

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 473 605**

51 Int. Cl.:

**C07K 19/00** (2006.01)

**C12N 15/64** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.06.2009** **E 09759243 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.05.2014** **EP 2294090**

54 Título: **ClyA no hemolítica para la excreción de proteínas**

30 Prioridad:

**03.06.2008 US 58299 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**07.07.2014**

73 Titular/es:

**UNIVERSITY OF MARYLAND, BALTIMORE  
(100.0%)  
620 West Lexington Street, 4th Floor  
Baltimore, MD 21201, US**

72 Inventor/es:

**GALEN, JAMES E. y  
CHEN, YUANSHA**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**ES 2 473 605 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

ClyA no hemolítica para la excreción de proteínas

**Apoyo estatal**

5 El sistema de exportación de proteínas definido en la presente se desarrolló gracias a la subvención n.º MARCE US4 A1057168 de the National Institutes of Health. La administración de EEUU tiene ciertos derechos sobre esta invención.

**Antecedentes de la invención**Campo de la invención

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

Descripción de la técnica relacionada

15 Los sistemas de expresión de proteínas han utilizado durante mucho tiempo vectores de expresión o plásmidos de expresión de alto número de copias para intentar aumentar los rendimientos de proteínas recombinantes de interés. Los plásmidos de expresión de alto número de copias y las proteínas de interés que codifican pueden ejercer un efecto negativo sobre la aptitud de un hospedante que contiene un plásmido de expresión. La carga notable a la que se someten las células hospedantes procariontas que portan plásmidos de múltiples copias es el resultado acumulado de una cascada metabólica activada por dos procesos: 1) la replicación y el mantenimiento de los plásmidos de expresión, y 2) la transcripción y la traducción de las diversas funciones codificadas por el plásmido que incluye el gen de interés. Estos mecanismos pueden explicar la observación de que las bacterias que portan plásmidos crecen con más lentitud que las bacterias que no tienen plásmidos. Esta carga también puede explicar la observación de que la velocidad de crecimiento disminuye a medida que aumenta el número de copias.

25 A medida que se expresa el gen de interés, disminuye la velocidad de crecimiento de la célula hospedante recombinante. La disminución en la velocidad de crecimiento puede activar la inducción de diversas proteasas celulares que pueden degradar la proteína producida de modo recombinante presente en el citoplasma de la célula hospedante. Por tanto, una menor velocidad de crecimiento es la consecuencia inevitable de la carga metabólica que, a su vez, es el resultado acumulado de una serie de perturbaciones fisiológicas. Debido a que esta reducción en la velocidad de crecimiento crea una presión selectiva sobre la pérdida de los plásmidos residentes en ausencia de selección, puede producirse una pérdida significativa de los plásmidos de expresión desde la célula hospedante que porta un vector de expresión después de la transformación de la célula hospedante.

30 Las células hospedantes con menores velocidades de crecimiento pueden expulsar espontáneamente un plásmido de expresión para eliminar de la célula hospedante una carga metabólica innecesaria y permitir que las células hospedantes sin plásmidos sobrepasen con rapidez a la población de células hospedantes que portan plásmidos. Se supone que este desplazamiento en la expresión de proteínas dentro de una población de células hospedantes reduciría la producción de proteínas.

35 Por consiguiente, sería deseable preparar un sistema de expresión de proteínas que optimice la expresión de proteínas del vector de expresión, mientras que al mismo tiempo minimice la carga metabólica sobre la célula hospedante generada por el vector de expresión.

40 El documento WO 2002/083890 describe un sistema de exportación de proteínas para producir proteínas recombinantes desde una célula hospedante. En una realización preferida, el sistema de exportación de proteínas utiliza la maquinaria de exportación de proteínas endógena de la bacteria hospedante en la que se introduce el vector del sistema de exportación de proteínas. Este documento describe la secuencia de la proteína ClyA de *Salmonella enterica* serovar *Typhi* (*S. Typhi*). Este documento describe una proteína de fusión que comprende al menos una porción de la proteína ClyA de *S. Typhi* y otra proteína de interés.

45 Galen *et al.* (2004), "Adaptation of the Endogenous *Salmonella enterica* Serovar *Typhi* clyA-Encoded Hemolysin for Antigen Export Enhances the Immunogenicity of Anthrax Protective Antigen Domain 4 Expressed by the Attenuated Live-Vector Vaccine Strain CVD 9098-htrA", *Infection and Immunity*, 72(12):7096-7106, describen proteínas de fusión de ClyA de *S. Typhi* condensadas con el dominio 4 de protección del antígeno del ántrax, y su uso para la vacunación.

Sumario de la invención

50 El material descrito se refiere al uso de una proteína de exportación para facilitar la exportación de una proteína de fusión hacia el exterior de una célula hospedante. Una realización descrita proporciona un método para expresar un gen en una célula bacteriana, que comprende proporcionar un vector de expresión a una población de células hospedantes bacterianas no transformadas, en el que el vector de expresión comprende un módulo de expresión

que comprende una secuencia codificadora de una proteína de exportación condensada genéticamente con una secuencia codificadora de una proteína de interés, expresar el módulo de expresión de modo que se produce una proteína de fusión de la proteína de exportación::proteína de interés y se exporta o se transporta hacia el medio de cultivo.

5 Otra realización descrita se refiere a un método para inducir una respuesta inmunológica en un animal, que comprende proporcionar a un animal una población de células hospedantes bacterianas transformadas con un vector de expresión que comprende un módulo de expresión que comprende una secuencia codificadora de una proteína de exportación condensada genéticamente con una secuencia codificadora de una proteína de interés, expresar el módulo de expresión de modo que se produce una proteína de fusión de la proteína de exportación::proteína de interés y se exporta o se transporta hacia el animal, e inducir una respuesta inmunológica en el animal contra la proteína de fusión.

10 Otra realización descrita se refiere a un sistema para expresar una proteína de interés que comprende: un vector de expresión que comprende un módulo de expresión, en el que el módulo de expresión comprende una secuencia codificadora de una proteína de exportación condensada genéticamente con una secuencia codificadora de una proteína de interés, una célula hospedante transformada con el vector de expresión, y un entorno de cultivo para la célula hospedante transformada, en el que el módulo de expresión expresa una proteína de fusión de la proteína de exportación::proteína de interés, que se exporta hacia el exterior de la célula hospedante transformada.

15 En un aspecto, la presente invención proporciona un método para producir una proteína de fusión, que comprende (a) transformar una población de bacterias con un vector de expresión que codifica una proteína de fusión, en el que la proteína de fusión comprende una proteína de interés unida al extremo carboxi terminal de una proteína de exportación, en el que dicha proteína de exportación es una proteína citolisina A (ClyA) de *Salmonella enterica* serovar *Typhi* (*S. Typhi*) que tiene una actividad hemolítica sustancialmente reducida en comparación con la proteína ClyA de SEQ ID NO:2, teniendo dicha proteína de exportación la secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO:2 y teniendo una mutación seleccionada del grupo que consiste en una mutación S195N, una mutación I198N, una mutación A199D, una mutación E204K y una mutación C285W, y (b) cultivar las bacterias transformadas de (a) en un medio de cultivo bajo condiciones en las que dicha proteína de fusión se expresa y se exporta hacia el medio de cultivo. La bacteria puede ser *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Vibrio* spp., o *E. coli*. Los ejemplos no limitantes de realizaciones incluyen, pero no se limitan a *S. Typhi*, tal como *S. Typhi* CVD 908 que tiene una mutación *htrA*, *E. coli*, tal como *E. coli* enterotoxigénica (ETEC) o *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *Vibrio cholerae*, y *Shigella flexneri* 2a. Además, la proteína de interés es un antígeno. El método puede incluir la etapa adicional de recolectar la proteína de fusión del medio de cultivo.

20 En otras realizaciones igualmente preferidas de este método, la proteína citolisina A (ClyA) de *S. Typhi* tiene la secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO:2 y una mutación individual seleccionada del grupo que consiste en una mutación S195N, una mutación I198N, una mutación A199D, una mutación E204K y una mutación C285W; una mutación doble I198N, C285W; y una mutación triple I198N, A199D, E204K. La proteína citolisina A (ClyA) de *S. Typhi* también puede tener la secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO:2 y una mutación C285W, así como una mutación adicional seleccionada del grupo que consiste en una mutación I198N, una mutación A199D, y una mutación E204K. Se describen métodos en los que la proteína citolisina A (ClyA) de *S. Typhi* tiene la secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO:2 y la proteína de interés es la proteína de la toxina del ántrax PA83.

25 En otro aspecto, la presente invención proporciona una población de bacterias para su uso para inducir una respuesta inmunológica contra una proteína de fusión en un sujeto, en la que dicha población de bacterias produce y exporta una proteína de fusión en una cantidad suficiente para inducir una respuesta inmunológica en dicho sujeto contra dicha proteína de fusión, en la que dichas bacterias comprenden un vector de expresión que codifica dicha proteína de fusión, en la que la proteína de fusión comprende una proteína de interés unida al extremo carboxi terminal de una proteína de exportación, y en la que dicha proteína de exportación es una proteína citolisina A (ClyA) de *Salmonella enterica* serovar *Typhi* (*S. Typhi*) que tiene una actividad hemolítica sustancialmente reducida en comparación con la proteína ClyA de SEQ ID NO:2, teniendo dicha proteína de exportación la secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO:2 y teniendo una mutación seleccionada del grupo que consiste en una mutación S195N, una mutación I198N, una mutación A199D, una mutación E204K y una mutación C285W. Preferiblemente, el sujeto es un animal, más preferiblemente un ser humano. La bacteria puede ser *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Vibrio* spp., o *E. coli*. Los ejemplos no limitantes de realizaciones incluyen, pero no se limitan a *S. Typhi*, tal como *S. Typhi* CVD 908 que tiene una mutación *htrA*, *E. coli*, tal como *E. coli* enterotoxigénica (ETEC) o *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *Vibrio cholerae*, y *Shigella flexneri* 2a. Además, la proteína de interés es un antígeno.

30 En otras realizaciones igualmente preferidas de este método, la proteína citolisina A (ClyA) de *S. Typhi* tiene la secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO:2 y una mutación individual seleccionada del grupo que consiste en una mutación S195N, una mutación I198N, una mutación A199D, una mutación E204K y una mutación C285W; una mutación doble I198N, C285W; y una mutación triple I198N, A199D, E204K. La proteína citolisina A (ClyA) de *S. Typhi* también puede tener la secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO:2 y una mutación C285W, así como una mutación adicional seleccionada del grupo que consiste en una mutación I198N, una mutación A199D, y

una mutación E204K. Se describen usos en los que la proteína citolisina A (ClyA) de *S. Typhi* tiene la secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO:2 y la proteína de interés es la toxina del ántrax PA83.

5 En otro aspecto, la presente invención proporciona un vector de expresión que comprende un módulo de expresión, en el que el módulo de expresión comprende una secuencia codificadora de una proteína de exportación unida a una secuencia codificadora de una proteína de interés en una disposición 5' a 3', en el que dicha proteína de exportación es una proteína citolisina A (ClyA) de *Salmonella enterica* serovar *Typhi* (*S. Typhi*) que tiene una actividad hemolítica sustancialmente reducida en comparación con la proteína ClyA de SEQ ID NO:2, teniendo dicha proteína de exportación la secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO:2 y teniendo una mutación seleccionada del grupo que consiste en una mutación S195N, una mutación I198N, una mutación A199D, una mutación E204K y una mutación C285W.

10 En otras realizaciones igualmente preferidas del vector de expresión, la proteína citolisina A (ClyA) de *S. Typhi* tiene la secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO:2 y una mutación individual seleccionada del grupo que consiste en una mutación S195N, una mutación I198N, una mutación A199D, una mutación E204K y una mutación C285W; una mutación doble I198N, C285W; y una mutación triple I198N, A199D, E204K. La proteína citolisina A (ClyA) de *S. Typhi* también puede tener la secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO:2 y una mutación C285W, así como una mutación adicional seleccionada del grupo que consiste en una mutación I198N, una mutación A199D, y una mutación E204K. Se describen vectores en los que la proteína citolisina A (ClyA) de *S. Typhi* tiene la secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO:2 y la proteína de interés es la toxina de ántrax PA83.

#### Breve descripción de los dibujos

20 La figura 1 proporciona ejemplos de los vectores de expresión de esta invención. La figura 1A ilustra el vector de expresión pSEC84. La figura 1B ilustra el vector de expresión pSEC84**bla**. La figura 1C ilustra pSEC84**sacB**. La figura 1D ilustra pSEC84**gfpuv**.

25 La figura 2 ilustra la exportación de la proteína de fusión de ClyA-SacB que se produce en el metabolismo de la sacarosa en el medio de crecimiento sólido. Las cepas se cultivaron en medio que contenía sacarosa al 8% (2A y 2B), sacarosa al 16% (2C y 2D), o sacarosa al 8% + L-arabinosa al 8% (2E y 2F). Las figuras 2A, 2C, y 2E muestran el crecimiento de CVD 908-*htrA* que expresa ClyA. Las figuras 2B, 2D, y 2F muestran el crecimiento de CVD 908-*htrA* que expresa ClyA-SacB.

La figura 3 ilustra el crecimiento de CVD 908-*htrA* que expresa ClyA (pSEC84) o ClyA-SacB (pSEC84**sacB**), cultivado en caldo 2XLB50 suplementado con DHB y sacarosa al 10% o glucosa al 10%.

30 La figura 4 ilustra un análisis de la inmunotransferencia Western de fracciones de células bacterianas de CVD 908-*htrA* (carriles 1-3) o CVD 908-*htrA*(pSEC84**gfpuv**) (carriles 4-8). Las fracciones celulares se cargan como sigue: sobrenadantes, carriles 1 y 4; citoplásmica, carriles 2 y 6; periplásmica, carril 5; insoluble, carril 7; célula entera, carriles 3 y 8; y 50 ng de GFPuv, carril 9. Las membranas con muestras idénticas se sondaron con anticuerpos específicos para GFPuv (panel A) o GroEL de *E. coli* (panel B).

35 La figura 5 muestra el plásmido de expresión pSEC92**gfpuv**. El pSEC92**gfpuv** tiene una inserción de una secuencia de *clyA* de *Salmonella Typhi* con optimización de codones. En otra derivación de este plásmido de expresión, pSEC93**gfp** tiene la misma estructura genética que pSEC92**gfpuv**, excepto que tiene tres mutaciones puntuales, I198→N, A199→D, E204→K en la secuencia de *clyA*.

40 La figura 6 muestra inmunotransferencias de mutantes de *clyA* no hemolíticos. La ClyA de tipo salvaje ("wt-*clyA*", hemolítica) y los mutantes no hemolíticos se expresan como proteínas de fusión de ClyA fusionada con la proteína fluorescente indicadora GFPuv expresada de plásmidos derivados de pSEC92**gfpuv** en DH5α. **A.** Detección de las proteínas de fusión de ClyA::GFPuv en los sobrenadantes del cultivo de wt *clyA* (hemolítica) o los mutantes de *clyA* (no hemolíticos). **B.** Detección de GroEL en los sobrenadantes del cultivo.

45 La figura 7 muestra la actividad hemolítica cuantificada de los mutantes de un solo aminoácido de ClyA. ClyA y sus mutantes no hemolíticos se expresan desde plásmidos derivados de pSEC92**gfpuv** en *E. coli* DH5α.

50 La figura 8 muestra inmunotransferencias de mutantes de ClyA no hemolíticos. La wt ClyA (hemolítica) y los mutantes no hemolíticos se expresan en *Salmonella Typhi* CVD 908-*htrA* como proteínas de fusión codificadas por plásmidos derivados de pSEC92**gfpuv**. **A.** Detección de GFPuv en los sobrenadantes del cultivo de wt ClyA o los mutantes de ClyA no hemolíticos. **B.** Detección de GroEL en los sobrenadantes del cultivo. **1.** mutante de *clyA* no hemolítico que porta la mutación I198→N. **2.** wt ClyA. **3.** mutante triple de ClyA no hemolítico que porta I198→N, A199→D, E204→K. **4.** extracto de células enteras de *Salmonella Typhi* CVD 908-*htrA* sin plásmido.

La figura 9 muestra la actividad hemolítica del mutante triple de *clyA* no hemolítico (I198→N, A199→D y E204→K) expresado en *Salmonella Typhi* CVD 908-*htrA* desde el plásmido pSEC93**gfp**.

La figura 10 muestra los resultados de un experimento de inmunogenicidad en el que se inmunizaron ratones por vía intranasal con dos dosis ( $10^9$  unidades formadoras de colonias (CFU) por dosis) de cepas de vectores vivos atenuados CVD 908-*htrA* que portan plásmidos derivados de pSEC92*gfpuv* que expresan proteínas variantes de fusión de ClyA no hemolítica::GFPuv. Todos los ratones recibieron un refuerzo intramuscular con GFPuv purificada en el día 42. Los resultados se indican como la media geométrica de las titulaciones (en unidades de ELISA (EU)) de IgG sérica frente al dominio GFPuv de ClyA::GFPuv.

La figura 11 proporciona un alineamiento de una porción de la secuencia de aminoácidos de ClyA de *S. Typhi* de tipo salvaje ("wt ClyA"), la secuencia del variante I198N, y la secuencia del variante I198N, A199D, E204K.

La figura 12 muestra inmunotransferencias de mutantes de *clyA* no hemolíticos. Carril 1 - marcador de proteínas caleiodoscópico; carril 2 - CVD908*htrA*; carril 3 - CVD908*htrA*(pSEC91-83); carril 4 - CVD908-*htrAssb*(pS-CPA83-I198N) - mutante individual 1; carril 5 - CVD908-*htrAssb*(pS-CPA83-C285W) - mutante individual 2; carril 6 - CVD908-*htrAssb*(pS-CPA83-DM) - mutante doble; carril 7 - proteína purificada PA83 (250 ng).

La figura 13 muestra la actividad hemolítica cuantificada de los mutantes de un solo aminoácido y de dos aminoácidos de ClyA. ClyA y sus mutantes no hemolíticos se expresan desde diferentes plásmidos en CVD908*htrA* y CVD908*htrA-ssb*.

La figura 14 muestra los resultados de un experimento de inmunogenicidad en el que se inmunizaron ratones por vía intranasal con dos dosis ( $10^9$  unidades formadoras de colonias (CFU) por dosis) de cepas de vectores vivos atenuados CVD 908-*htrA* que portan plásmidos derivados de pGEN222A3s que expresan proteínas variantes de fusión de ClyA no hemolítica::PA83. Todos los ratones recibieron un refuerzo intramuscular con la proteína PA83 más alhidrogel. Los resultados se indican como la media geométrica de las titulaciones (en unidades de ELISA (EU)) de IgG sérica frente al dominio PA83 de ClyA::PA83.

La figura 15 muestra los resultados de la comparación del porcentaje de ratones con seroconversión y GMT después de una vacunación con vectores vivos CVD908*htrA* que portan plásmidos con sistemas de exportación de ClyA de tipo salvaje y mutantes de ClyA no hemolíticos.

#### Descripción detallada de la realización preferida

La siguiente descripción proporciona un sistema de exportación de proteínas para producir, de forma eficaz, proteínas recombinantes desde un organismo hospedante. En una realización preferida, el sistema de exportación de proteínas utiliza la maquinaria de exportación de proteínas endógena del organismo hospedante en el que se introduce el vector del sistema de exportación de proteínas. El organismo hospedante puede ser un procarionta, tal como una bacteria, o un virus.

El sistema de exportación de proteínas tiene una serie de aplicaciones útiles. El sistema puede utilizarse para producir, de forma eficaz, proteínas recombinantes de interés dentro de un organismo hospedante y exportar la proteína de interés recombinante desde el organismo hospedante. Por ejemplo, el sistema descrito puede utilizarse para producir, de forma eficaz, proteínas de interés recombinantes en un biorreactor.

El sistema de exportación de proteínas también puede utilizarse para proporcionar a un animal un material antigénico contra el cual puede organizarse una respuesta inmunológica. Por ejemplo, en una realización, una bacteria atenuada, tal como *Salmonella*, *Escherichia*, *Shigella*, *Vibrio* o *Clostridium* spp., se transforma con los componentes del sistema de exportación de proteínas. Las bacterias recombinantes después pueden utilizarse como una composición inmunogénica de vectores vivos capaz de facilitar la generación de una respuesta inmunológica en un animal. El sistema de exportación de proteínas puede utilizarse con una diversidad de antígenos de interés. Las realizaciones específicas incluyen composiciones inmunogénicas dirigidas contra la fiebre tifoidea, el ántrax, la peste, la colitis pseudomembranosa y otras enfermedades. También se describen composiciones inmunogénicas que expresan antígenos que son exportados desde un organismo hospedante recombinante con un mínimo de lisis.

#### A. Sistema de exportación de proteínas de la familia HlyE

La siguiente descripción se refiere al uso de los miembros de la familia HlyE en un sistema de exportación de proteínas para facilitar la expresión de proteínas. Los miembros de la familia HlyE pueden utilizarse para facilitar la exportación de proteínas producidas de modo recombinante desde sus hospedantes bacterianos. Se cree que los sistemas de expresión que exportan proteínas producidas de modo recombinante facilitan una mayor producción de proteínas. El sistema de exportación de proteínas descrito también puede utilizarse para preparar composiciones inmunológicas con las que vacunar a animales.

Se ha observado que las velocidades de crecimiento de organismos recombinantes que contienen vectores de expresión disminuyen a medida que aumenta el nivel de expresión de un gen de interés. La disminución en el crecimiento puede activar la inducción de diversas proteasas celulares que pueden degradar la proteína recombinante expresada. Por tanto, una menor velocidad de crecimiento es la consecuencia inevitable de la carga metabólica que, a su vez, es el resultado acumulado de una serie de perturbaciones fisiológicas. Por ejemplo, se

producen perturbaciones fisiológicas debido a la expresión y la acumulación de la proteína de interés dentro de la bacteria hospedante. Esta acumulación puede ser perjudicial para la viabilidad de la bacteria hospedante y, así, constituir una presión de selección negativa.

Debido a que las cargas metabólicas, tales como las analizadas arriba, crean una presión selectiva sobre la pérdida de los vectores de expresión residentes en ausencia de selección, puede producirse una pérdida significativa de los vectores de expresión desde la bacteria hospedante después de que la bacteria hospedante haya sido transformada con el vector de expresión que contiene el gen de interés. La pérdida espontánea del plásmido elimina cualquier carga metabólica de la bacteria hospedante y permite que las bacterias sin plásmidos sobrepasen con rapidez a la población de bacterias que portan plásmidos. La mayor cantidad de células bacterianas que no contienen el vector de expresión y, por tanto, que no expresan la proteína de interés reduce los niveles de producción de proteínas en su conjunto. Por tanto, las bacterias hospedantes que no están genéticamente constreñidas para mantener vectores de expresión que dirigen la síntesis de altos niveles de una proteína de interés concreta pueden producir una cantidad significativamente menor de proteínas.

Una realización preferida para exportar la proteína de interés expresada de modo recombinante comprende aprovechar un sistema de exportación endógeno en la bacteria hospedante que contiene el vector de expresión. El aprovechamiento de un sistema de exportación endógeno resulta ventajoso en parte debido a que evita la necesidad de grandes cantidades de ADN heterólogo que codifica proteínas exóticas para suministrar un sistema de exportación exógeno. No obstante, los sistemas de exportación de proteínas que utilizan sistemas de exportación exógenos también se incluyen en la presente descripción.

Un candidato a sistema de exportación endógeno atractivo es la hemolisina críptica (ClyA), codificada por el gen de citolisina A (*clyA*) dentro del cromosoma de *Salmonella enterica* serovar *Typhi* (en lo sucesivo "*S. Typhi*"), un miembro de la familia de proteínas HlyE. La familia HlyE consiste en homólogos cercanos de *E. coli*, *Shigella flexneri* y *S. Typhi* y otras bacterias.

Para fines ilustrativos, se analiza la estructura de las proteínas de los miembros de la familia HlyE, haciendo referencia a la proteína HlyE de *E. coli*. La proteína de *E. coli* es una hemolisina bien caracterizada desde el punto de vista funcional, que forma poros y está codificada cromosómicamente denominada HlyE (también conocida como ClyA y hemolisina A silenciosa (SheA)). Consiste en 303 restos aminoácidos (34 kDa). Su transcripción está positivamente controlada por SlyA, un regulador que se encuentra en varias bacterias entéricas. HlyE forma poros transmembrana estables moderadamente selectivos para cationes con un diámetro de 2,5-3,0 nm en las bicapas lipídicas. La proteína se une al colesterol, y la formación de poros en una membrana es estimulada si la membrana contiene colesterol. La estructura cristalina de HlyE de *E. coli* se ha resuelto hasta una resolución de 2,0 Å, y se ha logrado la visualización de la forma asociada a lípidos de la toxina a baja resolución mediante microscopía electrónica. La estructura muestra un complejo haz helicoidal con una longitud de aproximadamente 100 Å. Oligomeriza en presencia de lípidos para formar poros transmembrana.

HlyE es una molécula con forma de bastoncillo ondulado con una región transmembrana de 27 restos hidrófoba. Esta región comprende un terminal de la molécula plegada y se ha propuesto que forma un poro dentro de una membrana diana. La formación del poro conduce, en último término, a la lisis de la célula diana. En elegantes estudios de microscopía electrónica, Wallace *et al.* han demostrado que HlyE se inserta en vesículas lipídicas para formar poros formados por 8 monómeros de HlyE.

Aunque se ha aclarado la formación de poros facilitada por HlyE, el mecanismo mediante el cual HlyE y los homólogos de HlyE son exportados hacia el exterior de la bacteria sigue sin estar claro. Además, la manera en que la hemolisina se inserta en las membranas diana para ensamblarse en poros tampoco se entiende por completo. Del Castillo *et al.* describen la secreción dependiente de la fase de crecimiento de actividad hemolítica, que alcanza su máximo durante la fase semilogarítmica y desaparece al principio de la fase estacionaria (Del Castillo, F.J., S.C. Leal, F. Moreno, e I. del Castillo, 1997, *The Escherichia coli* K-12 *sheA* gene encodes a 34-kDa secreted haemolysin, *Mol. Microbiol.*, 25:107-115). Ludwig *et al.* han indicado que la secreción de esta hemolisina críptica viene acompañada por la pérdida de proteínas periplásmicamente confinadas, pero no viene acompañada por la pérdida de proteínas citoplásmicas, lo cual es una prueba en contra de la lisis celular completa para liberar HlyE (Ludwig, A., S. Bauer, R. Benz, B. Bergmann, y W. Goebel, 1999, Analysis of the SlyA-controlled expression, subcellular localization and pore-forming activity of a 34 kDa haemolysin (ClyA) from *Escherichia coli* K-12, *Mol. Microbiol.*, 31:557-567).

Además, cuando se compara con la secuencia codificada por *hlyE*, la secuenciación N-terminal de HlyE segregada revela que HlyE no se procesa N-terminalmente durante el transporte. Oscarsson *et al.* han indicado que HlyE se une al colesterol y que la presencia de colesterol en las membranas diana estimula la formación de poros y la lisis (Oscarsson, J., Y. Mizunoe, L. Li, X. Lai, A. Wieslander, y B.E. Uhlin, 1999, Molecular analysis of the cytolytic protein ClyA (SheA) from *Escherichia coli*, *Mol. Microbiol.*, 32:1226-1238). Se ha calculado que aproximadamente  $10^3$  moléculas de HlyE son necesarias para la lisis de un eritrocito diana, lo cual sugiere una significativa acumulación de HlyE antes de la detección de la lisis celular. HlyE es muy estable dentro de un intervalo de valores de pH entre 3,0 y 9,0, y es resistente a la ruptura por proteasas, incluyendo la tripsina y la pepsina (Atkins, A., N.R. Wybom, A.J. Wallace, T.J. Stillman, L.K. Black, A.B. Fielding, M. Hisakado, P.J. Artymiuk, y J. Green, 2000,

Structure-function relationships of a novel bacterial toxin, hemolysin E. The role of  $\alpha_G$ , J. Biol. Chem., 275:41150-41155).

La familia de proteínas HlyE generalmente provoca hemólisis en las células diana. Los miembros de la familia de HlyE hemolíticamente activos o inactivos pueden utilizarse con las indicaciones descritas. Por ejemplo, se sabe que una mutación del gen *hlyE* puede reducir o eliminar la actividad hemolítica. Por ejemplo, se ha indicado la pérdida de la actividad hemolítica cuando *hlyE* está mutado de tal forma que aparecen sustituciones de aminoácidos en las posiciones 180, 185, 187 y 193. De modo específico, G180V, V185S, A187S y I193S dan como resultado la pérdida de la actividad hemolítica de una proteína HlyE expresada a partir de un gen *hlyE* mutado.

La presente descripción utiliza las características de exportación de la familia de proteínas HlyE para producir un sistema de exportación de proteínas. Por ejemplo, se describen proteínas de fusión que comprenden cualquier miembro de la familia HlyE y una proteína de interés. De modo más específico, se describen proteínas de fusión que comprenden ClyA de *S. Typhi* y una proteína de interés. Tal como se analiza a continuación, las proteínas de fusión que contienen ClyA se exportan desde la célula hospedante bacteriana y hacia el medio circundante. Esta característica del sistema de expresión comprende un componente de proteína de fusión de una proteína de exportación::proteína de interés que facilita la producción de la proteína de interés y la exportación de la proteína de fusión de una proteína de exportación::proteína de interés. En realizaciones preferidas, se emplean variantes de miembros de la familia HlyE que carecen de actividad hemolítica o que tienen una actividad hemolítica reducida como proteínas de exportación.

#### B. Sistema de exportación de la proteína citolisina A (ClyA)

Una realización preferida de la presente descripción se refiere al uso de la proteína citolisina A (ClyA) de *S. Typhi* en un sistema de exportación de proteínas. ClyA de *S. Typhi* fue descrita por primera vez por Wallace *et al.*, que también indicaron la estructura cristalina para la hemolisina homóloga de *E. coli* ((Wallace, A.J., T.J. Stillman, A. Atkins, S.J. Jamieson, P.A. Bullough, J. Green, y P.J. Artymiuk, 2000, *E. coli* hemolysin E (HlyE, ClyA, SheA): X-ray crystal structure of the toxin and observation of membrane pores by electron microscopy, Cell, 100:265-276). Esta hemolisina ha sido descrita previamente y se ha denominado de forma diversa como ClyA, HlyE, o SheA. Para evitar confusiones, la hemolisina de *E. coli* se denomina en la presente HlyE y es codificada por *hlyE*. También por claridad, la hemolisina de *S. Typhi* se denomina en la presente ClyA y es codificada por *clyA*.

Se ha resuelto la estructura cristalina de ClyA en *E. coli* (Wallace *et al.*, 2000). La estructura exclusiva puede dividirse en líneas generales en varios dominios, un dominio de cabeza, un dominio de cuerpo y un dominio de cola. El dominio de cuerpo consiste en un haz de hélices (A, B, C, D, F). El dominio de cola es una hélice G que se extiende hasta la mitad de la longitud del cuerpo. El dominio de cabeza consiste en una horquilla  $\beta$  corta (lengua- $\beta$ ) y dos pequeñas hélices (D y E), que flanquean cada una a la lengua- $\beta$ . Wallace *et al.* sugieren que la lengua- $\beta$  puede ser fundamental para la formación de poros y, por tanto, para la actividad hemolítica (Wallace *et al.*, 2000). A través de mutagénesis específica dirigida a sitio, Oscarsson *et al.* han descubierto muchas regiones de ClyA que son importantes para la actividad hemolítica (Oscarsson *et al.*, 1999). Pero su estrategia de mutagénesis puede haber distorsionado la estructura de ClyA y haber afectado a la exportación de ClyA sin abolir realmente la actividad hemolítica *per se*.

Un gen *clyA* de aproximadamente 1 kb ha sido clonado de *S. Typhi* CVD 908-*htrA* para su uso en un sistema de exportación de proteínas. La proteína ClyA se exporta de *E. coli* y *S. Typhi* y es capaz de exportar proteínas pasajeras que han sido genéticamente condensadas con el extremo 3'-terminal del marco de lectura abierto de *clyA*. La proteína pasajera indicada en la presente también se denomina proteína de interés. Se ha demostrado que el plegamiento apropiado de estas proteínas de fusión se produce de tal forma que se mantiene la actividad biológica inherente de los dominios implicados.

La secuencia de nucleótidos y de aminoácidos para el gen *clyA* de *S. Typhi* y la proteína ClyA aisladas se proporcionan en SEQ ID NO:21 y SEQ ID NO:22, respectivamente. La secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO:21 es la secuencia de nucleótidos de tipo salvaje recuperada de *Salmonella* serovar *Typhi* cepa Ty2. En SEQ ID NO:33 se proporciona una versión sintética con optimización de codones del gen *clyA* de *S. Typhi*, según se describe y se utiliza en la presente. Otros miembros de la familia HlyE que pueden utilizarse como proteínas de exportación en la presente también están disponibles y son conocidos por los expertos en la técnica. Los miembros de la familia incluyen una segunda citolisina A de *S. Typhi* (el gen *clyA* se indica en SEQ ID NO:22 y está disponible en GENBANK n.º de registro AJ313034); citolisina A de *Salmonella paratyphi* (la secuencia del gen *clyA* para la citolisina A se indica en SEQ ID NO:23 y está disponible en GENBANK n.º de registro AJ313033); HlyE truncada de *Shigella flexneri* (la secuencia del gen *hlyE* se indica en SEQ ID NO:24 y está disponible en GENBANK n.º de registro AF200955); HlyE de *Escherichia coli* (la secuencia del gen *hlyE* se indica en SEQ ID NO:25 y está disponible en GENBANK n.º de registro AJ001829).

#### C. Variantes no hemolíticas de los miembros de la familia HlyE

Tal como se indicó anteriormente, la familia de proteínas HlyE generalmente provoca la citólisis de las células diana, que incluye la hemólisis de eritrocitos. Debido a que puede considerarse que las citolisinas/hemolisinas son factores

de virulencia, la presente invención utiliza variantes de los miembros de la familia HlyE que han sido mutados de modo que carecen de actividad hemolítica o tienen actividad hemolítica reducida. La capacidad de estos variantes para ser exportados desde una célula bacteriana que los produce, solos o en el contexto de una fusión con una proteína de interés, se mantiene. Así, los variantes no hemolíticos de los miembros de la familia HlyE tienen actividad hemolítica reducida o no tienen actividad hemolítica, pero siguen siendo totalmente funcionales en los sistemas de exportación de proteínas de la presente invención.

Los variantes no hemolíticos de los miembros de la familia HlyE pueden tener una serie de mutaciones genéticas en la secuencia polinucleotídica que los codifica, de modo que la actividad hemolítica del variante se reduce o se abole completamente. Para conservar otras actividades y funciones de los variantes, resulta preferible que se realice el menor número de mutaciones en la secuencia codificadora de los variantes. En particular, pueden realizarse mutaciones en la secuencia codificadora de un miembro de la familia HlyE de modo que solo se produzcan 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o más cambios de aminoácidos. Los cambios de aminoácidos incluyen deleciones, adiciones y sustituciones. Las sustituciones de aminoácidos pueden ser sustituciones de aminoácidos conservativas o no conservativas. Las mutaciones pueden realizarse en cualquier región del polinucleótido que codifica el variante, pero en realizaciones preferidas, la mutación o mutaciones producen sustituciones de aminoácidos en la lengua-beta o la hélice pequeña E.

Tal como se indicó anteriormente, la actividad hemolítica de los variantes no hemolíticos de los miembros de la familia HlyE de la presente invención puede estar reducida o completamente abolida. Cuando la actividad hemolítica está reducida, la reducción es de aproximadamente 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 o 99% de reducción en la actividad, comparado con el miembro de la familia de tipo salvaje a partir del cual se deriva el variante. Tal como se emplea en la presente, un variante no hemolítico de un miembro de la familia HlyE de la presente invención que tienen una actividad hemolítica "sustancialmente reducida" es un variante que muestra una reducción de al menos aproximadamente 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99% de la actividad hemolítica de la proteína de tipo salvaje de la cual se deriva. La actividad hemolítica específica puede medirse cuantificando la liberación de hemoglobina desde los eritrocitos, según se describe en Sansonetti *et al.*, 1986, Infect. Immun., 51: 461-469.

Los expertos en la técnica entenderán que, aunque cada uno de los variantes de la presente invención mantiene la capacidad para ser exportado desde la célula en que se produce, solo o como una fusión con una proteína de interés, puede ser aceptable una pequeña reducción en la capacidad del variante para ser exportado. Por tanto, la presente invención también incluye los variantes que tienen una actividad hemolítica reducida o abolida, junto con una reducción en la capacidad para ser exportados de aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 o 50% en comparación con el miembro de la familia de tipo salvaje del cual se deriva el variante.

El variante no hemolítico de un miembro de la familia HlyE para su uso en la presente invención es un variante no hemolítico de la proteína ClyA de *S. Typhi*. Estos variantes de ClyA de *S. Typhi* incluyen los que tienen 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o más cambios de aminoácidos. Además, estos variantes de ClyA de *S. Typhi* tienen una reducción en la actividad hemolítica de aproximadamente 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 o 99% comparado con la proteína ClyA de *S. Typhi* de tipo salvaje. Además, estos variantes de ClyA de *S. Typhi* pueden presentar una reducción en la capacidad para ser exportados de aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 o 50% en comparación con la proteína ClyA de *S. Typhi* de tipo salvaje.

Los expertos en la técnica entenderán que las mutaciones pueden introducirse en la secuencia que codifica ClyA de *S. Typhi* utilizando una diversidad de técnicas, que incluyen kits disponibles en el mercado para la mutagénesis específica dirigida a sitio. Los variantes para su uso en la presente invención pueden producirse introduciendo mutaciones solo en la secuencia que codifica ClyA de *S. Typhi*, o en una secuencia que codifica una proteína de fusión que comprende ClyA de *S. Typhi* genéticamente condensada con una secuencia que codifica una proteína de interés o una proteína indicadora. En una realización, la secuencia que codifica ClyA de *S. Typhi* está condensada con una secuencia que codifica la proteína fluorescente verde (GFPuv) para producir una fusión genética *clyA::gfpuv*. Se sabe que GFPuv no fluoresce si está condensada con dominios cadena arriba que no se pliegan de forma correcta. Por tanto, una fusión genética *clyA::gfpuv* puede utilizarse para seleccionar los mutantes no hemolíticos, fluorescentes y con un plegamiento correcto, que es probable que sean exportados correctamente.

Además, de los variantes no hemolíticos de los miembros de la familia HlyE, se describen proteínas de fusión que comprende un miembro de la familia HlyE de tipo salvaje unido a una proteína de interés. Debido a las características innatas de algunas proteínas de interés, simplemente la creación de una proteína de fusión que comprenda un miembro de la familia HlyE de tipo salvaje y una proteína de interés puede dar como resultado la producción de una proteína de fusión que sea exportada desde la célula en la que se produce, pero que tiene actividad hemolítica reducida o abolida. Un ejemplo de dicha proteína de fusión comprende la proteína ClyA de *S. Typhi* unida a la proteína de la toxina del ántrax PA83. La fusión de proteínas ClyA::PA83 conserva la capacidad de ser exportada desde la célula en que se produce, pero tiene actividad hemolítica reducida.

Los variantes no hemolíticos de la proteína ClyA de *S. Typhi* incluyen los variantes mostrados en la tabla 1 que tienen una mutación individual en la posición indicada. La "posición" y la secuencia de tipo salvaje ("wt") indicadas



- 5 en la tabla 1 se corresponden con la secuencia de aminoácidos del polipéptido de ClyA de *S. Typhi* que aparece en SEQ ID NO:2. El "dominio" es el dominio particular del polipéptido de ClyA de *S. Typhi*. Las sustituciones de aminoácidos de una sola letra en la tabla 1, y tal como se emplean en la presente, son: Alanina - A; Arginina - R; Asparagina - N; Ácido aspártico - D; Cisteína - C; Ácido glutámico - E; Glutamina - Q; Glicina -G; Histidina - H; Isoleucina - I; Leucina - L; Lisina - K; Metionina - M; Fenilalanina - F; Prolina - P; Serina - S; Treonina - T; Triptófano - W; Tirosina - Y; Valina - V.

Tabla 1

Clon	Posición	wt	Mutación	Dominio	SEQ ID NO:
M133	109	A	T	$\alpha$ C	
M165	109	A	V	$\alpha$ C	
M188	116	L	Q	$\alpha$ C	
M187	148	L	P	$\alpha$ C	
M179	163	S	C	vuelta entre $\alpha$ C y $\alpha$ D	
M103	195	S	N	lengua- $\beta$	
M30	198	I	N	$\alpha$ E	30
M128	199	A	D	$\alpha$ E	
M135	204	E	K	$\alpha$ E	
M182	204	E	D	$\alpha$ E	
M109	205	G	D	$\alpha$ E	
M64	207	L	R	$\alpha$ F	
M185	215	L	P	$\alpha$ F	
M163	225	L	S	$\alpha$ F	
M176	229	V	L	$\alpha$ F	
M150	281	M	K	$\alpha$ G	
M171	284	T	P	$\alpha$ G	
M148	285	C	W	$\alpha$ G	

- 10 La mutación C285W de ClyA de *S. Typhi* altera un puente de cisteína intramolecular natural que evita la oligomerización de ClyA necesaria para la formación de poros citolítica.

#### Vectores de expresión de proteínas de exportación

- 15 El sistema de exportación de proteínas descrito en la presente puede utilizarse para expresar y exportar una amplia variedad de proteínas de fusión que comprenden una proteína de exportación y una proteína de interés. En una realización, la proteína de interés es codificada por un gen de interés. El gen de interés puede ser extraño a la bacteria que contiene el sistema de exportación de proteínas o puede ser un gen que es endógeno de la bacteria. Generalmente, una construcción de proteína de fusión de una proteína de exportación::proteína de interés está presente en el módulo de expresión que, a su vez, está presente en un vector de expresión. Cada una de estas unidades se analiza a continuación.

#### Vectores de expresión

- 20 El sistema de exportación de proteínas utiliza un vector de expresión para facilitar la producción recombinante de la proteína de interés. Generalmente, el vector de expresión comprenderá un origen de la replicación y otras características estructurales que controlan y regulan el mantenimiento del vector de expresión en la célula hospedante. Por definición, la expresión "vector de expresión" se refiere a un plásmido, un virus u otro vehículo

conocido en la técnica que ha sido manipulado mediante la inserción o la incorporación del módulo de expresión que comprende la proteína de fusión de la proteína de exportación::proteína de interés. Un ejemplo de un sistema de vector de expresión que describe vectores de expresión que confieren estabilidad al plásmido en dos niveles independientes se describe en Galen, *et al.*, *Immun.*, 67:6424-6433 (1999), y en la solicitud de patente de EEUU n.º de serie 09/204.117, presentada el 2 de diciembre, 1998, ahora patente de EEUU n.º 6.413.768, y n.º de serie 09/453.313, presentada el 2 de diciembre, 1999, ahora patente de EEUU n.º 6.703.233.

Los ejemplos de vectores de expresión que pueden utilizarse incluyen los que aparecen en la figura 1, que incluyen pSEC84, pSEC84*bla*, pSEC84*sacB*, pSEC84*toxC*, pSEC*gfpuv*, pSEC92*gfpuv*, pSEC93*gfpuv*, pSEC92M30*gfpuv*, pGEN222A3S, y pGEN222A3S-ClyA-PA83. Otros vectores incluyen los plásmidos de bajo número de copias derivados de pSC101, que incluyen pGEN206 y pSEC10, y sus fusiones, tales como pSEC91-83 y pSEC10-83S (Galen *et al.*, *Immunol. Cell Biol.*, 5 de mayo, 2009, pp. 1-13; Galen *et al.*, *J. Infect. Dis.*, 119:326-335 (2009)). La tecnología de los módulos permite adaptar cualquier replicón para la expresión de variantes de ClyA porque el módulo de fusión de *clyA* (que comprende el promotor *ompC*, *clyA*, y un compañero de fusión cadena abajo) está completamente autoconstrañido y requiere solo un replicón plasmídico para poder utilizarse con éxito en cualquier entorno bacteriano permisivo. Así, puede utilizarse cualquiera de los vectores descritos en la presente y cualquier otro vector conocido en la técnica por ser útil para los objetivos contemplados en la presente. Además, cada uno de los vectores de expresión descritos en la presente puede utilizarse según se proporciona. Sin embargo, los expertos en la técnica comprenderán que estos vectores de expresión también pueden utilizarse como un vector de esqueleto a partir del cual puede retirarse la secuencia que codifica la proteína de exportación, la secuencia que codifica la proteína de interés, o la secuencia que codifica la proteína de fusión de la proteína de exportación::proteína de interés (cuando están presentes) y reemplazarse por una secuencia diferente que codifique estos elementos. Por ejemplo, la secuencia que codifica GFPuv en pSEC93*gfpuv* puede retirarse y reemplazarse por una secuencia que codifique un antígeno de interés.

#### Módulos de expresión de proteína de fusión-proteína de exportación

El sistema de exportación de proteínas descrito en la presente puede utilizarse para expresar y exportar una amplia variedad de proteínas de fusión que comprenden una proteína de exportación y una proteína de interés. La proteína de interés es codificada por la secuencia codificadora de la proteína de interés, que también es el gen de interés. El gen de interés puede ser extraño a la bacteria que contiene el sistema de exportación de proteínas o puede ser un gen que es endógeno de la bacteria. La proteína de interés puede variar desde un único aminoácido a proteínas que tienen varias veces el tamaño de la molécula de la proteína de exportación. Más preferiblemente, la proteína de interés puede variar desde diez aminoácidos a dos veces el tamaño de la proteína de exportación. Resulta preferible que el tamaño de la proteína de interés sea tal que no interfiera con la capacidad de la proteína de exportación para ser exportada enteramente hacia el exterior de la bacteria. Los ejemplos de proteínas de interés tienen de 0 kDa hasta al menos 50 kDa de masa. También pueden utilizarse masas mayores, y así proteínas más largas, como proteínas de interés. Por ejemplo, las proteínas de interés pueden tener una masa de 55 kDa, 60 kDa, 65 kDa, 70 kDa, 75 kDa, 80 kDa, 85 kDa, 90 kDa, 95 kDa, 100 kDa, o mayor.

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

Generalmente, el gen de interés que se va a expresar está presente en un módulo de expresión. Un módulo de expresión generalmente contendrá características estructurales adecuadas, tales como un promotor, un terminador, etc., para permitir la transcripción del gen de interés.

Las secuencias polinucleotídicas que codifican una proteína de fusión de una proteína de exportación::proteína de interés (también conocidas como "secuencias codificadoras de la proteína de fusión de una proteína de exportación::proteína de interés") pueden estar unidas operativamente a secuencias de control de la expresión para formar un módulo de expresión. La expresión "unido operativamente" se refiere a una juxtaposición en la que los componentes descritos están en una relación que les permite funcionar según su manera prevista. Una secuencia de control de la expresión unida operativamente a una secuencia codificadora está acoplada de modo que se logra la expresión de la secuencia codificadora bajo condiciones compatibles con las secuencias de control de la expresión. Tal como se emplea en la presente, la expresión "secuencias de control de la expresión" se refiere a secuencias de ácidos nucleicos que regulan la expresión de una secuencia de ácido nucleico al cual están unidas operativamente. Las secuencias de control de la expresión están unidas operativamente a una secuencia de ácido nucleico cuando las secuencias de control de la expresión controlan y regulan la transcripción y, según sea apropiado, la traducción de la secuencia del ácido nucleico. Así, las secuencias de control de la expresión pueden incluir promotores apropiados, terminadores de la transcripción, secuencias de unión a ribosomas optimizadas, un codón de inicio (es decir, ATG) delante de un gen codificador de proteína, el marco de lectura correcto de ese gen para permitir la traducción apropiada del ARNm, y codones de fin. La expresión "secuencias de control" pretende incluir, como mínimo, los componentes cuya presencia pueden influir en la expresión, y también puede incluir otros componentes cuya presencia es ventajosa, por ejemplo, secuencias conductoras. Las secuencias de control de la expresión pueden incluir un promotor.

Un "promotor" es la secuencia mínima suficiente para dirigir la transcripción. También incluye los elementos promotores que son suficientes para hacer que la expresión del gen dependiente del promotor sea controlable por agentes o señales externos específicos del tipo celular, específicos del tejido, o sea inducible por agentes o señales externos; estos elementos pueden estar localizados en las regiones 5' o 3' de la secuencia codificadora de la proteína de fusión de la proteína de exportación::proteína de interés. Tanto los promotores constitutivos como los promotores inducibles son útiles con los métodos descritos. La expresión de las secuencias codificadoras de proteínas de fusión de una proteína de exportación::proteína de interés puede ser dirigida por una serie de promotores. Aunque puede utilizarse el promotor endógeno de una proteína de exportación para la regulación transcripcional del módulo de expresión, preferiblemente el promotor es una secuencia reguladora extraña. Un ejemplo de un promotor endógeno inducible es el promotor *ompC* que puede utilizarse para dirigir la transcripción del módulo de expresión.

Los promotores útiles en la invención incluyen promotores naturales constitutivos e inducibles, así como promotores modificados. Un promotor inducible preferido debería 1) proporcionar una baja expresión en ausencia del inductor; 2) proporcionar una alta expresión en presencia del inductor; 3) utilizar un esquema de inducción que no interfiera con la fisiología normal de la célula hospedante; y 4) tener poco o ningún efecto sobre la expresión de otros genes. Los ejemplos de promotores inducibles incluyen los inducidos por medios químicos. Los expertos en la técnica conocerán otros promotores, tanto constitutivos como inducibles.

El promotor concreto seleccionado debe ser capaz de provocar una expresión suficiente como para dar como resultado la expresión de una cantidad eficaz de la proteína de fusión de una proteína de exportación::proteína de interés. La cantidad eficaz de la proteína de fusión de una proteína de exportación::proteína de interés puede variar dependiendo del objetivo de la expresión. Los promotores utilizados en las construcciones de vectores de la presente descripción pueden modificarse, si se desea, para afectar a sus características de control.

La proteína de fusión de una proteína de exportación::proteína de interés que comprende la proteína de exportación y la proteína de interés también puede comprender marcadores de purificación introducidos en el módulo de expresión para ser expresados como parte de la proteína de fusión de una proteína de exportación::proteína de interés. El marcador se elige para facilitar la purificación de la proteína de fusión de una proteína de exportación::proteína de interés y/o la proteína de interés producida por los métodos descritos. Por ejemplo, puede introducirse una pluralidad de restos histidina en la porción C-terminal o la porción N-terminal de la proteína de interés para facilitar la purificación de las proteínas. Resulta preferible que la introducción del marcador minimice los plegamientos incorrectos de la proteína de interés.

Además del marcador de polihistidina, existe una serie de otros marcadores de proteínas que pueden utilizarse para facilitar la purificación de las proteínas. Por ejemplo, con el sistema descrito pueden utilizarse marcadores antigénicos, tales como el marcador de proteína de unión a la maltosa, un marcador de epitopo c-myc, un marcador de proteína fluorescente verde, un marcador de luciferasa, un marcador de beta-galactosidasa, un marcador de polihistidina o cualquier otro marcador de expresión de proteínas adecuado.

La proteína de fusión de una proteína de exportación::proteína de interés que comprende la proteína de exportación y la proteína de interés también puede comprender otras características para facilitar el uso de la proteína expresada y exportada. Por ejemplo, pueden introducirse sitios de reconocimiento de proteasas entre diversos componentes de la proteína de fusión de una proteína de exportación::proteína de interés, que incluyen, si resulta aplicable, los marcadores descritos anteriormente, para estimular la separación de los componentes de la proteína de fusión de una proteína de exportación::proteína de interés. Por ejemplo, puede introducirse un sitio de reconocimiento de proteasas entre las secuencias de la proteína de exportación y la proteína de interés en el módulo de expresión. Además, puede introducirse un sitio de reconocimiento de proteasas entre el marcador y las secuencias de la proteína de interés en el módulo de expresión. Estos sitios de reconocimiento de proteasas facilitan la separación de la proteína de exportación de la proteína de interés.

La proteína de fusión de una proteína de exportación::proteína de interés generalmente está dispuesta de modo que la proteína de interés está conectada al extremo carboxi-terminal de la proteína de exportación. Sin embargo, los expertos en la técnica comprenderán que, dependiendo de la identidad de la proteína de exportación y la proteína de interés, la proteína de fusión puede construirse de modo que la proteína de exportación esté conectada al extremo carboxi-terminal de la proteína de interés.

Opcionalmente, un marcador seleccionable puede estar asociado con el módulo de expresión. Tal como se emplea en la presente, el término "marcador" se refiere a un gen que codifica un rasgo o un fenotipo que permite la selección o la búsqueda de una célula hospedante que contiene el marcador. El gen marcador puede ser un gen de resistencia a antibióticos, con lo cual puede utilizarse el antibiótico apropiado para seleccionar las células hospedantes transformadas entre las otras células que no están transformadas, o el gen marcador puede ser cualquier otro gen de resistencia a fármacos. Los ejemplos de marcadores seleccionables adecuados incluyen la adenosina desaminasa, dihidrofolato reductasa, higromicina-B-fosfotransferasa, timidina quinasa, xantina-guanina fosforribosiltransferasa, resistencia a glifosato y glufosinato, y amino-glicósido 3'-O-fosfotransferasa II (resistencia a kanamicina, neomicina y G418). Los expertos en la técnica conocerán otros marcadores adecuados que pueden emplearse con las indicaciones descritas.

Un ejemplo de un vector de expresión se muestra en la figura 1. En la figura 1A se muestra el vector de expresión pSEC84. La secuencia de nucleótidos del vector pSEC84 aparece en SEQ ID NO:1. La secuencia de aminoácidos de ClyA codificado por el gen *clyA* aparece en SEQ ID NO:2.

5 Cada vector que aparece en las figuras 1A-D comprende un promotor ( $P_{ompC}$ , un promotor *ompC* modificado controlado osmóticamente de *E. coli*), una proteína de exportación (*clyA*), un origen de la replicación, un terminador de la transcripción (T1), una función de reparto pasivo (*par*), la resistencia a kanamicina (*aph*), un sistema de muerte postsegregacional (*hok-sok*), y un sistema de reparto activo (*parA*). Debe advertirse que estos componentes del vector son solo ejemplos de una única realización del sistema descrito.

10 La figura 1B ilustra el vector de expresión pSEC84*bla*. Este vector de expresión contiene las mismas características que el vector pSEC84 y comprende además una construcción de proteína de fusión de una proteína de exportación::proteína de interés. De modo específico, el gen *bla* que codifica la  $\beta$ -lactamasa se clonó en el vector pSEC84 en el sitio *Nhe* I en la posición 1426 del vector de origen. Otras construcciones de fusión se muestran en la figura 1C (pSEC84*sacB*) y la figura 1D (pSEC84*gfpuv*).

15 La figura 5 ilustra otro vector, pSEC92*gfpuv*, que contiene la secuencia codificadora de ClyA de *S. Typhi*, en la que los codones han sido optimizados para la expresión en procariontas que incluyen, pero no se limitan a los géneros *Salmonella* y *Escherichia*. Los expertos en la técnica apreciarán que la optimización de codones de genes extraños introducidos en un hospedante bacteriano permite un alto nivel de expresión de la proteína extraña codificada de interés. La presente invención describe la fusión genética de *clyA* con optimización de codones a *gfpuv* que codifica la proteína fluorescente verde GFPuv, codificada por el plásmido de expresión pSEC92*gfpuv*. La secuencia de nucleótidos de *clyA* con optimización de codones se indica en SEQ ID NO:33. El pSEC92*gfpuv* es particularmente útil para la generación y el ensayo de diferentes mutaciones puntuales dentro del gen *clyA*. Se sabe que GFPuv no fluoresce si está condensada a dominios cadena arriba que no se pliegan correctamente. Por tanto, una fusión geénica *clyA::gfpuv* puede utilizarse para seleccionar mutaciones puntuales en la región codificadora de *clyA* que producen mutantes plegados correctamente fluorescentes no hemolíticos, que es probable que sean exportados correctamente. El pSEC93*gfpuv* se deriva de pSEC92*gfpuv*, y codifica ClyA de *S. Typhi* con optimización de codones con la adición de tres mutaciones puntuales insertadas en la región codificadora de *clyA*: I198N, A199D y E204K, condensadas en la región codificadora de la proteína fluorescente verde (*gfpuv*).

#### Genes de interés

30 El sistema de exportación de proteínas descrito en la presente puede utilizarse con una diversidad de genes de interés. En una realización, el gen de interés codifica una proteína deseada. Cualquier proteína susceptible a la expresión bacteriana recombinante puede utilizarse con el sistema de exportación descritos. El gen de interés puede codificar cualquier polipéptido tal como, por ejemplo, un polipéptido de mamífero, tal como una enzima, un inhibidor de enzimas, una hormona, una linfoquina, un activador del plasminógeno o cualquier otra proteína de interés. El gen de interés puede codificar un gen eucariota, un gen procarionta, un gen vegetal o un gen vírico de interés.

35 Una ventaja del sistema descrito es que proporciona un método mediante el cual proteínas que son tóxicas para la bacteria hospedante ahora pueden expresarse. Por ejemplo, la expresión recombinante de ciertas proteínas es complicada o imposible cuando la proteína expresada no se exporta desde la célula bacteriana hospedante. Con los métodos descritos en la presente, los expertos en la técnica pueden expresar una proteína previamente inexpressable o infraexpresada para producir la proteína deseada en cantidades que se puedan utilizar.

40 En otra realización, el gen de interés es un gen que codifica un antígeno inmunogénico, y la proteína de interés es un antígeno puede ser una proteína o uno de sus fragmentos antigénicos procedente de cualquier patógeno, tal como patógenos víricos, patógenos bacterianos y patógenos parasitarios. Como alternativa, el gen de interés puede ser un gen sintético, construido utilizando métodos de ADN recombinante, que codifican antígenos o una de sus partes procedentes de patógenos víricos, bacterianos o parasitarios u otro antígeno de interés. Estos patógenos pueden ser infecciosos en hospedantes humanos, animales domésticos o animales salvajes.

45 Los ejemplos de patógenos víricos concretos a partir de los cuales se derivan los antígenos víricos incluyen, pero no se limitan a Ortomixovirus, tales como el virus de la gripe; Retrovirus, tales como el virus del sarcoma de Rous (RSV) y el virus de la inmunodeficiencia de simios (SIV); Herpesvirus, tal como el virus de Epstein Barr (EBV), citomegalovirus (CMV) o virus del herpes simplex virus; Lentivirus, tal como el virus de la inmunodeficiencia humana; Rhabdovirus, tal como el virus de la rabia; Picomovirus, tal como el poliovirus; Poxvirus, tal como el virus de vaccinia; Rotavirus; y Parvovirus.

50 Los ejemplos de antígenos inmunogénicos procedentes de patógenos víricos incluyen los antígenos del virus de la inmunodeficiencia humana Nef, p24, gp120, gp41, Tat, Rev, y Pol. Otros ejemplos de antígenos incluyen los epitopos de células T y células B de gp120, el antígeno de la superficie de la hepatitis B, antígenos de rotavirus, tales como VP4, VP6, y VP7, antígenos del virus de la gripe, tales como hemaglutinina o nucleoproteína, y timidina quinasa del virus del herpes simplex. Las secuencias de los ácidos nucleicos y de aminoácidos de cada uno de estos antígenos víricos son muy conocidas en la técnica y pueden obtenerse con facilidad.

Los patógenos bacterianos a partir de los cuales pueden derivarse antígenos bacterianos incluyen, pero no se limitan a *Mycobacterium* spp., *Helicobacter pylori*, *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *E. coli*, *Rickettsia* spp., *Listeria* spp., *Legionella pneumoniae*, *Pseudomonas* spp., *Vibrio* spp., *Clostridium* spp., *Yersinia* spp., y *Borellia burgdorferi*.

5 Los ejemplos de antígenos inmunogénicos de patógenos bacterianos incluyen, pero no se limitan a antígeno de *Shigella sonnei* de forma I, el O-antígeno de *V. cholerae* Inaba cepa 569B, los antígenos inmunogénicos de *E. coli* enterotoxigénica, tal como el antígeno fimbrial CFA/I, y la subunidad B no tóxica de la toxina termolábil, pertactina de *Bordetella pertussis*, la adenilato ciclasa-hemolisina de *B. pertussis*, el antígeno protector (PA83) de la toxina del ántrax de *Bacillus anthracis* y el fragmento C de la toxina del tétanos de *Clostridium tetani*, el antígeno F1 y/o V de *Yersinia pestis*, las enterotoxinas 1 y 2 de *Shigella* (es decir, ShET1, ShET2) de *Shigella* spp., las proteínas EAEC  
10 descritas en el documento U.S. 7.090.850, las fimbrias de *Escherichia coli* enterotoxigénica, y los antígenos de la superficie de *E. coli* (CS) o los antígenos del factor de colonización (CFA), las fimbrias de *Escherichia coli* enterotoxigénica (ETEC), que incluyen las fimbrias CS4 de *Escherichia coli* enterotoxigénica (ETEC) (de modo específico, cualquiera de csaA, csaB, csaC, csaE y/o csaD, que se describen más a fondo en el documento U.S. 6.902.736).

15 Los ejemplos de antígenos inmunogénicos de patógenos parasitarios a partir de los cuales pueden derivarse antígenos parasitarios incluyen, pero no se limitan a *Plasmodium* spp., *Trypanosome* spp., *Giardia* spp., *Boophilus* spp., *Babesia* spp., *Entamoeba* spp., *Eimeria* spp., *Leishmania* spp., *Schistosoma* spp., *Brugia* spp., *Fasciola* spp., *Dirofilaria* spp., *Wuchereria* spp., y *Onchocerca* spp.

20 Los ejemplos de antígenos inmunogénicos de patógenos parasitarios incluyen, pero no se limitan a los antígenos del circumesporozoito de *Plasmodium* spp., tal como el antígeno del circumesporozoito de *P. bergerii* o el antígeno del circumesporozoito de *P. falciparum*; el antígeno de la superficie del merozoito de *Plasmodium* spp.; la lectina específica de galactosa de *Entamoeba histolytica*, gp63 de *Leishmania* spp., paramiosina de *Brugia malayi*, la triosa-fosfato isomerasa de *Schistosoma mansoni*; la proteína similar a globina segregada de *Trichostrongylus colubriformis*; la glutatión-S-transferasa de *Fasciola hepatica*, *Schistosoma bovis* y *S. japonicum*; y KLH de *Schistosoma bovis* y *S. japonicum*.  
25

En otra realización, el gen de interés puede codificar un agente terapéutico tal como, pero sin limitarse a antígenos específicos de tumores, de trasplantes o autoinmunológicos o sus partes. Como alternativa, el gen de interés puede codificar genes sintéticos, que codifican antígenos específicos de tumores, de trasplantes o autoinmunológicos o sus partes.

30 Los ejemplos de antígenos específicos de tumores incluyen el antígeno específico de la próstata, TAG-72 y CEA, MAGE-1 y tirosinasa. En fechas recientes se ha demostrado en ratones que la inmunización con células no malignas que expresan un antígeno tumoral proporciona un efecto de tipo vacuna, y también ayuda al animal a montar una respuesta inmunológica para eliminar las células del tumor maligno que muestran el mismo antígeno.

35 Los ejemplos de antígenos de trasplante incluyen el receptor CD3 sobre células T. El tratamiento con un anticuerpo contra un receptor CD3 ha demostrado que elimina con rapidez las células T en la circulación y que revierte la mayoría de los episodios de rechazo.

Los ejemplos de antígenos autoinmunológicos incluyen la cadena IAS. La vacunación de ratones con un péptido de 18 aminoácidos de la cadena IAS ha demostrado proporcionar protección y tratamiento a ratones con encefalomiелitis autoinmunológica experimental.

40 Como alternativa, el gen de interés puede codificar moléculas inmunorreguladoras. Estas moléculas inmunorreguladoras incluyen, pero no se limitan a factores del crecimiento, tales como M-CSF, GM-CSF; y citoquinas, tales como IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12 o IFN-gamma. En fechas recientes, el transporte dirigido localizado de citoquinas a tejidos tumorales ha demostrado estimular una potente inmunidad sistémica y potenciar la presentación de antígenos tumorales sin producir una toxicidad de citoquinas sistémica.

#### 45 Sistemas de expresión basados en plásmidos estabilizados

Los sistemas de expresión bacterianos, por diseño, generalmente utilizan vectores de expresión para controlar y aprovechar la maquinaria de síntesis de proteínas de una célula hospedante bacteriana para producir una proteína de interés. Los niveles de expresión de proteínas a menudo pueden aumentarse utilizando plásmidos de alto número de copias o vectores de expresión de alto número de copias, con las células hospedantes. Sin embargo, tal como se  
50 analizó anteriormente, la introducción de un vector de expresión de alto número de copias en una célula hospedante bacteriana imprime ciertos estreses metabólicos sobre la célula hospedante que pueden provocar que la célula hospedante expulse el vector de expresión y, así, reducen los niveles de expresión de proteínas.

En la ingeniería de los vectores de expresión, a menudo no se tiene en cuenta el efecto que ejercen los vectores de expresión de alto número de copias sobre la aptitud de la célula hospedante en la que se introduce el vector de  
55 expresión. La carga impuesta sobre las células bacterianas hospedantes que portan plásmidos de múltiples copias es el resultado acumulado de una cascada metabólica. La cascada es activada por la replicación y el mantenimiento

de vectores de expresión (véase Bailey, J.E., Host-vector interactions in *Escherichia coli*, p. 29-77, en A. Fiechter (ed.), *Advances in Biochemical Engineering, Biotechnology*, Springer-Verlag, Berlín (1993); Glick, B.R., *Biotechnol. Adv.*, 13:247-261 (1995); y Smith y Bidochka, *Can. J. Microbiol.*, 44:351-355 (1998)). La cascada también es activada por la transcripción y la traducción de las diversas funciones codificadas por el vector de expresión que incluye la proteína de interés. Este tipo de mecanismos, tales como los descritos anteriormente, explican la observación de que las bacterias que portan plásmidos crecen con más lentitud que las bacterias sin plásmidos. Estos mecanismos también pueden explicar la observación de que la velocidad de crecimiento disminuye a medida que aumenta el número de copias.

Se ha observado que las velocidades de crecimiento de los organismos recombinantes que contienen vectores de expresión disminuyen a medida que aumenta la expresión de un gen de interés. La disminución en el crecimiento puede activar la inducción de diversas proteasas celulares que pueden degradar la proteína recombinante expresada de interés. Por tanto, una menor velocidad de crecimiento es la consecuencia inevitable de la carga metabólica que, a su vez, es el resultado acumulado de una serie de perturbaciones fisiológicas. Por ejemplo, se producen perturbaciones fisiológicas como resultado de la expresión y la acumulación de la proteína de interés dentro de la bacteria hospedante. Esta acumulación puede ser perjudicial para la viabilidad del organismo hospedante y, por tanto, es una presión de selección negativa.

Debido a que las cargas metabólicas, tales como las analizadas arriba, crean una presión selectiva sobre la pérdida de los vectores de expresión residentes en ausencia de selección, puede producirse una pérdida significativa de los vectores de expresión desde la célula hospedante después de que la célula hospedante haya sido transformada con el vector de expresión que contiene el gen de interés. La pérdida espontánea del plásmido elimina cualquier carga metabólica de la célula hospedante y permite que las células hospedantes sin plásmidos sobrepasen con rapidez a la población de células hospedantes que portan plásmidos. La mayor cantidad de células hospedantes que no contienen, y por tanto, que no expresan la proteína de interés reduce los niveles de producción de proteínas en su conjunto. Por tanto, las células hospedantes que no están genéticamente constreñidas para mantener vectores de expresión que dirigen la síntesis de altos niveles de una proteína de interés concreta pueden producir una cantidad significativamente menor de proteínas.

Existe una serie de medios mediante los cuales el estrés metabólico puede reducirse. La expresión controlada de una proteína de interés desde vectores de expresión de múltiples copias representa una solución para la síntesis de altos niveles de la proteína de interés dentro de células hospedantes. Esta solución es una realización con la que puede practicarse los métodos descritos. La utilización de promotores inducibles, por ejemplo, es un método mediante el cual puede controlarse la expresión desde un vector de expresión. Estos promotores inducibles se analizan en la sección de módulos de expresión de esta descripción.

Otra realización de los métodos descritos en la presente se refiere a un sistema de expresión basado en plásmidos modificado para permitir la expresión estable de altos niveles de una o más proteínas en una población creciente de células. Preferiblemente, un vector de expresión estable es un vector que perpetúa el vector de expresión a medida que la célula hospedante se replica. Los vectores de expresión que confieren estabilidad al plásmido a dos niveles independientes se han descrito recientemente en Galen, *et al.*, *Immun.*, 67:6424-6433 (1999), y en la solicitud de patente de EEUU n.º de serie 09/204.117, presentada el 2 de diciembre, 1998, ahora patente de EEUU n.º 6.413.768, y n.º de serie 09/453.313, presentada el 2 de diciembre, 1999, ahora patente de EEUU n.º 6.703.233.

En esta realización, pueden incorporarse funciones de reparto en un vector de expresión para potenciar la herencia del plásmido a medida que una célula hospedante o bacteria concretas crecen y posteriormente se dividen. En los casos raros en que una célula hija no hereda al menos una copia del vector de expresión, se activa un sistema de muerte postsegregacional latente y elimina esta bacteria o célula hospedante de la población en crecimiento mediante lisis celular.

#### D. Organismos hospedantes

Una serie de especies de bacterias son adecuadas para su uso con las indicaciones descritas en la presente. Preferiblemente, una especie de bacteria adecuada será capaz de exportar proteínas, de forma que el gen de interés pueda ser transcrito de modo adecuado de manera que la proteína de interés sea traducida y exportada hacia el exterior de la bacteria. En una realización de la invención, la bacteria se administra a un animal y, por tanto, la proteína de interés debe exportarse hacia el exterior de la bacteria hacia el animal. Pueden utilizarse bacterias invasivas y no invasivas. Los ejemplos de algunas bacterias invasivas incluyen *Clostridium* spp. (tal como *C. difficile*), *Shigella* spp., *Listeria* spp., *Rickettsia* spp., y *Escherichia coli* enteroinvasiva. Las realizaciones específicas utilizan especies de *Vibrio*, *Salmonella*, *Shigella* y/o *Clostridium*. Los ejemplos de realizaciones no limitantes incluyen, pero no se limitan a *S. Typhi*, tal como *S. Typhi* CVD 908 que tiene una mutación *htrA*, *E. coli*, tal como *E. coli* enterotoxigénica (ETEC) o *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *Vibrio cholerae*, *Shigella flexneri* 2a, y *Clostridium difficile*.

La cepa de *Salmonella* concreta empleada con la siguiente descripción no es crítica. Los ejemplos de cepas de *Salmonella* que pueden emplearse en la presente invención incluyen *S. Typhi* (ATCC n.º 7251) y *S. typhimurium* (ATCC n.º 13311). En la presente invención se emplean preferiblemente cepas de *Salmonella* atenuadas e incluyen

*S. Typhi* aroAroD (Hone *et al.*, Vacc., 9:810-816 (1991)), *S. Typhi* CVD 908-htrA y el mutante de *S. typhimurium* aroA (Mastroeni *et al.*, Micro. Pathol., 13:477-491 (1992))). Como alternativa, pueden construirse nuevas cepas de *Salmonella* atenuadas introduciendo una o más mutaciones atenuantes según se ha descrito anteriormente para *Salmonella* spp.

- 5 El organismo hospedante también puede ser un virus, tal como: (i) un fago; (ii) un virus de ADN bicatenario, tal como un adenovirus, un herpesvirus, o un poxvirus; (iii) un virus de ADN monocatenario, tal como un parvovirus; (iv) un virus de ARN bicatenario, tal como un reovirus; (v) un virus de ARN monocatenario, tal como un picornavirus, un togavirus, un ortomixovirus, o un rhabdovirus, (vi) un retrovirus; o (vii) un virus del mosaico del tabaco.

#### E. Biorreactores

- 10 El sistema de exportación de proteínas descrito en la presente es adecuado para su uso con biorreactores y dispositivos similares que facilitan el crecimiento de bacterias y la recolección o el uso de un producto deseado o proteína de interés. Tradicionalmente, existen cinco etapas para la recuperación de biomoléculas de los biorreactores de la técnica anterior: pretratamiento, separación sólidos/líquidos, concentración, purificación, y formulación. Puede haber una amplia gama de operaciones disponibles dentro de cada etapa. Estos intervalos de  
15 operaciones para cada etapa son los siguientes: pretratamiento: rotura de las células, estabilización, esterilización, pasteurización, y floculación; separación sólidos/líquidos: filtración, sedimentación, y centrifugación; concentración: membranas, precipitación, evaporación, extracción, y concentración con congelación; purificación: precipitación, extracción, diafiltración, absorción, y cromatografía; y formulación: secado, elaboración de aglomerados, extrusión, granulación, y formación de comprimidos.

- 20 En biorreactores en los que las bacterias no exportan el producto deseado hacia el exterior de la bacteria, se debe ampliar el número de bacterias, inducir a las bacterias para que produzcan el producto deseado, y después lisar las bacterias para liberar los contenidos. Generalmente, esta rotura se realiza en el mismo medio en el que se cultivan las bacterias. Se puede utilizar un homogeneizador o un molino de esferas para romper mecánicamente las bacterias. Para una rotura no mecánica se puede utilizar un choque térmico (que puede destruir las proteínas),  
25 detergentes, disolventes, secuestrantes y enzimas (Krijgsman, "Releases of Intracellular Components", pp. 27-42, en Product Recovery in Bioprocess Technology, editorial Butterworth-Heinemann Ltd., Oxford, Reino Unido, 1992).

Después de que las bacterias se hayan roto se separan las partículas sólidas de los fluidos (separación sólidos/líquidos). El producto deseado generalmente está en el líquido, que después hay que concentrar. Después se extrae el producto deseado del líquido concentrado.

- 30 Los factores que afectan a la separación del producto deseado de los sólidos o líquidos no deseados son el tamaño, la difusividad, la carga iónica, la solubilidad y la densidad. Para una separación dependiente del tamaño, se pueden utilizar microfiltros, filtros de tejidos y fibras, ultrafiltración, tamices/coladores, y cromatografía en gel. Para la separación dependiente de la difusividad se puede utilizar la ósmosis inversa y la diálisis. Se emplea la cromatografía de intercambio iónico para la separación dependiente de la carga iónica. Para separar el producto  
35 deseado basándose en su solubilidad se pueden utilizar extracciones con disolventes. Para la separación dependiente de la densidad se pueden utilizar ultracentrifugas, centrifugas, y sedimentación por gravedad (Krijgsman, "Downstream Processing in Biotechnology", pp. 2-12, en Product Recovery in Bioprocess Technology, editorial Butterworth-Heinemann Ltd., Oxford, Reino Unido, 1992).

- 40 Una ventaja de utilizar el sistema descrito es que una población de células hospedantes bacterianas recombinantes puede ser transformada con un vector de expresión que comprende el sistema de exportación de proteínas descrito y que la población de células hospedantes bacterianas puede mantenerse en cultivo y utilizarse para producir proteínas sin tener que recolectar y lisar las células hospedantes bacterianas. El cultivo de células hospedantes bacterianas y la recolección del medio de cultivo que contiene la proteína de interés expresada de modo recombinante puede realizarse en cualquier tipo de biorreactor.

- 45 Existen diversos tipos de biorreactores, pero la familia de dispositivos puede dividirse en dos categorías principales, los biorreactores de "flotación libre" y de "lecho". En los biorreactores de "flotación libre", las bacterias están flotando libremente en el medio. Los ejemplos de biorreactores de "flotación libre" son biorreactores de tanque con agitación convencionales, columnas de burbujas, circuitos aerotransportadores, biorreactores de torre de múltiples fines, biorreactores de circuitos impulsados por líquidos, y biorreactores de circuitos de torre bombeada. Un ejemplo de  
50 biorreactor de tipo de "lecho" es el biorreactor de lecho cargado. En un biorreactor de tipo de "lecho", las bacterias están unidas a esferas, a una membrana o a otro soporte sólido. Puede producirse un tipo de biorreactor híbrido utilizando un biorreactor de lecho fluido en el que las bacterias están unidas a esferas u otro soporte pero pueden flotar en el medio (Mijnbeek, "The Conventional Stirrer Tank Reactor", pp. 39-74; Mijnbeek, "Bubble Column, Airlift Reactors, and Other Reactor Designs", pp. 75-114; Geraats, "An Introduction to Immobilized Systems", pp. 115-124;  
55 todos en "Operational Modes of Bioreactors", editorial Butterworth-Heinemann Ltd, Oxford, Reino Unido, 1992).

La utilización del sistema de exportación de proteínas descrito en la presente con un biorreactor de "lecho" evita la etapa de pretratamiento y de separación de sólidos/líquidos porque la proteína de interés deseada se exporta hacia el exterior de la bacteria hacia el medio. Solo es necesario retirar el medio del lecho antes de intentar aislar el

producto deseado. Para los biorreactores de "flotación libre", se puede centrifugar la mezcla de líquido/bacterias para sedimentar las bacterias. Después se retira el líquido que contiene la proteína de interés deseada de las bacterias sedimentadas. Después se aísla la proteína de interés deseada del medio. Otra ventaja del sistema descrito es que el medio contendrá menos proteínas no deseadas que las que están presentes en el medio en el que las bacterias se rompen; todos los componentes intracelulares de las bacterias rotas están ausentes del medio en la presente invención. Así, es más fácil la purificación de la proteína de interés deseada. Además, la presencia de marcadores y sitios de ruptura de proteasas dentro de la proteína de fusión de la proteína de exportación::proteína de interés facilita aún más el aislamiento y la purificación de la proteína de interés.

Un ejemplo de un biorreactor es el aparato que aparece en la patente de EEUU n.º 5.635.368, "Biorreactor con bacterias de ácido láctico inmovilizadas y su uso", de Lommi *et al.*, 3 de junio, 1997. El aparato de Lommi se refiere a un biorreactor con bacterias inmovilizadas, que se caracteriza por que las bacterias están fijadas sobre la superficie de un vehículo sustancialmente no comprimible. Otro ejemplo de un biorreactor se encuentra en la patente de EEUU n.º 4.910.139, "Método para la producción continua de ácido cítrico mediante un biorreactor de membrana de fibras huecas dual", de Chang *et al.*, 20 de marzo, 1990. Esta invención se refiere al cultivo de bacterias inmovilizadas para producir ácido cítrico de modo continuo.

Otro aparato biorreactor se describe en la patente de EEUU n.º 5.585.266, "Biorreactor de células inmovilizadas", de Plitt *et al.*, 17 de diciembre, 1996. El dispositivo de Plitt descrito se refiere a un biorreactor de células inmovilizadas en el que las células son portadas dentro o sobre una matriz de inmovilización que incluye láminas de soporte de células formadas por tejido textil común. Las patentes de EEUU n.ºs 4.665.027 y 5.512.480 describen otras realizaciones de biorreactores.

#### F. Vacunas

El sistema de exportación de proteínas descrito en la presente tiene utilidad para la producción de vacunas. Por ejemplo, puede lograrse la producción de vacunas de subunidades utilizando el sistema de exportación de proteínas puesto que el sistema facilita la recolección de proteínas recombinantes y reduce la presencia de proteínas contaminantes del medio de crecimiento en el que se propagan las células hospedantes recombinantes. Las vacunas de células hospedantes recombinantes también pueden utilizarse para generar composiciones inmunogénicas en las que se proporciona la célula hospedante recombinante a un sujeto, y el sistema inmunológico del sujeto genera una respuesta inmunológica contra las proteínas exportadas desde la célula hospedante recombinante. Así, se describen vacunas de subunidades que comprenden proteínas producidas utilizando los sistemas de exportación de proteínas de la presente invención, así como vacunas de vectores de bacterias vivas que comprenden células hospedantes recombinantes transformadas con un sistema de exportación de proteínas de la presente invención.

El sistema de exportación de proteínas descrito en la presente puede utilizarse con cualquier antígeno para preparar una vacuna a partir de él, en la que el antígeno es la proteína de interés según se describió anteriormente. La preparación de la vacuna se describe en general en *New Trends and Developments in Vaccines*, editado por Voller *et al.*, University Park Press, Baltimore, Md., EEUU, 1978. La encapsulación dentro de liposomas se describe, por ejemplo, en Fullerton, patente de EEUU n.º 4.235.877. La conjugación de proteínas a macromoléculas se describe, por ejemplo, en Likhite, patente de EEUU n.º 4.372.945, y en Armor *et al.*, patente de EEUU n.º 4.474.757.

La cantidad de antígeno en cada dosis de vacuna se selecciona como la cantidad que induce una respuesta inmunoprotectora sin los efectos secundarios adversos significativos de las vacunas típicas. Una respuesta inmunoprotectora es la que confiere una mayor capacidad para prevenir, retrasar o reducir la gravedad de la aparición de una enfermedad, comparado con estas capacidades en ausencia de la vacunación. Esta cantidad variará dependiendo de los antígenos específicos que se están empleando y de la tecnología de administración empleada (solo como ejemplo, proteínas purificadas o bacterias vivas), así como de factores tales como el peso, la edad y la salud del receptor. En general, se espera que las dosis que comprenden proteínas purificadas en vacunas de subunidades comprenderán 1-1000 µg de antígeno total, preferiblemente 2-200 µg. En general, se espera que las dosis que comprenden bacterias vivas que transportan proteínas de interés (vacunas de vectores de bacterias vivas) comprenderán 1-1000 ng del antígeno total de interés. Puede determinarse una cantidad óptima para una vacuna concreta mediante estudios convencionales que implican la observación de las titulaciones de anticuerpos y otras respuestas en sujetos. Después de una vacunación inicial, los sujetos (animales o seres humanos) pueden recibir una o más dosis de refuerzo, por ejemplo después de 1 y 6 meses.

El sistema de exportación de proteínas también puede utilizarse con una vacuna de vectores de bacterias vivas para aumentar la eficacia de la preparación. Por ejemplo, la patente de EEUU n.º 5.387.744, de Curtiss *et al.*, titulada "Microbios avirulentos y sus usos: *Salmonella typhi*", proporciona una vacuna de vectores de bacterias vivas contra *S. Typhi*. De forma más específica, la patente de Curtiss proporciona composiciones inmunogénicas para la inmunización de un vertebrado o un invertebrado que comprende un derivado avirulento de *S. Typhi*. Los derivados tienen una mutación de los genes *cya* y/o *crp* y/o *cdt*.

Los derivados avirulentos descritos por Curtiss *et al.* pueden transformarse con el sistema de exportación de proteínas descrito en la presente para permitir que el organismo recombinante resultante actúe como una



composición inmunogénica contra *S. Typhi*, así como cualquier otro antígeno o antígenos que estén acoplados con la proteína de exportación del sistema descrito.

Se contempla que las vacunas de subunidades y las vacunas de vectores de bacterias vivas de la presente solicitud se administren en formulaciones farmacéuticas para su uso en la vacunación de individuos, preferiblemente seres humanos. Estas formulaciones farmacéuticas pueden incluir vehículos farmacéuticamente eficaces y, opcionalmente, pueden incluir otros ingredientes terapéuticos, tales como diversos adyuvantes conocidos en la técnica.

El vehículo o los vehículos deben ser farmacéuticamente aceptables en el sentido de que sean compatibles con los componentes de la vacuna y no sean excesivamente perjudiciales para el receptor de la misma. Los vehículos adecuados pueden incluir agua o una disolución salina, con o sin un agente estabilizante, disoluciones tamponadas, medios de dispersión, revestimientos, preparaciones isotónicas.

Los modos de administración pueden comprender el uso de cualquier medio y/o método adecuado para administrar las vacunas de subunidades y las vacunas de vectores de bacterias vivas a un locus corpóreo del animal hospedante, por lo cual las vacunas de subunidades y las vacunas de vectores de bacterias vivas son inmunogénicas y generan unos niveles protectores de respuestas inmunológicas pertinentes y deseadas. Los modos de administración pueden incluir, sin limitación, métodos de administración parenteral, tales como inyección subcutánea (SC), inyección intravenosa (IV), transdérmica, intramuscular (IM), intradérmica (ID), así como no parenteral, por ejemplo, administración oral, nasal, intravaginal, pulmonar, oftálmica y/o rectal.

Las vacunas de vectores de bacterias vivas de la presente solicitud pueden administrarse de forma útil al animal hospedante con cualquier otro agente farmacológica o fisiológicamente activo adecuado, por ejemplo, sustancias antigénicas y/u otras sustancias biológicamente activas. Los animales a los cuales se les pueden administrar las proteínas de fusión y las vacunas de la presente invención incluyen especies de mamíferos, tales como seres humanos, primates no humanos (por ejemplo, monos, babuinos y chimpancés), caballos, animales bovinos (por ejemplo, toros, vacas o bueyes), cerdos, cabras, ovejas, perros, gatos, conejos, jerbos, hámsters, ratas y ratones, y otras especies no mamíferas, tales como aves (por ejemplo, pollos, pavos y patos) y peces.

Las formulaciones farmacéuticas descritas en la presente pueden presentarse, por ejemplo, como unidades discretas, tales como cápsulas, sellos, comprimidos o pastillas, que contienen cada una una cantidad predeterminada de la estructura de administración del vector; o como una suspensión.

#### C. Utilidad adicional

Además de los antígenos y las proteínas terapéuticas que son útiles para la industria farmacéutica, el gen de interés puede codificar enzimas, polipéptidos, proteínas o aminoácidos que pueden ser útiles, y solo como ejemplo, para la industria alimentaria, la industria de los suplementos nutricionales, la industria de piensos para animales, la industria de la biomedicación, la industria de las aguas residuales, y la industria del tratamiento de aguas. Para estas industrias, puede que no sea necesario aislar la proteína de interés codificada por el gen de interés del medio de un biorreactor para que la proteína de interés haga su función. La proteína de interés puede ser un catalizador para una reacción deseada o puede actuar como un componente precursor para una reacción deseada.

Los siguientes ejemplos se proporcionan solo con fines ilustrativos, y no pretenden limitar el alcance de la presente invención.

#### **Ejemplos**

##### **Ejemplo 1: Clonación y mutagénesis de *clyA* de *S. Typhi***

La identificación de *clyA* se realizó mediante un análisis BLASTN de la secuencia del genoma de *S. Typhi* recientemente completado disponible en the Sanger Center (Wellcome Trust Genome Campus, Hinxton, Cambridge, CB10 1SA, Reino Unido) (véase el sitio web que tiene la dirección [sanger.ac.uk/Projects/S\\_typhi/blast\\_server.shtml](http://sanger.ac.uk/Projects/S_typhi/blast_server.shtml)), utilizando la secuencia de ADN de *hlyE* de *E. coli* (GenBank n.º de registro U57430).

El marco de lectura abierto de *clyA* se identificó como una secuencia de 912 pb que se predice que codifica una proteína de 304 restos con una masa molecular de 33,8 kDa que es 89,4% idéntica a *HlyE* de *E. coli*. Aunque *clyA* es 85,3% idéntica al marco de lectura abierto de *hlyE* de *E. coli* de 915 pb, la región de control de la transcripción cadena arriba está relacionada ligeramente solo con 33,6% de bases idénticas dentro de una región de 250 pb.

Basándose en este análisis se diseñaron cebadores para la amplificación mediante PCR de un módulo genético sin promotores que codifica *ClyA* en el que el sitio de unión a ribosomas optimizado se modificó de forma 5'-proximal al codón de inicio ATG. Las secuencias de cebadores se listan en la tabla 2.

Tabla 2: Cebadores utilizados en la construcción y el análisis de la secuencia de los módulos de plásmidos

n.º de cebador	Secuencia <sup>a</sup>	Módulo creado	Molde
1	5' <b>GGATCC</b> AAAATAAGGAGGAAAAAAAAATGACTAGTATTT TTGCAGAACAACTGTAGAGGTAGTTAAAAGCGCGATCGA AACCGC AGATGGGGCATTAGATC-3' (SEQ ID NO:3)	<i>clyA-tetA</i>	CVD 908- <i>htrA</i>
2	5' <b>CCTAGG</b> TTATCAGCTAGCGACGTCAGGAACCTCGAAAAG CGTCTTCTTACCATGACGTTGTTGGTATTACATTACAGGTGTT AATCAT TTTCTTTGCAGCTC-3' (SEQ ID NO:4)	"	"
3	5'CACGGTAAGAAGACGCTTTTTCGAGGTTCTGACGTC <b>GCTA</b> <b>GCTGATAACCTAGG</b> TCATGTTAGACAGCTTATCATCGATA AGCTTT AATGCGGTAGT-3' (SEQ ID NO:5)	"	pBR322
4	5' <b>AGATCTACTAGT</b> GTCGAC <b>GCTAGC</b> TATCAGGTCGAGGTG GCCGGCTCCATGCACCGCGACGCAACGCG-3' (SEQ ID NO:6)	"	"
5	5' <b>ACTAGT</b> CACCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAAAGATGCT GAA GATCAGTTGGGTGCACGA-3' (SEQ ID NO:7)	<i>bla-tetA</i>	pGEM-T
6	5'CATTAAAGGTTATCGATGATAAGCTGTCAAACATG <b>AGCT</b> <b>AGCCTAGG</b> TCATTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTAT CTCAGC GATCTGTCTATTTG-3' (SEQ ID NO:8)	"	"
7	5'CGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTA AGCATTGGTAATG <b>CCTAGGCTAGC</b> TCATGTTTGACAGCT TATCAT CGATAACCTTTAATG-3' (SEQ ID NO:9)	"	pBR322
8	5'GCGC <b>ACTAGT</b> AAAGAAACGAACCAAAGCCATATAAGG AAA CATACGGCATTCCCATATTACAGCCATG-3' (SEQ ID NO:10)	<i>sacB-tetA</i>	pIB279
9	5'TAAACTACCGCATTAAAGCTTATCGATGATAAGCTGTCAA ACATG <b>CCCGGG</b> TCACTATTTGTTAACTGTTAATTGTCTT GTTCAA GGATGCTGTCTTTGAC-3' (SEQ ID NO:11)	"	"
10	5'TCATGTTTGACAGCTTATCATCGATAAGCTTTAATGCGGT AGT TTA-3' (SEQ ID NO:12)	"	pBR322
11	5'GCGC <b>AGATCT</b> TAAATCATCCACAGGAGGC <b>GCTAGC</b> ATGAG TAAAGGAGAAGAACCTTTTCACTGGAGTTGTCCCAATTCTTG- 3' (SEQ ID NO:13)	<i>gfpuv-tetA</i>	pGEN84
12	5'GTGATAAACTACCGCATTAAAGCTTATCGATGATAAGCTG TCAAACATGAGCGCT <b>TCTAGA</b> ACTAGTTCATTATTTGTAGA GCTCATCCATGCCATGTGTAATCCAGCAG-3' (SEQ ID NO:14)	"	"

<sup>a</sup> Los sitios de restricción pertinentes se indican en **negrita**, subrayados; los sitios de unión a ribosomas y los codones de inicio se indican en *cursiva*.

5 Para facilitar la recuperación, se emplearon técnicas de PCR solapante para crear un módulo genético *clyA-tetA* de 2252 pares de bases sin promotores, sintetizado mediante PCR solapante tal como se ha descrito previamente, utilizando los cebadores 1 y 2 con ADN de molde cromosómico procedente de CVD 908-*htrA*, y los cebadores 3 y 4 con un molde derivado de pBR322, y recuperado en pGEM-T (Promega, Madison, Wis.) transformado en *E. coli* DH5 $\alpha$ .

10 Se seleccionaron los clones recombinantes sobre un medio de agar sólido que contenía eritrocitos de oveja. De modo específico, la selección para la actividad hemolítica se realizó sobre un medio de agar 1XLB recién preparado que contenía una selección apropiada de antibióticos y sangre de oveja al 5%. Después las placas se incubaron a 37 °C durante 24 horas para detectar las zonas de hemólisis de eritrocitos ("red blood cells", RBC). Se identificaron inmediatamente varias colonias que producían halos transparentes de hemólisis. Esta observación sugiere que si *clyA* requiere proteínas accesorias para la translocación hacia el exterior de la bacteria, estas proteínas parecen ser comunes a *S. Typhi* y *E. coli*. Se eligió un aislado positivo, denominado pGEM-T-*clyA*, para su uso posterior.

15 Se estudiaron los papeles funcionales de diversas regiones de ClyA para proporcionar información para la

modificación adecuada de las proteínas de fusión recombinantes que codifican un antígeno unido a ClyA. De modo específico, se estudió el papel desempeñado por el extremo amino-terminal, el extremo carboxilo-terminal, o ambos, en la exportación de la hemolisina hacia el exterior de la bacteria.

5 Para lograr esto, *clyA* se sometió a mutagénesis aleatoria utilizando el transposón *TnphoA*. El "*phoA*" de "*TnphoA*" codifica la fosfatasa alcalina (véase Manoil y Bechwith, PNAS, vol. 82, pp. 8129-8133, 1985). La transposición de *TnphoA* permite la formación aleatoria de fusiones dentro de marco del N-terminal de PhoA sobre una proteína diana concreta. La mutagénesis de *TnphoA* se realizó después de la electroporación de pGEM-*TclyA*, que expresa la hemolisina ClyA de *S. Typhi* funcional, en DH5 $\alpha$  para producir DH5 $\alpha$  (pGEM-*TclyA*). Entonces se realizó un apareamiento por estría cruzada entre DH5 $\alpha$  (pGEM-*TclyA*) y la cepa donante de *TnphoA* SM10(pRT733), y seleccionando los transconjugantes sobre 2XLB50 suplementado con tetraciclina, carbenicilina y kanamicina a 10  $\mu$ g/ml, 50  $\mu$ g/ml y 10  $\mu$ g/ml, respectivamente (2XLB50+T10C50K10). Después la bacterias se reunieron y se cultivaron en caldos de cultivo para la purificación de los plásmidos, y los plásmidos purificados se retransformaron en la cepa de *E. coli phoA* $\Delta$ 20 mutante CC118 para la selección de los transformantes Pho<sup>+</sup> sobre 2XLB50+T10C50K10 suplementado con 200  $\mu$ g/ml del sustrato de la fosfatasa alcalina 5-bromo-4-cloro-3-indolilfosfato (BCIP, Sigma, St. Louis, MO). Las fusiones de la proteína diana que son segregadas N-terminalmente hacia el periplasma, son expuestas sobre la superficie, o son exportadas totalmente hacia el exterior de la bacteria pueden ser seleccionadas con facilidad utilizando el sustrato cromogénico BCIP para detectar los halos de color azul oscuro de la hidrólisis; las proteínas que son segregadas C-terminalmente no pueden detectarse utilizando este método.

20 Utilizando la mutagénesis de *TnphoA*, se identificaron 4 de 621 colonias PhoA<sup>+</sup> que ya no muestran actividad hemolítica. La secuenciación de un aislado confirma la inserción dentro de marco de PhoA después del resto 179 (Ala) de ClyA. Esta inserción trunca ClyA en la región transmembrana hidrófoba propuesta y elimina el resto de los 125 restos carboxilo-terminales. Por tanto, se concluye que el extremo carboxilo-terminal de ClyA de *S. Typhi* no es necesario para el transporte del citoplasma de *E. coli* (y probablemente también de *S. Typhi*), y que debe realizarse la fusión genética de genes heterólogos que potencialmente codifican fusiones de proteínas exportadas en el extremo 3'-terminal de *clyA*.

### Ejemplo 2: Construcción de fusiones carboxilo-terminales de los antígenos de ensayo con ClyA

30 Para ensayar la capacidad para exportar proteínas pasajeras unidas al extremo carboxilo-terminal de ClyA, se eligió el gen *bla* que codifica la proteína de  $\beta$ -lactamasa RTEM-1, que confiere resistencia a la ampicilina y a la carbenicilina, para la experimentación.

Esta fusión de proteínas se introdujo como una fusión genética de un módulo *SpeI* insertado dentro de marco en el sitio *NheI* adyacente al tándem de codones de fin en el extremo 3'-terminal de *clyA* de pSEC84. Al principio, se sintetizó un fragmento *SpeI-NheI* de 807 pb que codifica la  $\beta$ -lactamasa de 268 aminoácidos madura sin la secuencia señal de 23 restos, a partir de un derivado de pBR322 mediante PCR. El fragmento purificado después se insertó dentro de marco en el sitio *NheI* carboxi-terminal introducido de *clyA* para crear una fusión genética *clyA-bla* de 1742 pb que codifica una proteína de fusión de 62,9 kDa predicha. La construcción de plásmido deseada se recuperó con facilidad en colonias aisladas a partir de cultivos cultivados en presencia de carbenicilina 5  $\mu$ g/ml, pero los plásmidos recuperados después de la selección con carbenicilina 50  $\mu$ g/ml parecen ser inestables y estar genéticamente reordenados.

#### 40 Fusión *bla-tetA*

Debido al problema con la estabilidad del plásmido y la reordenación genética de la construcción *clyA-bla* descrita anteriormente, se sintetizó la fusión *bla-tetA* como un módulo *SpeI* de 2111 pb mediante PCR solapante utilizando los cebadores 5 y 6 con el molde pGEM-T, y los cebadores 7 y 4 con el molde derivado de pBR322; la inserción de este módulo en pSEC84 roto con *NheI* produce pSEC84*bla* (véase la figura 1B).

45 Después de la introducción en CVD 908-*htrA*, las colonias se seleccionaron para la conservación de actividad hemolítica, y después se seleccionaron para la actividad  $\beta$ -lactamasa utilizando el sustrato cromogénico nitrocefina a una concentración de 100  $\mu$ g/ml en 2XLA50+DHB+T10; las placas se incubaron a 30 °C durante al menos 16 horas y se estudiaron para la presencia de halos rojos alrededor de las colonias que indican la ruptura de la nitrocefina. Se observaron halos rojos alrededor de CVD 908-*htrA*(pSEC84*bla*), que indican la ruptura de la nitrocefina y confirman la presencia de  $\beta$ -lactamas enzimáticamente activa. Se concluye que una duplicación aproximada de la masa molecular de ClyA desde 34 kDa a 63 kDa produce una proteína de fusión de 2 dominios en la que ambos dominios parecen plegarse correctamente para mantener la actividad biológica esperada de cada dominio.

#### Fusion *sacB-tetA*

55 Para investigar la versatilidad de ClyA como compañero de fusión para exportar antígenos heterólogos fuera de *S. Typhi*, se estudió la eficacia de ClyA para exportar la levansacarasa, potencialmente letal, codificada por *sacB* de *Bacillus subtilis*. La expresión del gen *sacB* es letal cuando se expresa dentro del citoplasma de bacterias entéticas,

que incluyen *S. Typhi*, cultivadas en presencia de sacarosa. Se intentó la construcción de una fusión de proteínas ClyA-SacB con una masa molecular predicha de 83,9 kDa, para su introducción en CVD 908-*htrA*. Esta fusión se introdujo como un módulo *SpeI sacB-tetA* que codifica la levansacarasa de 50,0 kDa de 445 restos madura, sin la secuencia señal de 29 aminoácidos, y se insertó dentro de marco en el sitio *NheI* carboxilo-terminal modificado de ClyA en pSEC84. Se seleccionó el CVD 908-*htrA* que porta la construcción deseada utilizando tetraciclina y se seleccionó en presencia de sacarosa para la supervivencia. Si ClyA-SacB no ha podido ser exportada hacia el exterior del citoplasma, no se recuperarán aislados, pero para las fusiones que se expresan sobre la superficie o que son totalmente exportadas hacia el exterior de la bacteria hacia el medio circundante, puede esperarse que un resto SacB enzimáticamente activo rompa la sacarosa para liberar glucosa, que inmediatamente será transportada hacia el interior de la bacteria y metabolizada.

Se sintetizó el módulo *sacB-tetA* utilizando los cebadores 8 y 9 con el molde pIB279 y los cebadores 10 y 4, igual que anteriormente, para crear un módulo *SpeI* de 2653 pb inserado en pSEC84 que genera la fusión *clyA::sacB* de pSEC84-*sacB* (SEQ ID NO:18) (véase la figura 1C). Después de la introducción en CVD 908-*htrA*, las colonias de nuevo se seleccionaron para la conservación de la actividad hemolítica, y después se estudiaron para la actividad levansacarasa mediante cultivo en medio con base de agar MacConkey (Difco) suplementado con DHB y sacarosa (al 8% o al 16% en p/v) o sacarosa al 8%+arabinosa al 8% como única fuente de carbohidratos. Las placas se incubaron a 30 °C durante 16-24 horas para recuperar los cfu aislados y determinar la fermentación del carbohidrato; se requirió más incubación a temperatura ambiente durante varios días para observar la formación de cúpulas de tipo polisacárido sobre las colonias.

Tal como se muestra en las figura 2B y 2D, el crecimiento de CVD 908-*htrA*(pSEC84-*sacB*) fue excelente cuando se cultiva en el medio indicador que contiene sacarosa al 8% o sacarosa al 16% como única fuente de carbohidratos (cuando se cultiva en el medio con base de agar MacConkey). En efecto, se observó una cúpula de tipo polisacárido sobre las colonias de CVD 908-*htrA*(pSEC84-*sacB*) aisladas, que no se observa para CVD 908-*htrA* (figuras 2A y 2C), y que se intensifica con concentraciones mayores de sacarosa. Estableciendo como hipótesis que este material de tipo polisacárido es levano, formado por la polimerización catalizada por levansacarasa de la fructosa liberada a partir de la hidrólisis de la sacarosa, se intentó bloquear esta polimerización introduciendo L-arabinosa al 8%, que se sabe que inhibe la levansacarasa. Tal como se muestra en la figura 2F, ya no se observan cúpulas, siendo ahora similares las colonias de CVD 908-*htrA* y CVD 908-*htrA*(pSEC84-*sacB*).

Si las fusiones de proteínas ClyA-SacB en efecto son exportadas hacia el exterior de CVD 908-*htrA*(pSEC84-*sacB*) , entonces la ruptura de la sacarosa por el dominio SacB para liberar glucosa libre debería proporcionar una ventaja metabólica comparado con CVD 908-*htrA* cuando estas cepas se cultivan como cultivos en caldo en presencia de sacarosa. Para ensayar esta hipótesis, se establecieron 100 ml de cultivos en caldo de CVD 908-*htrA*(pSEC84) o CVD 908-*htrA*(pSEC84-*sacB*) en matraces con pantalla de 1 litro que contenían 2XLB50+DHB+K10 más sacarosa al 10%, y el crecimiento se comparó con cultivos de CVD 908-*htrA*(pSEC84) cultivados en presencia de glucosa al 10% como control positivo. Tal como se muestra en la figura 3, se observó que CVD 908-*htrA*(pSEC84-*sacB*) crece con más rapidez en presencia de sacarosa que CVD 908-*htrA*(pSEC84) cultivado con glucosa o con sacarosa, una observación confirmada con los recuentos viables. Cuando se toman conjuntamente con los resultados observados anteriormente para ClyA-Bla, los datos sugieren claramente que ClyA es un compañero de fusión versátil para la exportación hacia el exterior de la bacteria de proteínas de fusión correctamente plegadas en las que se conserva la actividad biológica de los dominios fusionados.

#### Fusión *clyA::gfpuv*

Para definir aún más las propiedades de exportación de ClyA y, de forma específica, verificar la presencia de productos de fusión de ClyA en el sobrenadante de CVD 908-*htrA* en crecimiento exponencial, se construyó una fusión genética en la que *clyA* se fusiona con la proteína fluorescente verde indicadora (GFPuv), creando el módulo *clyA::gfpuv* de pSEC84-*gfpuv* (véase la figura 1D), e isogénica con pSEC84-*bla* y pSEC84-*sacB*. De nuevo, CVD 908-*htrA*(pSEC84-*gfpuv*) sigue siendo hemolítica pero con una fluorescencia reducida cuando se compara con GFPuv expresada citoplásmicamente. Empleando un anticuerpo policlonal GFP (BD Biosciencias Clontech, Palo Alto, California), se estudió la exportación de ClyA-GFPuv hacia el sobrenadante del cultivo utilizando un análisis de inmunotransferencia Western, tal como se muestra en la figura 4. La figura 4 ilustra un conjunto de inmunotransferencias Western que analizan fracciones de células bacterianas de CVD 908-*htrA* (carriles 1-3) o CVD 908-*htrA*(pSEC84-*gfpuv*) (carriles 4-8). Las fracciones celulares se cargan como sigue: sobrenadantes, carriles 1 y 4; citoplásmica, carriles 2 y 6; periplásmica, carril 5; insoluble, carril 7; célula entera, carriles 3 y 8; y 50 ng de GFPuv, carril 9. Las membranas con muestras idénticas se sondaron con anticuerpos específicos para GFPuv (panel A) o GroEL de *E. coli* (panel B). Como puede observarse en esta figura, se detecta una cantidad significativa de la proteína de fusión de 61 kDa esperada en 0,5 ml del sobrenadante precipitado con TCA de CVD 908-*htrA*(pSEC84-*gfpuv*) (carril 4); también se detecta una especie de reacción cruzada irrelevante de aproximadamente 45 kDa en el citoplasma de CVD 908-*htrA* (carril 2), y en las fracciones de células enteras, insoluble, y citoplásmica de CVD 908-*htrA*(pSEC84-*gfpuv*); de modo interesante, el carril 5 sugiere que muy poco ClyA-GFPuv se recupera del espacio periplásmico.

#### Conclusión

Los resultados de este trabajo apoyan claramente la conclusión de que la hemolisina críptica ClyA de *S. Typhi* puede utilizarse para facilitar la exportación de dominios de antígenos heterólogos hacia el exterior de la cepa de vacuna atenuada CVD 908-*htrA* y hacia el medio circundante. Además, este trabajo demuestra que ClyA puede utilizarse para facilitar la exportación de una proteína de fusión hacia el exterior de la bacteria hacia el medio circundante. Tal como se ilustró anteriormente, se demostró la capacidad para exportar proteínas de interés plegadas correctamente fusionadas al extremo carboxilo-terminal de ClyA utilizando el gen *bla* que codifica la proteína de  $\beta$ -lactamasa RTEM-1 que confiere resistencia a la ampicilina y la carbenicilina. El gen *bla* de pBR322 tiene una longitud de 861 pb y codifica una proteína de 31,5 kDa con una secuencia señal de 23 aminoácidos que dirige la secreción N-terminal de la  $\beta$ -lactamasa hacia el espacio periplásmico. El anterior trabajo indica la modificación correcta de una fusión génica que codifica una fusión de proteína ClyA- $\beta$ -lactamasa funcional que conserva la actividad hemolítica y la capacidad para romper el sustrato de  $\beta$ -lactamasa cromogénico nitrocefina para producir halos rojos sobre un fondo amarillo de nitrocefina no rota.

De manera interesante, los intentos para seleccionar estos vectores de expresión cuando se cultivan transformantes en un medio rico suplementado con 50  $\mu$ g/ml de carbenicilina o ampicilina no tuvieron éxito y solo se recuperaron plásmidos muy reordenados, según se resuelve mediante cartografiado de restricción. Se ha demostrado concluyentemente que la  $\beta$ -lactamasa citoplásmicamente expresada confiere resistencia a aproximadamente 5  $\mu$ g/ml de ampicilina, mientras que la  $\beta$ -lactamasa periplásmica expresada confiere resistencia a >4000  $\mu$ g/ml de ampicilina. Sin embargo, la presentación sobre la superficie de fusiones de proteínas de  $\beta$ -lactamasa ha demostrado conferir resistencia a aproximadamente 100  $\mu$ g/ml de ampicilina. En efecto, Chervaux *et al.* han indicado que la secreción mediada por HlyA de fusiones de  $\beta$ -lactamasa hacia el exterior de *E. coli* de nuevo confiere una resistencia de nivel bajo a aproximadamente 5  $\mu$ g/ml de ampicilina. Han demostrado que aunque la actividad específica del dominio de  $\beta$ -lactamasa intacto de la fusión de la superficie sigue siendo similar a la de la  $\beta$ -lactamasa sin modificar, no se observa resistencia a altos niveles de ampicilina, y concluyen que la resistencia bacteriana a antibióticos de  $\beta$ -lactama requiere concentraciones significativas de  $\beta$ -lactamasa dentro del espacio periplásmico cercano a las dianas asesinas. Basándose en estas observaciones, se concluye que las fusiones de proteínas ClyA- $\beta$ -lactamasa correctamente plegadas son sintetizadas dentro de CVD 908-*htrA*(pSEC84*bla*) y exportadas para conferir un fenotipo hemolítico, así como la hidrólisis mediada por  $\beta$ -lactamasa de la cefalosporina cromogénica nitrocefina, sin conferir resistencia a ampicilina o carbenicilina.

Para definir con más claridad la naturaleza de la exportación mediada por ClyA de dominios de antígenos heterólogos hacia el exterior de CVD 908-*htrA*, y quizás descartar la implicación de los intermedios periplásmicos, se estudiaron fusiones de *sacB* que codifican la levansacarasa potencialmente letal de *B. subtilis*. La levansacarasa es una exoenzima de un único polipéptido de 50 kDa que cataliza la hidrólisis de la sacarosa para producir fructosa y glucosa libre y, a su vez, cataliza la polimerización de la fructosa en polímeros largo denominados levano. La secreción de levansacarasa desde *B. subtilis* cultivado sobre un medio que contiene sacarosa da como resultado el crecimiento de colonias aisladas cubiertas por una impresionante cúpula de levano viscoso después de una prolongada incubación a temperatura ambiente.

Se ha establecido que la expresión citoplásmica y periplásmica de levansacarasa codificada por *sacB* es letal para una diversidad de bacterias que crecen en presencia de sacarosa. En fechas recientes se ha demostrado, utilizando mutaciones de péptidos señal, que la levansacarasa se convierte en letal dentro del citoplasma de *B. subtilis* cultivado en presencia de sacarosa, y que la inactivación de la actividad fructosa polimerasa es fundamental para la eliminación de la letalidad inducida por sacarosa. Por tanto, se ha razonado que el fracaso de las fusiones ClyA-SacB para ser exportadas hacia el exterior del citoplasma y del espacio periplásmico de CVD 908-*htrA* debería producir una significativa acumulación intracelular de la proteína de fusión que resulta en letalidad para CVD 908-*htrA*(pSEC84*sacB*) cultivado en presencia de sacarosa.

Sin embargo, tal como se muestra en la figura 2B, se ha observado que CVD 908-*htrA*(pSEC84*sacB*) no solo crece en presencia de sacarosa al 8%, sino que fermenta el azúcar, un fenotipo no observado para CVD 908-*htrA*(pSEC84) cultivado bajo condiciones idénticas. A medida que la concentración de sacarosa aumenta desde 8% al 16% de sacarosa, la fermentación de la sacarosa también aumenta con la acumulación de impresionantes cúpulas de material similar al levano que desaparecen en presencia del inhibidor de levansacarasa arabinosa. Jung *et al.* han indicado observaciones similares de actividad levansacarasa para un dominio de levansacarasa expresado sobre la superficie fusionado con el extremo carboxilo-terminal de la proteína de nucleación de hielo de *Pseudomonas syringae* y expresado dentro de *E. coli*. A la vista de estos resultados, se concluye que CVD 908-*htrA*(pSEC84*sacB*) modificado tiene la capacidad de utilizar la sacarosa como fuente de carbono en experimentos de cultivos de caldo en los que se observa que CVD 908-*htrA*(pSEC84*sacB*) crece con más rapidez que CVD 908-*htrA*(pSEC84) cultivado en presencia de sacarosa o glucosa pura. De nuevo se concluye que, al igual que las fusiones de proteínas ClyA- $\beta$ -lactamasa descritas anteriormente, se sintetizan fusiones de proteínas ClyA-SacB correctamente plegadas dentro de CVD 908-*htrA* y se exportan para conferir el fenotipo hemolítico esperado, así como la actividad levansacarasa que permite el catabolismo extracelular de una fuente de carbohidratos alternativa no utilizada por la cepa hospedante sin plásmido.

### 60 Ejemplo 3: Expresión de proteínas en biorreactor de una fusión ClyA-SacB

Se prepara un biorreactor según las indicaciones de la patente de EEUU n.º 5.635.368. Brevemente, se fabrica una celulosa derivatizada granular según la patente de EEUU n.º 4.355.117 como sigue: se mezclan 25 partes de celulosa fibrosa con 25 partes de dióxido de titanio, y la mezcla se mezcla con 50 partes de poliestireno de alto impacto utilizando un extrusor de doble huso. El extrusionado se enfría en agua, y se tamiza hasta un tamaño de partícula de 0,35-0,85 mm. Las partículas de celulosa aglomeradas granular tamizadas se derivatizan para formar DEAE-celulosa según se describe en la anterior patente de EEUU.

Después, se reducen diez (10) gramos de la DEAE-celulosa granular a una suspensión en agua destilada y se dejan en remojo durante 5 horas agitando de vez en cuando. Después, el vehículo hidratado se decanta con el agua destilada y se traslada a una columna de vidrio con un diámetro interno de 15 mm, en donde forma un lecho con una altura de 145 mm.

Las bacterias transformadas con pSEC84*sacB* (véase el ejemplo 2) se cultivan durante 48 horas a 30 °C. Se bombean cincuenta (50) mililitros de la suspensión celular a través del lecho de vehículo a una velocidad de flujo de 25 ml/hora. Después, se bombea más cantidad de medio de cultivo a través del lecho de vehículo. Se recoge el flujo de salida de la columna y se aísla la proteína de fusión ClyA-SacB (codificada por SEQ ID NO:19) expresada de modo recombinante y se purifica del flujo de salida. La ruptura de SacB proporcionará grandes cantidades comerciales de levansacarasa para la generación de levano.

#### Ejemplo 4: Purificación de la proteína marcada con His bajo condiciones desnaturalizantes

Un cultivo bacteriano se transforma con un vector de expresión que contiene un módulo de expresión que comprende la secuencia codificadora para una proteína ClyA atenuada fusionada con un gen *sacB*, que está fusionado con una secuencia codificadora que codifica un sitio de reconocimiento de proteasas, que está fusionado con una secuencia que codifica un marcador de polihistidina. El cultivo bacteriano se introduce en un biorreactor como el descrito en el ejemplo 3.

El cultivo se coloca bajo condiciones que estimulan la expresión de la proteína de fusión recombinante, que se exporta hacia el medio de cultivo. El medio de cultivo se recoge y se aplica a una columna de Ni (HISTRAP, Pharmacia) equilibrada con un tampón que contiene urea a una concentración lo suficientemente alta como para desnaturalizar la proteína. Después la columna se lava y se eluye. El eluato se analiza mediante una electroforesis en gel para determinar la presencia de la proteína purificada.

Las fracciones que contienen la proteína purificada se dializan contra un tampón de digestión enzimática. Las muestras dializadas después se reúnen y se someten a una proteólisis catalizada por la enzima apropiada. La muestra proteolizada se purifica para eliminar el marcador de polihistidina delecionado, dejando la proteína purificada aislada.

#### Ejemplo 5: Construcción de CVD 908-*htrA* atenuado que expresa Frag C y que genera una respuesta inmunológica contra él

Se genera una proteína de fusión ClyA-Frag C en CVD 908-*htrA* según las etapas analizadas en el ejemplo 1. La estrategia de los inventores consiste en expresar un marco de lectura abierto de *toxC* con optimización de codones que codifica el fragmento C de la toxina del tétanos insertado en ClyA expresada desde el vector de expresión descrito en la presente. La exportación del fragmento C se consigue mediante una fusión genética dentro de marco de *toxC* con el extremo 3'-terminal de *clyA* y portado sobre el replicón *oriE1* de pSEC84 como un módulo  $P_{ompC}$ -*clyA* EcoRI-*NheI* de 1426 pb. El *toxC* que codifica el fragmento C se vuelve a modificar a partir de construcciones de la técnica anterior utilizando el cebador directo 5'-GCGCACTAGTAAAAACCTTGATTGTTGGGTCGACAACGAAGAAGACATCGATGTTATCCTGAAAAAGTCTACCAT TCTGAACTTGGACATCAAC-3' (SEQ ID NO:15) y el cebador inverso 5'-AACTACCGCATTAAAGCTTATCGATGATAAGCTGTCAAACATGAGCTAGCCTAGGTCATTAGTCGTTGGTCCAAC CTTTCATCGGTCGGAACGAAGTA-3' (SEQ ID NO:16) para generar el producto de la PCR deseado (1424 pb). Después el módulo *toxC* se subclona en pSEC84 digerido con *NheI* para construir pSEC84*toxC*. La secuencia de ADN de la unión de fusión *clyA-toxC* prevista se confirma utilizando el cebador de secuenciación 5'-CGATGCGGCAAAATTGAAATTAGCCACTGA-3' (SEQ ID NO:17) que se hibrida 172 bases cadena arriba del sitio *NheI* modificado en el extremo 3'-terminal de *clyA*. Las construcciones se seleccionan para la conservación de la actividad hemolítica y se confirma que exportan ClyA-Frag C hacia el sobrenadante mediante un análisis de inmunotransferencia Western.

Grupos de diez ratones Balb/c de 6 semanas se inmunizan por vía intranasal con  $1,0 \times 10^{10}$  cfu de la cepa CVD 908-*htrA* que expresa la proteína de fusión ClyA-Frag C. Los ratones se sangran antes y 30 días después de la inmunización, y su suero se conserva a -20 °C hasta su uso. Los anticuerpos presentes en el suero contra los antígenos de ClyA y Frag C se determinan mediante ELISA. Los resultados indican que la inmunización con la cepa CVD 908-*htrA* que expresa la proteína de fusión ClyA-Frag C induce niveles de anticuerpos contra el antígeno de Frag C que son significativamente mayores que los obtenidos con la cepa 908-*htrA* que no expresa la proteína de fusión ClyA-Frag C. Los resultados demuestran que la expresión del antígeno de Frag C como una proteína de fusión con ClyA potencia la respuesta inmunológica contra este antígeno. Se confirma una inmunidad protectora

contra la toxina del tétanos mediante la exposición de ratones inmunizados a unas dosis, que en un caso normal sería letales, de la toxina del tétanos natural.

### Ejemplo 6: Construcción y análisis de variantes no hemolíticas de ClyA de *S. Typhi*

5 Aunque, tal como se demuestra en la presente, ClyA puede ser adaptada para su uso en un sistema de exportación para antígenos extraños, dado que ClyA es un factor de virulencia teórico, representa un problema potencial en aplicaciones de vacunas. Por tanto, se produjeron variantes de ClyA de *S. Typhi* mediante mutación, en los que se mantiene la actividad de exportación de los variantes, pero se abole su actividad hemolítica.

#### Materiales y métodos

##### Cepas bacterianas y condiciones de cultivo

10 Todas las construcciones de plásmidos se recuperaron en *E. coli* cepa DH5 $\alpha$  (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, Calif.). El vector vivo de *Salmonella* serovar Typhi CVD-908-*htrA* es un derivado auxotrófico de la cepa de tipo salvaje Ty2 con deleciones en *aroC*, *aroD* y *htrA* (Tacket *et al.*, 1997). Las cepas de *Salmonella enterica* serovar Typhi utilizadas en este trabajo se cultivaron en medio suplementado con ácido 2,3-dihidroxibenzoico (DHB) (Sigma, St. Louis, Mo.) (Galen *et al.*, 1997; Hone *et al.*, 1991). Las cepas que portan plásmidos de CVD-908-*htrA* se cultivaron en estrias a partir de disoluciones madre congeladas (-70 °C) sobre 2x agar Luria-Bertani (medio sólido) que contenía 20 g de triptona Bacto, 10 g de extracto de levadura Bacto, y NaCl 50 mM (2x agar LB50) más kanamicina a 15 mg/ml. Las placas se incubaron a 30 °C durante 24 a 36 h para obtener colonias aisladas con un diámetro de 2 mm y para minimizar cualquier toxicidad de la expresión de antígenos heterólogos en CVD-908-*htrA*.

##### Mutación del gen *clyA*

20 Se realizó una mutagénesis aleatoria utilizando el kit de mutagénesis aleatoria GeneMorph II (Stratagene, La Jolla, CA) siguiendo las instrucciones del fabricante. Para generar bajas frecuencias de mutación, se emplearon 700 ng de pSEC92*gfpuv* como molde, y la PCR de mutación se realizó con 25 ciclos. Para generar altas frecuencias de mutación, se utilizaron 10 ng de pSEC92*gfpuv* como molde, y la PCR de mutación se realizó durante 2 rondas, cada una con 30 ciclos. Se emplearon los cebadores G751 (CTTCTCCTTTACTCATGCTAGCCACA; SEQ ID NO:26) y G755 (AAATGGTACCTCCAAAATAAGGAGGAAAAAAAATG; SEQ ID NO:27) para amplificar la longitud completa de *clyA*. Después de la PCR, la reacción se digirió con DpnI para eliminar el plásmido molde. Después de la purificación, los productos de la PCR se digirieron con PvuI y NheI y se volvieron a clonar en pSEC92*gfpuv*, que también había sido digerido con las mismas enzimas de restricción, para regenerar un marco de lectura abierto de ClyA intacto. Los clones se recuperaron en *E. coli* cepa DH5 $\alpha$  sobre agar TSA que contenía sangre de oveja al 5% y se incubaron a 37 °C durante 24 a 48 horas para detectar las zonas de hemólisis. La expresión de la proteína fluorescente verde se visualizó mediante subiluminación ultravioleta. Después de identificar las mutaciones específicas que abolen la actividad hemolítica, las mutaciones seleccionadas se ensamblaron en un único marco de lectura abierto de ClyA mediante mutagénesis específica dirigida a sitio utilizando el kit de mutagénesis específica dirigida a sitio QuikChange II-E (Stratagene, la Jolla, CA) y las instrucciones del fabricante. Se emplearon los cebadores G835 (AGCTATAGCAATGACGCGGGCGTTATTAAGGCAAAGTGA; SEQ ID NO:28) y G836 (TCAGTTTGCCTTTAATAACGCCCGCGTCATTGCTATAGCT; SEQ ID NO:29) para construir el mutante triple de *clyA* codificado por pSEC93*gfpuv*.

##### Ensayo hemolítico

40 La medición de la liberación de hemoglobina de los eritrocitos se realizó como se ha descrito (Sansone *et al.*, 1986, Infect. Immun., 51: 461-469), con varias modificaciones. Las bacterias se cultivaron hasta la fase logarítmica tardía (DO<sub>600</sub> a 0,9-1,0) y se recolectaron. Se mezclaron 1 x 10<sup>9</sup> células en 50  $\mu$ l de PBS con un volumen igual de eritrocitos de oveja lavados (Lampire Biological, Pipersville, PA) a la concentración de 4 x 10<sup>9</sup>/ml. La mezcla se centrifugó a 2.200 x g durante 15 min a 30 °C y después se incubó a 37 °C durante dos horas. La reacción se resuspendió añadiendo 150  $\mu$ l de PBS frío y después se centrifugó a 2.200 x g durante 15 min a 4 °C. Al final de la reacción, se trasladaron 100  $\mu$ l del sobrenadante a una placa de microtitulación de fondo plano. Se midió la actividad hemolítica mediante la lectura de la densidad óptica a 545 nm en un lector de microplacas Versamax (Molecular Devices, Toronto, Canadá).

##### Análisis de inmunotransferencia

50 Se realizó un análisis de inmunotransferencia Western como se ha descrito (Galen *et al.*, 2004, Infect. Immun., 72(12):7096-7106), teniendo cuidado de analizar las muestras de los cultivos cultivados a 30 °C hasta unas densidades ópticas a 600 nm (DO<sub>600</sub>) no mayores que 1,0. Las proteínas en el sobrenadante del cultivo se precipitaron con TCA enfriado en hielo al 10% y se lavaron dos veces con acetona enfriada en hielo. El sedimento se secó, se resuspendió en Tris-Cl 100 mM, pH 8,0, y se mezcló con 2x tampón de muestra (Biorad).

55 La detección de GFPuv se realizó utilizando un anticuerpo primario anti-GFP de ratón policlonal (BD Biosciences/Clontech, Palo Alto, Calif.) y un anticuerpo secundario anti-ratón de cabra purificado por afinidad

5 marcado con peroxidasa (Kirkegaard & Perry Laboratories, Inc., Gaithersburg, Md.). Las inmunotransferencias se revelaron utilizando un sistema de detección ECL+Plus (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) y las transferencias se expusieron a una película Kodak-X-OMAT XAR-2. Para calcular la cantidad de lisis celular que puede contribuir a la liberación de las fusiones ClyA-GFPuv hacia los sobrenadantes, se detectó la contaminación de los sobrenadantes con la proteína citoplásmica GroEL utilizando un anticuerpo de conejo anti-GroEL de *E. coli* (Sigma) y un anticuerpo secundario anti-conejo de cabra conjugado con fosfatasa alcalina (BioRad). Las inmunotransferencias de GroEL se revelaron utilizando el sustrato conjugado Immun-star AP (BioRad).

### Resultados

#### Variantes de *clyA*

10 El gen *clyA* de *S. Typhi* se mutó en el plásmido pSEC92*gfpuv* (figura 5). El pSEC92*gfpuv* (SEQ ID NO:32) codifica una ClyA con optimización de codones fusionada a GFPuv. La secuencia de *clyA* con optimización de codones se muestra en SEQ ID NO:33. Los genes *clyA* que portan mutaciones puntuales aleatorias y, por tanto, que codifican los variantes de la presente invención, se denominan en la presente *clyM* (véase, por ejemplo, la tabla 3). La secuencia diana sometida a mutagénesis abarca los restos 18 a 303. Se construyó una serie de plásmidos pClyM que son muy similares a pSEC92*gfpuv* excepto que portan *clyM* en lugar de *clyA*. En cada pClyM, un gen *gfpuv* se fusiona cadena abajo de *clyM*. Esta fusión no solo permite rastrear la expresión de ClyM, sino que también sirve como indicador para el plegamiento correcto de ClyM (Waldo, G.S. *et al.*, 1999, Nat. Biotechnol., 17(7):691-695).

#### Actividad hemolítica de los variantes de ClyA

20 Se secuenció *clyM* a partir de 43 clones que seguían manteniendo su actividad hemolítica. La ClyM en estos clones porta de 1 a 4 mutaciones (tabla 3; las posiciones de las mutaciones en ClyA se corresponden con la secuencia del polipéptido de ClyA de SEQ ID NO:2). Los resultados de la secuencia indican que puede introducirse una mutación en muchas posiciones de cualquier subdominio de ClyA sin afectar a su actividad hemolítica. Por tanto, los aminoácidos en estas posiciones no son críticos para la actividad hemolítica de ClyA en el contexto del dominio de fusión cadena abajo.

25

Tabla 3

Posición de la mutación en ClyA	n.º del clon de ClyM	Dominio	Posición de la mutación en ClyA	n.º del clon de ClyM	Dominio
19	HM42	$\alpha A/A'$	167	HM49	$\alpha D$
20	HM30	$\alpha A/A'$	168	HM23	$\alpha D$
25	HM42	$\alpha A/A'$	168	HM54	$\alpha D$
29	HM32	$\alpha A/A'$	169	HM20	$\alpha D$
33	HM15	$\alpha A/A'$	170	HM44	$\alpha D$
51	HM42		171	HM27	$\alpha D$
55	HM17		171	HM35	$\alpha D$
55	HM23		172	HM44	$\alpha D$
58	HM25	$\alpha B$	180	HM20	
66	HM14	$\alpha B$	182	HM35	
71	HM10	$\alpha B$	193	HM54	lengua $\beta$
72	HM45	$\alpha B$	203	HM28	$\alpha E$
73	HM40	$\alpha B$	203	HM39	$\alpha E$
73	HM26	$\alpha B$	208	HM26	$\alpha F$
73	HM18	$\alpha B$	219	HM23	$\alpha F$
78	HM26	$\alpha B$	222	HM8	$\alpha F$



Posición de la mutación en ClyA	n.º del clon de ClyM	Dominio	Posición de la mutación en ClyA	n.º del clon de ClyM	Dominio
84	HM45	$\alpha$ B	224	HM32	$\alpha$ F
84	HM37	$\alpha$ B	226	HM45	$\alpha$ F
90	HM11	$\alpha$ B	230	HM8	$\alpha$ F
104	HM53		234	HM11	$\alpha$ F
106	HM42	$\alpha$ C	234	HM43	$\alpha$ F
107	HM53	$\alpha$ C	234	HM44	$\alpha$ F
110	HM14	$\alpha$ C	242	HM46	$\alpha$ F
110	HM26	$\alpha$ C	244	HM29	$\alpha$ F
111	HM44	$\alpha$ C	246	HM28	$\alpha$ F
114	HM46	$\alpha$ C	250	HM32	$\alpha$ F
114	HM51	$\alpha$ C	263	HM10	
122	HM20	$\alpha$ C	272	HM44	$\alpha$ G
123	HM51	$\alpha$ C	279	HM46	$\alpha$ G
128	HM13	$\alpha$ C	270	HM2	$\alpha$ G
131	HM45	$\alpha$ C	285	HM37	$\alpha$ G
143	HM52	$\alpha$ C	256	HM39	$\alpha$ G
150	HM57	$\alpha$ C	294	HM7	
157	HM2	$\alpha$ C			
160	HM39				

5 Para determinar cuáles son los aminoácidos críticos para la actividad hemolisina de ClyA de *S. Typhi* se secuenció *clyM* a partir de 111 clones que no tenían actividad hemolítica visible (o muy reducida), pero que seguían siendo fluorescentes sobre agar de sangre de oveja. Se descubrió que 18 de estos clones tenían solo una mutación de un aminoácido (tabla 4). La mayoría de estos aminoácidos están localizados en las alfa-hélicas C, E, F o G. No se localizaron mutaciones en este grupo en las hélices A, B o D. Se ha indicado previamente que la alteración del puente de cisteína intramolecular natural entre los restos 87 y 285 de ClyA abole la actividad hemolítica evitando la oligomerización requerida para la formación de poros y la actividad citolítica (Atkins A. *et al.*, 2000, J. Biol. Chem., 275: 41150-41155). La "Posición" indicada y el aminoácido de tipo salvaje ("wt") en la tabla 4 se corresponden con la secuencia de aminoácidos del polipéptido de ClyA de *S. Typhi* mostrado en SEQ ID NO:2. El "dominio" es el dominio concreto del polipéptido de ClyA de *S. Typhi*.

Tabla 4

Clon	Posición	wt	Mutación	Dominio	SEQ ID NO:
M133	109	A	T	$\alpha$ C	
M165	109	A	V	$\alpha$ C	
M188	116	L	Q	$\alpha$ C	
M187	148	L	P	$\alpha$ C	
M179	163	S	C	vuelta entre $\alpha$ C y $\alpha$ D	

Clon	Posición	wt	Mutación	Dominio	SEQ ID NO:
M103	195	S	N	lengua-β	
M30	198	I	N	αE	30
M128	199	A	D	αE	
M135	204	E	K	αE	
M182	204	E	D	αE	
M109	205	G	D	αE	
M64	207	L	R	αF	
M185	215	L	P	αF	
M163	225	L	S	αF	
M176	229	V	L	αF	
M150	281	M	K	αG	
M171	284	T	P	αG	
M148	285	C	W	αG	

#### Exportación de variantes de ClyA

- 5 Para investigar la actividad de exportación de los 18 clones fluorescentes no hemolíticos (o con una actividad hemolítica reducida) listados en la tabla 4, se seleccionaron los sobrenadantes del cultivo de estos 18 clones para la presencia de GFPuv mediante inmunotransferencia. Los resultados demuestran que 6 mutaciones individuales, es decir, S195→N, I198→N, A199→D, E204→K, E204→D, y G205→D, conservan propiedades de exportación similares a las fusiones de proteínas de tipo salvaje (hemolíticas) ClyA::GFPuv, mientras que siguen siendo no hemolíticas y fluorescentes (figura 6). Los 6 aminoácidos se agrupan a una distancia muy estrecha, todos localizados en la hélice pequeña E junto a la lengua-β.
- 10 Después se midió específicamente la actividad hemolítica de estos 6 variantes de ClyA (figura 7). Las mutaciones S195N, I198N, A199D o E204K redujeron drásticamente la actividad hemolítica hasta 2-8% del tipo salvaje. Una mutación G205D redujo la actividad hemolítica hasta menos del 50% del tipo salvaje. De modo interesante, una sustitución E204D tiene mucho menos efecto (reducción del 30%) sobre la actividad hemolítica frente a la sustitución E204K (reducción hasta menos del 2% del tipo salvaje), lo cual demuestra claramente el efecto de los diferentes aminoácidos introducidos en una posición dada dentro de ClyA. Estos resultados demuestran que las funciones de la citólisis y la exportación de proteínas pueden estar desacopladas en ClyA. El desacoplamiento de estas dos funciones puede lograrse mediante la mutación de un resto aminoácido individual dentro de una región muy pequeña de ClyA, es decir, los aminoácidos en la hélice pequeña E adyacente a la lengua-β.

#### Construcción de un mutante triple

- 20 Utilizando los anteriores resultados, el gen *clyA* con optimización de codones en pSEC92*gfpuv* después se remodeló para contener una mutación triple: I198N, A199D, E204K (SEQ ID NO:31), creando pSEC93*gfpuv*. Puesto que cada una de estas mutaciones individuales reduce sustancialmente la actividad hemolítica sin tener un efecto aparente sobre la exportación, se espera que la combinación de estas tres mutaciones pueda abolir completamente la actividad hemolítica. La exportación de la fusión ClyA::GFPuv mutante triple se ensayó mediante
- 25 inmunotransferencia (figura 8A). Los resultados demuestran que la exportación del mutante triple desde la cepa de vacuna de vector vivo CVD 908-*htrA* es casi indistinguible de las fusiones ClyA wt::GFPuv, y los ensayos de la actividad hemolítica confirmaron que este mutante triple no tiene actividad citolítica con los eritrocitos (figura 9). De nuevo, la ausencia de GroEL en los sobrenadantes sugiere con fuerza que las fusiones de variantes de ClyA están siendo exportadas con eficacia hacia el sobrenadante en ausencia de autólisis detectable (figura 8B).

#### Inmunogenicidad de las proteínas de fusión exportadas

En una realización preferida, estos mutantes no hemolíticos se fusionan con antígenos distintos de GFPuv, para desarrollar vacunas de vectores vivos contra patógenos humanos que incluyen, pero no se limitan al antígeno

protector PA83 de longitud completa de la toxina del ántrax. Por tanto, resulta crítico evaluar si las fusiones de ClyA no hemolíticas siguen siendo inmunogénicas, con respuestas inmunológicas pertinentes (respuestas celulares y/o humorales protectoras) capaces de dirigirse al dominio extraño cadena abajo.

5 Por tanto, se ensayó la inmunogenicidad de las fusiones de proteínas ClyA::GFPuv de variantes no hemolíticas en ratones. Los ratones se inmunizaron por vía intranasal con dos dosis ( $10^9$  unidades formadoras de colonias (CFU) por dosis) de cepas de vectores vivos atenuadas CVD 908-*htrA* que portan plásmidos derivados de pSEC92*gfpuv* que expresan proteínas de fusión ClyA::GFPuv de variantes no hemolíticas. Todos los ratones recibieron un refuerzo intramuscular con GFPuv purificada en el día 42. Los resultados se indican en la figura 10 como la media geométrica de las titulaciones (en unidades ELISA (EU)) de IgG sérica contra el dominio GFPuv de ClyA::GFPuv. Resulta inmediatamente obvio que la inmunogenicidad del mutante triple de ClyA codificado por pSEC93*gfpuv* (que contiene las 3 sustituciones de aminoácidos I198N, A199D, E204K) no es tan inmunogénica como el variante no hemolítico expresado por pSEC92M30*gfpuv* (que expresa un mutante no hemolítico que contiene la única sustitución I198N). Tal como se esperaba, la ClyA::GFPuv inalterada expresada a partir de cepas que portan el pSEC92*gfpuv* original proporcionar la mayor inmunidad humoral específica de GFPuv, pero la inmunogenicidad del mutante no hemolítico M30 (I198N) es comparable. Los resultados de este experimento crítico claramente demuestran que aunque es posible eliminar genéticamente la actividad hemolítica de ClyA conservando al mismo tiempo sus capacidades de exportación, unos cambios sutiles introducidos en la estructura de las proteínas de fusión ClyA::GFPuv como sustituciones de restos acumuladas, pueden afectar drásticamente a la inmunogenicidad de estas proteínas de fusión.

## 20 Ejemplo 7: Construcción y análisis de otros variantes no hemolíticos de ClyA de *S. Typhi*

Cada una de las mutaciones creadas en el mutante triple (pSEC93*gfpuv*) analizadas en el ejemplo 6 se derivó de loci adyacentes en el dominio  $\alpha E$  que pueden provocar cambios en la conformación de la proteína GFPuv (u otro dominio de fusión cadena abajo) expresada por el plásmido. Por tanto, se diseñó otra estrategia para alterar la actividad hemolítica de la proteína ClyA.

### 25 Construcción de plásmidos derivados de pSEC91-83

En lugar de optimizar la estrategia de ClyA no hemolítica utilizando pSEC92*gfpuv*, se introdujeron mutaciones puntuales en un plásmido de expresión previamente descrito, pSEC91-83, que codifica ClyA fusionada con el antígeno protector (PA83) de la toxina del ántrax, para abolir la actividad hemolítica de ClyA (Galen *et al.*, 2009, J. Infect. Dis., 199:326-335). Debido a que la mutación individual (I198N) induce un nivel de IgG anti-GFP que es comparable al control positivo, esta mutación comprende la mutación primaria con la que se ensayó otra mutación distinta. Se construyeron tres derivados de pSEC91-83 como sigue:

- 1) Mutante individual 1 = I198N introducido en *clyA* de pSEC91-83 para crear pSEC91-83I198N.
- 2) Mutante individual 2 = C285W introducido en *clyA* de pSEC91-83 para crear pSEC91-83C285W; ha sido previamente establecido que esta localización abole la actividad hemolítica de la proteína ClyA (Kim *et al.* (2008); tabla 4 en la presente, clon M148).
- 3) Mutante doble (DM) = I198N y C285W introducidos en *clyA* de pSEC91-83 para crear pSEC91-83DM.

Se diseñaron dos pares de cebadores para introducir las mutaciones en *clyA* codificada por pSEC91-83 utilizando procedimientos de mutagénesis específica dirigida a sitio convencionales:

- 1) I198N
  - 40 G873: 5' - TATTCCTATTCTAATGCTGCGGGCGTGATTGAAGG - 3' (SEQ ID NO:33)
  - G874: 5' - CCTTCAATCACGCCCGCAGCATTAGAATAGGAAATA - 3' (SEQ ID NO:34)
- 2) C285W
  - G875: 5' - TGATTAACACCTGGAATGAATACCAACAACGTCATGG - 3' (SEQ ID NO:35)
  - G876: 5' - CCATGACGTTGTTGGTATTCATTCCAGGTGTTAATCA - 3' (SEQ ID NO:36)

45 Cada una de las tres construcciones (pSEC91-83I198N, pSEC91-83C285W, y pSEC91-83DM) se construyó con éxito y se transformó en el vector vivo CVD 908-*htrA*. Sin embargo, los resultados iniciales sugieren que las cepas no son estables utilizando el esqueleto de pSEC91-83. Por tanto, se seleccionó otro esqueleto que incorpora el sistema estabilizante SSB para la posterior modificación (pGEN222S**X**bal).

### Construcción de clones CVD 908-*htrA*-*ssb*(pS-CPA83)

50 El pGEN222S**X**bal es un derivado del plásmido previamente descrito pGEN222 (Galen *et al.*, 1999, Infect. Immun., 67:6424-6433) en el que se ha introducido el sistema de estabilización SSB. Para modificar este plásmido de

- número intermedio de copias, el módulo *ssb* utilizado en la construcción del plásmido de mantenimiento temporal pBRmSSB primero se escindió de pCV546 como un módulo Xba I-Nhe I de 798 pb y se insertó en un derivado de pGEN222, destruyendo el sitio Spe I exclusivo y creando pGEN222S. Puesto que *ssb* actuará de forma eficaz como una función de muerte postsegregacional *in vivo*, la inclusión de *hok-sok* ya no es necesaria, de forma que el sitio Xho I 5'-proximal a *hok-sok* se cambió mediante mutagénesis específica dirigida a sitio por un sitio Xba I, creando pGEN222SXbaI para la futura delección de *hok-sok* y *bla*.
- También se diseñó un módulo especial y se creó para permitir la selección sencilla de plásmidos antes de la introducción en cepas CVD 908-*htrAssb*. Este módulo está formado por un gen de tetraciclina flanqueado por sitios de recombinación FRT, denominados en la presente FRT-*tetA*-FRT y flanqueados por los sitios de restricción Xba I y Not I. Este módulo FRT-*tetA*-FRT Xba I-Not I se generó utilizando los siguientes cebadores con pSEC91 como ADN molde:
- FRT-*tetA*-directo:
- TCTAGAgaggttctattctatatatagtaggaacttcGCTAGCTCATGTTTGACAGCTTATCATCGATA  
AGCTTTAATGCGGTAGTTTATCAC (SEQ ID NO:37)
- FRT-*tetA*-inverso:
- TCTAGAgaggttctatactatatatagaataggaacttcGCTAGCCTATCAGGTCGAGGTGGCCCGGCTC  
CATGCACCGCGACGCAACGCGGGGAG (SEQ ID NO:38)
- Este módulo FRT-*tetA*-FRT se recuperó en pCR-BLUNT II-TOPO para la excisión fácil como un fragmento Xba I-Not I de 1397 pb.
- Se realizaron las siguientes etapas en la construcción de vectores de expresión que emplean el esqueleto de pGR222SXbaI. En construcciones distintas, los alelos *clyA* mutados se subclonaron a partir de pSEC91-831198N, pSEC91-83C285W, y pSEC91-83DM mediante digestión con BamHI y AvrII, y el acoplamiento en pGEN222SXbaI roto con las mismas enzimas de restricción, creando pGEN222SXbaI-1198N, pGEN222SXbaI-C285W y pGEN222SXbaI-DM.
- Después, los módulos *bla-hok-sok* de los plásmidos pGEN222SXbaI-1198N, pGEN222SXbaI-C285W y pGEN222SXbaI-DM resultantes se reemplazaron por el módulo FRT-*tetA*-FRT digiriendo pCR-BLUNT II-TOPO que contiene FRT-*tetA*-FRT con XbaI y NotI, e insertando este fragmento de 1397 pb en los plásmidos pGEN222SXbaI-1198N, pGEN222SXbaI-C285W y pGEN222SXbaI-DM digeridos de forma idéntica, creandos las construcciones resistentes a tetraciclina, denominadas como sigue:
- 1) pTS-CPA83-1198N - mutante individual 1
  - 2) pTS-CPA83-C285W - mutante individual 2
  - 3) pTS-CPA83-DM - mutante doble.
- Estas construcciones se recuperaron en DH5 $\alpha$ Δ*ssb*.
- Después, el plásmido pCP20 se introdujo en estas tres cepas para inducir la excisión del módulo del gen de tetraciclina utilizando una metodología idéntica a la utilizada para deleccionar *ssb* de los cromosomas de DH5 $\alpha$ Δ*ssb* y CVD 908-*htrAssb*.
- Por último, las construcciones resultantes que tienen un sistema estabilizante SSB y que carecen de marcadores de resistencia a antibióticos se transformaron en CVD 908-*htrAssb* y se denominaron como sigue:
- 1) CVD908-*htrAssb* (pS-CPA83-1198N) - mutante individual 1
  - 2) CVD908-*htrAssb* (pS-CPA83-C285W) - mutante individual 2
  - 3) CVD908-*htrAssb* (pS-CPA83-DM) - mutante doble
- Se realizaron unos análisis de inmunotransferencia Western para la detección de la expresión de la proteína de fusión según se ha descrito (Galen *et al.*, 2009, J. Infect. Dis., 199:326-335). Los lisados de células enteras que expresan las fusiones ClyM-PA83 se separaron sobre geles de SDS-poliacrilamida. La detección de las proteínas de fusión de PA83 con un peso molecular relativo de aproximadamente 117 kDa se realizó utilizando IgG policlonal anti-PA de cabra (List Biological Laboratories, Campbell, CA) e IgG anti-cabra de conejo marcada con peroxidasa de rábano (HRP) (Kirkegaard & Perry Labs, Inc., Gaithersburg, MD). Las inmunotransferencias se revelaron utilizando el sistema de detección ECL+Plus (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) y las transferencias se expusieron a una película Kodak X-OMAT XAR-2. Los resultados de las inmunotransferencias se muestran en la figura 12.

Se realizó la medición de la liberación de hemoglobina desde los eritrocitos según se ha descrito (Sansonetti *et al.*, 1986, *Infect. Immun.*, 51: 461-469), con varias modificaciones. Las bacterias se cultivaron hasta la fase logarítmica tardía (DO600 a 0,9-1,0) y se recolectaron. Se mezclaron  $1 \times 10^9$  células en 50  $\mu$ l de PBS con un volumen igual de eritrocitos de oveja lavados (Lampire Biological, Pipersville, PA) a una concentración de  $4 \times 10^9$ /ml. La mezcla se centrifugó a  $2.200 \times g$  durante 15 min a  $30^\circ\text{C}$  y después se incubó a  $37^\circ\text{C}$  durante dos horas. La reacción se resuspendió añadiendo 150  $\mu$ l de PBS frío y después se centrifugó a  $2.200 \times g$  durante 15 min a  $4^\circ\text{C}$ . Al final de la reacción se trasladaron 100  $\mu$ l del sobrenadante a una placa de microtitulación de fondo plano. Se midió la actividad hemolítica leyendo la densidad óptica a 545 nm en un lector de microplacas Versamax (Molecular Devices, Toronto, Canadá). Los resultados del ensayo se muestran en la figura 13. El pSE10, pSEC91 y pSEC91-83 expresan cada uno ClyA no modificada. La cepa Ty21a es la cepa de vacuna tifoidea que está autorizada en la actualidad; no sorprende que muestre una ligera actividad hemolítica, según ha sido advertido previamente por Oscarsson *et al.* (Oscarsson *et al.*, 2002, *Infect. Immun.*, 70:5759-5769). Estos resultados claramente demuestran que la actividad hemolítica de cada una de las tres construcciones pS-CPA83 (I198N, C285W y DM) ha sido abolida.

Para comparar la inmunogenicidad entre las construcciones que expresan PA83 fusionada a ClyA de tipo salvaje (es decir, la cepa CVD 908-*htrA*(pSEC91-83)) frente a PA83 procedente de las cepas que expresan los variantes ClyA estabilizados con SSB (es decir, CVD908-*htrAssb* (pS-CPA83-I198N), CVD908-*htrAssb* (pS-CPA83-C285W), y CVD908-*htrAssb* (pS-CPA83-DM)), se inmunizaron ratones hembra BALB/c (H2d) por vía intranasal a lo largo de 7 semanas según se describe en la tabla 5.

Tabla 5

Grupo	Ratones totales	1 <sup>er</sup> cebador (10-22-08) $1 \times 10^9$ CFU/10 $\mu$ l	2 <sup>o</sup> cebador (11-5-08) $1 \times 10^9$ CFU/10 $\mu$ l	3 <sup>er</sup> refuerzo (12-3-08)
1 Jaulas (A,B)	10	CVD908- <i>htrA</i> (intranasal)	CVD908- <i>htrA</i> (intranasal)	proteína PA más alhidrogel (intramuscular)
2 Jaulas (C,D)	10	CVD908- <i>htrA</i> (pSEC91-83) (intranasal)	CVD908- <i>htrA</i> (pSEC91-83) (intranasal)	proteína PA más alhidrogel (intramuscular)
3 Jaulas (E,F)	10	CVD908- <i>htrA</i> (mutante individual 1 pS-CPA83-I198N) (intranasal)	CVD908- <i>htrA</i> (mutante individual 1 pS-CPA83-I198N) (intranasal)	proteína PA más alhidrogel (intramuscular)
4 Jaulas (G,H)	10	CVD908- <i>htrA</i> (mutante individual 2 pS-CPA83-C285W) (intranasal)	CVD908- <i>htrA</i> (mutante individual 2 pS-CPA83-C285W) (intranasal)	proteína PA más alhidrogel (intramuscular)
5 Jaulas (I,J)	10	CVD908- <i>htrA</i> (mutante doble pS- CPA83-DM) (intranasal)	CVD908- <i>htrA</i> (mutante doble pS- CPA83-DM) (intranasal)	proteína PA más alhidrogel (intramuscular)
6 Jaulas (K)	5	PBS (intranasal)	PBS (intranasal)	PBS (intramuscular)

\* Proteína PA83 más alhidrogel: 10  $\mu$ g de PA83 absorbida con 0,5 mg de alhidrogel por dosis (50  $\mu$ l).

Sangrado:

- preinmunización: día -1 (10-21-08)

- postinmunización: día 13 (11-4-08), 28 (11-19-08), 40 (12-1-08), 49 (12-10-08), 56 (12-17-08) y 70 (12-31-08)

Las condiciones bajo las cuales se produjeron los diferentes inóculos se muestran a continuación:

#### 1) CVD 908*htrA*

(i) Se cultiva en estrías a partir de una disolución madre sobre 2x LA + DHB y se incuba a  $30^\circ\text{C}$  durante 48 horas.

(ii) Se inoculan 2-3 colonias aisladas a partir de la placa en 5 ml de 2x LB + DHB y se incuba a  $30^\circ\text{C}$  durante la noche.

## ES 2 473 605 T3

- (iii) Se subcultivan 2,5 ml del cultivo de la noche (1:100) en 250 ml de 2x LB + DHB y se espera hasta que la  $DO_{600\text{ nm}}$  alcance aproximadamente 1,4 a 37 °C (aproximadamente 4 h).
- (vi) Se centrifuga (6.000 rpm, 20 min), se rechaza todo el sobrenadante y se resuspende en 300  $\mu\text{l}$  de PBS.
- (v) Se diluye 1:1.000 para la lectura de la DO para asegurarse de que  $DO_{600\text{ nm}}$  sea aproximadamente 0,4-0,5.
- 5 (vi) Se extraen 10  $\mu\text{l}$  para la inmunización ( $1-2 \times 10^9$  CFU/10  $\mu\text{l}$ ).
- 2) CVD 908*htrA*(pSEC91-83)
- (i) Se cultiva en estrías a partir de una disolución madre sobre 2x LA + DHB + Kan (25  $\mu\text{g/ml}$ ) y se incuba a 30 °C durante 48 horas.
- 10 (ii) Se inoculan 2-3 colonias de la placa en 25 ml de 2x LB + DHB + Kan (25  $\mu\text{g/ml}$ ) y se incuba a 30 °C durante la noche.
- (iii) Se subcultivan 20 ml del cultivo de la noche (1:12,5) en 250 ml de 2x LB + DHB + Kan (25  $\mu\text{g/ml}$ ) y se espera hasta que la  $DO_{600\text{ nm}}$  alcance aproximadamente 1,4 a 37 °C (aproximadamente 5 h 30 min).
- (vi) Se centrifuga (6.000 rpm, 20 min), se rechaza todo el sobrenadante y se resuspende en 300  $\mu\text{l}$  de PBS.
- (v) Se diluye 1:1.000 para la lectura de la DO para asegurarse de que  $DO_{600\text{ nm}}$  sea aproximadamente 0,4-0,5.
- 15 (vi) Se extraen 10  $\mu\text{l}$  para la inmunización ( $1-2 \times 10^9$  CFU/10  $\mu\text{l}$ ).
- 3) CVD 908*htrA-ssb*(pS-CPA83-I198N) = mutante individual 1 de ClyA (I198N en un esqueleto de pSSB)
- (i) Se cultiva en estrías a partir de una disolución madre sobre 2x LA + DHB y se incuba a 30 °C durante 48 horas.
- (ii) Se inoculan 2-3 colonias de la placa en 25 ml de 2x LB + DHB y se incuba a 30 °C durante la noche.
- 20 (iii) Se subcultivan 20 ml del cultivo de la noche (1:12,5) en 250 ml de 2x LB + DHB y se espera hasta que la  $DO_{600\text{ nm}}$  alcance aproximadamente 1,4 a 37 °C (aproximadamente 5 h).
- (vi) Se centrifuga (6.000 rpm, 20 min), se rechaza todo el sobrenadante y se resuspende en 150  $\mu\text{l}$  de PBS.
- (v) Se diluye 1:1.000 para la lectura de la DO para asegurarse de que  $DO_{600\text{ nm}}$  sea aproximadamente 0,4-0,5.
- (vi) Se extraen 10  $\mu\text{l}$  para la inmunización ( $1-2 \times 10^9$  CFU/10  $\mu\text{l}$ ).
- 4) CVD 908*htrA-ssb*(pS-CPA83-C285W) = mutante individual 2 de ClyA (C285W en un esqueleto de pSSB)
- 25 (i) Se cultiva en estrías a partir de una disolución madre sobre 2x LA + DHB y se incuba a 30 °C durante 48 horas.
- (ii) Se inoculan 2-3 colonias de la placa en 30 ml de 2x LB + DHB y se incuba a 30 °C durante la noche.
- (iii) Se subcultivan 20 ml del cultivo de la noche (1:12,5) en 250 ml de 2x LB + DHB y se espera hasta que la  $DO_{600\text{ nm}}$  alcance aproximadamente 1,4 a 37 °C (aproximadamente 5 h).
- (vi) Se centrifuga (6.000 rpm, 20 min), se rechaza todo el sobrenadante y se resuspende en 150  $\mu\text{l}$  de PBS.
- 30 (v) Se diluye 1:1.000 para la lectura de la DO para asegurarse de que  $DO_{600\text{ nm}}$  sea aproximadamente 0,4-0,5.
- (vi) Se extraen 10  $\mu\text{l}$  para la inmunización ( $1-2 \times 10^9$  CFU/10  $\mu\text{l}$ ).
- 5) CVD 908*htrA-ssb*(pS-CPA83-DM) = mutante doble de ClyA (I198N y C285W en un esqueleto de pSSB)
- (i) Se cultiva en estrías a partir de una disolución madre sobre 2x LA + DHB y se incuba a 30 °C durante 48 horas.
- (ii) Se inoculan 2-3 colonias de la placa en 30 ml de 2x LB + DHB y se incuba a 30 °C durante la noche.
- 35 (iii) Se subcultivan 20 ml del cultivo de la noche (1:12,5) en 250 ml de 2x LB + DHB y se espera hasta que la  $DO_{600\text{ nm}}$  alcance aproximadamente 1,4 a 37 °C (aproximadamente 5 h).
- (vi) Se centrifuga (6.000 rpm, 20 min), se rechaza todo el sobrenadante y se resuspende en 150  $\mu\text{l}$  de PBS.
- (v) Se diluye 1:1.000 para la lectura de la DO para asegurarse de que  $DO_{600\text{ nm}}$  sea aproximadamente 0,4-0,5.
- (vi) Se extraen 10  $\mu\text{l}$  para la inmunización ( $1-2 \times 10^9$  CFU/10  $\mu\text{l}$ ).

Se mide la Ig anti-PA83 sérica total mediante ELISA tal como se describió previamente (Galen *et al.*, 2009, J. Infect. Dis., 199:326-335). Las placas se revistieron con PA83 (List Biological) a 2 µg/ml en PBS y se bloqueó con leche en polvo al 10% en PBS. Se ensayaron muestras por duplicado en diluciones en serie. Se empleó IgG anti-mono marcada con HRP (KPL) como el conjugado, seguido del sustrato TMB (KPL). Se calcularon las titulaciones de IgG anti-PA mediante la interpolación de los valores de la absorbancia corregidos para la regresión de las muestras individuales en una curva patrón. Los resultados se muestran en la figura 14. Además, la figura 15 proporciona una tabla que muestra una comparación del porcentaje de ratones con seroconversión y GMT después de una vacunación con vectores vivos de *S. Typhi* atenuados que portan plásmidos que suministran PA83 fusionado con ClyA de tipo salvaje y los variantes de ClyA no hemolíticos. Estos datos indican que aunque los variantes de ClyA de mutantes individuales y de mutante doble inducen una inmunidad humoral menos específica de PA83 7 días después del refuerzo, los niveles se convierten en indistinguibles de la inmunogenicidad de ClyA de tipo salvaje-PA83 4 semanas después del refuerzo (día 70) y son significativamente diferentes de los de los ratones cebados con el vector vivo vacío y reforzados con PA83 (grupo 1). Los resultados demuestran claramente que los variantes de ClyM no hemolíticos todavía pueden conservar la inmunogenicidad de las proteínas extrañas fusionadas con el extremo carboxi-terminal de ClyM.

### Referencias bibliográficas

- Atkins, A., N.R. Wyborn, A.J. Wallace, T.J. Stillman, L.K. Black, A.B. Fielding, M. Hisakado, P.J. Artymiuk, y J. Green, 2000, Structure-function relationships of a novel bacterial toxin, hemolysin E. The role of  $\alpha_G$ , J. Biol. Chem., b:41150-41155.
- Bailey, J.E., Host-vector interactions in *Escherichia coli*, p. 29-77, en A. Fiechter (ed.), Advances in Biochemical Engineering, Biotechnology, Springer-Verlag, Berlín (1993).
- Balbas, P., X. Soberon, E. Merino, M. Zurita, H. Lomeli, F. Valle, N. Flores, y F. Bolivar, 1986, Plasmid vector pBR322 and its special-purpose derivatives--a review, Gene, 50:3-40.
- Blomfield, I.C., V. Vaughn, R.F. Rest, y B.I. Eisenstein, 1991, Allelic exchange in *Escherichia coli* using the *Bacillus subtilis* *sacB* gene and a temperature-sensitive pSC101 replicon, Mol. Microbiol., 5:1447-1457.
- Boe, L., K. Gerdes, y S. Molin, 1987, Effects of genes exerting growth inhibition and plasmid stability on plasmid maintenance, J. Bacteriol., 169:4646-4650.
- Borchert, T.V. y V. Nagarajan, 1991, Effect of signal sequence alterations on the export of levansucrase in *Bacillus subtilis*, J. Bacteriol., 173:276-282.
- Bramucci, M.G. y V. Nagarajan, 1996, Direct selection of cloned DNA en *Bacillus subtilis* based on sucrose-induced lethality, Appl. Environ. Microbiol., 62:3948-3953.
- Chervaux, C., N. Sauvonnet, A. Le Clainche, B. Kenny, A.L. Hunt, J.K. Broome-Smith, e I.B. Holland, 1995, Secretion of active  $\beta$ -lactamase to the medium mediated by the *Escherichia coli* haemolysin transport pathway, Mol. Gen. Genet., 249:237-245.
- Corchero, J.L. y A. Villaverde, 1998, Plasmid maintenance in *Escherichia coli* recombinant cultures is dramatically, steadily, and specifically influenced by features of the encoded proteins, Biotechnol. Bioeng., 58:625-632.
- Cserjan-Puschmann, M., W. Kramer, E. Duerrschmid, G. Streidner, y K. Bayer, 1999, Metabolic approaches for the optimisation of recombinant fermentation processes, Appl. Microbiol. Biotechnol., 53:43-50.
- Datta, N. y P. Kontomichalou, 1965, Penicillinase synthesis controlled by infectious R factors in Enterobacteriaceae, Nature, 208:239-241.
- Dedonder, R., 1966, Levansucrase from *Bacillus subtilis*, p. 500-505, en E.F. Neufeld y V. Ginsburg (eds.), Methods in Enzymology, Academic Press, Nueva York.
- del Castillo, F.J., S.C. Leal, F. Moreno, e I. del Castillo, 1997, The *Escherichia coli* K-12 *sheA* gene encodes a 34-kDa secreted haemolysin, Mol. Microbiol., 25:107-115.
- Fouet, A., M. Arnaud, A. Klier, y G. Rapoport, 1984, Characterization of the precursor form of the exocellular levansucrase from *Bacillus subtilis*, Biochem. Biophys. Res. Commun., 119:795-800.
- Galen, J.E., O.G. Gómez-Duarte, G. Losonsky, J.L. Halpern, C.S. Lauderbaugh, S. Kaintuck, M.K. Reymann, y M.M. Levine, 1997, A murine model of intranasal immunization to assess the immunogenicity of attenuated *Salmonella typhi* live vector vaccines in stimulating serum antibody responses to expressed foreign antigens, Vaccine, 15:700-708.

- Galen, J.E. y M.M. Levine, 2001, Can a "flawless" live vector vaccine strain be engineered?, *Trends in Microbiology*, 9:372-376.
- 5 Galen, J.E., J. Nair, J.Y. Wang, S.S. Wasserman, M.K. Tanner, M. Sztein, y M.M. Levine, 1999, Optimization of plasmid maintenance in the attenuated live vector vaccine strain *Salmonella typhi* CVD 908-*htrA*, *Infect. Immun.*, 67:6424-6433.
- Gay, P., D. Le Coq, M. Steinmetz, T. Berkelman, y C.I. Kado, 1985, Positive selection procedure for entrapment of insertion sequence elements in Gram-negative bacteria, *J. Bacteriol.*, 164:918-921.
- Gay, P., D. Le Coq, M. Steinmetz, E. Ferrari, y J.A. Hoch, 1983, Cloning structural gene *sacB*, which codes for exoenzyme levansucrase of *Bacillus subtilis*: expression of the gene in *Escherichia coli*, *J. Bacteriol.*, 153:1424-1431.
- 10 Glick, B.R., *Biotechnol. Adv.*, 13:247-261 (1995).
- Han, Y.W., 1990, Microbial levan, *Advances in Applied Microbiology*, 35:171-194.
- Harcum y Bentley, 1993, *Biotechnol. Bioeng.*, 42:675-685.
- Hone, D.M., A.M. Harris, S. Chatfield, G. Dougan, y M.M. Levine, 1991, Construction of genetically defined double *aro* mutants of *Salmonella typhi*, *Vaccine*, 9:810-816.
- 15 Jung, H., J. Lebeault, y J. Pan, 1998, Surface display of *Zymomonas mobilis* levansucrase by using the ice-nucleation protein of *Pseudomonas syringae*, *Nat. Biotechnol.*, 16:576-580.
- Lattemann, C.T., J. Maurer, E. Gerland, y T.F. Meyer, 2000, Autodisplay: functional display of active  $\beta$ -lactamase on the surface of *Escherichia coli* by the AIDA-I autotransporter, *J. Bacteriol.*, 182:3726-3733.
- 20 Le Coq, D., P. Ratet, M. Steinmetz, y P. Gay, 1984, A genetic approach to levansucrase secretion in *Bacillus subtilis*, p. 141-152, en A.T. Ganesan y J.A. Hoch (eds.), *Genetics and biotechnology of bacilli*, Academic Press, Nueva York.
- LeBrun, E. y R. van Rapenbusch, 1980, The structure of *Bacillus subtilis* levansucrase at 3.8 Å resolution, *J. Biol. Chem.*, 255:12034-12036.
- 25 Ludwig, A., S. Bauer, R. Benz, B. Bergmann, y W. Goebel, 1999, Analysis of the SlyA-controlled expression, subcellular localization and pore-forming activity of a 34 kDa haemolysin (ClyA) from *Escherichia coli* K-12, *Mol. Microbiol.*, 31:557-567.
- Matthew, M. y R.W. Hedges, 1976, Analytical isoelectric focusing of R factor-determined  $\beta$ -lactamases: correlation with plasmid compatibility, *J. Bacteriol.*, 125:713-718.
- 30 McDermott, P.J., P. Gowland, y P.C. Gowland, 1993, Adaptation of *Escherichia coli* growth rates to the presence of pBR322, *Lett. Appl. Microbiol.*, 17:139-143.
- Orr, N., J.E. Galen, y M.M. Levine, 1999, Expression and immunogenicity of a mutant diphtheria toxin molecule, CRM197, and its fragments in *Salmonella typhi* vaccine strain CVD 908-*htrA*, *Infect. Immun.*, 67:4290-4294.
- Oscarsson, J., Y. Mizunoe, L. Li, X. Lai, A. Wieslander, y B.E. Uhlin, 1999, Molecular analysis of the cytolytic protein ClyA (SheA) from *Escherichia coli*, *Mol. Microbiol.*, 32:1226-1238.
- 35 Oscarsson, J., Y. Mizunoe, B.E. Uhlin, y D.J. Haydon, 1996, Induction of haemolytic activity in *Escherichia coli* by the *slyA* gene product, *Mol. Microbiol.*, 20:191-199.
- Pecota, D.C., C.S. Kim, K. Wu, K. Gerdes, y T.K. Wood, 1997, Combining the *hok/sok*, *parDE*, and *pnd* postsegregational killer loci to enhance plasmid stability, *Appl. Environ. Microbiol.*, 63:1917-1924.
- 40 Pluckthun, A. y J.R. Knowles, 1987, The consequences of stepwise deletions from the signal-processing site of  $\beta$ -lactamase, *J. Biol. Chem.*, 262:3951-3957.
- Ried, J. y A. Collmer, 1987, An *npl-sacB-sacR* cartridge for constructing directed, unmarked mutations in Gram-negative bacteria by marker exchange- eviction mutagenesis, *Gene*, 57:239-246.
- Sambrook, J., E.F. Fritsch, y T. Maniatis, 1989, *Anonymous Molecular cloning: a laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
- 45 Sambrook, J. y D.W. Russell, 2001, Expression of cloned genes in *Escherichia coli*, p. 15.35, *Anonymous Molecular cloning. A laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.



- Shaw, K.J., P.N. Rather, R.S. Hare, y G.H. Miller, 1993. Molecular genetics of aminoglycoside resistance genes and familial relationships of the aminoglycoside-modifying enzymes, *Microbiol. Rev.*, 57:138-163.
- Smith y Bidochka, *Can. J. Microbiol.*, 44:351-355 (1998).
- 5 Steinmetz, M., D. Le Coq, H.B. Djemia, y P. Gay, 1983, Genetic analysis of *sacB*, the structural gene of a secreted enzyme, levansucrase of *Bacillus subtilis* Marburg, *Mol. Gen. Genet.*, 191:138-144.
- Summers, D.K., 1998, Timing, self-control and sense of direction are the secrets of multicopy plasmid stability, *Mol. Microbiol.*, 29:1137-1145.
- Sutcliffe, J.G., 1978, Nucleotide sequence of the ampicillin resistance gene of *Escherichia coli* plasmid pBR322, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 75:3737-3741.
- 10 Tacket, C.O., M. Sztein, G. Losonsky, S.S. Wasserman, J.P. Nataro, R. Edelman, D. Pickard, G. Dougan, S. Chatfield, y M.M. Levine, 1997, Safety of live oral *Salmonella typhi* vaccine strains with deletions in *htrA* and *aroC* *aroD* and immune responses in humans, *Infect. Immun.*, 65:452-456.
- 15 Wallace, A.J., T.J. Stillman, A. Atkins, S.J. Jamieson, P.A. Bullough, J. Green, y P.J. Artymiuk, 2000, *E. coli* hemolysin E (HlyE, ClyA, SheA): X-ray crystal structure of the toxin and observation of membrane pores by electron microscopy, *Cell*, 100:265-276.
- Wang, J.Y., F. Noriega, J.E. Galen, E.M. Barry, y M.M. Levine, 2000, Constitutive expression of the Vi polysaccharide capsular antigen in attenuated *Salmonella enterica* serovar Typhi oral vaccine strain CVD 909, *Infect. Immun.*, 68:4647-4652.
- 20 Wang, J.Y., M.F. Pasetti, F. Noriega, R.J. Anderson, S.S. Wasserman, J.E. Galen, M. Sztein, y M.M. Levine, 2001, Construction, genotypic and phenotypic characterization, and immunogenicity of attenuated *DguaBA Salmonella enterica* serovar Typhi strain CVD 915, *Infect. Immun.*, 69:4734-4741.
- Wu, K. y T.K Wood, 1994, Evaluation of the *hok/sok* killer locus for enhanced plasmid stability, *Biotechnol. Bioeng.*, 44:912-921.

LISTA DE SECUENCIAS

5 <110> University of Maryland, Baltimore  
 GALEN, James E.  
 CHEN, Yuansha  
 <120> ClyA no hemolítica para la excreción de proteínas  
 10 <130> 70089.0006WOU2  
 <150> US 61/058,299  
 <151> 03-06-2008  
 15 <160> 41  
 <170> PatentIn versión 3.5  
 <210> 1  
 <211> 6271  
 <212> ADN  
 20 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Plásmido de expresión pSEC84  
 25 <400> 1  
  
 gaattctgtg gtagcacaga ataatgaaaa gtgtgtaaag aagggtaaaa aaaaccgaat 60  
 gcgaggcatc cggttgaaat aggggtaaac agacattcag aatgaatga cggtaataaa 120  
 taaagttaat gatgatagcg ggagttattc tagttgcgag tgaaggtttt gttttgacat 180  
 tcagtgctgt caaataactta agaataagtt attgatttta accttgaatt attattgctt 240  
 gatgttaggt gcttatttcg ccattccgca ataatcttaa aaagttccct tgcatttaca 300  
 ttttgaaaca tctatagcga taaatgaaac atcttaaaag ttttagtata atattcgtgt 360  
 tggattattc tgcatttttg gggagaatgg acttgccgac tgattaatga gggttaatca 420  
 gtatgcagtg gcataaaaaa gcaaataaag gcatataaca gatcgatctt aaacatccac 480  
 aggaggatgg gatccaaaat aaggaggaaa aaaaaatgac tagtattttt gcagaacaaa 540  
 ctgtagaggt agttaaagc gcgatcgaaa ccgcagatgg ggcattagat ctttataaca 600  
 aatacctcga ccaggtcac ccttgaaga cttttgatga aaccataaaa gagttaagcc 660  
 gttttaaaca ggagtactcg caggaagctt ctgttttagt tggatgattt aaagttttgc 720  
 ttatggacag ccaggacaag tattttgaag cgacacaaac tgtttatgaa tgggtgtggtg 780  
 tcgtgacgca attactctca gcgtatattt tactatttga tgaatataat gagaaaaaag 840  
 catcagccca gaaagacatt ctcatagga tattagatga tgggtgtcaag aaactgaatg 900  
 aagcgcaaaa atctctcctg acaagttcac aaagtttcaa caacgcttcc ggaaaactgc 960

ES 2 473 605 T3

tggcattaga	tagccagtta	actaatgatt	tttcggaaaa	aagtagttat	ttccagtcac	1020
aggtggatag	aattcgtaag	gaagcttatg	cgggtgctgc	agccggcata	gtcgcgggtc	1080
cgtttgatt	aattatttcc	tattctattg	ctgcgggcgt	gattgaaggg	aaattgattc	1140
cagaattgaa	taacaggcta	aaaacagtgc	aaaatttctt	tactagctta	tcagctacag	1200
tgaacaagc	gaataaagat	atcgatgcmg	caaaattgaa	attagccact	gaaatagcag	1260
caattgggga	gataaaaacg	gaaaccgaaa	caaccagatt	ctacgttgat	tatgatgatt	1320
taatgctttc	tttattaaaa	ggagctgcaa	agaaaatgat	taacacctgt	aatgaatacc	1380
aacaacgtca	tggtagaag	acgcttttcg	aggttcctga	cgctcgctagc	tgataaccta	1440
gggccagcaa	aaggccagga	accgtaaaaa	ggccgcgctg	ctggcgtttt	tccataggct	1500
ccgccccct	gacgagcatc	acaaaaatcg	acgctcaagt	cagaggtggc	gaaacccgac	1560
aggactataa	agataccagg	cgtttcccc	tggaagctcc	ctcgtgcgct	ctcctgttcc	1620
gaccctgcmg	cttaccggat	acctgtccgc	ctttctccct	tcgggaagcg	tgccgcttcc	1680
tcatagctca	cgctgtaggt	atctcagttc	gggtgtaggtc	gttcgctcca	agctgggctg	1740
tgtgcacgaa	cccccgcttc	agcccgaccg	ctgcccctta	tcgggtaact	atcgtcttga	1800
gtccaacccg	gtaagacacg	acttatcgcc	actggcagca	gccactggta	acaggattag	1860
cagagcgagg	tatgtaggcmg	gtgctacaga	gttcttgaag	tggtggccta	actacggcta	1920
cactagaagg	acagtatttg	gtatctgcmg	tctgctgaag	ccagttacct	tcggaaaaag	1980
agttggtagc	tcttgatccg	gcaaacaaac	caccgctggg	agcgggtgggt	tttttgtttg	2040
caagcagcag	attacgcmgca	gaaaaaaagg	atctcaagaa	gatcctttga	tcttttctac	2100
ggggtctgac	gctcagtaga	tctaaaacac	taggccaag	agttttaga	aacgcaaaaa	2160
ggccatccgt	caggatggcc	ttctgcttaa	tttgatgcct	ggcagtttat	ggcgggcmg	2220
ctgcccgmca	ccctccgggc	cgttgcttcg	caacgttcaa	atccgctccc	ggcggatttg	2280
tcctactcag	gagagcmgtc	accgacaaac	aacagataaa	acgaaaggcc	cagtctttcg	2340
actgagcctt	tcgttttatt	tgatgcctgg	cagttcccta	ctctcgcatg	gggagacccc	2400
acactaccat	cggcgctacg	gcgtttcact	tctgagttcg	gcatggggtc	aggtgggacc	2460
accgcgctac	tgccgccagg	caaattctgt	tttatcagac	cgcttctgcmg	ttctgattta	2520
atctgtatca	ggctgaaaat	cttctctcat	ccgcaaaaac	agccaagctg	gatctggcaa	2580
atcgctgaat	attccttttg	tctccgacca	tcaggcacct	gagtcgctgt	ctttttcgtg	2640

ES 2 473 605 T3

acattcagtt cgctgcgctc acggctctgg cagtgaatgg gggtaaattgg cactacaggc 2700  
 gccttttatg gattcatgca aggaaactac ccataatata agaaaagccc gtcacgggct 2760  
 tctcagggcg ttttatggcg ggtctgctat gtggtgctat ctgacttttt gctgttcagc 2820  
 agttcctgcc ctctgatttt ccagtctgac cacttcggat tatcccgtga caggtcattc 2880  
 agactggcta atgcaccag taaggcagcg gtatcatcaa caggcttacc cgtcttactg 2940  
 tcaaccggat ctaaaacact agcccaacct ttcataagaag gcggcggtgg aatcgaatc 3000  
 tcgtgatggc aggttgggcg tcgcttggtc ggtcatttcg aaccccagag tcccgcctcag 3060  
 aagaactcgt caagaaggcg atagaaggcg atgcgctgcg aatcgggagc ggcgataccg 3120  
 taaagcacga ggaagcggtc agcccattcg ccgccaagct cttcagcaat atcacgggta 3180  
 gccaacgcta tgtcctgata ggggtccgcc acaccagcc ggccacagtc gatgaatcca 3240  
 gaaaagcggc cattttccac catgatattc ggcaagcagg catcgccatg ggtcacgacg 3300  
 agatcctcgc cgtcgggcat gcgcgccttg agcctggcga acagttcggc tggcgcgagc 3360  
 cctgatgct cttcgtccag atcatcctga tcgacaagac cggcttccat ccgagtacgt 3420  
 gctcgcctcga tgcgatgttt cgcttgggtg tcgaatgggc aggtagccgg atcaagcgt 3480  
 tgcagccgcc gcattgcac agccatgatg gatactttct cggcaggagc aaggtgagat 3540  
 gacaggagat cctgccccgg cacttcgccc aatagcagcc agtcccttc cgtctcagtg 3600  
 acaacgctcga gcacagctgc gcaaggaacg cccgtcgtgg ccagccacga tagccgcgct 3660  
 gcctcgtcct gcagttcatt cagggcaccg gacaggtcgg tcttgacaaa aagaaccggg 3720  
 cgccccctgcg ctgacagccg gaacacggcg gcatcagagc agccgattgt ctgtttgtgcc 3780  
 cagtcatagc cgaatagcct ctccacccaa ggggcccggag aacctgcgtg caatccatct 3840  
 tgttcaatca tgcgaaacga tctcatcct gtctcttgat cagatcttga tcccctgcgc 3900  
 catcagatcc ttggcggcaa gaaagccatc cagtttactt tgcagggctt cccaacctta 3960  
 ccagagggcg cccagctgg caattccggg tcgctgctag acaacatcag caaggagaaa 4020  
 ggggctaccg gcgaaccagc agccccttta taaaggcgct tcagtagtca gaccagcatc 4080  
 agtctgaaa aggggggctt gcgcccgcct ccaggttgc acttaccgga ttcgtaagcc 4140  
 atgaaagccg ccacctccct gtgtccgtct ctgtaacgaa tctcgcacag cgattttcgt 4200  
 gtcagataag tgaatatcaa cagtgtgaga cacacgatca acacacacca gacaagggaa 4260  
 cttcgtggta gtttcatggc cttcttctcc ttgcgcaaag cgcggttaaga ggctatcctg 4320  
 atgtggacta gacatagga tgcctcgtgg tggttaatga aaattaactt actacggggc 4380

ES 2 473 605 T3

tatcttcttt	ctgccacaca	acacggcaac	aaaccacctt	cacgtcatga	ggcagaaagc	4440
ctcaagcgcc	gggcacatca	tagcccatat	acctgcacgc	tgaccacact	cactttccct	4500
gaaaataatc	cgctcattca	gaccgttcac	gggaaatccg	tgtgattggt	gccgcatcac	4560
gctgcctccc	ggagtttgtc	tcgagcactt	ttgttaccgg	ccaaacaaaa	cccaaaaaca	4620
accataccc	aaccaataa	aacacaaaa	caagacaaat	aatcattgat	tgatggttga	4680
aatggggtaa	acttgacaaa	caaaccctt	taaaacccaa	aacataccca	aacacacacc	4740
aaaaaacac	cataaggagt	ttataaatg	ttggtattca	ttgatgacgg	ttcaacaaac	4800
atcaaactac	agtggcagga	aagcgacgga	acaattaaac	agcacattag	cccgaacagc	4860
ttcaaacgcg	agtgggcagt	ctcttttgg	gataaaaagg	tctttaacta	cacactgaac	4920
ggcgaacagt	attcatttga	tccaatcagc	ccggatgctg	tagtcacaac	caatatcgca	4980
tggcaataca	gcgacgttaa	tgtcgttgca	gtgcatcacg	ccttactgac	cagtggctctg	5040
ccggtaaagc	aagtggatat	tgtttgcaca	cttctctgga	cagagtatta	cgacagaaat	5100
aaccaacca	atacggaaa	tattgagcgt	aagaaagcaa	acttccggaa	aaaaattaca	5160
ttaaatggcg	gggatacatt	cacaataaaa	gatgtaaaag	tcatgcctga	atctataccg	5220
gcaggttatg	aagttctaca	agaactggat	gagttagatt	ctttattaat	tatagatctc	5280
gggggcacca	cattagatat	ttctcaggta	atggggaaat	tatcggggat	cagtaaaata	5340
tacggagact	catctcttgg	tgtctctctg	gttacatctg	cagtaaaaga	tgccctttct	5400
cttgcgagaa	caaaggaag	tagctatctt	gctgacgata	taatcattca	cagaaaagat	5460
aataactatc	tgaagcaacg	aattaatgat	gagaacaaaa	tatcaatagt	caccgaagca	5520
atgaatgaag	cacttcgtaa	acttgagcaa	cgtgtattaa	atacgctcaa	tgaattttct	5580
ggttatactc	atgttatggt	tataggcgg	ggcgcagaat	taatatgcga	tgacagtaaaa	5640
aaacacacac	agattcgtga	tgaacgtttt	ttcaaaaacca	ataactctca	atatgattta	5700
gttaacggta	tgtatctcat	aggtaattaa	tgatggacaa	ggcgcagaacc	attgccttca	5760
aactaaatcc	agatgtaa	caaacagata	aaattgtttg	tgatacactg	gacagtatcc	5820
cgcaagggga	acgaagccgc	cttaaccggg	ccgcaactgac	ggcaggtctg	gccttataca	5880
gacaagatcc	ccggaccctt	ttccttttat	gtgagctgct	gacgaaagaa	accacatttt	5940
cagatatcgt	gaatatattg	agatcgctat	ttccaaaaga	gatggccgat	tttaattctt	6000
caatagtcac	tcaatcctct	tcacaacaag	agcaaaaaag	tgatgaagag	accaaaaaaa	6060

ES 2 473 605 T3

atgqgatgaa gctaataaat taattcaatt attattgagt tccctttatc cactatcagg 6120  
ctggataaag ggaactcaat caagttatct tcttaccagt cattacataa tcggttattat 6180  
gaaataatcg tttgcactgt ctctgttatt caggcaatct caataaaggc acttgctcac 6240  
gctctgtcat tttctgaaac tcttcatgct g 6271

5 <210> 2  
<211> 305  
<212> PRT  
<213> Salmonella Typhi

<400> 2  
Met Thr Ser Ile Phe Ala Glu Gln Thr Val Glu Val Val Lys Ser Ala  
1 5 10 15  
Ile Glu Thr Ala Asp Gly Ala Leu Asp Leu Tyr Asn Lys Tyr Leu Asp  
20 25 30  
Gln Val Ile Pro Trp Lys Thr Phe Asp Glu Thr Ile Lys Glu Leu Ser  
35 40 45  
Arg Phe Lys Gln Glu Tyr Ser Gln Glu Ala Ser Val Leu Val Gly Asp  
50 55 60  
Ile Lys Val Leu Leu Met Asp Ser Gln Asp Lys Tyr Phe Glu Ala Thr  
65 70 75 80  
Gln Thr Val Tyr Glu Trp Cys Gly Val Val Thr Gln Leu Leu Ser Ala  
85 90 95  
Tyr Ile Leu Leu Phe Asp Glu Tyr Asn Glu Lys Lys Ala Ser Ala Gln  
100 105 110  
Lys Asp Ile Leu Ile Arg Ile Leu Asp Asp Gly Val Lys Lys Leu Asn  
115 120 125  
Glu Ala Gln Lys Ser Leu Leu Thr Ser Ser Gln Ser Phe Asn Asn Ala  
130 135 140  
Ser Gly Lys Leu Leu Ala Leu Asp Ser Gln Leu Thr Asn Asp Phe Ser  
145 150 155 160  
Glu Lys Ser Ser Tyr Phe Gln Ser Gln Val Asp Arg Ile Arg Lys Glu

	165		170		175
Ala Tyr Ala Gly Ala Ala Ala Gly Ile Val Ala Gly Pro Phe Gly Leu	180		185		190
Ile Ile Ser Tyr Ser Ile Ala Ala Gly Val Ile Glu Gly Lys Leu Ile	195		200		205
Pro Glu Leu Asn Asn Arg Leu Lys Thr Val Gln Asn Phe Phe Thr Ser	210		215		220
Leu Ser Ala Thr Val Lys Gln Ala Asn Lys Asp Ile Asp Ala Ala Lys	225		230		235
Leu Lys Leu Ala Thr Glu Ile Ala Ala Ile Gly Glu Ile Lys Thr Glu	245		250		255
Thr Glu Thr Thr Arg Phe Tyr Val Asp Tyr Asp Asp Leu Met Leu Ser	260		265		270
Leu Leu Lys Gly Ala Ala Lys Lys Met Ile Asn Thr Cys Asn Glu Tyr	275		280		285
Gln Gln Arg His Gly Lys Lys Thr Leu Phe Glu Val Pro Asp Val Ala	290		295		300
Ser					
305					

- 5 <210> 3
- <211> 102
- <212> ADN
- <213> Secuencia Artificial

- 10 <220>
- <223> Cebador de clonación
- <400> 3

```

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

```

- 15 <210> 4
- <211> 101
- <212> ADN
- <213> Secuencia Artificial

20

ES 2 473 605 T3

<220>  
 <223> Cebador de clonación

<400> 4  
 cctaggttat cagctagcga cgtcaggaac ctcgaaaagc gtcttcttac catgacgttg 60  
 5 ttggtattca ttacaggtgt taatcatttt ctttgcagct c 101

<210> 5  
 <211> 97  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Cebador de clonación

15 <400> 5  
 cacggtaaga agacgctttt cgaggttcct gacgtcgcta gctgataacc taggtcatgt 60  
 tagacagctt atcatcgata agctttaatg cggtagt 97

<210> 6  
 <211> 69  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Cebador de clonación

25 <400> 6  
 agatctacta gtgtcgacgc tagctatcag gtcgaggtgg cccggctcca tgcaccgca 60  
 cgcaacgcg 69

<210> 7  
 <211> 60  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Cebador de clonación

35 <400> 7  
 actagtcacc cagaaacgct ggtgaaagta aaagatgctg aagatcagtt ggggtgcacga 60

<210> 8  
 <211> 101  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Cebador de clonación

<210> 9  
 <211> 101  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Cebador de clonación

55 <400> 8



	cattaaaggt tatcgatgat aagctgtcaa acatgagcta gcctaggtca ttaccaatgc	60
	ttaatcagtg aggcacctat ctacagcgtc tgtctatttc g	101
5	<210> 9 <211> 101 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
	<220> <223> Cebador de clonación	
10	<400> 9	
	cgaaatagac agatcgctga gataggtgcc tcaactgatta agcattggta atgacctagg	60
	ctagctcatg ttgacagct tatcatcgat aacctttaat g	101
15	<210> 10 <211> 71 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
	<220> <223> Cebador de clonación	
20	<400> 10	
	gcgactagt aaagaaacga accaaaagcc atataaggaa acatacggca tttcccatat	60
	tacacgcat g	71
25	<210> 11 <211> 103 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
	<220> <223> Cebador de clonación	
30	<400> 11	
	taaactaccg cattaaagct tatcgatgat aagctgtcaa acatgaccgg ggtcactatt	60
	tgttaactgt taattgtcct tgttcaagga tgtgtcttt gac	103
35	<210> 12 <211> 46 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
40	<220> <223> Cebador de clonación	
	<400> 12	
45	tcatgtttga cagcttatca tcgataagct ttaatgcbgg agttta	46
	<210> 13 <211> 80 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
50	<220> <223> Cebador de clonación	

ES 2 473 605 T3

	<400>	13		
			gcgcagatct taatcatcca caggaggcgc tagcatgagt aaaggagaag aacttttcac	60
			tggagttgtc ccaattcttg	80
5	<210>	14		
	<211>	110		
	<212>	ADN		
	<213>	Secuencia Artificial		
10	<220>			
	<223>	Cebador de clonación		
	<400>	14		
			gtgataaaact accgcattaa agcttatcga tgataagctg tcaaacaatga gcgctctaga	60
			actagttcat tatttgtaga gctcatccat gccatgtgta atcccagcag	110
15	<210>	15		
	<211>	94		
	<212>	ADN		
	<213>	Secuencia Artificial		
20	<220>			
	<223>	Cebador de clonación		
	<400>	15		
			gcgcactagt aaaaaccttg attggtgggt cgacaacgaa gaagacatcg atggtatcct	60
			gaaaaagtct accattctga acttgacat caac	94
25	<210>	16		
	<211>	97		
	<212>	ADN		
	<213>	Secuencia Artificial		
30	<220>			
	<223>	Cebador de clonación		
	<400>	16		
35			aactaccgca ttaaagctta tcgatgataa gctgtcaaac atgagctagc ctaggtcatt	60
			agtcggtgggt ccaaccttca tcggtcggaa cgaagta	97
	<210>	17		
	<211>	30		
40	<212>	ADN		
	<213>	Secuencia Artificial		
	<220>			
	<223>	Cebador de clonación		
45	<400>	17		
			cgatcgggca aaattgaaat tagccactga	30
	<210>	18		
50	<211>	8908		
	<212>	ADN		
	<213>	Secuencia Artificial		
	<220>			
55	<223>	vector pSEC84sacB		

ES 2 473 605 T3

<400> 18  
gaattctgtg gtagcacaga ataatgaaaa gtgtgtaaag aagggtaaaa aaaaccgaat 60  
gcgaggcatc cggttgaaat aggggtaaac agacattcag aatgaatga cggtaataaa 120  
taaagttaat gatgatagcg ggagttattc tagttgagag tgaaggtttt gttttgacat 180  
tcagtgtgtt caaataactta agaataagtt attgatttta acottgaatt attattgctt 240  
gatgttaggt gcttatttcg ccattccgca ataatcttaa aaagttccct tgcatttaca 300  
ttttgaaaca tctatagcga taaatgaaac atcttaaaag ttttagtacc atattcgtgt 360  
tggattattc tgcatttttg gggagaatgg acttgccgac tgattaatga gggttaatca 420  
gtatgcagtg gcataaaaa gcaaataaag gcatataaca gatcgatcct aaacatccac 480  
aggaggatgg gatccaaaat aaggaggaaa aaaaaatgac tagtattttt gcagaacaaa 540  
ctgtagaggt agttaaagc gcgatcgaaa ccgcagatgg ggcattagat ctttataaca 600  
aatacctcga ccaggtcac ccttgaaga cctttgatga aaccataaaa gagttaagcc 660  
gttttaaaaca ggagtactcg caggaagcct ctgttttagt tggatgatt aaagttttgc 720  
ttatggacag ccaggacaag tattttgaag cgacacaaac tgtttatgaa tgggtgtggtg 780  
tcgtgacgca attactctca gcgtatattt tactatttga tgaatataat gagaaaaaag 840  
catcagccca gaaagacatt ctcatagga tattagatga tgggtgcaag aaactgaatg 900  
aagcgcaaaa atctctcctg acaagttcac aaagtttcaa caacgcttcc ggaaaactgc 960  
tggcattaga tagccagtta actaatgatt tttcggaaaa aagtagttat ttccagtcac 1020

ES 2 473 605 T3

agtggatag aattecgt aagccttatg ccgggtctgc agccggcata gtcgccggtc 1080  
 cgtttgatt aattatttcc tattctattg ctgcgggctg gattgaaggg aaattgattc 1140  
 cagaattgaa taacaggcta aaaacagtgc aaaatttctt tactagctta tcagctacag 1200  
 tgaacaagc gaataaagat atcgatgctg caaaattgaa attagccact gaaatagcag 1260  
 caattgggga gataaaaacg gaaaccgaaa caaccagatt ctacgctgat tatgatgatt 1320  
 taatgctttc tttattaaaa ggagctgcaa agaaaatgat taacacctgt aatgaatacc 1380  
 aacaacgtca tggtaagaag acgcttttct aggttctctg cgtcgtctagt aaagaaacga 1440  
 accaaaagcc atataaggaa acatacggca tttcccatat tacacgcat gatatgctgc 1500  
 aatccctga acagcaaaaa aatgaaaaat atcaagttcc tgaattcgat tcgtccacaa 1560  
 ttaaaaatat ctcttctgca aaaggcctgg acgtttgga cagctggcca ttacaaaacg 1620  
 ctgacggcac tgtcgcaaac tatcacggct accacatcgt ctttgatta gccggagatc 1680  
 ctaaaaatgc ggatgacaca tcgatttaca tgttctatca aaaagtcggc gaaacttcta 1740  
 ttgacagctg gaaaaacgct ggccgctct ttaaagacag cgacaaattc gatgcaaatg 1800  
 attctatcct aaaagaccaa acacaagaat ggtcaggttc agccacattt acatctgacg 1860  
 gaaaaatccg tttattctac actgatttct ccggtaaaca ttacggcaaa caaacactga 1920  
 caactgcaca agttaacgta tcagcatcag acagctcttt gaacatcaac ggtgtagagg 1980  
 attataaatc aatctttgac ggtgacggaa aaacgatca aatgtacag cagttcatcg 2040  
 atgaaggcaa ctacagctca ggcgacaacc atacgctgag agatcctcac tacgtagaag 2100  
 ataaaggcca caaatactta gtatttgaag caaacactgg aactgaagat ggctaccaag 2160  
 gcgaagaatc tttatttaac aaagcatact atggcaaaag cacatcattc ttccgtcaag 2220  
 aaagtcaaaa acttctgcaa agcgataaaa aacgcacggc tgagttagca aacggcgctc 2280  
 tcggtatgat tgagctaaac gatgattaca cactgaaaaa agtgatgaaa ccgctgattg 2340  
 catctaacac agtaacagat gaaattgaac gcgcgaacgt ctttaaaatg aacggcaaat 2400  
 ggtacctgtt cactgactcc cgcggatcaa aatgacgat tgacggcatt acgtctaacg 2460  
 atatttacat gcttggttat gtttctaatt ctttaactgg cccatacaag ccgctgaaca 2520  
 aaactggcct tgtgttaaaa atggatcttg atcctaacga tgtaaccttt acttactcac 2580  
 acttcgctgt acctcaagcg aaaggaaaca atgtcgtgat tacaagctat atgacaaaca 2640  
 gaggattcta cgcagacaaa caatcaacgt ttgcgccaag cttcctgctg aacatcaaag 2700

ES 2 473 605 T3

gcaagaaaaC atctgttgtc aaagacagca tccttgaaca aggacaatta acagttaaca 2760  
aatagtgacc cgggtcatgt ttgacagctt atcatcgata agctttaatg cggtagttta 2820  
tcacagttaa attgctaacg cagtcaggca cgtgtatga aatctaaca tgcgctcatc 2880  
gtcatcctcg gcaccgtcac cctggatgct gtaggcatag gcttggttat gccggtactg 2940  
ccgggcctct tgcgggatat cgtccattcc gacagcatcg ccagtcacta tggcgtgctg 3000  
ctagcgtat atgcgttgat gcaatttcta tgcgcaccog ttctcggagc actgtccgac 3060  
cgctttggcc gccgccagc cctgctcgtt tcgtaacttg gagccactat cgactacgcg 3120  
atcatggcga ccacaccogt cctgtggatc ctctacgcoy gacgcatcgt ggccggcatc 3180  
accggcgcca caggtgcggt tgctggcgcc tatatcgccg acatcaccga tggggaagat 3240  
cgggctcgcc acttcgggct catgagcgtt tgtttcggcg tgggtatggt ggcaggcccc 3300  
gtggccgggg gactgttggg cgccatctcc ttgcatgcac cattccttgc ggccggcgtg 3360  
ctcaacggcc tcaacctact actgggctgc ttctaatgc aggagtcgca taagggagag 3420  
cgtcgaccga tgcccttgag agccttcaac ccagtcagct ccttcgggtg ggccgggggc 3480  
atgactatcg tcgccgact tatgactgtc ttctttatca tgcaactcgt aggacaggtg 3540  
ccggcagcgc tctgggtcat ttctggcgag gaccgctttc gctggagcgc gacgatgatc 3600  
ggcctgtcgc ttgcggtatt cggaatcttg cacgccctcg ctcaagcctt cgtcactggt 3660  
cccgccacca aacgtttcgg cgagaagcag gccattatcg ccggcatggc ggccgacgcg 3720  
ctgggctacg tcttgctggc gttcgcgacg cgaggctgga tggccttccc cattatgatt 3780  
cttctcgtt ccggcggcat cgggatgccc gcgttgacg ccattgctgtc caggcaggta 3840  
gatgacgacc atcagggaca gcttcaagga tcgctcgcgg ctcttaccag cctaacttcg 3900  
atcactggac cgctgatcgt cacggcgatt tatgccgcct cggcgagcac atggaacggg 3960  
ttggcatgga ttgtaggcgc cgcctatac cttgtctgcc tcccccggtt gcgtcgcggt 4020  
gcatggagcc gggccacctc gacctgatag ctagcgtcga cactagctga taacctaggg 4080  
ccagcaaaag gccaggaacc gtaaaaaggc cgcgttgctg gcgtttttcc ataggctccg 4140  
ccccctgac gagcatcaca aaaatcgacg ctcaagtcag aggtggcgaa acccgacagg 4200  
actataaaga taccaggcgt tccccctgg aagctccctc gtgcgctctc ctgttccgac 4260  
cctgccgctt accggatacc tgtccgcctt tctcccttcg ggaagcgtgg cgctttctca 4320  
tagctcacgc tgtaggtatc tcagttcggg gtaggtcgtt cgctccaagc tgggctgtgt 4380  
gcacgaacce cccgttcagc ccgaccgctg cgccttatcc ggtaactatc gtcttgagtc 4440

ES 2 473 605 T3

caaccoggta	agacacgact	tatcgccact	ggcagcagcc	actggtaaca	ggattagcag	4500
agcgaggat	gtaggcggtg	ctacagagtt	cttgaagtgg	tggcctaact	acggctacac	4560
tagaaggaca	gtatttggtg	tctgcgctct	gctgaagcca	gttaccttcg	gaaaaagagt	4620
tgtagctct	tgatccggca	aacaaaccac	cgctggtagc	ggtaggtttt	ttgtttgcaa	4680
gcagcagatt	acgcgcagaa	aaaaaggatc	tcaagaagat	cctttgatct	tttctacggg	4740
gtctgacgt	cagtagatct	aaaacactag	gccaagagt	ttgtagaac	gcaaaaaggc	4800
catccgtcag	gatggccttc	tgcttaattt	gatgcctggc	agtttatggc	gggcgtcctg	4860
cccgccacc	tccgggccgt	tgcttcgcaa	cgttcaaadc	cgctcccggc	ggatttgtcc	4920
tactcaggag	agcgttcacc	gacaaacaac	agataaaaac	aaaggcccag	tctttcgact	4980
gagcctttcg	ttttatttga	tgccctggcag	ttccctactc	tcgcatgggg	agaccccaca	5040
ctaccatcgg	cgctacggcg	tttcaacttct	gagttcggca	tggggtcagg	tgggaccacc	5100
gcgctactgc	cgccaggcaa	attctgtttt	atcagaccgc	ttctgcgttc	tgatttaatc	5160
tgtatcaggg	tgaaaatctt	ctctcatccg	ccaaaacagc	caagctggat	ctggcaaadc	5220
gctgaatatt	ccttttgtct	ccgaccatca	ggcacctgag	tcgctgtctt	ttcgtgaca	5280
ttcagttcgc	tgcgctcagc	gctctggcag	tgaatggggg	taaatggcac	tacaggcgcc	5340
ttttatggat	tcatgcaagg	aaactacca	taatacaaga	aaagcccgtc	acgggcttct	5400
cagggcgttt	tatggcgggt	ctgctatgtg	gtgctatctg	actttttgct	gttcagcagt	5460
tcctgccttc	tgattttcca	gtctgaccac	ttcggattat	cccgtgacag	gtcattcaga	5520
ctggctaata	caccagtaa	ggcagcggta	tcatcaacag	gcttaccctg	cttactgtca	5580
accgatcta	aaacactagc	ccaacctttc	atagaaggcg	gcggtggaat	cgaaatctcg	5640
tgatggcagg	ttgggcgtcg	cttggtegg	catttcgaac	cccagagtcc	cgctcagaag	5700
aactcgtcaa	gaaggcgata	gaaggcgatg	cgctgcgaat	cgggagcggc	gataccgtaa	5760
agcacgagga	agcggtcagc	ccattcgccg	ccaagctctt	cagcaatadc	acgggtagcc	5820
aacgctatgt	cctgatagcg	gtccgccaca	cccagccggc	cacagtcgat	gaatccagaa	5880
aagcggccat	tttccaccat	gatattcggc	aagcaggcat	cgccatgggt	cacgacgaga	5940
tcctgcctcg	cgggcatgcg	cgcttgagc	ctggcgaaca	gttcggctgg	cgcgagcccc	6000
tgatgctctt	cgtccagatc	atcctgatcg	acaagaccgg	cttccatccg	agtacgtgct	6060
cgctcgatgc	gatgtttcgc	ttggtggctg	aatgggcagg	tagccggatc	aagcgtatgc	6120

ES 2 473 605 T3

agccgccgca ttgcatcagc catgatggat actttctcgg caggagcaag gtgagatgac 6180  
 aggagatcct gccccggcac ttcgcccaat agcagccagt cccttcccgc ttcagtgaca 6240  
 acgtcgagca cagctgcgca aggaacgccc gtcgtggcca gccacgatag ccgcgctgcc 6300  
 tcgtcctgca gttcattcag ggcaccggac aggtcgggtct tgacaaaaag aaccggggcg 6360  
 ccctgcgctg acagccggaa cacggcggca tcagagcagc cgattgtctg ttgtgcccag 6420  
 tcatagccga atagcctctc cacccaagcg gccggagaac ctgctgcaa tccatcttgt 6480  
 tcaatcatgc gaaacgatcc tcatcctgtc tcttgatcag atcttgatcc cctgcgccat 6540  
 cagatccttg gcggaagaa agccatccag tttactttgc agggcttccc aaccttacca 6600  
 gagggcgccc cagctggcaa ttccggttcg ctgctagaca acatcagcaa ggagaaaggg 6660  
 gctaccggcg aaccagcagc ccctttataa aggcgcttca gtagtcagac cagcatcagt 6720  
 cctgaaaagc cgggcctgcg cccgcctcca ggttgctact taccggattc gtaagccatg 6780  
 aaagccgcca cctccctgtg tccgtctctg taacgaatct cgcacagcga tttcgtgtc 6840  
 agataagtga atatcaacag tgtgagacac acgatcaaca cacaccagac aagggaaact 6900  
 cgtggtagtt tcatggcctt cttctccttg cgcaaagcgc ggtaagaggc tatcctgatg 6960  
 tggactagac atagggatgc ctgctggtgg ttaatgaaaa ttaacttact acggggctat 7020  
 cttctttctg ccacacaaca cggcaacaaa ccaccttac gtcattgaggc agaaagcctc 7080  
 aagcgccggg cacatcatag cccatatacc tgcaagctga ccacactcac tttccctgaa 7140  
 aataatccgc tcattcagac cgttcacggg aaatccgtgt gattgttgcc gcatcacgct 7200  
 gcctcccgga gtttgtctcg agcacttttg ttaccgcgca aacaaaacc aaaacaacc 7260  
 catacccaac ccaataaaac accaaaacaa gacaaataat cattgattga tggttgaaat 7320  
 ggggtaaact tgacaaacaa acccacttaa aaccacaaac ataccacaaac acacacaaa 7380  
 aaaacaccat aaggagtttt ataaatgttg gtattcattg atgacggttc aacaaacatc 7440  
 aaactacagt ggcaggaaag cgacggaaca attaacagc acattagccc gaacagcttc 7500  
 aaacgcgagt gggcagtctc ttttggtgat aaaaaggtct ttaactacac actgaacggc 7560  
 gaacagtatt catttgatcc aatcagcccg gatgctgtag tcacaaccaa tatcgcatgg 7620  
 caatacagcg acgttaatgt cgttgacgtg catcacgcct tactgaccag tggctgcgg 7680  
 gtaagcgaag tggatattgt ttgcacactt cctctgacag agtattacga cagaaataac 7740  
 caaccaata cggaaaatat tgagcgtaag aaagcaact tccggaaaa aattacatta 7800  
 aatggcgggg atacattcac aataaaagat gtaaaagtca tgcctgaatc tataccggca 7860

ES 2 473 605 T3

```

ggttatgaag ttctacaaga actggatgag ttagattctt tattaattat agatctcggg      7920
ggcaccacat tagatatttc tcaggtaatg gggaaattat cgggatcag taaaatatac      7980
ggagactcat ctcttggtgt ctctctggtt acatctgcag taaaagatgc cctttctctt      8040
gcgagaacaa aaggaagtag ctatcttctt gacgatataa tcattcacag aaaagataat      8100
aactatctga agcaacgaat taatgatgag aacaaaatat caatagtcac cgaagcaatg      8160
aatgaagcac ttcgtaaact tgagcaacgt gtattaaata cgctcaatga attttctggt      8220
tatactcatg ttatggttat aggcggtggc gcagaattaa tatgcatgac agtaaaaaaa      8280
cacacacaga ttcgtgatga acgttttttc aaaaccaata actctcaata tgatttagtt      8340
aacggtatgt atctcatagg taattaatga tggacaagcg cagaaccatt gccttcaaac      8400
taaatccaga tgtaaatcaa acagataaaa ttgtttgtga taaactggac agtatcccgc      8460
aaggggaacg aagccgcctt aaccgggccc cactgacggc aggtctggcc ttatacagac      8520
aagatccccg gacccttttc cttttatgtg agctgctgac gaaagaaacc acattttcag      8580
atatcgtgaa tatattgaga tcgctatttc caaaagagat ggccgatttt aattcttcaa      8640
tagtcaacta atcctcttca caacaagagc aaaaaagtga tgaagagacc aaaaaaatg      8700
cgatgaagct aataaattaa ttcaattatt attgagttcc ctttatccac tatcaggctg      8760
gataaagga actcaatcaa gttattttct taccagtcac tacataatcg ttattatgaa      8820
ataatcgttt gcaactgtctc tgttattcag gcaatttcaa taaaggcact tgctcacgct      8880
ctgtcatttt ctgaaactct tcatgctg      8908

```

```

<210> 19
<211> 2253
<212> ADN
5 <213> Secuencia Artificial

```

```

<220>
<223> gen de fusión ClyA::SacB

```

```

10 <220>
<221> CDS
<222> (1)..(2253)

```

```

<400> 19
atg act agt att ttt gca gaa caa act gta gag gta gtt aaa agc gcg      48
Met Thr Ser Ile Phe Ala Glu Gln Thr Val Glu Val Val Lys Ser Ala
1          5          10          15

```

```

15 atc gaa acc gca gat ggg gca tta gat ctt tat aac aaa tac ctc gac      96

```



ES 2 473 605 T3

Ile	Glu	Thr	Ala	Asp	Gly	Ala	Leu	Asp	Leu	Tyr	Asn	Lys	Tyr	Leu	Asp	
			20					25					30			
cag	gtc	atc	ccc	tgg	aag	acc	ttt	gat	gaa	acc	ata	aaa	gag	tta	agc	144
Gln	Val	Ile	Pro	Trp	Lys	Thr	Phe	Asp	Glu	Thr	Ile	Lys	Glu	Leu	Ser	
		35					40					45				
cgt	ttt	aaa	cag	gag	tac	tcg	cag	gaa	gct	tct	ggt	tta	ggt	gat		192
Arg	Phe	Lys	Gln	Glu	Tyr	Ser	Gln	Glu	Ala	Ser	Val	Leu	Val	Gly	Asp	
	50					55					60					
att	aaa	ggt	ttg	ctt	atg	gac	agc	cag	gac	aag	tat	ttt	gaa	gcg	aca	240
Ile	Lys	Val	Leu	Leu	Met	Asp	Ser	Gln	Asp	Lys	Tyr	Phe	Glu	Ala	Thr	
	65				70					75					80	
caa	act	ggt	tat	gaa	tgg	tgt	ggt	gtc	gtg	acg	caa	tta	ctc	tca	gcg	288
Gln	Thr	Val	Tyr	Glu	Trp	Cys	Gly	Val	Val	Thr	Gln	Leu	Leu	Ser	Ala	
				85				90						95		
tat	att	tta	cta	ttt	gat	gaa	tat	aat	gag	aaa	aaa	gca	tca	gcc	cag	336
Tyr	Ile	Leu	Leu	Phe	Asp	Glu	Tyr	Asn	Glu	Lys	Lys	Ala	Ser	Ala	Gln	
			100					105					110			
aaa	gac	att	ctc	att	agg	ata	tta	gat	gat	ggt	gtc	aag	aaa	ctg	aat	384
Lys	Asp	Ile	Leu	Ile	Arg	Ile	Leu	Asp	Asp	Gly	Val	Lys	Lys	Leu	Asn	
		115					120					125				
gaa	gcg	caa	aaa	tct	ctc	ctg	aca	agt	tca	caa	agt	ttc	aac	aac	gct	432
Glu	Ala	Gln	Lys	Ser	Leu	Leu	Thr	Ser	Ser	Gln	Ser	Phe	Asn	Asn	Ala	
	130					135					140					
tcc	gga	aaa	ctg	ctg	gca	tta	gat	agc	cag	tta	act	aat	gat	ttt	tcg	480
Ser	Gly	Lys	Leu	Leu	Ala	Leu	Asp	Ser	Gln	Leu	Thr	Asn	Asp	Phe	Ser	
	145				150					155					160	
gaa	aaa	agt	agt	tat	ttc	cag	tca	cag	gtg	gat	aga	att	cgt	aag	gaa	528
Glu	Lys	Ser	Ser	Tyr	Phe	Gln	Ser	Gln	Val	Asp	Arg	Ile	Arg	Lys	Glu	
				165					170					175		
gct	tat	gcc	ggt	gct	gca	gcc	ggc	ata	gtc	gcc	ggt	ccg	ttt	gga	tta	576
Ala	Tyr	Ala	Gly	Ala	Ala	Ala	Gly	Ile	Val	Ala	Gly	Pro	Phe	Gly	Leu	
			180					185					190			
att	att	tcc	tat	tct	att	gct	gcg	ggc	gtg	att	gaa	ggg	aaa	ttg	att	624
Ile	Ile	Ser	Tyr	Ser	Ile	Ala	Ala	Gly	Val	Ile	Glu	Gly	Lys	Leu	Ile	
		195					200					205				
cca	gaa	ttg	aat	aac	agg	cta	aaa	aca	gtg	caa	aat	ttc	ttt	act	agc	672
Pro	Glu	Leu	Asn	Asn	Arg	Leu	Lys	Thr	Val	Gln	Asn	Phe	Phe	Thr	Ser	
		210				215					220					
tta	tca	gct	aca	gtg	aaa	caa	gcg	aat	aaa	gat	atc	gat	gcg	gca	aaa	720
Leu	Ser	Ala	Thr	Val	Lys	Gln	Ala	Asn	Lys	Asp	Ile	Asp	Ala	Ala	Lys	
	225				230					235					240	
ttg	aaa	tta	gcc	act	gaa	ata	gca	gca	att	ggg	gag	ata	aaa	acg	gaa	768
Leu	Lys	Leu	Ala	Thr	Glu	Ile	Ala	Ala	Ile	Gly	Glu	Ile	Lys	Thr	Glu	

ES 2 473 605 T3

245					250					255						
acc	gaa	aca	acc	aga	ttc	tac	gtt	gat	tat	gat	gat	tta	atg	ctt	tct	816
Thr	Glu	Thr	Thr	Arg	Phe	Tyr	Val	Asp	Tyr	Asp	Asp	Leu	Met	Leu	Ser	
			260					265					270			
tta	tta	aaa	gga	gct	gca	aag	aaa	atg	att	aac	acc	tgt	aat	gaa	tac	864
Leu	Leu	Lys	Gly	Ala	Ala	Lys	Lys	Met	Ile	Asn	Thr	Cys	Asn	Glu	Tyr	
		275					280					285				
caa	caa	cgt	cat	ggt	aag	aag	acg	ctt	ttc	gag	gtt	cct	gac	gtc	gct	912
Gln	Gln	Arg	His	Gly	Lys	Lys	Thr	Leu	Phe	Glu	Val	Pro	Asp	Val	Ala	
	290					295					300					
agt	aaa	gaa	acg	aac	caa	aag	cca	tat	aag	gaa	aca	tac	ggc	att	tcc	960
Ser	Lys	Glu	Thr	Asn	Gln	Lys	Pro	Tyr	Lys	Glu	Thr	Tyr	Gly	Ile	Ser	
305				310						315					320	
cat	att	aca	cgc	cat	gat	atg	ctg	caa	atc	cct	gaa	cag	caa	aaa	aat	1008
His	Ile	Thr	Arg	His	Asp	Met	Leu	Gln	Ile	Pro	Glu	Gln	Gln	Lys	Asn	
				325					330						335	
gaa	aaa	tat	caa	gtt	cct	gaa	ttc	gat	tcg	tcc	aca	att	aaa	aat	atc	1056
Glu	Lys	Tyr	Gln	Val	Pro	Glu	Phe	Asp	Ser	Ser	Thr	Ile	Lys	Asn	Ile	
			340					345					350			
tct	tct	gca	aaa	ggc	ctg	gac	gtt	tgg	gac	agc	tgg	cca	tta	caa	aac	1104
Ser	Ser	Ala	Lys	Gly	Leu	Asp	Val	Trp	Asp	Ser	Trp	Pro	Leu	Gln	Asn	
		355					360					365				
gct	gac	ggc	act	gtc	gca	aac	tat	cac	ggc	tac	cac	atc	gtc	ttt	gca	1152
Ala	Asp	Gly	Thr	Val	Ala	Asn	Tyr	His	Gly	Tyr	His	Ile	Val	Phe	Ala	
	370					375					380					
tta	gcc	gga	gat	cct	aaa	aat	gcg	gat	gac	aca	tcg	att	tac	atg	ttc	1200
Leu	Ala	Gly	Asp	Pro	Lys	Asn	Ala	Asp	Asp	Thr	Ser	Ile	Tyr	Met	Phe	
385					390					395					400	
tat	caa	aaa	gtc	ggc	gaa	act	tct	att	gac	agc	tgg	aaa	aac	gct	ggc	1248
Tyr	Gln	Lys	Val	Gly	Glu	Thr	Ser	Ile	Asp	Ser	Trp	Lys	Asn	Ala	Gly	
			405						410					415		
cgc	gtc	ttt	aaa	gac	agc	gac	aaa	ttc	gat	gca	aat	gat	tct	atc	cta	1296
Arg	Val	Phe	Lys	Asp	Ser	Asp	Lys	Phe	Asp	Ala	Asn	Asp	Ser	Ile	Leu	
			420					425					430			
aaa	gac	caa	aca	caa	gaa	tgg	tca	ggt	tca	gcc	aca	ttt	aca	tct	gac	1344
Lys	Asp	Gln	Thr	Gln	Glu	Trp	Ser	Gly	Ser	Ala	Thr	Phe	Thr	Ser	Asp	
		435					440					445				
gga	aaa	atc	cgt	tta	ttc	tac	act	gat	ttc	tcc	ggt	aaa	cat	tac	ggc	1392
Gly	Lys	Ile	Arg	Leu	Phe	Tyr	Thr	Asp	Phe	Ser	Gly	Lys	His	Tyr	Gly	
	450					455					460					
aaa	caa	aca	ctg	aca	act	gca	caa	gtt	aac	gta	tca	gca	tca	gac	agc	1440
Lys	Gln	Thr	Leu	Thr	Thr	Ala	Gln	Val	Asn	Val	Ser	Ala	Ser	Asp	Ser	
465					470					475					480	

ES 2 473 605 T3

tct ttg aac atc aac ggt gta gag gat tat aaa tca atc ttt gac ggt	1488
Ser Leu Asn Ile Asn Gly Val Glu Asp Tyr Lys Ser Ile Phe Asp Gly	
485 490 495	
gac gga aaa acg tat caa aat gta cag cag ttc atc gat gaa ggc aac	1536
Asp Gly Lys Thr Tyr Gln Asn Val Gln Gln Phe Ile Asp Glu Gly Asn	
500 505 510	
tac agc tca ggc gac aac cat acg ctg aga gat cct cac tac gta gaa	1584
Tyr Ser Ser Gly Asp Asn His Thr Leu Arg Asp Pro His Tyr Val Glu	
515 520 525	
gat aaa ggc cac aaa tac tta gta ttt gaa gca aac act gga act gaa	1632
Asp Lys Gly His Lys Tyr Leu Val Phe Glu Ala Asn Thr Gly Thr Glu	
530 535 540	
gat ggc tac caa ggc gaa gaa tct tta ttt aac aaa gca tac tat ggc	1680
Asp Gly Tyr Gln Gly Glu Glu Ser Leu Phe Asn Lys Ala Tyr Tyr Gly	
545 550 555 560	
aaa agc aca tca ttc ttc cgt caa gaa agt caa aaa ctt ctg caa agc	1728
Lys Ser Thr Ser Phe Phe Arg Gln Glu Ser Gln Lys Leu Leu Gln Ser	
565 570 575	
gat aaa aaa cgc acg gct gag tta gca aac ggc gct ctc ggt atg att	1776
Asp Lys Lys Arg Thr Ala Glu Leu Ala Asn Gly Ala Leu Gly Met Ile	
580 585 590	
gag cta aac gat gat tac aca ctg aaa aaa gtg atg aaa ccg ctg att	1824
Glu Leu Asn Asp Asp Tyr Thr Leu Lys Lys Val Met Lys Pro Leu Ile	
595 600 605	
gca tct aac aca gta aca gat gaa att gaa cgc gcg aac gtc ttt aaa	1872
Ala Ser Asn Thr Val Thr Asp Glu Ile Glu Arg Ala Asn Val Phe Lys	
610 615 620	
atg aac ggc aaa tgg tac ctg ttc act gac tcc cgc gga tca aaa atg	1920
Met Asn Gly Lys Trp Tyr Leu Phe Thr Asp Ser Arg Gly Ser Lys Met	
625 630 635 640	
acg att gac ggc att acg tct aac gat att tac atg ctt ggt tat gtt	1968
Thr Ile Asp Gly Ile Thr Ser Asn Asp Ile Tyr Met Leu Gly Tyr Val	
645 650 655	
tct aat tct tta act ggc cca tac aag ccg ctg aac aaa act ggc ctt	2016
Ser Asn Ser Leu Thr Gly Pro Tyr Lys Pro Leu Asn Lys Thr Gly Leu	
660 665 670	
gtg tta aaa atg gat ctt gat cct aac gat gta acc ttt act tac tca	2064
Val Leu Lys Met Asp Leu Asp Pro Asn Asp Val Thr Phe Thr Tyr Ser	
675 680 685	
cac ttc gct gta cct caa gcg aaa gga aac aat gtc gtg att aca agc	2112
His Phe Ala Val Pro Gln Ala Lys Gly Asn Asn Val Val Ile Thr Ser	
690 695 700	

ES 2 473 605 T3

tat atg aca aac aga gga ttc tac gca gac aaa caa tca acg ttt gcg	2160
Tyr Met Thr Asn Arg Gly Phe Tyr Ala Asp Lys Gln Ser Thr Phe Ala	
705 710 715 720	
cca agc ttc ctg ctg aac atc aaa ggc aag aaa aca tct gtt gtc aaa	2208
Pro Ser Phe Leu Leu Asn Ile Lys Gly Lys Lys Thr Ser Val Val Lys	
725 730 735	
gac agc atc ctt gaa caa gga caa tta aca gtt aac aaa tag tga	2253
Asp Ser Ile Leu Glu Gln Gly Gln Leu Thr Val Asn Lys	
740 745	

5 <210> 20  
 <211> 749  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>  
 <223> Constructo sintético

<400> 20

Met Thr Ser Ile Phe Ala Glu Gln Thr Val Glu Val Val Lys Ser Ala	
1 5 10 15	
Ile Glu Thr Ala Asp Gly Ala Leu Asp Leu Tyr Asn Lys Tyr Leu Asp	
20 25 30	
Gln Val Ile Pro Trp Lys Thr Phe Asp Glu Thr Ile Lys Glu Leu Ser	
35 40 45	
Arg Phe Lys Gln Glu Tyr Ser Gln Glu Ala Ser Val Leu Val Gly Asp	
50 55 60	
Ile Lys Val Leu Leu Met Asp Ser Gln Asp Lys Tyr Phe Glu Ala Thr	
65 70 75 80	
Gln Thr Val Tyr Glu Trp Cys Gly Val Val Thr Gln Leu Leu Ser Ala	
85 90 95	
Tyr Ile Leu Leu Phe Asp Glu Tyr Asn Glu Lys Lys Ala Ser Ala Gln	
100 105 110	
Lys Asp Ile Leu Ile Arg Ile Leu Asp Asp Gly Val Lys Lys Leu Asn	
115 120 125	
Glu Ala Gln Lys Ser Leu Leu Thr Ser Ser Gln Ser Phe Asn Asn Ala	
130 135 140	

ES 2 473 605 T3

Ser Gly Lys Leu Leu Ala Leu Asp Ser Gln Leu Thr Asn Asp Phe Ser  
 145 150 155 160

Glu Lys Ser Ser Tyr Phe Gln Ser Gln Val Asp Arg Ile Arg Lys Glu  
 165 170 175

Ala Tyr Ala Gly Ala Ala Ala Gly Ile Val Ala Gly Pro Phe Gly Leu  
 180 185 190

Ile Ile Ser Tyr Ser Ile Ala Ala Gly Val Ile Glu Gly Lys Leu Ile  
 195 200 205

Pro Glu Leu Asn Asn Arg Leu Lys Thr Val Gln Asn Phe Phe Thr Ser  
 210 215 220

Leu Ser Ala Thr Val Lys Gln Ala Asn Lys Asp Ile Asp Ala Ala Lys  
 225 230 235 240

Leu Lys Leu Ala Thr Glu Ile Ala Ala Ile Gly Glu Ile Lys Thr Glu  
 245 250 255

Thr Glu Thr Thr Arg Phe Tyr Val Asp Tyr Asp Asp Leu Met Leu Ser  
 260 265 270

Leu Leu Lys Gly Ala Ala Lys Lys Met Ile Asn Thr Cys Asn Glu Tyr  
 275 280 285

Gln Gln Arg His Gly Lys Lys Thr Leu Phe Glu Val Pro Asp Val Ala  
 290 295 300

Ser Lys Glu Thr Asn Gln Lys Pro Tyr Lys Glu Thr Tyr Gly Ile Ser  
 305 310 315 320

His Ile Thr Arg His Asp Met Leu Gln Ile Pro Glu Gln Gln Lys Asn  
 325 330 335

Glu Lys Tyr Gln Val Pro Glu Phe Asp Ser Ser Thr Ile Lys Asn Ile  
 340 345 350

Ser Ser Ala Lys Gly Leu Asp Val Trp Asp Ser Trp Pro Leu Gln Asn  
 355 360 365

- 5
- <210> 21
  - <211> 921
  - <212> ADN
  - <213> Salmonella Typhi
  - <400> 21

ES 2 473 605 T3

```

atgactagta tttttgcaga acaaactgta gaggtagtta aaagcgcgat cgaaaccgca      60
gatggggcat tagatcttta taacaaatac ctgcaccagg tcatcccctg gaagaccttt      120
gatgaaacca taaaagagtt aagccgtttt aacacaggagt actcgcagga agcttctggt      180
ttagttggtg atattaaagt tttgcttatg gacagccagg acaagtattt tgaagcgaca      240
caaactgttt atgaatggtg tgggtgctgtg acgcaattac tctcagcgtg tattttacta      300
tttgatgaat ataatgagaa aaaagcatca gccagaaag acattctcat taggatatta      360

gatgatggtg tcaagaaact gaatgaagcg caaaaatctc tctgacaag ttcacaaagt      420
ttcaacaacg cttccggaaa actgctggca ttagatagcc agttaactaa tgatttttctg      480
gaaaaaagta gttatttcca gtcacagggtg gatagaattc gtaaggaagc ttatgccggt      540
gctgcagccg gcatagtcgc cggtcctgtt ggattaatta tttcctattc tattgctgcg      600
ggcgtgattg aagggaaatt gattccagaa ttgaataaca ggctaaaaac agtgcaaaat      660
ttctttacta gcttatcagc tacagtgaaa caagcgaata aagatatcga tgcggcaaaa      720
ttgaaattag ccaactgaaat agcagcaatt ggggagataa aaacggaaac cgaaacaacc      780
agattctacg ttgattatga tgatttaatg ctttctttat taaaaggagc tgcaaagaaa      840
atgattaaca cctgtaatga ataccaacaa cgtcatggta agaagacgct tttcgagggt      900
cctgacgtcg ctagctgata a                                          921

```

- 5
- <210> 22
  - <211> 1102
  - <212> ADN
  - <213> Salmonella Typhi
  - <400> 22

ES 2 473 605 T3

```

ggaggttaata ggtaagaata cttataaaa caggactta attgcaattt atatatttaa      60
agaggcaaat gattatgacc ggaatatttg cagaacaaac tgtagaggta gttaaagcg      120
cgatcgaaac cgcagatggg gcattagatc tttataacaa atacctcgac caggctatcc      180
cctggaagac ctttgatgaa accataaaag agttaagccg ttttaaacag gactactcgc      240
aggaagcttc tgttttagtt ggtgatatta aagttttgct tatggacagc caggacaagt      300
atittgaagc gacacaaact gtttatgaat ggtgtggtgt cgtgacgcaa ttactctcag      360
cgtatatttt actatttgat gaatataatg agaaaaaagc atcagcccag aaagacattc      420
tcattaggat attagatgat ggtgtcaaga aactgaatga agcgcaaaaa tctctcctga      480
caagttcaca aagtttcaac aacgcttccg gaaaactgct ggcattagat agccagttaa      540
ctaatgattt ttcggaaaaa agtagttatt tccagtcaca ggtggataga attcgtaagg      600
aagcttatgc cgggtgctgca gccggcatag tcgccggtcc gtttggatta attatttctc      660
attctattgc tgcgggcgtg attgaaggga aattgattcc agaattgaat aacaggctaa      720
aaacagtgca aaatttcttt actagcttat cagctacagt gaaacaagcg aataaagata      780
tcgatgcggc aaaattgaaa ttagccactg aaatagcagc aattggggag ataaaaacgg      840
aaaccgaaac aaccagattc tacgttgatt atgatgattt aatgctttct ttattaaaag      900
gagctgcaaa gaaaatgatt aacacctgta atgaatacca acaagacac ggtaagaaga      960
cgcttttcga ggttctctgac gtctgataca ttttcattcg atctgtgtac ttttaacgcc      1020
cgatagcgtg aagaaaatga gagacggaga aaaagcgata ttcaacagcc cgataaacia      1080
gagtcgttac cgggctgacg ag                                             1102

```

- 5 <210> 23
- <211> 1102
- <212> ADN
- <213> Salmonella Paratyphi
- <400> 23

ES 2 473 605 T3

```

ggaggcaata ggtaggaata agttataaaa caatagctta attgcaattt atatatttaa      60
agaggcaaat gattatgact ggaatatttg cagaacaaac tgtagaggta gttaaaagcg      120
cgatcgaaac cgcagatggg gcattagatt tttataacaa atacctcgac caggttatcc      180
cctggaagac ctttgatgaa accataaaaag agttaagccg ttttaaacag gagtactcgc      240
aggaagcttc tgttttagtt ggtgatatta aagttttgct tatggacagc caggataagt      300
attttgaagc gacacaaact gtttatgaat ggtgtggtgt cgtgacgcaa ttactctcag      360
cgtatatttt actatttgat gaatataatg agaaaaaagc atcagcgcag aaagacattc      420
tcatcaggat attagatgat ggcgtcaata aactgaatga agcgcaaaaa tctctcctgg      480
gaagttcaca aagtttcaac aacgcttcag gaaaactgct ggcattagat agccagttaa      540
ctaatgattt ctcgaaaaa agtagttatt tccagtcaca ggtggataga attcgtaagg      600
aagcttatgc cgggtctgca gcaggcatag tcgccggtec gtttggatta attatttctt      660
attctattgc tgcgggcgtg attgaaggga aattgattcc agaattgaat gacaggctaa      720
aagcagtgca aaatttcttt actagcttat cagtcacagt gaaacaagcg aataaagata      780
tcgatgcggc aaaattgaaa ttagccactg aaatagcagc aattggggag ataaaaacgg      840
aaaccgaaac aaccagattc tacgttgatt atgatgattt aatgctttct ttactaaaag      900
gagctgcaaa gaaaatgatt aacacctgta atgaatacca acaaaggcac ggtaagaaga      960
cgcttctcga ggttctcgac atctgataca ttttcattcg ctctgtttac ttttaacgcc     1020
cgatagcgtg aagaaaatga gagacggaga aaaagcgata ttcaacagcc cgataaacia     1080
gagtcgttac cgggctggcg ag                                             1102

```

5 <210> 24  
 <211> 904  
 <212> ADN  
 <213> Shigella Flexneri

10 <400> 24



ES 2 473 605 T3

atgactgaaa tcgttgcaga taaaacggta gaagtagtta aaaacgcaat cgaaaccgca 60  
gatggagcat tagatcttta taataaatat ctcgatcagg tcatcccctg gcagaccttt 120  
gatgaaacca taaaagagtt aagtcgcttt aaacaggagt attcacaggc agcctccggt 180  
ttagtcggcg atattaaaac cttacttatg gatagccagg ataagtattt tgaagcaacc 240  
caaacagtgt atgaatgggtg tgggtgtgcg acgcaattgc tcgcagcgta tattttgcta 300  
tttgatgagt acaatgagaa gaaagcatcc gccccctcatt aaggtagctg atgacggcat 360  
cacgaagctg aatgaagcgc aaaattccct gctggtaagc tcacaaagtt tcaacaacgc 420  
ttccgggaaa ctgctggcgt tagatagcca gttaccaat gatttttcag aaaaaagcag 480  
ctatttccag tcacaggtag ataaaatcag gaaggaagcg tatgccgggtg ccgcagccgg 540  
tgtcgtcgcc ggtccatttg gtttaatcat ttcctattct attgctgagg gcgtagttga 600  
agggaaactg attccagaat tgaagaacaa gttaaaatct gtgcagagtt tctttaccac 660  
cctgtctaac acggttaaac aagcgaataa agatatcgat gccgccaaat tgaaattaac 720  
caccgaaata gccgccatcg gggagataaa aacggaaact gaaaccacca gattctatgt 780  
tgattatgat gatttaatgc tttctttgct aaaagcagcg gccaaaaaaaa tgattaacac 840  
ctgtaatgag tatcagaaaa gacacggtaa aaagacactc ttgaggtac ctgaagtctg 900  
ataa 904

- <210> 25
- <211> 1080
- <212> ADN
- <213> Escherichia Coli

<400> 25  
agaaataaag acattgacgc atcccgcccg gctaactatg aattagatga agtaaaattt 60  
attaatagtt gtaaaacagc agtttcatta caatttatat atttaaagag gcgaatgatt 120  
atgactgaaa tcgttgcaga taaaacggta gaagtagtta aaaacgcaat cgaaaccgca 180  
gatggagcat tagatcttta taataaatat ctcgatcagg tcatcccctg gcagaccttt 240  
gatgaaacca taaaagagtt aagtcgcttt aaacaggagt attcacaggc agcctccggt 300  
ttagtcggcg atattaaaac cttacttatg gatagccagg ataagtattt tgaagcaacc 360  
caaacagtgt atgaatgggtg tgggtgtgcg acgcaattgc tcgcagcgta tattttgcta 420

ES 2 473 605 T3

	tttgatgagt acaatgagaa gaaagcatcc gccagaaaag acattctcat taaggactg	480
	gatgacggca tcacgaagct gaatgaagcg caaaaatccc tgctggtaag ctcaaaaagt	540
	ttcaacaacg cttccgggaa actgctggcg ttagatagcc agttaaccaa tgatttttca	600
	gaaaaaagca gctatttcca gtcacaggta gataaaatca ggaaggaagc atatgccggt	660
	gccgcagccg gtgtcgtcgc cggtcattt ggattaatca tttcctattc tattgctgcg	720
	ggcgtagtgt aaggaaaact gattccagaa ttgaagaaca agttaaaatc tgtgcagaat	780
	ttctttacca cctgttctaa cacggttaa caagcgaata aagatatoga tgccgcaaaa	840
	ttgaaattaa ccaccgaaat agccgccatc ggtgagataa aaacggaaac tgaacaacc	900
	agattctacg ttgattatga tgatttaatg ctttctttgc taaaagaagc ggccaaaaaa	960
	atgattaaca cctgtaatga gtatcagaaa agacacggta aaaagacact ctttgaggta	1020
	cctgaagtct gataagcgat tattctctcc atgtactcaa ggtataaggt ttatcacatt	1080
5	<210> 26 <211> 26 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
	<220> <223> cebador PCR sintetizado químicamente	
10	<400> 26	
	cttctccttt actcatgcta gccaca	26
15	<210> 27 <211> 36 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
	<220> <223> cebador PCR sintetizado químicamente	
20	<400> 27	
	aaatggtacc tccaaaataa ggaggaaaa aaaatg	36
25	<210> 28 <211> 40 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
	<220> <223> cebador PCR sintetizado químicamente	
30	<400> 28	
	agctatagca atgacgcggg cgttattaa ggcaaaactga	40
35	<210> 29 <211> 40 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
40	<220> <223> cebador PCR sintetizado químicamente	

ES 2 473 605 T3

<400> 29

tcagtttgcc ttaataaacg cccgcgcat tgctatagct 40

5 <210> 30  
 <211> 881  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>  
 <223> mutante clyA I198N sintetizado químicamente

<400> 30

atgactagta tttttgcgga acagaccgtg gaagtggta aaagcgcgat cgaaaccgcg 60

gatggcgcgt tagatcttta taacaaatat ctggatcagg tgattccgtg gaaaaccttt 120

gatgaaacca ttaaagaact gagccgtttt aacacggaat atagccagga agcgcgcgtg 180

ctggtgggcg atattaaagt gctgctgatg gatagccagg ataaatattt tgaagcgacc 240

cagaccgtgt atgaatggtg cggcgtggtt acccagctgc tgagcgcgta tatcctgctg 300

tttgatgaat ataacgaaaa gaaagcgagc gctcagaaag atattctgat tcgtattctg 360

gatgacggcg tgaaaaaact gaacgaagcg cagaaaagcc tgctgaccag cagccagagc 420

tttaacaatg cgtccgaaa actgctggcg ctggatagcc agctgaccaa cgattttagc 480

gaaaaaagca gctattttca gagccaggtg gatagaattc gtaaagaagc ctatgccggc 540

gctgcagccg gcattgtggc tggcctggtt ggctgatta tcagctatag caatgccgcg 600

ggcgttattg aaggcaaact gattccggaa ctgaataacc gtctgaaaac cgttcagaat 660

ttctttacaa gcttaagcgc gaccgtgaaa caggcgaaca aagatatcga tgcggcaaaa 720

ctgaaactgg cgaccgaaat tgcggctatt ggcgaaatta aaaccgaaac cgaaaccacc 780

cgtttttatg tggattatga tgacctgatg ctgagcctgc tgaaaggcgc ggcaaagaaa 840

atgattaaca cctgcaacga atatcagcag cgtcatggca a 881

15 <210> 31  
 <211> 919  
 <212> ADN

20 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> mutante clyA I198N, A199D, E204K sintetizado químicamente

25 <400> 31

ES 2 473 605 T3

```

atgactagta tttttgcgga acagaccgtg gaagtgggta aaagcgcgat cgaaaccgcg      60
gatggcgcgt tagatcttta taacaaatat ctggatcagg tgattccgtg gaaaaccttt      120
gatgaaacca ttaaagaact gagccgtttt aaacaggaat atagccagga agcgcgagcgtg      180
ctgggtgggcg atattaaagt gctgctgatg gatagccagg ataaatattt tgaagcgacc      240
cagaccgtgt atgaatgggtg cggcgtggtt acccagctgc tgagcgcgta tatcctgctg      300
tttgatgaat ataacgaaaa gaaagcgagc gctcagaaaag atattctgat tcgtattctg      360
gatgacggcg tgaaaaaact gaacgaagcg cagaaaagcc tgctgaccag cagccagagc      420
ttaaacaatg cgtccggaaa actgctggcg ctggatagcc agctgaccaa cgatttttagc      480
gaaaaaagca gctattttca gagccagggtg gatagaattc gtaaagaagc ctatgccggc      540
gctgcagccg gcattgtggc tggccggtt ggccctgatta tcagctatag caatgacgcg      600
ggcgttatta aaggcaaact gattccggaa ctgaataacc gtctgaaaac cgttcagaat      660
ttctttacaa gcttaagcgc gaccgtgaaa caggcgaaca aagatatcga tgcggcaaaa      720
ctgaaactgg cgaccgaaat tgcggctatt ggcgaaatta aaaccgaaac cgaaaccacc      780
cgtttttatg tggattatga tgacctgatg ctgagcctgc tgaaaggcgc ggcaaagaaa      840
atgattaaca cctgcaacga atatcagcag cgtcatggca agaaaacct gtttgaagtg      900
ccggatgtgg ctagcatga                                     919

```

- 5 <210> 32
- <211> 6273
- <212> ADN
- <213> Secuencia Artificial

- 10 <220>
- <223> plásmido sintetizado químicamente que codifica ClyA con codón optimizado, condensado con GFPuv

```

<400> 32
gaattaattc tgtggtagca cagaataatg aaaagtgtgt aaagaagggt aaaaaaacc      60
gaatgcgagg catccggttg aaataggggt aaacagacat tcagaaatga atgacggtaa      120
taaataaagt taatgatgat agcgggagtt attctagtgt cgagtgaagg ttttgttttg      180
acattcagtg ctgtcaaata cttaagaata agttattgat tttaaccttg aattattatt      240

```

ES 2 473 605 T3

gcttgatggt aggtgcttat ttcgccatc cgcaataatc ttaaaaagtt cccttgcat 300  
tacatcttga aacatctata gcgataaatg aaacatctta aaagttttag tatcatattc 360  
gtggttgatt attctgcatt tttggggaga atggacttgc cgactgatta atgagggtta 420  
atcagtatgc agtggcataa aaaagcaaat aaaggcatat aacagatcga tcttaaacat 480  
ccacaggagg atgggatcca aaataaggag gaaaaaaaaa tgactagtat ttttgccgaa 540  
cagaccgtgg aagtgggtaa aagcgcgatc gaaaccgcgg atggcgcggt agatctttat 600  
aacaatatc tggatcaggt gattccgtgg aaaacctttg atgaaacat taaagaactg 660  
agccgtttta aacaggaata tagccaggaa gcgagcgtgc tggtagggcga tattaagtg 720  
ctgctgatgg atagccagga taaatatttt gaagcgacct agaccgtgta tgaatgggct 780  
ggcgtgggta cccagctgct gagcgcgat atcctgctgt ttgatgaata taacgaaaag 840  
aaagcgagcg ctcagaaaga tattctgatt cgtattctgg atgacggcgt gaaaaaactg 900  
aacgaagcgc agaaaagcct gctgaccagc agccagagct ttaacaatgc gtccggaaaa 960  
ctgctggcgc tggatagcca gctgaccaac gatcttagcg aaaaaagcag ctatcttcag 1020  
agccaggtgg atagaattcg taaagaagcc tatgccggcg ctgcagccgg cattgtggct 1080  
ggtccgtttg gcctgattat cagctatagc attgccggcg gcgttattga aggcaaactg 1140  
attccggaac tgaataaccg tctgaaaacc gttcagaatt tctttacaag cttaagecgc 1200  
accgtgaaac aggcgaacaa agatatgat gcggcaaac tgaaactggc gaccgaaatt 1260  
gcggctattg gcgaaattaa aaccgaaacc gaaaccacct gtttttatgt ggattatgat 1320  
gacctgatgc tgagcctgct gaaaggcgcg gcaaaagaaa tgattaacac ctgcaacgaa 1380  
tatcagcagc gtcattggca gaaaaccctg tttgaagtgc cggatgtggc tagctgataa 1440  
cctagcgtcg aactagccc gcctaagtag cgggcttttt tttctcggcc taggagatac 1500  
ttaacaggga agtgagaggg ccgcgcaaa gccgtttttc cataggctcc gccccctga 1560  
caagcatcac gaaatctgac gctcaaatca gtgggtggcga aaccggacag gactataaag 1620  
ataccaggcg tttccccctg gcggctccct cgtgcgctct cctgttctg cctttcgggt 1680  
taccggtgct attccgctgt tatggccgcg tttgtctcat tccacgctg aactcagtt 1740  
ccgggtaggc agttcgctcc aagctggact gtatgcacga acccccgtt cagtccgacc 1800  
gctgcgcctt atccggtaac tatcgtcttg agtccaacct ggaaagacat gcaaaagcac 1860  
cactggcagc agccactggg aattgattta gaggagttag tcttgaagtc atgcgccggt 1920  
taaggctaaa ctgaaaggac aagttttggt gactgcgctc ctccaagcca gttacctcgg 1980

ES 2 473 605 T3

ttcaaagagt	tggtagctca	gagaaccttc	gaaaaaccgc	cctgcaaggc	ggttttttcg	2040
ttttcagagc	aagagattac	gcgcagacca	aaacgatctc	aagaagatca	tcttattaat	2100
cagataaaat	atctctagga	tctaaaacac	taggccaag	agtttgtaga	aacgcaaaaa	2160
ggccatccgt	caggatggcc	ttctgcttaa	tttgatgcct	ggcagtttat	ggcgggcgtc	2220
ctgcccgcc	ccctccgggc	cgttgcttgc	caacgttcaa	atccgctccc	ggcggatttg	2280
tctactcag	gagagcgctc	accgacaac	aacagataaa	acgaaaggcc	cagtctttcg	2340
actgagcctt	tcgttttatt	tgatgcctgg	cagttcccta	ctctcgcatg	gggagacccc	2400
acactacat	cggcgctacg	gcgtttcact	tctgagttcg	gcatggggtc	aggtgggacc	2460
accgcgctac	tgccgccagg	caaattctgt	tttatcagac	cgcttctgcg	ttctgattta	2520
atctgtatca	ggctgaaaat	cttctctcat	ccgcaaac	agccaagctg	gatctggcaa	2580
atcgctgaat	attccttttg	tctccgacca	tcaggcacct	gagtcgctgt	ctttttcgtg	2640
acattcagtt	cgctgcgctc	acggctctgg	cagtgaatgg	gggtaaattg	cactacaggc	2700
gccttttatg	gattcatgca	aggaaactac	ccataataca	agaaaagccc	gtcacgggct	2760
tctcagggcg	ttttatggcg	ggtctgctat	gtggtgctat	ctgacttttt	gctgttcagc	2820
agttcctgcc	ctctgatttt	ccagtctgac	cacttcggat	tatcccgtga	caggtcattc	2880
agactggcta	atgcacccag	taaggcagcg	gtatcatcaa	caggcttacc	cgtcttactg	2940
tcaaccggat	ctaaaacact	agcccaacct	ttcatagaag	gcggcgggtg	aatcgaaatc	3000
tcgtgatggc	aggttgggcg	tcgcttggtc	ggtcatttcg	aaccccagag	tcccgcctcag	3060
aagaactcgt	caagaaggcg	atagaaggcg	atgcgctgcg	aatcgggagc	ggcgataccg	3120
taaagcacga	ggaagcggtc	agcccatctg	ccgccaagct	cttcagcaat	atcacgggta	3180
gccaacgcta	tgtcctgata	gcggtccgcc	acaccagcc	ggccacagtc	gatgaatcca	3240
gaaaagcggc	cattttccac	catgatattc	ggcaagcagg	catcgccatg	ggtcacgacg	3300
agatcctcgc	cgtcgggcat	gcgcgcttgc	agcctggcga	acagttcggc	tggcgcgagc	3360
ccctgatget	cttcgtccag	atcatcctga	tcgacaagac	cggcttccat	ccgagtacgt	3420
gctcgctcga	tgcgatgttt	cgcttggtgg	tcgaatgggc	aggtagccgg	atcaagcgta	3480
tgacgccgcc	gcattgcatc	agccatgatg	gatactttct	cggcaggagc	aaggtgagat	3540
gacaggagat	cctgccccgg	cacttcgccc	aatagcagcc	agtcccttcc	cgcttcagtg	3600
acaacgtoga	gcacagctgc	gcaaggaacg	cccgtcgtgg	ccagccacga	tagccgcgct	3660

ES 2 473 605 T3

gcctcgtcct gcagttcatt cagggcaccg gacaggtcgg tcttgacaaa aagaaccggg 3720  
cgccctgcg ctgacagccg gaacacggcg gcatcagagc agccgattgt ctggttgccc 3780  
cagtcatagc cgaatagcct ctccacccaa gcggccggag aacctgctg caatccatct 3840  
tgttcaatca tgcgaaacga tctcctcct gtctcttgat cagatcttga tcccctgccc 3900  
catcagatcc ttggcggcaa gaaagccatc cagtttactt tgcagggctt cccaacctta 3960  
ccagagggcg cccagccgt ggcaattccg gttcgtgct agacaacatc agcaaggaga 4020  
aaggggctac cggcgaacca gcagcccctt tataaaggcg cttcagtagt cagaccagca 4080  
tcagtctga aaaggcggc ctgcgccgc ctccaggtg ctacttaccg gattcgtgaag 4140  
ccatgaaagc cgccacctcc ctgtgtccgt ctctgtaacg aatctcgcac agcgattttc 4200  
gtgtcagata agtgaatata aacagtgtga gacacacgat caacacacac cagacaaggg 4260  
aacttcgtgg tagtttcatg gccttcttct ccttgccgaa agcgcggtaa gaggctatcc 4320  
tgatgtggac tagacatagg gatgcctcgt ggtggtaat gaaaattaac ttactacggg 4380  
gctatcttct ttctgccaca caacacggca acaaccacc ttcacgcat gaggcagaaa 4440  
gcctcaagcg cggggcacat catagcccat atacctgac gctgaccaca ctcactttcc 4500  
ctgaaaataa tccgctcatt cagaccgttc acgggaaatc cgtgtgattg ttgccgcatc 4560  
acgctgcctc cgggagttg tctcgagcac ttttgttacc cgccaaaca aacccaaaaa 4620  
caaccatac ccaaccat aaacaccaa aacaagaca ataatcattg attgatggtt 4680  
gaaatgggg aaacttgaca acaaaccca cttaaaacc aaaacatacc caaacacaca 4740  
ccaaaaaac accataagga gttttataaa tgttggtatt cattgatgac ggttcaacaa 4800  
acatcaaact acagtggcag gaaagcgagc gaacaattaa acagcacatt agcccgaaca 4860  
gcttcaaacg cgagtgggca gtctctttt gtgataaaaa ggtctttaac tacacactga 4920  
acggcgaaca gtattcatt gatccaatca gcccgatgc tgtagtcaca accaatatcg 4980  
catggcaata cagcgacgtt aatgtcgtt cagtgcata cgccttactg accagtggtc 5040  
tgccggaag cgaagtggat attgtttgca cacttctct gacagagtat tacgacagaa 5100  
ataaccaacc caatacggaa aatattgagc gtaagaaagc aaacttccg aaaaaatta 5160  
cattaaatgg cgggatata ttcacaataa aagatgtaa agtcatgcct gaatctatac 5220  
cggcaggta tgaagttcta caagaactgg atgagttaga ttctttatta attatagatc 5280  
tcgggggac cacattagat atttctcagg taatggggaa attatcggg atcagtaaaa 5340  
tatacggaga ctcatctctt ggtgtctctc tggttacatc tgcagtaaaa gatgcccttt 5400

ES 2 473 605 T3

```

ctcttgcgag aacaaaagga agtagctatc ttgctgacga tataatcatt cacagaaaag 5460
ataataacta tctgaagcaa cgaattaatg atgagaacaa aatatcaata gtcaccgaag 5520
caatgaatga agcacttcgt aaacttgagc aacgtgtatt aaatacgctc aatgaatfff 5580
ctggttatac tcatgttatg gttataggcg gtggcgcaga attaatatgc gatgcagtaa 5640
aaaaacacac acagattcgt gatgaacggt ttttcaaac caataactct caatatgatt 5700
tagttaacgg tatgtatctc ataggtaatt aatgatggac aagcgcagaa ccattgcctt 5760
caactaaat ccagatgtaa atcaaacaga taaaattggt tgtgatacac tggacagtat 5820
cccgaaggg gaacgaagcc gccttaaccg ggccgcactg acggcaggtc tggccttata 5880
cagacaagat ccccggaacc ctttcctttt atgtgagctg ctgacgaaag aaaccacatt 5940
ttcagatata gtgaatatat tgagatcgtc atttcacaaa gagatggccg attttaattc 6000
ttcaatagtc actcaatcct cttcacaaca agagcaaaaa agtgatgaag agaccacaaa 6060
aatgctgatg aagctaataa attaattcaa ttattattga gttcccttta tccactatca 6120
ggctggataa agggaactca atcaagttat tttcttacca gtcattacat aatcgttatt 6180
atgaaataat cgtttgcact gtctctgta ttcaggcaat ttcaataaag gcacttgctc 6240
acgctctgctc attttctgaa actcttcatg ctg 6273

```

- 5 <210> 33
- <211> 909
- <212> ADN
- <213> Secuencia Artificial

- 10 <220>
- <223> secuencia de polinucleótidos de S. Typhi clyA con codón optimizado sintetizada químicamente
- <400> 33

```

atgactagta tttttgcgga acagaccgtg gaagtgggta aaagcgcgat cgaaaccgcg 60
gatggcgcgt tagatcttta taacaaatat ctggatcagg tgattccgtg gaaaaccttt 120
gatgaaacca ttaaagaact gagccgtttt aacaggaat atagccagga agcgcgctg 180
ctgggtggcg atattaaagt gctgctgatg gatagccagg ataaatattt tgaagcgacc 240
cagaccgtgt atgaatgggt cggcgtggtt acccagctgc tgagcgcgta tatcctgctg 300
tttgatgaat ataacgaaaa gaaagcgagc gctcagaaag atattctgat tcgtattctg 360
gatgacggcg tgaaaaaact gaacgaagcg cagaaaagcc tgctgaccag cagccagagc 420
tttaacaatg cgtccggaaa actgctggcg ctggatagcc agctgaccaa cgattttagc 480

```



ES 2 473 605 T3

	gaaaaaagca gctatatttca gagccagggtg gatagaattc gtaaagaagc ctatgccggc	540
	gctgcagccg gcattgtggc tggccggtt ggccctgatta tcagctatag cattgccgcg	600
	ggcgttattg aaggcaaact gattccggaa ctgaataacc gtctgaaaac cgttcagaat	660
	ttctttaca gcttaagcgc gaccgtgaaa caggcgaaca aagatatcga tgcggcaaaa	720
	ctgaaactgg cgaccgaaat tgcggctatt ggcgaaatta aaaccgaaac cgaaaccacc	780
	cgtttttatg tggattatga tgacctgatg ctgagcctgc tgaaaggcgc ggcaaagaaa	840
	atgattaaca cctgcaacga atatcagcag cgtcatggca agaaaacct gtttgaagtg	900
	ccggatgtg	909
5	<210> 34 <211> 36 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
10	<220> <223> cebador PCR sintetizado químicamente	
	<400> 34 tatttcctat tctaattgctg cggcgctgat tgaagg	36
15	<210> 35 <211> 36 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
20	<220> <223> cebador PCR sintetizado químicamente	
	<400> 35 ccttcaatca cgcccgcagc attagaatag gaaata	36
25	<210> 36 <211> 37 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
30	<220> <223> cebador PCR sintetizado químicamente	
	<400> 36 tgattaacac ctggaatgaa taccaacaac gtcatgg	37
35	<210> 37 <211> 37 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
40	<220> <223> cebador PCR sintetizado químicamente	
45	<400> 37 ccatgacggtt gttggtattc attccagggtg ttaatca	37

ES 2 473 605 T3

	<210>	38		
	<211>	96		
	<212>	ADN		
	<213>	Secuencia Artificial		
5	<220>			
	<223>	cebador PCR sintetizado químicamente		
	<400>	38		
10			tctagagaag ttcctattct atatatagta taggaacttc gctagctcat gtttgacagc	60
			ttatcatcga taagctttaa tgcggtagtt tatcac	96
	<210>	39		
	<211>	97		
15	<212>	ADN		
	<213>	Secuencia Artificial		
	<220>			
20	<223>	cebador PCR sintetizado químicamente		
	<400>	39		
			tctagagaag ttcctatact atatatagaa taggaacttc gctagcctat caggtcgagg	60
			tggcccggct ccatgcaccg cgacgcaacg cggggag	97
	<210>	40		
25	<211>	1368		
	<212>	ADN		
	<213>	Secuencia Artificial		
	<220>			
30	<223>	casete FRT-tetA-FRT Xba I-Not I sintetizado químicamente		
	<400>	40		
			tctagagaag ttcctattct atatatagta taggaacttc gctagctcat gtttgacagc	60
			ttatcatcga taagctttaa tgcggtagtt tatcacagtt aaattgctaa cgcagtcagg	120
			caccgtgtat gaaatctaac aatgcgctca tcgtcatcct cggcaccgtc accctggatg	180
			ctgtaggcat aggcttggtt atgccggtac tgcgggcct cttgcgggat atcgccatt	240
			cgcacagcat cgccagtcac tatggcgtgc tgctagcgct atatgcgttg atgcaatttc	300
			tatgcgacc cgttctcgga gcactgtccg accgcttgg ccgccgcca gt.cctgctcg	360

ES 2 473 605 T3

cttcgctact tggagccact atcgactacg cgatcatggc gaccacaccc gtcctgtgga 420  
 tcctctacgc cggacgcatac gtggccggca tcaccggcgc cacaggtgcg gttgctggcg 480  
 cctatatcgc cgacatcacc gatggggaag atcgggctcg ccacttcggg ctcatgagcg 540  
 cttgtttcgg cgtgggtatg gtggcaggcc ccgtggccgg gggactggtg ggcgccatct 600  
 cettgcatgc accattcctt gcggcggcgg tgctcaacgg cctcaaccta ctactgggct 660  
 gcttcctaat gcaggagtcg cataaggag agcgtcgacc gatgcccttg agagccttca 720  
 acccagtcag ctctctccgg tgggcgcggg gcatgactat cgtcgccgca cttatgactg 780  
 tcttctttat catgcaactc gtaggacagg tgccggcagc gctctgggtc attttcggcg 840  
 aggaccgctt tcgctggagc gcgacgatga tcggcctgtc gcttgccgga ttcggaatct 900  
 tgcacgccct cgctcaagcc ttcgtcactg gtcccgccac caaacgtttc ggcgagaagc 960  
 aggccattat cgccggcatg gcggccgacg cgctgggcta cgtcttgctg gcgttcgca 1020  
 cgcgaggctg gatggccttc cccattatga ttcttctcgc ttccggcggc atcgggatgc 1080  
 ccgcgttgca ggccatgctg tccaggcagg tagatgacga ccatcagga cagcttcaag 1140  
 gatcgctcgc ggctcttacc agcctaactt cgatcactgg accgctgac gtcacggcga 1200  
 tttatgccgc ctccggcagc acatggaacg ggttgcatg gattgtaggc gccgcctat 1260  
 accttgtctg cctccccgcg ttgcgtcgcg gtgcatggag ccgggccacc tcgacctgat 1320  
 aggctagcga agttcctatt ctatatatag tataggaact tctctaga 1368

<210> 41  
 <211> 6979  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

5

<220>  
 <223> Plásmido de expresión pGEN222SXbal

10

<400> 41  
 gaattctgtg gtagcacaga ataatgaaaa gtgtgtaaag aagggtaaaa aaaaccgaat 60  
 gcgaggcatc cgggtgaaat aggggtaaac agacattcag aatgaaatga cggtaataaa 120  
 taaagttaat gatgatagcg ggagttattc tagttgcgag tgaaggtttt gttttgacat 180  
 tcagtgtctg caaataacta agaataagtt attgatttta accttgaatt attattgctt 240  
 gatgttaggt gcttatttcg ccattccgca ataattctaa aaagttccct tgcatttaca 300  
 ttttgaaaca tctatagcga taaatgaaac atcttaaaag ttttagtata atattcgtgt 360

ES 2 473 605 T3

tggattat	tc	gattttt	g	gggagaat	g	acttgccg	ac	tgattaat	ga	ggg	gtaata	ca	420
gtatgcag	tg	gcataaaaa	g	caaataa	ag	gcatata	aaca	gatcgat	cctt	aa	acatcc	ac	480
aggaggat	at	ctgatgag	ta	aaggaga	aga	actttt	cact	ggagtt	gtcc	ca	attctt	gt	540
tgaattag	at	ggtgat	gtta	atgggc	acaa	attttct	gtc	agtggag	agg	gt	gaag	gtga	600
tgcaacata	c	ggaaaact	ta	cccttaa	aatt	tatttgc	act	actggaaa	ac	tac	ctgt	tcc	660
atggcca	aca	cttgtc	acta	ctttct	ctta	tgg	gttcaa	tgctttt	ccc	gt	tatcc	gga	720
tcatatg	aaa	cggcat	gact	ttttca	agag	tgccat	gccc	gaagg	ttag	tac	agga	acg	780
cactatat	ct	ttcaa	agat	acggga	acta	caagac	gcgt	gctga	agtca	ag	tttga	aagg	840
tgatacc	cctt	gttaat	cgta	tcgag	ttaa	aggtatt	gat	tttaa	aga	ag	atgg	aa	900
tctcgg	acac	aaactc	gagt	acaact	ataa	ctcac	acaat	gtata	cat	ca	cgg	cag	960
acaaa	agaat	ggaat	caaag	ctaact	tcaa	aattc	gccac	aacatt	gaag	at	ggat	ccgt	1020
tcaact	agca	gaccatt	atc	aacaaa	atac	tccaatt	ggc	gatgg	ccctg	tc	cttt	tacc	1080
agaca	ac	tac	ctgtc	ga	cacaat	ctgc	cctttc	gaaa	gatccc	aacg	aaa	agc	1140
ccacat	ggtc	cttctt	gagt	ttgta	actgc	tgctgg	gatt	acacat	ggca	tgg	atg	agct	1200
ctacaa	ataa	tgagct	tagcc	cgcta	atga	gcggg	ctttt	ttttct	cgcc	ctag	gag	ata	1260
cttaac	aggg	aagt	gagag	gccgc	ggcaa	agccg	ttttt	ccatag	gctc	cg	cccc	ccctg	1320
acaag	catca	cgaaat	ctga	cgctc	aaatc	agtgg	tggcg	aaaccc	gaca	gg	actata	aaa	1380
gatacc	aggc	gtttccc	ct	ggcg	ctccc	tcgtg	cgctc	tcctg	ttcct	gc	ctttc	gggt	1440
ttacc	ggtgt	cattcc	gctgt	ttatg	gccgc	gtttg	tctca	ttccac	gcct	gac	actc	ag	1500
tc	cggttag	cagttc	gctc	caagct	ggac	tgtat	gcacg	aa	cccccc	ct	tcag	tccg	1560
cgctg	cgct	tatcc	ggtaa	ctatc	gtctt	gagtc	caacc	cg	gaaag	aca	tg	caaaa	1620
ccact	ggcag	cagcc	actgg	taatt	gattt	agagg	ag	gtc	ttga	agt	catg	cgccg	1680
ttaag	gctaa	actg	aaagga	caag	ttttg	tgact	gcgct	cctc	caag	cc	ag	ttac	1740
gttca	aagag	ttggt	agctc	agaga	ac	ctt	cg	aaaa	accg	ccctg	caag	cg	1800
gtttc	agag	caag	agatta	cg	cg	cagacc	aaa	ac	gatct	ca	aga	agatc	1860
tcagata	aaa	tattt	ctag	atc	t	aaa	aca	ctag	g	ccca	gag	ttt	1920
aggcc	atccg	tcag	gatgg	cttct	gctta	at	ttgat	gcc	tg	gcag	ttta	tg	1980
cctg	cccgc	accct	ccggg	ccg	ttg	cttc	gca	ac	gttca	aat	ccg	ctcc	2040
gtc	ctactca	ggag	agcgtt	cacc	g	acaaa	caac	agata	aa	c	gaa	aggc	2100

ES 2 473 605 T3

gactgagcct ttcgttttat ttgatgacct gcagttccct actctcgcac ggggagaccc 2160  
cacactacca tcggcgctac ggcgtttcac ttctgagttc ggcatggggt caggtgggac 2220  
caccgcgcta ctgccgccag gcaaattctg ttttatcaga ccgcttctgc gttctgattt 2280  
aatctgtatc aggctgaaaa tcttctctca tccgccaaaa cagccaagct ggatctggca 2340  
aatcgctgaa tattcctttt gtctccgacc atcaggcacc tgagtcgctg tctttttcgt 2400  
gacattcagt tcgctgcgct cacggctctg gcagtgaatg ggggtaaagt gcactacagg 2460  
cgccttttat ggattcatgc aaggaaacta ccataatac aagaaaagcc cgtcacgggc 2520  
ttctcagggc gttttatggc gggctctgcta tgtggtgcta tctgactttt tgctgttcag 2580  
cagttcctgc cctctgattt tccagtctga ccacttcgga ttatcccgtg acaggtcatt 2640  
cagaactggc aatgcaccca gtaaggcagc ggtatcatca acaggcttac ccgtcttact 2700  
gtcaaccgga tctaaaacac tagctctagc tattgtttta atgacaaac agaacggaat 2760  
gtcatcatca aagtccatcg gcggctcggt agacggcgct gccggagcgg actgctgcgg 2820  
gcgagactgc gcgccgccgc tgaactgatt gccaccctgc ggctgctgag gctgacccca 2880  
accgccctgc ggctgaccac caccgatatt gccaccctgc ggagcgccac caccctgacg 2940  
accaccagc atctgcatgg tgccgccaac gttcaccacg acttctgtgg tgtagcgatc 3000  
ctgaccggat tgatcggtcc atttacgggt acgcagctga ccttcgatat aaacctgaga 3060  
acctttaogc agatattcgc tcgccacttc tgccagtttg ccgaacagca caacgcgggtg 3120  
ccattcagtc tgttctttca tctcgcgggt cgctttatca cgccaggatt cggaagtagc 3180  
cagcgtaatg ttggcaactg cgccaccatt tggcatgtag cgtacttccg ggtcctgacc 3240  
cagattacca acgagaataa ccttgtttac gcctctgctg gccatgttcg tgtctcctga 3300  
aaaaaatcgt tctgaataag tgtaaacgcg cgattgtacc attaccaata gcgcttttac 3360  
tatgttgtga cctcggttcc gggaaacaaa cctggccaga cattgttaca caacactccg 3420  
gataatgcat tccaatactg tatattcatt caggtcaatc atatgaaggc cgaattctgc 3480  
agatatccat cacactggcg gccgctcgag catgcatcta gactcgagta agggattttg 3540  
gtcatgagat tatcaaaaag gatcttcacc tagatccttt taaattaaat atgaagtttt 3600  
aatcaatct aaagtatata tgagtaaact tggctctgaca gttaccaatg cttaatcagt 3660  
gaggcaccta tctcagcgat ctgtctatct cgttcatcca tagttgcctg actccccgtc 3720  
gtgtagataa ctacgatagc ggagggctta ccatctggcc ccagtgcctgc aatgataacc 3780

ES 2 473 605 T3

cgagacccac gctcaccggc tccagattta tcagcaataa accagccagc cggaagggcc 3840  
 gagcgcagaa gtggtcctgc aactttatcc gcctccatcc agtctattaa ttgttgccgg 3900  
 gaagctagag taagtagttc gccagttaat agtttgcgca acgttgttgc cattgctaca 3960  
 ggcatcgtgg tgtcacgctc gtcgtttggg atggcttcat tcagctccgg ttcccaacga 4020  
 tcaaggcgag ttacatgatc ccccatgttg tgcaaaaaag cggttagctc cttcggtcct 4080  
 ccgatcgttg tcagaagtaa gttggccgca gtgttatcac tcatggttat ggcagcactg 4140  
 cataattctc ttactgtcat gccatccgta agatgctttt ctgtgactgg tgagtactca 4200  
 accaagtcac tctgagaata gtgtatgctg cgaccgagtt gctcttgccc ggcgtcaaca 4260  
 cgggataata ccgcgccaca tagcagaact ttaaaagtgc tcatcattgg aaaacgttct 4320  
 tcggggcgaa aactctcaag gatcttaccg ctgttgagat ccagttcgat gtaacccact 4380  
 cgtgcacca actgatcttc agcatctttt actttcacca gcgtttctgg gtgagcaaaa 4440  
 acaggaaggc aaaatgccgc aaaaaagga ataagggcga cacggaaatg ttgaatactc 4500  
 atactcttcc tttttcaata ttattgaagc atttatcagg gttattgtct catgagcggg 4560  
 tacatatttg aatgtattta gaaaaataaa caaatagggg ttccgcgcac atttccccga 4620  
 aaagtgccac ctgacgtcta agaaaccatt attatcatga cattaaccta taaaaatagg 4680  
 cgtatcacga ggccctttcg tctgctagac aacatcagca aggagaaagg ggctaccggc 4740  
 gaaccagcag cccctttata aaggcgcttc agtagtcaga ccagcatcag tctgaaaag 4800  
 gcgggcctgc gcccgctcc aggttgctac ttaccggatt cgtaagccat gaaagccgcc 4860  
 acctccctgt gtccgtctct gtaacgaatc tcgcacagcg atttctgtgt cagataagtg 4920  
 aatatcaaca gtgtgagaca cacgatcaac acacaccaga caagggaaact tcgtggtagt 4980  
 tcatggcct tcttctcctt gcgcaaagcg cggtaagagg ctatcctgat gtggactaga 5040  
 catagggatg cctcgtggtg gttaatgaaa attaacttac tacggggcta tcttctttct 5100  
 gccacacaac acggcaaca accaccttca cgtcatgagg cagaaagcct caagcgcgg 5160  
 gcacatcata gcccatatac ctgcacgctg accacactca ctttccctga aaataatccg 5220  
 ctcatcaga ccgttcacgg gaaatccgtg tgattgttgc cgcacacgc tgccctccgg 5280  
 agtttgtctc tagaactttt gttaccggcc aaacaaaacc caaaaacaac ccatacccaa 5340  
 cccaataaaa caccaaaaaca agacaaataa tcattgattg atggttgaaa tggggtaaac 5400  
 ttgacaaaca aaccactta aaacccaaaa catacccaaa cacacacca aaaaacacca 5460  
 taaggagttt tataaatggt ggtattcatt gatgacgggt caacaaacat caaactacag 5520

ES 2 473 605 T3

tggcaggaaa ggcacggaac aattaaacag cacattagcc cgaacagctt caaacgcgag	5580
tgggcagtct cttttggtga taaaaaggtc ttaactaca cactgaacgg cgaacagtat	5640
tcatttgatc caatcagccc ggatgctgta gtcacaacca atatcgcatg gcaatacagc	5700
gacgttaatg tcgttgcaat gcatcacgcc ttactgacca gtggctctgcc ggtaagcgaa	5760
gtggatattg tttgcacact tcctctgaca gagtattacg acagaaataa ccaacccaat	5820
acggaaaata ttgagcgtaa gaaagcaaac ttccggaaaa aaattacatt aaatggcggg	5880
gatacattca caataaaaga tgtaaaagtc atgcctgaat ctataccggc aggttatgaa	5940
gttctacaag aactggatga gttagattct ttattaatta tagatctcgg gggcaccaca	6000
ttagatattt ctcaggtaat ggggaaatta tcggggatca gtaaaatata cgggagactca	6060
tctcttggtg tctctctggt tacatctgca gtaaaagatg ccctttctct tgcgagaaca	6120
aaaggaagta gctatcttgc tgacgatata atcattcaca gaaaagataa taactatctg	6180
aagcaacgaa ttaatgatga gaacaaaata tcaatagtca ccgaagcaat gaatgaagca	6240
cttcgtaaac ttgagcaacg tgtattaat acgctcaatg aattttctgg ttatactcat	6300
gttatggtta taggcgggtg cgcagaatta atatgcatg cagtaaaaaa acacacacag	6360
atcgtgatg aacgtttttt caaaaccaat aactctcaat atgatttagt taacggtatg	6420
tatctcatag gtaattaatg atggacaagc gcagaacat tgccttcaa ctaaatccag	6480
atgtaaatca aacagataaa attgtttggt atacactgga cagtatcccg caaggggaac	6540
gaagccgct taaccgggcc gcaactgacgg caggtctggc cttatacaga caagatcccc	6600
ggacccctt ccttttatgt gagctgctga cgaaagaaac cacattttca gatatcgtga	6660
atatattgag atcgctattt caaaagaga tggccgattt taattcttca atagtcactc	6720
aatcctcttc acaacaagag caaaaaagtg atgaagagac caaaaaaat gcgatgaagc	6780
taataaatta attcaattat tattgagttc cctttatcca ctatcaggct ggataaaggg	6840
aactcaatca agttattttc ttaccagtca ttacataatc gttattatga aataatcgtt	6900
tgcaactgtc ctgttattca ggcaatttca ataaaggcac ttgctcacgc tctgtcattt	6960
tctgaaactc ttcattgctg	6979

**REIVINDICACIONES**

- 1.- Un método para producir una proteína de fusión, que comprende:
  - 5 (a) transformar una población de bacterias con un vector de expresión que codifica una proteína de fusión, en el que dicha proteína de fusión comprende una proteína de interés unida al extremo carboxi-terminal de una proteína de exportación, en el que dicha proteína de exportación es una proteína citolisina A (ClyA) de *Salmonella enterica* serovar *Typhi* (*S. Typhi*) que tiene una actividad hemolítica sustancialmente reducida en comparación con la proteína ClyA de SEQ ID NO:2, teniendo dicha proteína de exportación la secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO:2 y teniendo una mutación seleccionada del grupo que consiste en una mutación S195N, una mutación I198N, una mutación A199D, una mutación E204K y una mutación C285W, y
  - 10 (b) cultivar las bacterias transformadas de (a) en un medio de cultivo bajo condiciones en las que dicha proteína de fusión se expresa y se exporta hacia el medio de cultivo.
- 2.- Una población de bacterias para su uso para inducir una respuesta inmunológica contra una proteína de fusión en un sujeto, en la que dicha población de bacterias produce y exporta una proteína de fusión en una cantidad suficiente para inducir una respuesta inmunológica en dicho sujeto contra dicha proteína de fusión, en la que dichas bacterias comprenden un vector de expresión que codifica dicha proteína de fusión, en la que dicha proteína de fusión comprende una proteína de interés unida al extremo carboxi-terminal de una proteína de exportación, y en la que dicha proteína de exportación es una proteína citolisina A (ClyA) de *Salmonella enterica* serovar *Typhi* (*S. Typhi*) que tiene una actividad hemolítica sustancialmente reducida en comparación con la proteína ClyA de SEQ ID NO:2, teniendo dicha proteína de exportación la secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO:2 y teniendo una mutación seleccionada del grupo que consiste en una mutación S195N, una mutación I198N, una mutación A199D, una mutación E204K y una mutación C285W.
- 3.- Un vector de expresión que comprende un módulo de expresión, en el que el módulo de expresión comprende una secuencia codificadora de una proteína de exportación unida a una secuencia codificadora de una proteína de interés en una disposición 5' a 3', en el que dicha proteína de exportación es una proteína citolisina A (ClyA) de *Salmonella enterica* serovar *Typhi* (*S. Typhi*) que tiene una actividad hemolítica sustancialmente reducida en comparación con la proteína ClyA de SEQ ID NO:2, teniendo dicha proteína de exportación la secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO:2 y teniendo una mutación seleccionada del grupo que consiste en una mutación S195N, una mutación I198N, una mutación A199D, una mutación E204K y una mutación C285W.
- 4.- El método de la reivindicación 1 o la población de bacterias para su uso para inducir una respuesta inmunológica de la reivindicación 2, en el que dicha bacteria se selecciona del grupo que consiste en *Salmonella* spp., *Vibrio* spp. *Escherichia* spp. y *Shigella* spp.
- 5.- El método o la población de bacterias para su uso para inducir una respuesta inmunológica de la reivindicación 4, en el que dicha bacteria se selecciona del grupo que consiste en *S. Typhi*, *E. coli*, *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC) y *Shigella flexneri* 2a.
- 6.- El método, la población de bacterias para su uso para inducir una respuesta inmunológica o el vector de expresión de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la proteína de interés es un antígeno.
- 7.- El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1, 4, 5 y 6, que comprende además recoger dicha proteína de fusión desde el medio de cultivo.
- 8.- El método, la población de bacterias para su uso para inducir una respuesta inmunológica o el vector de expresión de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que la proteína citolisina A (ClyA) de *S. Typhi* tiene la secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO:2 y tiene una mutación C285W, y otra mutación seleccionada del grupo que consiste en una mutación I198N, una mutación A199D, y una mutación E204K.
- 9.- El método, la población de bacterias para su uso para inducir una respuesta inmunológica o el vector de expresión de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que la proteína citolisina A (ClyA) de *S. Typhi* tiene la secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO:2 y tiene una mutación I198N, una mutación A199D, y una mutación E204K.
- 10.- El método, la población de bacterias para su uso para inducir una respuesta inmunológica o el vector de expresión de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que la proteína citolisina A (ClyA) de *S. Typhi* tiene la secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO:2 y tiene una mutación I198N y una mutación C285W.
- 11.- El método, la población de bacterias para su uso para inducir una respuesta inmunológica o el vector de expresión de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que la proteína citolisina A (ClyA) de *S. Typhi* tiene la secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO:2, y en el que la proteína de interés es la proteína de la toxina del ántrax PA83.



12.- La población de bacterias para su uso para para inducir una respuesta inmunológica de una cualquiera de las reivindicaciones 2, 4 a 6 y 8 a 11, en la que dicho sujeto es un animal.

13.- La población de bacterias para su uso para para inducir una respuesta inmunológica de la reivindicación 12, en el que dicho sujeto es un ser humano.

Figura 1

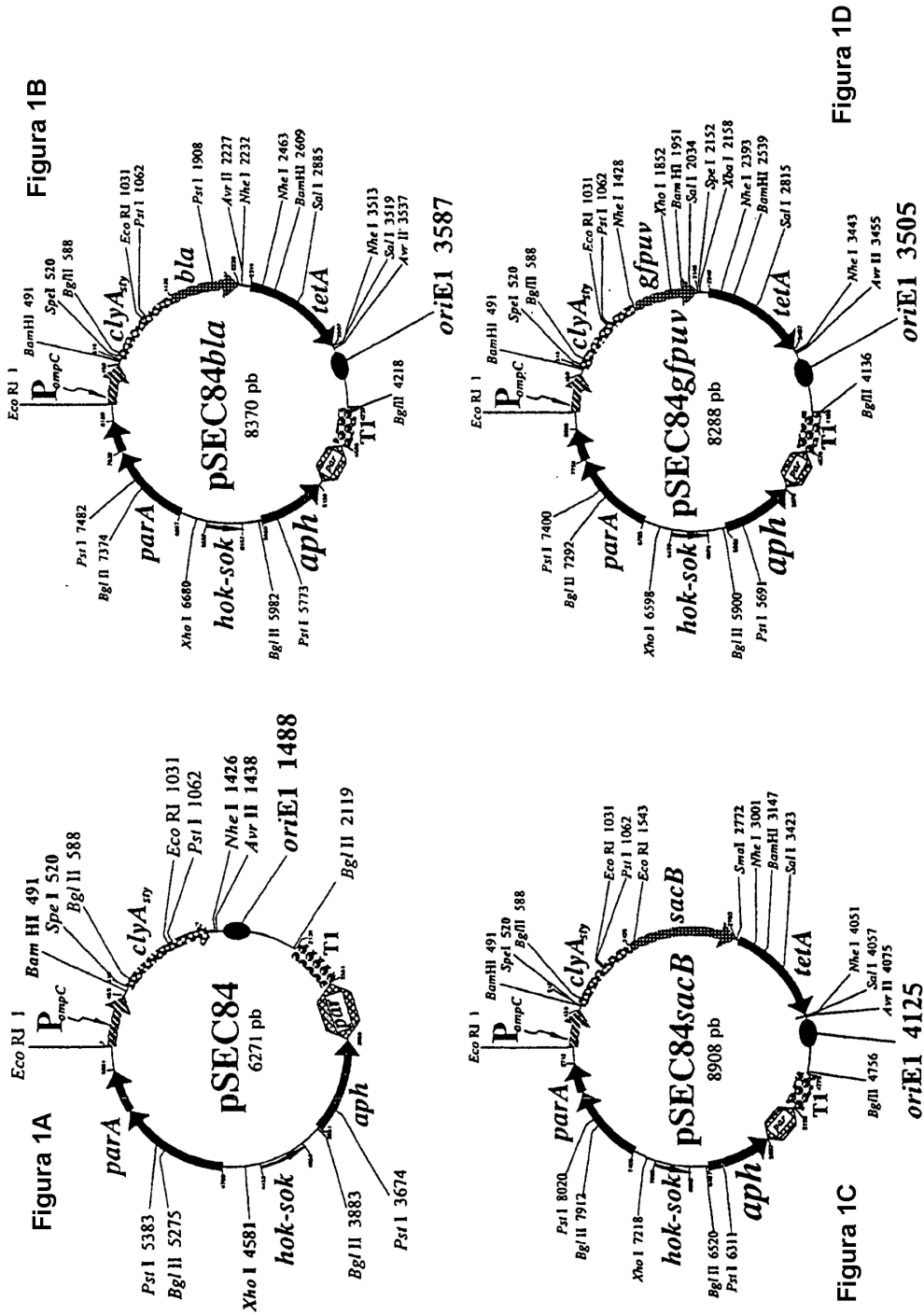
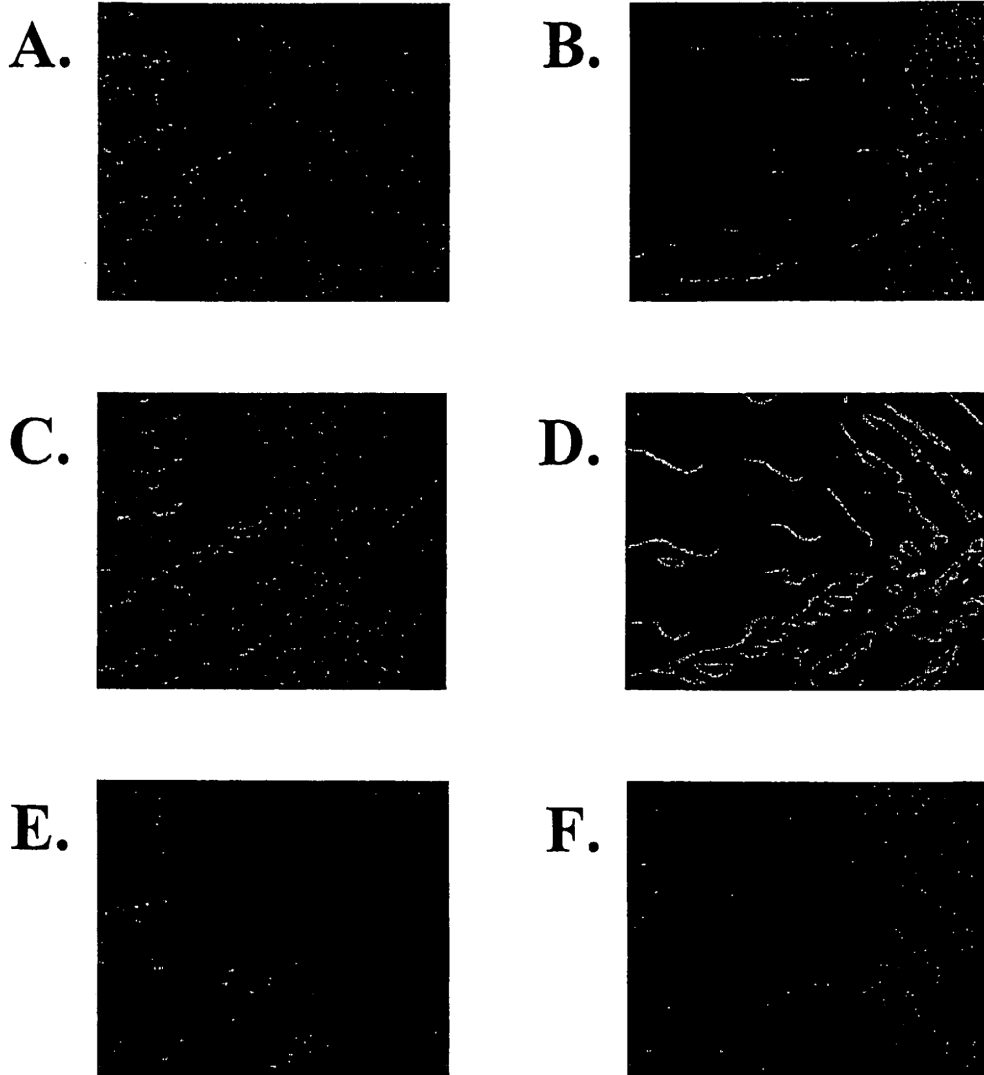


Figura 2



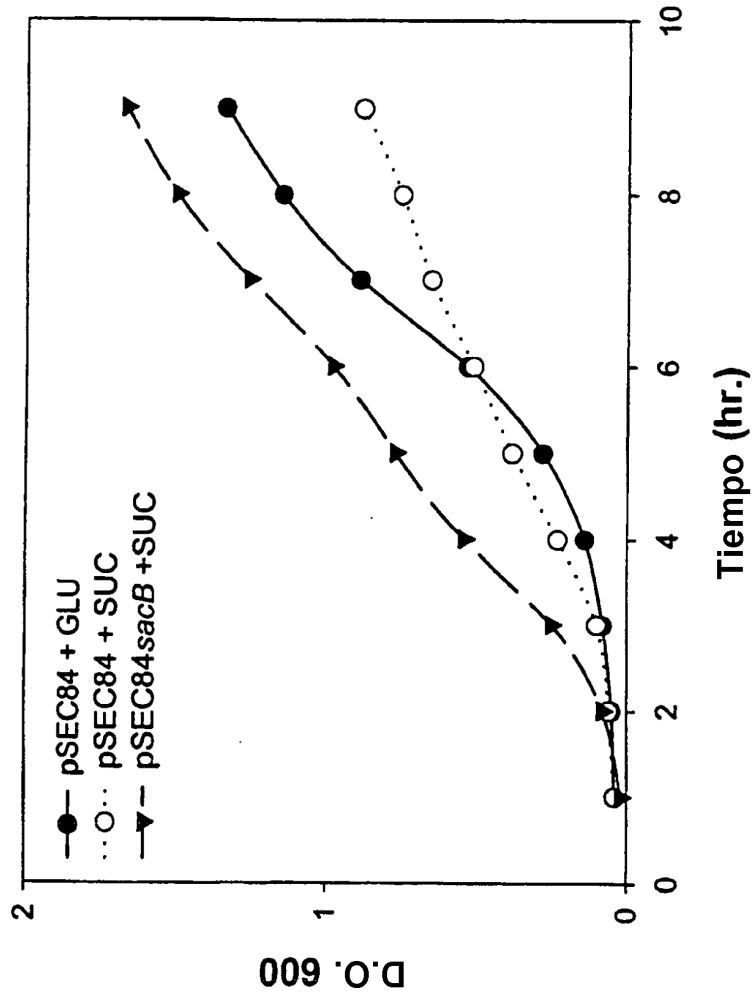


Figura 3

Figura 4

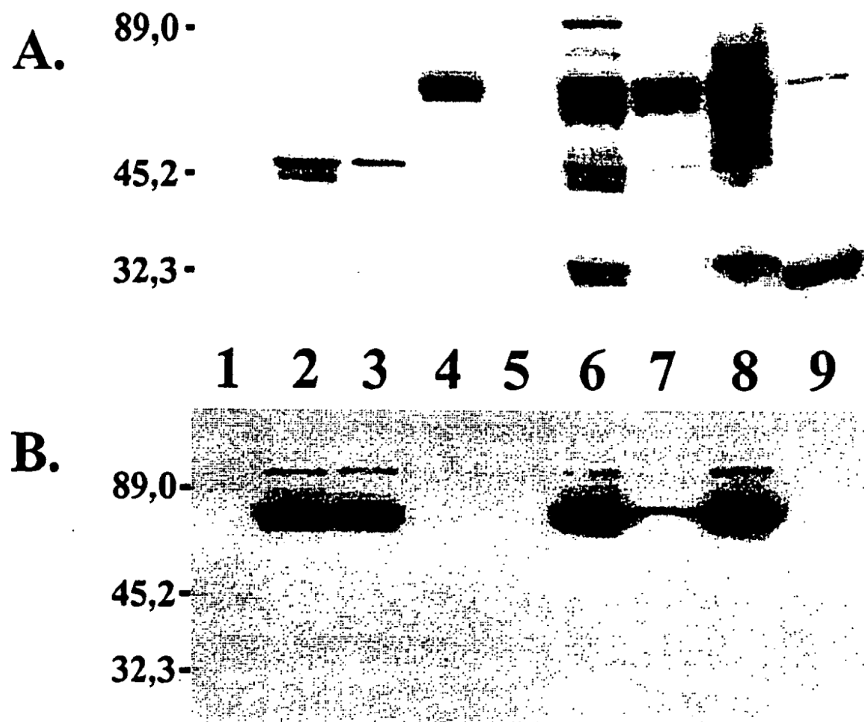


Figura 5

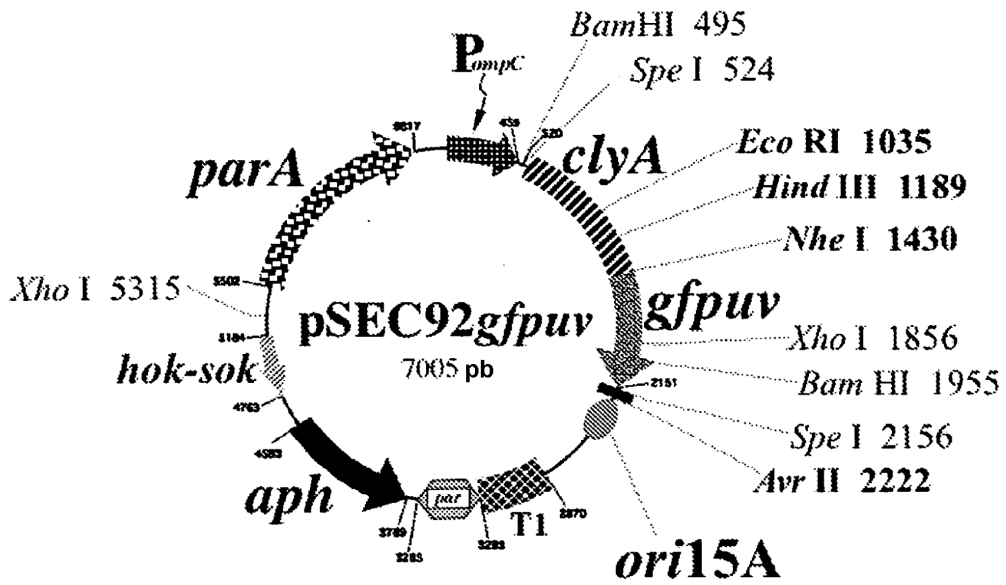


Figura 6

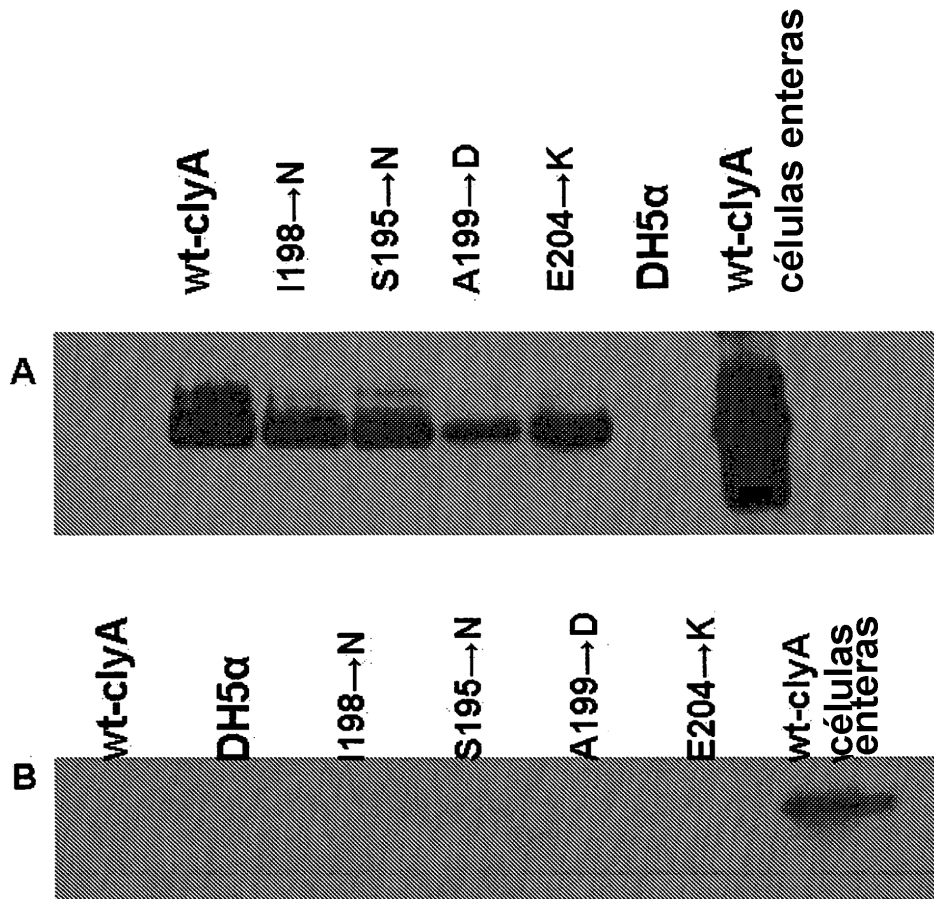


Figura 7

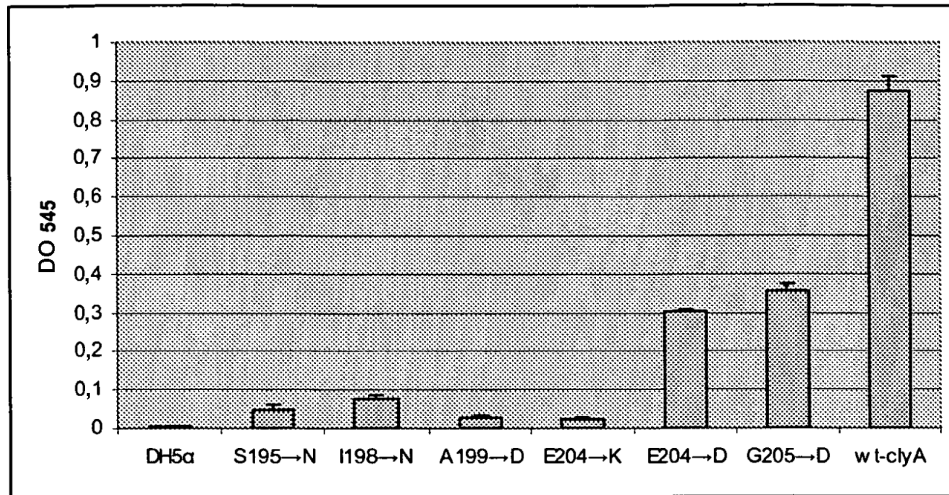




Figura 8

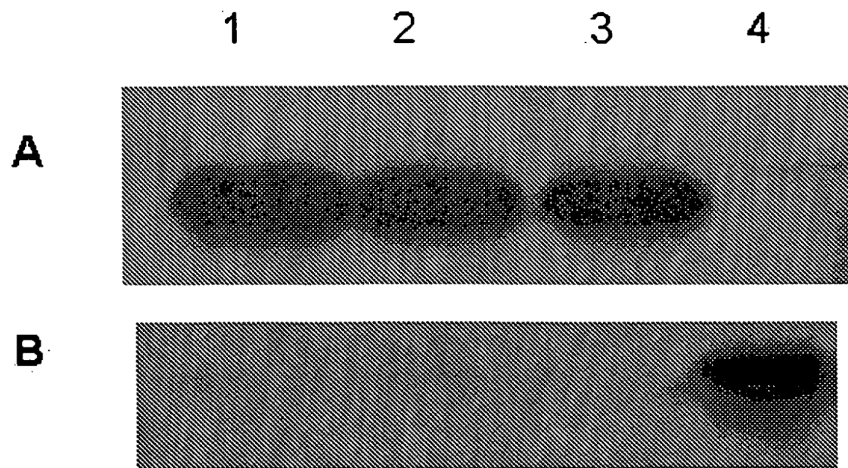


Figura 9

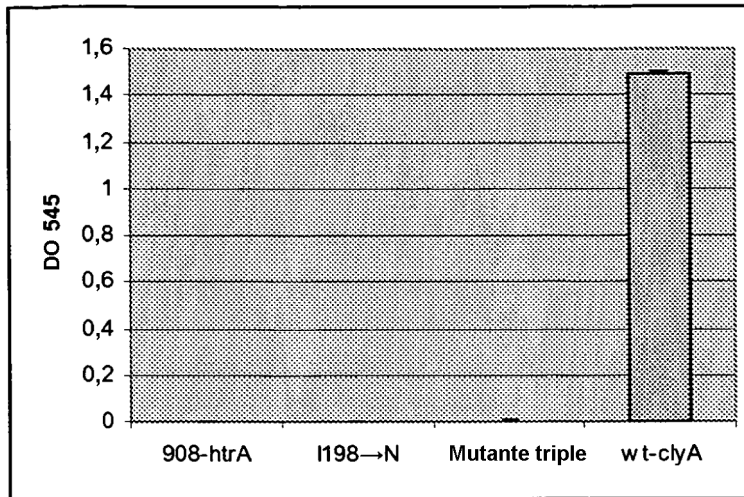


Figura 10

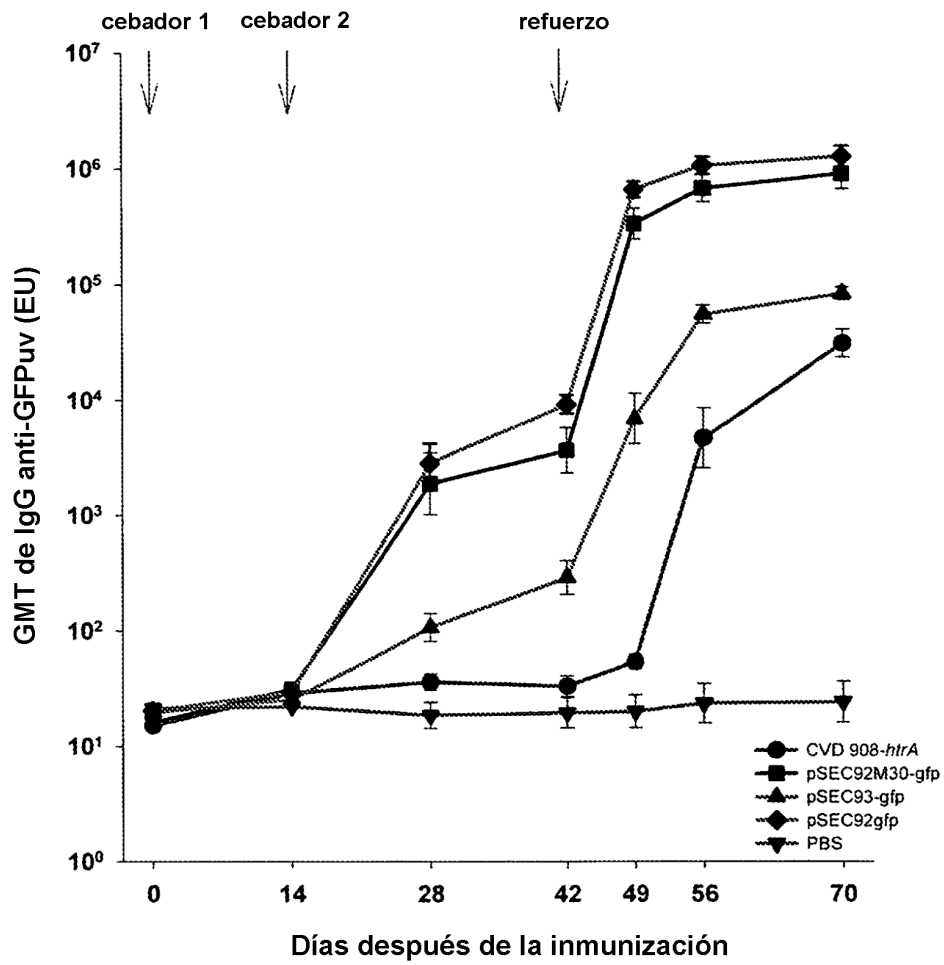


Figura 11

			490	500	510	520	530	540
<u>wt ClyA</u>	<u>Secuencia</u>		gaaaaaagca	gctatntttca	gagccaggtg	gatagaattc	gtaaaagaagc	ctatgccggc
	<u>Traducción</u>		E K S S	Y F Q	S Q V	D R I R	K E A	Y A G
I198N	<u>Secuencia</u>		gaaaaaagca	gctatntttca	gagccaggtg	gatagaattc	gtaaaagaagc	ctatgccggc
	<u>Traducción</u>		E K S S	Y F Q	S Q V	D R I R	K E A	Y A G
198,199,204	<u>Secuencia</u>		GAAAAAGCA	GCTATNTTCA	GAGCCAGGTG	GATAGAATTC	GTAAGAAGC	CTATGCCGGC
	<u>Traducción</u>		E K S S	Y F Q	S Q V	D R I R	K E A	Y A G
			550	560	570	580	590	600
<u>wt ClyA</u>	<u>Secuencia</u>		gctgcagccg	gcattgtggc	tggtccgttt	ggcctgatta	tcagctatag	caatgccgcg
	<u>Traducción</u>		A A A G	I V A	G P F	G L I I	S Y S	I A A
I198N	<u>Secuencia</u>		gctgcagccg	gcattgtggc	tggtccgttt	ggcctgatta	tcagctatag	caatgccgcg
	<u>Traducción</u>		A A A G	I V A	G P F	G L I I	S Y S	N A A
198,199,204	<u>Secuencia</u>		GCTGCAGCCG	GCATTGTGGC	TGGTCCGTTT	GGCCTGATTA	TCAGCTATAG	CAATGACGCG
	<u>Traducción</u>		A A A G	I V A	G P F	G L I I	S Y S	N D A
			610	620	630	640	650	660
<u>wt ClyA</u>	<u>Secuencia</u>		ggcgttatgg	aaggcaaaact	gattccggaa	ctgaataacc	gtctgaaaac	cgttcagaat
	<u>Traducción</u>		G V I E	G K L	I P E	L N N R	L K T	V Q N
I198N	<u>Secuencia</u>		ggcgttatgg	aaggcaaaact	gattccggaa	ctgaataacc	gtctgaaaac	cgttcagaat
	<u>Traducción</u>		G V I E	G K L	I P E	L N N R	L K T	V Q N
198,199,204	<u>Secuencia</u>		GGCGTTATTA	AAGGCAAACT	GATTCCGGAA	CTGAATAACC	GTCTGAAAAC	CGTTCAGAAAT
	<u>Traducción</u>		G V I K	G K L	I P E	L N N R	L K T	V Q N
			670	680	690	700	710	720
<u>wt ClyA</u>	<u>Secuencia</u>		ttctttacaa	gcttaagcgc	gaccgtgaaa	caggcgaaca	aagatatcga	tgccggcaaaa
	<u>Traducción</u>		F F T S	L S A	T V K	Q A N K	D I D	A A K
I198N	<u>Secuencia</u>		ttctttacaa	gcttaagcgc	gaccgtgaaa	caggcgaaca	aagatatcga	tgccggcaaaa
	<u>Traducción</u>		F F T S	L S A	T V K	Q A N K	D I D	A A K
198,199,204	<u>Secuencia</u>		TTCTTTACAA	GCTTAAGCGC	GACCGTGAAA	CAGGCGAACA	AAGATATCGA	TGCCGGCAAAA
	<u>Traducción</u>		F F T S	L S A	T V K	Q A N K	D I D	A A K
			730	740	750	760	770	780
<u>wt ClyA</u>	<u>Secuencia</u>		ctgaaactgg	cgaccgaaat	tgccggctatt	ggcgaaatga	aaaccgaaac	cgaaaccacc
	<u>Traducción</u>		L K L A	T E I	A A I	G E I K	T E T	E T T
I198N	<u>Secuencia</u>		ctgaaactgg	cgaccgaaat	tgccggctatt	ggcgaaatga	aaaccgaaac	cgaaaccacc
	<u>Traducción</u>		L K L A	T E I	A A I	G E I K	T E T	E T T
198,199,204	<u>Secuencia</u>		CTGAAACTGG	CGACCGAAAT	TGCCGGCTAT	GGCGAAATTA	AAACCGAAAC	CGAAACCACC
	<u>Traducción</u>		L K L A	T E I	A A I	G E I K	T E T	E T T
			790	800	810	820	830	840
<u>wt ClyA</u>	<u>Secuencia</u>		cgtttttatg	tgattatga	tgacctgatg	ctgagcctgc	tgaaaggcgc	ggcaaaagaa
	<u>Traducción</u>		R F Y V	D Y D	D L M	L S L L	K G A	A K K
I198N	<u>Secuencia</u>		cgtttttatg	tgattatga	tgacctgatg	ctgagcctgc	tgaaaggcgc	ggcaaaagaa
	<u>Traducción</u>		R F Y V	D Y D	D L M	L S L L	K G A	A K K
198,199,204	<u>Secuencia</u>		CGTTTTTATG	TGATTATGA	TGACCTGATG	CTGAGCCTGC	TGAAAGGCGC	GGCAAAGAAA
	<u>Traducción</u>		R F Y V	D Y D	D L M	L S L L	K G A	A K K

Figura 12

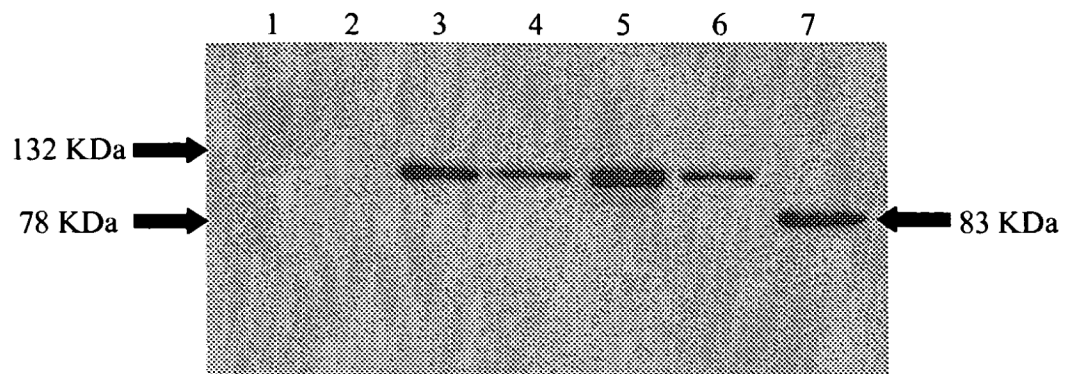


Figura 13

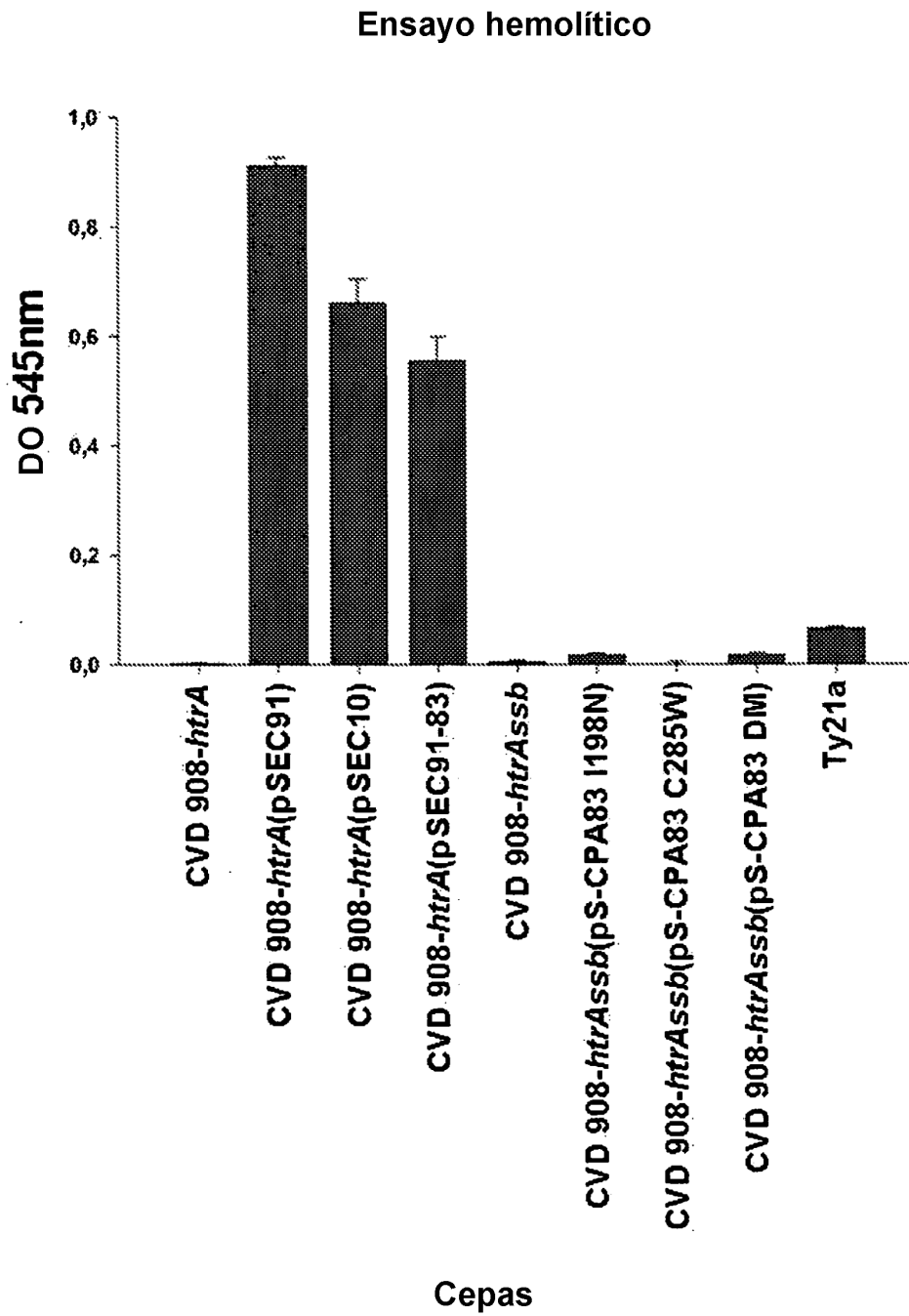


Figura 14

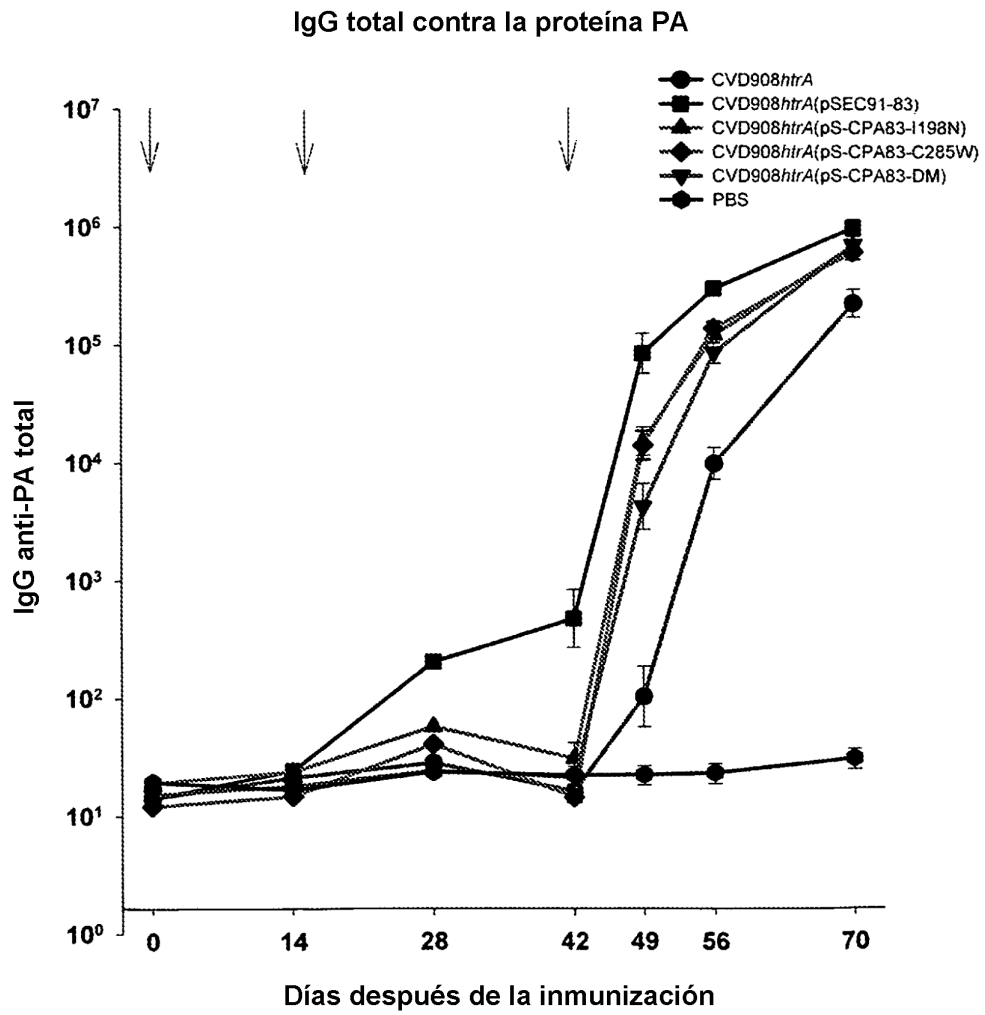


Figura 15

Grupo	Régimen de inmunización <sup>a</sup>			Porcentaje de ratones <sup>b</sup> con seroconversión y (GMT) <sup>c</sup>			
	Cebador 1	Cebador 2	Refuerzo	Día 42	Día 49	Día 56	Día 70
1	CVD 908- <i>htrA</i>	CVD 908- <i>htrA</i>	PA	0 (16)	20 (104)	100 (9.807)	100 (223.230)
2	CVD 908- <i>htrA</i> (pSEC91-83)	CVD 908- <i>htrA</i> (pSEC91-83)	PA	80 (479)	100 (84.498)	100 (297.860)	100 (967.681)
3	CVD 908- <i>htrA</i> (pS-CPA83-I198N))	CVD 908- <i>htrA</i> (pS-CPA83-I198N)	PA	10 (31)	100 (15.223)	100 (120.477)	100 (670.169)
4	CVD 908- <i>htrA</i> (pS-CPA83-C285W)	CVD 908- <i>htrA</i> (pS-CPA83-C285W)	PA	0 (15)	100 (14.079)	100 (137.606)	100 (607.847)
5	CVD 908- <i>htrA</i> (pS-CPA83-DM)	CVD 908- <i>htrA</i> (pS-CPA83-DM)	PA	0 (21)	100 (4.258)	100 (85.290)	100 (699.931)
6	PBS	PBS	PBS	0 (21)	0 (21)	0 (21)	0 (28)

<sup>a</sup>Los animales recibieron las inmunizaciones primarias en los días 0 y 14 y las inmunizaciones de refuerzo en el día 42.

<sup>b</sup> Representa el porcentaje de ratones que desarrollan titulaciones de IgG anti-PA séricas recíprocas después de la vacunación. Los sueros se ensayaron a partir de dos diluciones en serie en dos veces comenzando en 1:50.

5 <sup>c</sup> Representa la media geométrica de las titulaciones anti-PA séricas (GMT), en unidades ELISA (EU).



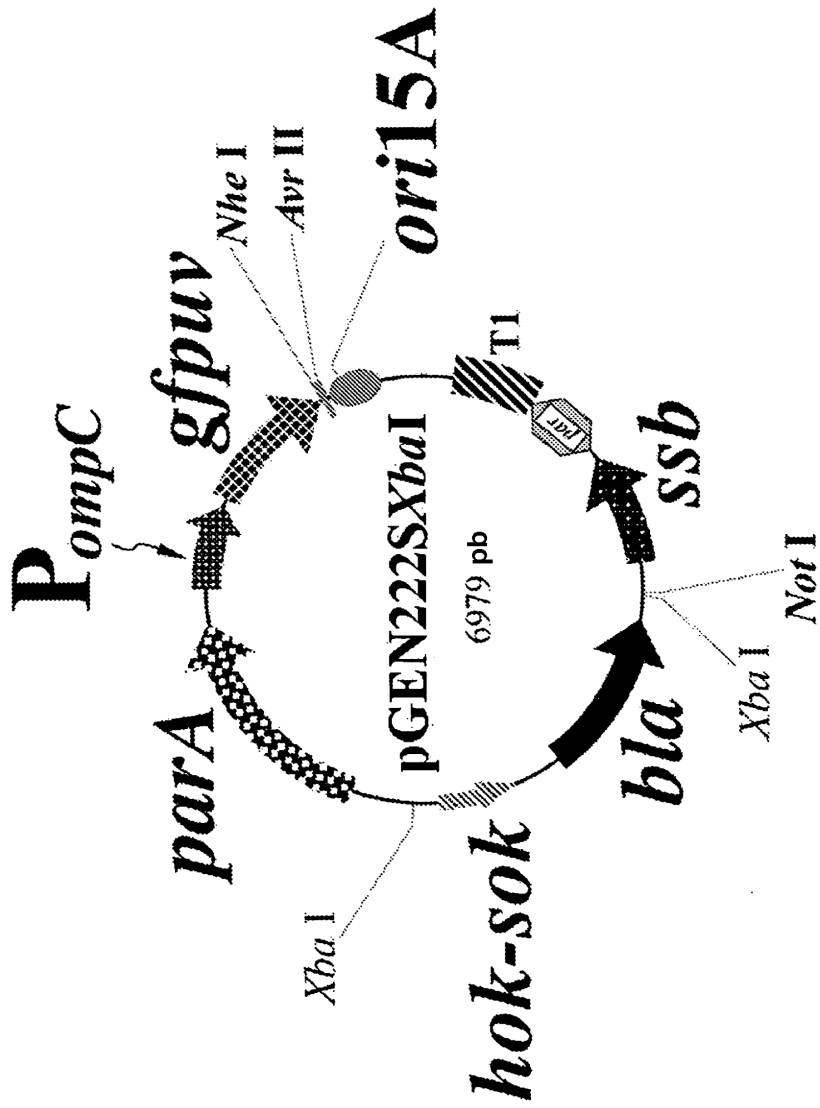


Figura 16