Pro Ala Met Asn Ile
           65           70           75           80

20     Leu Val Tyr Thr Ala Tyr Gln Gln Glu Tyr Met Thr Ile Lys Thr Leu
           85           90           95

      Ala Ala Gly Ala Asn Gly Tyr Val Leu Lys Ser Ser Ser Gln Gln Val
           100          105          110

25     Leu Leu Ala Ala Leu Gln Thr Val Ala Val Asn Lys Arg Tyr Ile Asp
           115          120          125

      Pro Thr Leu Asn Arg Glu Ala Ile Leu Ala Glu Leu Asn Ala Asp Thr
           130          135          140

30     Thr Asn His Gln Leu Leu Thr Leu Arg Glu Arg Gln Val Leu Lys Leu
           145          150          155          160

35     Ile Asp Glu Gly Tyr Thr Asn His Gly Ile Ser Glu Lys Leu His Ile
           165          170          175

      Ser Ile Lys Thr Val Glu Thr His Arg Met Asn Met Met Arg Lys Leu
           180          185          190

      Gln Val His Lys Val Thr Glu Leu Leu Asn Cys Ala Arg Arg Met Arg
           195          200          205

45     Leu Ile Glu Tyr
           210

```

<210> 38

<211> 388

50 <212> ADN

<213> *Salmonella*

55 <400> 38

```

60     gcttcctcc agttgctgt tgcaaaatct ttggcacttg atcactatcg cagtacatat 60
      agttcatca gaagattaat cgatggtgtt atcattagga agataaattt cttcatatat 120
      aaccagtcg atgactacaa ttacttttta ataagatggc gatgtaaaaa catcgtaaca 180
      gtttatttaa taaataattt ttcaaattgt aagtttttat gtcaatgctg aaaatgtaat 240
      tgtgaattta tcggaaaatc cgaatgatag aatcgctgtg gacaagggtat atgtagacag 300
      catcctgata ttgtacaaga agagatagtc gaaataaatg tgaatcaggc tttttacgga 360
      tgtggtgtg agcgaatttg atagaaac 388

```

65 <210> 39

<211> 262

ES 2 313 792 T3

<212> ADN

<213> *Salmonella*

5 <400> 39

```
taaaaatattc ttagagccta tcccaccagg cgtaattgg cgcagccagt ttggacacgg 60
atagcgcgcga aaaaccgcag cgtacacgta gtacgtgagg ttgactcgc tacgctcgcc 120
cttcgggccc cgcctagcgg cgttcaaaac gctaacgcgt ttggcgagc actgcccagg 180
ttcaaaatgg caagtaaaat agcctaattgg gataggctct tagttagcac gtaattatc 240
tattcgtgtat atggaggggga at                                     262
```

<210> 40

<211> 192

15 <212> PRT

<213> EPEC

<300>

<303> Mol. Microbiol.

20 <304> 28

<306> 1-4

<307> 1998

25 <400> 40

```
Met Asp Thr Ser Thr Thr Ala Ser Val Ala Ser Ala Asn Ala Ser Thr
  1              5              10              15

Ser Thr Ser Met Ala Tyr Asp Leu Gly Ser Met Ser Lys Asp Asp Val
              20              25              30

Ile Asp Leu Phe Asn Lys Leu Gly Val Phe Gln Ala Ala Ile Leu Met
              35              40              45

Phe Ala Tyr Met Tyr Gln Ala Gln Ser Asp Leu Ser Ile Ala Lys Phe
  50              55              60

Ala Asp Met Asn Glu Ala Ser Lys Glu Ser Thr Thr Ala Gln Lys Met
  65              70              75              80

Ala Asn Leu Val Asp Ala Lys Ile Ala Asp Val Gln Ser Ser Ser Asp
              85              90              95

Lys Asn Ala Lys Ala Gln Leu Pro Asp Glu Val Ile Ser Tyr Ile Asn
 100              105              110

Asp Pro Arg Asn Asp Ile Thr Ile Ser Gly Ile Asp Asn Ile Asn Ala
 115              120              125

Gln Leu Gly Ala Gly Asp Leu Gln Thr Val Lys Ala Ala Ile Ser Ala
 130              135              140

Lys Ala Asn Asn Leu Thr Thr Thr Val Asn Asn Ser Gln Leu Glu Ile
 145              150              155              160
```

<210> 41

60 <211> 380

<212> PRT

<213> EPEC

<300>

65 <303> Mol. Microbiol.

<304> 28

ES 2 313 792 T3

<306> 1-4

<307> 1998

5 <400> 41

	Met	Leu	Asn	Val	Asn	Asn	Asp	Ile	Gln	Ser	Val	Arg	Ser	Gly	Ala	Ser	
	1				5					10					15		
10	Ala	Ala	Thr	Ala	Thr	Ser	Gly	Ile	Asn	Gln	Ser	Glu	Val	Thr	Ser	Ala	
				20				25					30				
	Leu	Asp	Leu	Gln	Leu	Val	Lys	Ser	Thr	Ala	Pro	Ser	Ala	Ser	Trp	Thr	
15			35				40					45					
	Glu	Ser	Thr	Ala	Leu	Ala	Thr	Pro	Pro	Ala	Gly	His	Ser	Leu	Val	Thr	
		50				55					60						
20	Pro	Ser	Ala	Ala	Glu	Asp	Val	Leu	Ser	Lys	Leu	Phe	Gly	Gly	Ile	Ser	
	65					70					75				80		
	Gly	Glu	Val	Thr	Ser	Arg	Thr	Glu	Gly	Thr	Glu	Pro	Gln	Arg	Ser	Thr	
25				85				90						95			
	Gln	Asn	Ala	Ser	Ser	Gly	Tyr	Pro	Tyr	Leu	Ser	Gln	Val	Asn	Asn	Val	
			100					105					110				
30	Asp	Pro	Gln	Ala	Met	Met	Met	Met	Ala	Thr	Leu	Leu	Ser	Leu	Asp	Ala	
		115						120					125				
	Ser	Ala	Gln	Arg	Val	Ala	Ser	Met	Lys	Asn	Ser	Asn	Glu	Ile	Tyr	Ala	
		130				135						140					
35	Asp	Gly	Gln	Asn	Lys	Ala	Leu	Asp	Asn	Lys	Thr	Leu	Glu	Phe	Lys	Lys	
	145				150					155					160		
	Gln	Leu	Glu	Glu	Gln	Gln	Lys	Ala	Glu	Glu	Lys	Ala	Gln	Lys	Ser	Lys	
40				165					170					175			
	Ile	Val	Gly	Gln	Val	Phe	Gly	Trp	Leu	Gly	Val	Ala	Ala	Thr	Ala	Ile	
			180					185						190			
45	Ala	Ala	Ile	Phe	Asn	Pro	Ala	Leu	Trp	Ala	Val	Val	Ala	Ile	Ser	Ala	
		195				200							205				
	Thr	Ala	Met	Ala	Leu	Gln	Thr	Ala	Val	Asp	Val	Met	Gly	Asp	Asp	Ala	
50		210				215						220					
	Pro	Gln	Ala	Leu	Lys	Thr	Ala	Ala	Gln	Ala	Phe	Gly	Gly	Leu	Ser	Leu	
	225				230						235				240		
55	Ala	Ala	Gly	Ile	Leu	Thr	Ala	Gly	Ile	Gly	Gly	Val	Ser	Ser	Leu	Ile	
			245					250					255				
	Ser	Lys	Val	Gly	Asp	Val	Ala	Asn	Lys	Val	Gly	Ser	Asn	Ile	Val	Lys	
			260					265					270				
60	Val	Val	Thr	Thr	Leu	Ala	Asp	Thr	Phe	Val	Asp	Asn	Val	Ala	Ser	Lys	
			275					280					285				
65	Ile	Ser	Ala	Val	Ala	Asn	Gly	Leu	Thr	Thr	Ser	Ser	Arg	Ser	Ile	Gly	
		290				295					300						
	Thr	Thr	Val	Leu	Asn	Asn	Asp	Ala	Ala	Tyr	Tyr	Asn	Val	Leu	Ser	Gln	

ES 2 313 792 T3

	305		310		315		320
	Val Ser Ala Phe Ala Val Glu Asn Leu Thr Arg Gln Ser Glu Tyr Leu						
5		325		330		335	
	Ser Gln Ser Ala Lys Ala Glu Leu Glu Lys Ala Thr Leu Glu Leu Gln						
		340		345		350	
10	Asn Gln Ala Asn Tyr Ile Gln Ser Ala Ser Gln Leu Met Ser Asp Ser						
		355		360		365	
	Ala Arg Val Asn Ile Arg Ile Val Ser Gly Arg Val						
15		370		375		380	

<210> 42

<211> 401

<212> PRT

<213> *Yersinia enterocolitica*

<300>

<301> Hakansson, S.

Schesser, K.

Persson, C.

Galyov, E. E.

Rosqvist, R.

Homble, F.

Wolf Watz, H.

<303> EMBO J.

<304> 15

<306> 5812-5823

<307> 1996

ES 2 313 792 T3

<400> 42

5 Met Ser Ala Leu Ile Thr His Asp Arg Ser Thr Pro Val Thr Gly Ser
1 5 10 15

Leu Val Pro Tyr Ile Glu Thr Pro Ala Pro Ala Pro Leu Gln Thr Gln
20 25 30

10 Gln Val Ala Gly Glu Leu Lys Asp Lys Asn Gly Gly Val Ser Ser Gln
35 40 45

15 Gly Val Gln Leu Pro Ala Pro Leu Ala Val Val Ala Ser Gln Val Thr
50 55 60

Glu Gly Gln Gln Gln Glu Ile Thr Lys Leu Leu Glu Ser Val Thr Arg
65 70 75 80

20 Gly Thr Ala Gly Ser Gln Leu Ile Ser Asn Tyr Val Ser Val Leu Thr
85 90 95

25 Asn Phe Thr Leu Ala Ser Pro Asp Thr Phe Glu Ile Glu Leu Gly Lys
100 105 110

Leu Val Ser Asn Leu Glu Glu Val Arg Lys Asp Ile Lys Ile Ala Asp
115 120 125

30 Ile Gln Arg Leu His Glu Gln Asn Met Lys Lys Ile Glu Glu Asn Gln
130 135 140

Glu Lys Ile Lys Glu Thr Glu Glu Asn Ala Lys Gln Val Lys Lys Ser
145 150 155 160

35 Gly Met Ala Ser Lys Ile Phe Gly Trp Leu Ile Ala Ile Ala Ser Val
165 170 175

40 Val Ile Gly Ala Ile Met Val Ala Ser Gly Val Gly Ala Val Ala Gly
180 185 190

Ala Met Met Ile Ala Ser Gly Val Ile Gly Met Ala Asn Met Ala Val
195 200 205

ES 2 313 792 T3

Lys Gln Ala Ala Glu Asp Gly Leu Ile Ser Gln Glu Ala Met Gln Val
 210 215 220
 5 Leu Gly Pro Ile Leu Thr Ala Ile Glu Val Ala Leu Thr Val Val Ser
 225 230 235 240
 Thr Val Met Thr Phe Gly Gly Ser Ala Leu Lys Cys Leu Ala Asp Ile
 245 250 255
 10 Gly Ala Lys Leu Gly Ala Asn Thr Ala Ser Leu Ala Ala Lys Gly Ala
 260 265 270
 15 Glu Phe Ser Ala Lys Val Ala Gln Ile Ser Thr Gly Ile Ser Asn Thr
 275 280 285
 Val Gly Ser Ala Val Thr Lys Leu Gly Gly Ser Phe Gly Ser Leu Thr
 290 295 300
 20 Met Ser His Val Ile Arg Thr Gly Ser Gln Ala Thr Gln Val Ala Val
 305 310 315 320
 Gly Val Gly Ser Gly Ile Thr Gln Thr Ile Asn Asn Lys Lys Gln Ala
 325 330 335
 25 Asp Leu Gln His Asn Asn Ala Asp Leu Ala Leu Asn Lys Ala Asp Met
 340 345 350
 30 Ala Ala Leu Gln Ser Ile Ile Asp Arg Leu Lys Glu Glu Leu Ser His
 355 360 365
 Leu Ser Glu Ser His Arg Gln Val Met Glu Leu Ile Phe Gln Met Ile
 370 375 380
 35 Asn Ala Lys Gly Asp Met Leu His Asn Leu Ala Gly Arg Pro His Thr
 385 390 395 400
 40 Val

<210> 43

45 <211> 390

<212> PRT

<213> *Pseudomonas aeruginosa*

<300>

50 <301> Hauser, A. R.

Fleiszig, S

Kang, P. J.

Mostov, K.

Engel, J. N.

55 <303> Infect. Immun.

<304> 66

<306> 1413-1420

60 <307> 1998

65

ES 2 313 792 T3

<400> 43

```

5      Met Asn Pro Ile Thr Leu Glu Arg Ala Gly Leu Pro Tyr Gly Val Ala
      1             5             10             15

10     Asp Ala Gly Asp Ile Pro Ala Leu Gly Arg Pro Val Ala Arg Asp Val
      20             25             30

      Glu Ser Leu Arg Val Glu Arg Leu Ala Ala Pro Ala Ala Ala Ser Ala
      35             40             45

15     Ser Gly Thr Gly Val Ala Leu Thr Pro Pro Ser Ala Ala Ser Gln Gln
      50             55             60

      Arg Leu Glu Val Ala Asn Arg Ala Glu Ile Ala Ser Leu Val Gln Ala
20     65             70             75             80

      Val Gly Glu Asp Ala Gly Leu Ala Arg Gln Val Val Leu Ala Gly Ala

```

25

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 313 792 T3

Glu Leu Ala Lys Ile Thr Gly Glu Val Glu Asn Gln Gln Lys Lys Leu
 115 120 125
 5 Lys Leu Thr Glu Ile Glu Gln Ala Arg Lys Gln Asn Leu Gln Lys Met
 130 135 140
 Glu Asp Asn Gln Gln Lys Ile Arg Glu Ser Glu Glu Ala Ala Lys Glu
 145 150 155 160
 10 Ala Gln Lys Ser Gly Leu Ala Ala Lys Ile Phe Gly Trp Ile Ser Ala
 165 170 175
 15 Ile Ala Ser Ile Ile Val Gly Ala Ile Met Val Ala Thr Gly Val Gly
 180 185 190
 Ala Ala Ala Gly Ala Leu Met Ile Ala Gly Gly Val Met Gly Val Val
 195 200 205
 20 Ser Gln Ser Val Gln Gln Ala Ala Asp Gly Leu Ile Ser Lys Glu
 210 215 220
 25 Val Met Glu Lys Leu Gly Pro Ala Leu Met Gly Ile Glu Ile Ala Val
 225 230 235 240
 Ala Leu Leu Ala Ala Val Val Ser Phe Gly Gly Ser Ala Val Gly Gly
 245 250 255
 30 Leu Ala Lys Leu Gly Ala Lys Ile Gly Gly Lys Ala Ala Glu Met Thr
 260 265 270
 35 Ala Ser Leu Ala Ser Lys Val Ala Asn Leu Gly Gly Lys Phe Gly Ser
 275 280 285
 Leu Ala Gly Gln Ser Leu Ser His Ser Leu Lys Leu Gly Val Gln Val
 290 295 300
 40 Ser Asp Leu Thr Leu Asp Val Ala Asn Gly Ala Ala Gln Ala Thr His
 305 310 315 320
 Ser Gly Phe Gln Ala Lys Ala Ala Asn Arg Gln Ala Asp Val Gln Glu
 325 330 335
 45 Ser Arg Ala Asp Leu Thr Thr Leu Gln Gly Val Ile Glu Arg Leu Lys
 340 345 350
 50 Glu Glu Leu Ser Arg Met Leu Glu Ala Phe Gln Glu Ile Met Glu Arg
 355 360 365
 Ile Phe Ala Met Leu Gln Ala Lys Gly Glu Thr Leu His Asn Leu Ser
 370 375 380
 55 Ser Arg Pro Ala Ala Ile
 385 390

60 <210> 44
 <211> 20
 <212> ADN
 65 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Precursor

ES 2 313 792 T3

	<400> 44	
	ttttacgtg aagcggggtg	20
5	<210> 45	
	<211> 22	
	<212> ADN	
10	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia Artificial: Precursor	
15	<400> 45	
	ggcattagcg gatgtctgac tg	22
20	<210> 46	
	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
25	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia Artificial: Precursor	
30	<400> 46	
	caccaggaac cattttctct gg	22
35	<210> 47	
	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
40	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia Artificial: Precursor	
	<400> 47	
45	cagcgatgac gatattcgac aag	23
	<210> 48	
50	<211> 17	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
55	<223> Descripción de Secuencia Artificial: Precursor	
	<400> 48	
60	gaaatcccg c agaatg	17
	<210> 49	
	<211> 17	
65	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	

ES 2 313 792 T3

	<220>		
	<223> Descripción de Secuencia Artificial: Precursor		
5	<400> 49		
	aaggcgataa tataaac		17
10	<210> 50		
	<211> 17		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia Artificial		
15	<220>		
	<223> Descripción de Secuencia Artificial: Precursor		
	<400> 50		
20	agagatgtat tagatac		17
	<210> 51		
25	<211> 17		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia Artificial		
30	<220>		
	<223> Descripción de Secuencia Artificial: Precursor		
	<400> 51		
35	gcaataagag tatcaac		17
	<210> 52		
40	<211> 31		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia Artificial		
	<220>		
45	<223> Descripción de Secuencia Artificial: Precursor		
	<400> 52		
50	gctaagcttc ggctcaaatt gtttgaaaa c		31
	<210> 53		
	<211> 27		
55	<212> ADN		
	<213> Secuencia Artificial		
	<220>		
	<223> Descripción de Secuencia Artificial: Precursor		
60	<400> 53		
	gctaagctta gagatgtatt agatacc		27
65	<210> 54		
	<211> 23		

ES 2 313 792 T3

	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
5	<223> Descripción de Secuencia Artificial: Precursor	
	<400> 54	
10	attggatccg caagcgtcca gaa	23
	<210> 55	
	<211> 23	
15	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
20	<223> Descripción de Secuencia Artificial: Precursor	
	<400> 55	
25	tatggatcct cagattaagc gcg	23
	<210> 56	
	<211> 29	
30	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia Artificial: Precursor	
35	<400> 56	
40	atagaattcg gagggagatg gagtggaag	29
	<210> 57	
	<211> 30	
	<212> ADN	
45	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia Artificial: Precursor	
50	<400> 57	
	atagaattcg aagataaagc gattgccgac	30
55	<210> 58	
	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
60	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia Artificial: Precursor	
65	<400> 58	
	gaaggatcca ctccatctcc etc	23

ES 2 313 792 T3

	<210> 59	
	<211> 27	
	<212> ADN	
5	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia Artificial: Precursor	
10	<400> 59	
	gaaggatcca ttgctctat ttcttgc	27
15	<210> 60	
	<211> 30	
	<212> ADN	
20	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia Artificial: Precursor	
25	<400> 60	
	atgggatccg agattcgcca gaatgcgcaa	30
30	<210> 61	
	<211> 30	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
35	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia Artificial: Precursor	
40	<400> 61	
	atgggatcca ctggcataaa cggtttcg	30
45	<210> 62	
	<211> 27	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
50	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia Artificial: Precursor	
55	<400> 62	
	attggatcct gacgtaaatc attatca	27
60	<210> 63	
	<211> 27	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
65	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia Artificial: Precursor	

ES 2 313 792 T3

	<400> 63	
	attggatcct taagcaataa gtgaatc	27
5	<210> 64	
	<211> 25	
	<212> ADN	
10	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia Artificial: Precursor	
15	<400> 64	
	aaggaattca acaggcaact ggagg	25
20	<210> 65	
	<211> 26	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
25	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia Artificial: Precursor	
30	<400> 65	
	ctgccctcgc gaaaattaag ataata	26
35	<210> 66	
	<211> 17	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
40	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia Artificial: Precursor	
45	<400> 66	
	cttatttttc gcgaggg	17
50	<210> 67	
	<211> 18	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
55	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia Artificial: Precursor	
60	<400> 67	
	ggacgcccct ggtaata	18
65	<210> 68	
	<211> 29	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	

ES 2 313 792 T3

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Precursor

5 <400> 68

ggtctgcagg attttcacg catcgctc

29

10 <210> 69

<211> 30

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

15 <220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Precursor

<400> 69

20

ggtctgcaga accattgata tataagctgc

30

25

30

35

40

45

50

55

60

65