

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 505 324**

51 Int. Cl.:

C12N 9/88 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.03.2009 E 09155929 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.06.2014 EP 2233569**

54 Título: **Polipéptidos de CyaA mutantes y derivados polipeptídicos adecuados para el suministro de moléculas inmunogénicas a una célula**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
09.10.2014

73 Titular/es:

**INSTITUT PASTEUR (33.3%)
25-28 rue du Docteur Roux
75724 Paris Cédex 15, FR;
INSTITUTE OF MICROBIOLOGY OF THE ASCR,
V.V.I. (33.3%) y
INSTITUTE OF PHYSIOLOGY OF THE ASCR,
V.V.I. (33.3%)**

72 Inventor/es:

**SEBO, PETER;
LECLERC, CLAUDE;
OSICKOVA, ADRIANA;
FAYOLLE, CATHERINE;
MASIN, JIRI;
KRUSEK, JAN;
OSICKA, RADIM y
BASLER, MAREK**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 505 324 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

Polipéptidos de CyaA mutantes y derivados polipeptídicos adecuados para el suministro de moléculas inmunogénicas a una célula

La invención se refiere a polipéptidos adecuados para su uso en el suministro de una o más moléculas a una célula.

En particular, la invención se refiere a polipéptidos adecuados para su uso en el suministro de una o más moléculas que son capaces de provocar una respuesta inmune en un hospedador, abordando células que expresan el receptor CD11b/CD18 (también mencionadas en este documento como "células que expresan CD11b").

La invención se refiere más particularmente a polipéptidos derivados de una proteína adenilato ciclasa (CyaA), usándose ésta última en forma de una toxina o de una proteína destoxificada o toxoide, que son polipéptidos mutantes. Dichos polipéptidos mutantes son capaces de retener la actividad de unión de CyaA nativa al receptor CD11b/CD18 de células que expresan el mismo y preferiblemente también de retener la actividad de translocación de CyaA nativa a través de su dominio N-terminal en dichas células y además tienen una actividad de formación de poro que está reducida o suprimida en comparación con la de la toxina CyaA nativa.

La invención se refiere en particular al uso de dichos polipéptidos como vectores proteicos. Por consiguiente los polipéptidos mutantes se combinan adicionalmente con moléculas no CyaA, dando lugar de este modo a derivados polipeptídicos, donde dichas moléculas tienen un interés preventivo de vacuna y/o terapéutico cuando se administra a un hospedador.

Los polipéptidos de acuerdo con la invención son adecuados para su uso como vectores proteicos para el suministro de una molécula, en particular de una molécula polipeptídica que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende uno o más epítomos, especialmente antígenos, a una célula, especialmente en células que expresan CD11b.

La invención por tanto también se refiere a un derivado polipeptídico (un derivado del polipéptido mutante de la invención) que comprende o consiste en un polipéptido mutante de acuerdo con la invención recombinado con una o más moléculas, en particular con una o más moléculas adecuadas para provocar una respuesta inmune, constituyendo de este modo un polipéptido recombinante o un polipéptido de fusión. La invención también se refiere a derivados polipeptídicos obtenidos injertando químicamente dicha molécula o moléculas en los polipéptidos mutantes.

De acuerdo con una realización, los derivados polipeptídicos de acuerdo con la invención son adecuados para su uso en tratamiento profiláctico y especialmente en vacunación y en terapia incluyendo en inmunoterapia, en particular para provocar una respuesta inmune en un sujeto.

La CyaA nativa usada en el contexto de la presente invención para el diseño de los polipéptidos de la invención es la adenilato ciclasa producida en *Bordetella pertussis* y que tiene las siguientes características y propiedades descritas con el propósito de caracterizar dicha proteína en el contexto de la invención.

La toxina adenilato ciclasa-hemolisina RTX bi-funcional (también denominada en este documento como toxina adenilato ciclasa (CyaA, ACT, o AC-Hly) es un factor de virulencia clave de *Bordetella pertussis* que es el agente causante de la tos ferina (1). Su polipéptido de 1706 restos de longitud es una fusión de un dominio o parte enzimática adenilato ciclasa (AC) N-terminal (~400 restos) a una hemolisina RTX de formación de poros (Repetición en Toxina citolisina) de ~1306 restos que constituye la parte o dominio C-terminal (2). El último alberga los sitios de activación de proCyaA en CyaA por palmitoilación post-traducciona covalente de grupos grupos ϵ -amino de Lys⁸⁶⁰ y Lys⁹⁸³, así como las numerosas repeticiones RTX que forman ~40 sitios de unión de calcio, cuya carga es necesaria para la actividad citotóxica de CyaA (3, 4). La proteína CyaA de hecho se sintetiza como una protoxina inactiva que se convierte en una toxina activa por palmitoilación post-traducciona de dos restos internos de lisina (lisinas 860 y 983). Esta modificación post-traducciona requiere la expresión con el gen *mCyaA*, de un gen accesorio, es decir, *cyaC* que está localizado cerca de CyaA en el cromosoma de *B. pertussis*.

La toxina principalmente aborda fagocitos mieloides hospedadores que expresan el receptor de integrina $\alpha_M\beta_2$, conocido también como CD11b/CD18, CR3 o Mac-1 (5). Dicha toxina se une especialmente al receptor CD11b/CD18 de células que expresan el mismo a través de un sitio de unión a receptor presente en su parte C-terminal. Estas células por consiguiente son células diana para la toxina nativa y también para los polipéptidos de la invención. CyaA se inserta en la membrana citoplasmática de células y transloca el dominio enzimático AC al citosol de dichas células diana (6, 7). Dentro de las células, la AC se activa por calmodulina y cataliza la conversión no controlada de ATP celular en AMPc, una molécula de segundo mensajero clave que proporciona alteración de las funciones bactericida de los fagocitos (1). A dosis elevadas (>100 ng/ml), la disipación catalizada por CyaA de ATP en AMPc se convierte en citotóxica y promueve la apoptosis o incluso una muerte necrótica rápida y lisis de monocitos CD11b⁺ (8, 9).

Recientemente, los inventores demostraron que CyaA se une a oligosacáridos N-ligados de su receptor CD11b/CD18 (10). Esto sugiere que las interacciones de baja especificidad con glucanos de proteínas o glucolípidos de superficie celular ubicuas pueden suponer una capacidad aproximadamente dos órdenes de magnitud reducida pero fácilmente detectable de CyaA para penetrar también en células que carecen de CD11b/CD18. De hecho, debido a la actividad catalítica específica extremadamente elevada del dominio AC, se descubrió que CyaA eleva sustancialmente el AMPc también en eritrocitos, linfocitos, linfoma, neuroblastoma, CHO, o células epiteliales de la tráquea de mamíferos y aves (1, 11).

Ya se ha propuesto en la técnica previa proporcionar toxina destoxificada también llamada toxoide, donde la actividad adenilato ciclasa está disminuida, especialmente suprimida esencialmente. Dicho toxoide CyaA/AC⁻ puede usarse para conseguir la preparación de los polipéptidos de la invención.

Además de elevar el AMPc, la toxina muestra también una actividad hemolítica moderada en eritrocitos de mamíferos y aves. Esto se debe a la capacidad de formar poros selectivos de cationes pequeños de un diámetro estimado de 0,6 a 0,8 nm, que permeabilizan la membrana celular y finalmente provocan la lisis celular coloide-osmótica (12). Recientemente, los inventores y otros han demostrado que la actividad de formación de poros de CyaA sinergiza con su actividad enzimática AC invasiva de células y contribuye a la potencia citolítica global de CyaA sobre células CD11b⁺ (13, 14). Debido a una capacidad intacta de formación de poros (hemolítica), en ausencia de osmoprotectores tales como suero, el toxoide CyaA/AC⁻ enzimáticamente inactivo (15) aún muestra una actividad hemolítica completa sobre eritrocitos y una actividad citolítica residual, aproximadamente diez veces reducida sobre monocitos que expresan CD11b (8), lo que establece un límite a su uso en terapia.

En seguida se descubrió que las actividades hemolítica (formación de poros) y AC de translocación de membrana (invasiva de células) de CyaA son disociables por concentración baja de calcio, temperatura baja (16) y por el grado y naturaleza de acilación de CyaA (4, 12, 17). Además, la dos actividades difieren sustancialmente en sensibilidad a sustituciones de reversión de carga o neutras de glutamatos en las posiciones 509, 516, 570 y 581 dentro del dominio hidrófobo (8, 13, 18). Las actividades invasiva de células y de formación de poros de CyaA por tanto se propusieron como mutuamente independientes y de funcionamiento en paralelo en membrana de células diana. El modelo ilustrado en la figura 5A, sugiere que dos conformeros CyaA distintos se insertan en la membrana de células diana en paralelo, siendo uno el precursor de translocación, que supone el suministro del dominio AC a través de la membrana celular con flujo entrante concomitante de iones calcio en las células, siendo el otro un precursor de poros que finalmente forma poros oligoméricos (13, 18, 19).

Los inventores ahora han ensayado este modelo y los han refinado, demostrando que la actividad de formación de poros no está implicada en la translocación del dominio AC a través de la célula diana.

En la presente invención, los inventores inicialmente diseñaron polipéptidos mutantes CyaA, basándose en la adenilato ciclasa de *Bordetella pertussis*, en el formato de toxina o de toxoide, que tiene una combinación de sustituciones dentro de los dominios de formación de poros (E570Q) y que alberga acilación (K860R) y demostraron que esta combinación específica de sustituciones anulaba selectivamente la actividad de permeabilización de células de CyaA, eliminando de este modo la actividad citolítica residual de toxoides CyaA/AC⁻ sobre células CD11b⁺. Al mismo tiempo, la construcción E570Q+K860R retenía una capacidad completa de translocar el dominio AC al citosol de las células para elevar el AMPc celular y su toxoide era completamente capaz de suministrar epítomos que contenían moléculas insertadas dentro de dicha construcción a la vía citosólica de células dendríticas para la presentación restringida a MHC clase I y la inducción de respuestas de células T citotóxicas específicas *in vivo*.

El mutante CyaA/233OVA/E570Q+K860R diseñado por los inventores, y en que hay un péptido antigénico OVA insertado como se describe en los ejemplos, es la primera construcción ilustrativa de la capacidad del mutante CyaA de proporcionar una capacidad reducida de forma importante para permeabilizar las células que permanece completamente capaz de translocar el dominio AC a través de la membrana celular.

Los inventores ahora han diseñado construcciones particulares, ilustradas especialmente como un toxoide CyaA/E570Q+K860R/AC⁻ y han demostrado que a pesar de su actividad permeabilizante de células (citolítico) muy reducida, sigue siendo completamente activo en el suministro de antígeno a APC CD11b⁺. Los inventores han demostrado adicionalmente que la actividad citolítica global del toxoide CyaA/E570Q+K860R/AC⁻ ilustrativo es muy baja. Por tanto está desprovisto de toxicidad residual en un hospedador animal o humano y por lo tanto es muy adecuado para su uso en terapia.

La invención por tanto proporciona nuevos polipéptidos, que son toxoides y tienen un perfil potenciado de seguridad y pueden usarse como vectores proteicos para el suministro de moléculas de interés, en particular de secuencias peptídicas inmunogénicas, a células de un paciente en necesidad de un tratamiento, y más particularmente a células que expresan CD11b.

En base a los experimentos realizados por los inventores ha sido posible definir y proporcionar un polipéptido cuya secuencia de aminoácidos comprende o consiste en una de las siguientes secuencias:

a) una secuencia de aminoácidos que es un fragmento que tiene un tramo de aminoácidos que comprende los restos aminoacídicos 1 a 860 o 2 a 860 de la SEC ID N° 1, en el que:

- 5 (i) el resto de ácido glutámico, correspondiente a la posición 570 en la secuencia de CyaA nativo de *Bordetella pertussis* definida en la SEC ID N° 1, está sustituido por un resto de glutamina; y
 (ii) el resto de lisina, correspondiente a la posición 860 en la secuencia de CyaA nativo de *Bordetella pertussis* definida en la SEC ID N° 1, está sustituido por un resto de arginina,

10 teniendo dicho fragmento la capacidad de la proteína CyaA de *Bordetella pertussis* de unirse al receptor CD11b/CD18 de células que expresan el mismo, la capacidad de translocar su dominio enzimático adenilato ciclasa N-terminal al interior de dichas células y teniendo una actividad de formación de poros que está reducida o suprimida en comparación con la de la toxina CyaA nativa; o,

b) una secuencia de aminoácidos que difiere de un fragmento que tiene un tramo de aminoácidos que comprende los restos aminoacídicos 1 a 860 o 2 a 860 de la SEC ID N° 1, por:

- 15 (i) la sustitución del resto de ácido glutámico, correspondiente a la posición 570 en la secuencia de CyaA nativo de *Bordetella pertussis* definida en la SEC ID N° 1, por un resto de glutamina;
 (ii) la sustitución del resto de lisina, correspondiente a la posición 860 en la secuencia de CyaA nativo de *Bordetella pertussis* definida en la SEC ID N° 1, por un resto de arginina; y
 20 (iii) de 1 a 50 sustituciones adicionales;

25 consistiendo el polipéptido en dicha secuencia que tiene la capacidad de la proteína CyaA de *Bordetella pertussis* de unirse al receptor CD11b/CD18 de células que expresan el mismo, la capacidad a translocar su dominio enzimático adenilato ciclasa N-terminal al interior de dichas células y teniendo una actividad de formación de poros que está reducida o suprimida en comparación con la de la toxina CyaA nativa.

30 Para el propósito de la invención, el dominio N-terminal del fragmento descrito es la secuencia de aminoácidos del fragmento que incluye los restos aminoacídicos contiguos de la parte N-terminal de la proteína CyaA nativa, por ejemplo la parte N-terminal del fragmento es todo o parte de los restos contiguos que forman la secuencia de 400 restos aminoacídicos del dominio N-terminal de la proteína CyaA de *Bordetella pertussis*.

En este documento, "E570Q" abarca la sustitución del resto de ácido glutámico en la posición 570 de CyaA nativa de *Bordetella pertussis* por un resto de glutamina.

35 En este documento, "K860R" abarca la sustitución del resto de lisina en la posición 860 de CyaA nativa de *Bordetella pertussis* por un resto de arginina.

40 La CyaA nativa de *Bordetella pertussis* también se ha descrito como una secuencia de aminoácidos y una secuencia de nucleótidos por Glaser, P. et al., 1988, *Molecular Microbiology* 2(1), 19 - 30. Esta secuencia se menciona como SEC ID N° 1 ilustrada en la figura 6. Por consiguiente, cuando se citan restos aminoacídicos o secuencias o nucleótidos o secuencias de nucleótidos de la proteína CyaA de *B. pertussis*, en la presente invención, se dan sus posiciones con respecto a las secuencias descritas en dicha publicación de Glaser et al. 1988.

45 En una realización de la presente invención la secuencia de aminoácidos de la adenilato ciclasa de *Bordetella pertussis* es la secuencia descrita como SEC ID N° 1.

50 Cuando se hace referencia a la SEC ID N° 1 o a la SEC ID N° 2 en este documento, se señala especialmente que, salvo que sea técnicamente no relevante, se aplicarían las características descritas de manera similar a una secuencia modificada por inserción de restos en la SEC ID N° 1 o SEC ID N° 2 para detoxificar la proteína CyaA. En dicho caso, la numeración de los restos aminoacídicos debe adaptarse (especialmente en la medida en que estén implicadas las posiciones 570 y 860 de la secuencia nativa).

55 De forma ventajosa, la proteína CyaA o un fragmento de la misma es una proteína o un fragmento de la misma, que es el resultado de la co-expresión en una célula, especialmente en una célula recombinante, de los genes tanto *cyaA* como *cyaC*. De hecho se ha demostrado que para que tenga propiedades invasivas para células diana, CyaA deben experimentar modificaciones post-traduccionales que se ven posibilitadas por la expresión de los genes tanto *cyaA* como *cyaC* (documento WO 93/21324).

60 Como se describe en este documento, la proteína CyaA es una proteína bacteriana. Como se describe en este documento, la proteína de CyaA se obtiene de una especie *Bordetella*.

65 La especie *Bordetella* de la invención es *Bordetella pertussis*. Otras cepas de *Bordetella* son aquellas de *Bordetella parapertussis*, *Bordetella hinzii* o *Bordetella bronchiseptica*. Las secuencias de la proteína CyaA de *B. parapertussis* se han descrito especialmente con el número de acceso NC 002928.3 (como una secuencia de 1740 aminoácidos) y en Parkhill J. et al. (*Nat. Genet.* DOI, 10 (2003)), para *B. hinzii* en Donato G.M. et al. (*J. Bacteriol.* 2005 Nov, 187(22):7579 - 88) y para *B. bronchiseptica* en Betsou F. et al. (*Gene* 1995, 30 de agosto; 162(1): 165 - 6).

La expresión "mutante polipeptídico de la proteína adenilato ciclasa" excluye la adenilato ciclasa nativa expresada por *Bordetella*. Como se ha indicado anteriormente, se caracteriza por una diferencia primaria con la proteína nativa, que recae en la sustitución combinada de dos restos aminoacídicos específicos. Puede modificarse adicionalmente con respecto a dicha proteína nativa y puede ser especialmente un fragmento de la proteína así mutada, tal como por ejemplo una variante truncada de dicha proteína mutada, donde están delecionados restos en uno de los dos o ambos extremos terminales. En particular pueden delecionarse restos en el extremo C-terminal en la medida en que no afecten al sitio de reconocimiento y unión para el receptor celular CD11b/CD18. Alternativa o adicionalmente pueden delecionarse restos en el extremo N-terminal en la medida en que no afecte a la capacidad de translocación del polipéptido mutante obtenido. También puede ser un fragmento obtenido también después de deleciones internas de uno o más restos de la proteína CyaA mutada nativa.

Cuando la invención se refiere a un mutante polipeptídico que es un fragmento indicado en este documento, dicho fragmento que necesariamente comprende los restos mutados E570Q y K860R (cuando se hace referencia a la secuencia de aminoácidos de la proteína CyaA de *Bordetella pertussis*) también retiene la capacidad de CyaA de longitud completa mutada de unirse a las células y translocar su dominio N-terminal al citosol de células que expresan CD11b/CD18.

La invención por tanto proporciona polipéptidos mutantes adecuados para su uso en el diseño de medios para el suministro de una o más moléculas a una célula, especialmente una célula diana que expresa el receptor CD11b/CD18.

En particular, la invención proporciona polipéptidos mutantes de una proteína CyaA, donde dicha proteína se obtiene de la toxina CyaA o se obtiene preferiblemente de un toxoide de la misma, especialmente un toxoide CyaA/AC⁻. Los polipéptidos mutantes son capaces de unirse a una célula, especialmente una célula diana que expresa el receptor CD11b/CD18, son capaces de translocar su dominio N-terminal o la molécula insertada en dicho dominio o injertada en el mismo al interior de la célula y su actividad de formación de poros está total o parcialmente suprimida en comparación con la de la toxina o toxoide CyaA.

La capacidad del polipéptido mutante de abordar células CD11b/CD18 se pueden ensayar especialmente de acuerdo con los métodos descritos en el documento EP 03291486.3 y El-Azami-El-Idrissi M. et al., J. Biol. Chem., 278(40)38514 - 21 o en el documento WO 02/22169. Además, la capacidad del polipéptido mutante de translocar el epítipo o epítopos o polipéptido o polipéptidos que contienen dicho epítipo o epítopos al citosol de la célula diana se puede ensayar aplicando el método descrito en el documento WO 02/22169.

La supresión total o parcial de la actividad de formación de poros de la toxina o toxoide CyaA, o la capacidad de permeabilización celular, se entiende como la supresión total o parcial de la capacidad de formar poros, en particular poros selectivos de cationes de un diámetro estimado de 0,6 a 0,8 nm, que permeabilizan una membrana celular y finalmente provocan la lisis celular coloide-osmótica. La actividad de formación de poros se puede medir usando el experimento de pinzamiento zonal de una única célula completa como se describe en los ejemplos.

La actividad de formación de poros de la toxina CyaA contribuye a su actividad citolítica o hemolítica global sobre las células. De hecho en el contexto de la presente invención, la actividad citolítica o hemolítica global de CyaA (o su "actividad citotóxica global") debe entenderse como resultante de al menos las actividades adenilato ciclasa y de formación de poros de la toxina CyaA. Por tanto la supresión total o parcial de la actividad de formación de poros de la toxina CyaA permite al menos una supresión parcial de su actividad citolítica.

En una realización preferida, la actividad citolítica global del polipéptido de acuerdo con la invención, en particular sobre células que expresan el receptor CD11b/CD18, está total o parcialmente reducida en comparación con la de la toxina CyaA de *Bordetella pertussis*. La actividad citolítica del polipéptido de la invención se puede determinar midiendo la cantidad de hemoglobulina (para eritrocito) o de lactato deshidrogenasa (para monocitos) liberada por las células cuando se incuban con el polipéptido ensayado como se describe en los ejemplos.

En una realización preferida, la actividad citolítica global del polipéptido de acuerdo con la invención sobre células que expresan el receptor CD11b/CD18 es al menos un 75% inferior, más preferiblemente al menos un 80%, 85%, 90% o 95% inferior, que la de la toxina CyaA de *Bordetella pertussis*, o que la de una proteína CyaA de *Bordetella pertussis* cuya actividad adenilato ciclasa está parcial o totalmente suprimida (o "toxoide CyaA"). En una realización particularmente preferida, la actividad citolítica global del polipéptido de acuerdo con la invención sobre células que expresan el receptor CD11b/CD18 es al menos un 75% inferior, más preferiblemente al menos un 80% o 85% inferior, que el del toxoide CyaA de *Bordetella pertussis* cuya secuencia de aminoácidos se muestra en la figura 2 (SEC ID N° 2).

En una realización preferida, la invención se refiere a un polipéptido que es un mutante de una adenilato ciclasa y cuya secuencia de aminoácidos comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos (i) que está mutada con respecto a la secuencia de aminoácidos descrita en la SEC ID N° 1, comprendiendo dichas mutaciones al menos las sustituciones E570Q y K860R o (ii) que es un fragmento de la proteína CyaA que tiene dicha secuencia de aminoácidos descrita como SEC ID N° 1, en la medida en que dicho fragmento tiene una secuencia de aminoácidos

que incluye las sustituciones E570Q y K860R y donde el polipéptido es capaz de unirse al receptor CD11b/CD18 de células que expresan el mismo y de translocar su dominio N-terminal al interior de dicha célula.

5 En una realización particular de la presente invención, el fragmento que incluye una sustitución del resto de ácido glutámico en la posición 570 de la SEC ID N° 1 por un resto de glutamina (mencionada como "E570Q"), y la sustitución del resto de lisina en la posición 860 de la SEC ID N° 1 por un resto de arginina (mencionada como "K860R") abarca al menos la secuencia de aminoácidos de la proteína CyaA que empieza con el primer resto N-terminal o desde uno de los restos aminoacídicos comprendidos entre las posiciones 1 y 400, preferiblemente entre las posiciones 1 y 380 y que se extiende hasta los restos que forman el sitio de reconocimiento y de unión para el receptor celular CD11b/CD18 y dicho fragmento contiene restos correspondiente a los restos E570Q y K860R mutados o consiste en dicha secuencia de aminoácidos. En una realización preferida, el fragmento que incluye las sustituciones E570Q y K860R no comprende la secuencia de aminoácidos que discurre desde el aminoácido en la posición 1 de la SEC ID N° 1 hasta el aminoácido en la posición 372 de la SEC ID N° 1.

15 En una realización preferida, el fragmento que se prepara de este modo tiene esencialmente pérdida actividad enzimática adenil ciclasa (actividad AC)

En una realización preferida, el polipéptido mutante de la invención se produce por co-expresión en una célula recombinante de un gen mutante que codifica la secuencia de aminoácidos de CyaA mutada en E570Q y R860R y del gen *cyaC*, seguido por la recuperación del fragmento expresado seleccionado de CyaA mutante.

Preferiblemente, el polipéptido mutante de la invención tiene un resto de lisina que corresponde al resto de lisina en la posición 983 de la secuencia de aminoácidos de CyaA expuesta en la SEC ID N° 1 y que se acila, en particular que se palmitoila o palmitoleila.

25 Como alternativa, el polipéptido mutante de la invención tiene un resto de lisina que corresponde al resto de lisina en la posición 983 de la secuencia de aminoácidos de CyaA expuesta en la SEC ID N° 1 que no está acilado.

30 En una realización específica, el polipéptido mutante de la invención tiene una secuencia de aminoácidos derivada de la secuencia de aminoácidos de CyaA descrita en la SEC ID N° 1 por mutación de restos resultante en E570Q y K860R y tiene una secuencia de aminoácidos que comparte al menos un 50%, preferiblemente al menos un 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o 99% de identidad con la secuencia expuesta en la SEC ID N° 1.

35 En otra realización específica, el polipéptido mutante de la invención tiene una secuencia de aminoácidos que difiere de un fragmento que tiene un tramo de aminoácidos que comprende los restos aminoacídicos 1 a 860 o 2 a 860 de la SEC ID N° 1 por mutación de restos resultante en E570Q y K860R y por mutaciones adicionales resultantes en 1 a 50 sustituciones de restos aminoacídicos incluyendo las sustituciones E570Q y K860R.

40 En una realización específica, el polipéptido mutante de la invención no porta ninguna sustitución, supresión, y/o inserción de restos aminoacídicos en comparación con la secuencia de aminoácidos de CyaA de *Bordetella pertussis* diferente a las sustituciones E570Q y K860R. En una realización específica, el polipéptido mutante tiene la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 2 ilustrada en la figura 7. En otra realización específica, las únicas sustituciones, supresiones, y/o inserciones de aminoácidos adicionales en comparación con la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 2 consisten en sustituciones, supresiones, y/o inserciones de aminoácidos que suprimen total o parcialmente la actividad enzimática adenil ciclasa de la proteína CyaA, tal como en particular la inserción de un dipéptido, por ejemplo un dipéptido "LQ" o "GS" entre los aminoácidos correspondiente a las posiciones 188 y 189.

50 En una realización particular, el polipéptido mutante de la invención difiere de la secuencia de aminoácidos de CyaA expuesta en la SEC ID N° 1 por 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ó 10 sustituciones, supresiones, y/o inserciones de restos aminoacídicos además de las sustituciones E570Q y K860R.

55 En una realización particular, además de las sustituciones E570Q y K860R, el resto de leucina en la posición 247 de la proteína CyaA nativa de *Bordetella pertussis* está sustituido por un resto de glutamina (L247Q) o por otro resto aminoacídico en particular un resto de aminoácido conservativo.

60 Un polipéptido mutante de la invención que es un fragmento descrito en este documento de la secuencia de aminoácidos descrita en la SEC ID N° 1 se entiende como una secuencia que comprende uno o más fragmentos que tienen un tramo de aminoácidos que comprende los restos aminoacídicos 1 a 860 o 2 a 860 y hasta aproximadamente 1705 restos aminoacídicos de la secuencia de aminoácidos SEC ID N° 1, en particular fragmentos que comprenden un tramo de al menos 900, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400, 1500, 1600 restos aminoacídicos de la SEC ID N° 1, que abarcan los restos E570Q y K860R. Un polipéptido mutante de la invención también puede definirse como un fragmento de la secuencia de aminoácidos descrita en la SEC ID N° 2 que comprende uno o más fragmentos que tienen un tramo de aminoácidos que comprende los restos aminoacídicos 1 a 860 o 2 a 860 y hasta aproximadamente 1705 restos aminoacídicos de la secuencia de aminoácidos SEC ID N° 2, en particular fragmentos que comprenden un tramo de al menos 900, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400, 1500, 1600 restos aminoacídicos de la

ES 2 505 324 T3

SEC ID N° 2, que abarcan los restos 570 y 860. Dichos fragmentos preferiblemente retienen la capacidad de unión al receptor CD11b/CD18 de células que expresan el mismo y la capacidad a translocar su dominio N-terminal al interior de dichas células. Preferiblemente, el polipéptido mutante de la invención que es dicho fragmento que tiene un tramo de aminoácidos que comprende los restos aminoácidos 570 como E570Q a 860 como K860R o 1 a 860, o 2 a 860 de la SEC ID N° 1 en la medida en que se observan las mutaciones E570Q y K860R con respecto a la SEC ID N° 1 original.

En una realización preferida, el fragmento comprende adicionalmente los restos aminoácidos 1166 a 1281 o los restos aminoácidos 1208 a 1243 de la secuencia de aminoácidos de CyaA expuesta en la SEC ID N° 1 de la proteína CyaA para su interacción con células diana CD11b/CD18.

Un fragmento particular por tanto comprende todo o parte de la parte C-terminal de la proteína nativa, siendo dicha parte responsable de la unión del polipéptido de la invención a la membrana y/o receptor CD11b/CD18 de la célula diana, y del posterior suministro del dominio N-terminal del polipéptido al citosol celular. Un polipéptido particular de la invención es el fragmento de la proteína CyaA que contiene los restos aminoácidos 373 a 1706 de la proteína CyaA especialmente de la SEC ID N° 1, en la medida en que los restos 570 y 860 están mutados como E570Q y K860R.

En otra realización preferida, el polipéptido mutante es un fragmento que tiene un tramo de aminoácidos que comprende los restos aminoácidos 1 a 860 o 2 a 860 de la SEC ID N° 1, en que:

a) una primera secuencia de aminoácidos que corresponde a un tramo de al menos 100 restos aminoácidos contiguos de la SEC ID N° 1 comprende el resto aminoácido 570 como E570Q, y además incluye 0, 1, 2, 3, 4 ó 5 sustituciones en comparación con la SEC ID N° 1 y

b) una segunda secuencia de aminoácidos que corresponde a un tramo de al menos 100 restos aminoácidos contiguos de la SEC ID N° 1 comprende el resto aminoácido 860 como K860R, y además incluye 0, 1, 2, 3, 4 ó 5 sustituciones en comparación con la SEC ID N° 1 y preferiblemente comprende

c) una tercera secuencia de aminoácidos que comprende los restos aminoácidos 1166 a 1281 o los restos aminoácidos 1208 a 1243 de la secuencia de aminoácidos de CyaA expuesta en la SEC ID N° 1 de la proteína CyaA para su interacción con células diana CD11b/CD18.

La solicitud describe un fragmento que es uno que corresponde a la proteína CyaA mutada E570Q y K860R donde los restos aminoácidos 225 a 234 se han delecionado, proporcionando de este modo un fragmento que contiene los restos 1 a 224 y 235 a 1706 de la proteína mutada.

En una realización particularmente preferida, el fragmento polipeptídico de acuerdo con la invención se une a una célula que expresa el receptor CD11b/CD18 como un resultado de la unión específica a dicho receptor.

En una realización preferida, la actividad adenilato ciclasa del polipéptido en una célula está parcial o totalmente suprimida en comparación con la de la toxina CyaA de *Bordetella pertussis*. Como se ha indicado anteriormente, la expresión "proteína CyaA" se refiere a la forma de toxina o preferiblemente a la forma de toxoide de la proteína. Por consiguiente, cada realización de la invención que se refiere al polipéptido que es un mutante de la proteína CyaA se aplica a cada una de las formas de toxina o toxoide de la proteína.

La supresión total o parcial de la actividad enzimática adenilato ciclasa CyaA debe entenderse como la supresión total o parcial de la capacidad a convertir ATP en AMPc en un entorno celular en comparación con la de una toxina CyaA producida por co-expresión de los genes *cyaA* y *cyaC* en una célula. La capacidad a convertir ATP en AMPc puede determinarse midiendo el nivel de AMPc intracelular como se describe en los ejemplos.

Dicha supresión total o parcial puede obtenerse como resultado de inactivación genética, por ejemplo por introducción de una corta secuencia de aminoácidos, que comprende por ejemplo de uno a diez aminoácidos, en particular un dipéptido en un sitio de la secuencia de aminoácidos de CyaA que es parte del sitio catalítico, es decir en un sitio localizado dentro de los primeros 400 aminoácidos (dominio AC) de la SEC ID N° 1 o por sustitución de una parte de la secuencia de aminoácidos de CyaA expuesta en la SEC ID N° 1 que es esencial para la actividad enzimática. En una realización preferida, la supresión total o parcial de la actividad enzimática CyaA se obtiene por inserción de un dipéptido, por ejemplo un dipéptido "LQ" o "GS", entre los aminoácidos correspondientes a las posiciones 188 y 189 de la secuencia de CyaA expuesta ²²²²²²²²²²²²²²²² en la SEC ID N° 1. Esto puede conseguirse insertando un oligonucleótido, tal como "CTG CAG" o "CGATCC", en el sitio EcoRV en la posición 564 de la fase codificante del gen *cyaA*. Véase Ladant et al., 1992. Como alternativa, la supresión total o parcial de la actividad enzimática puede obtenerse también por mutagénesis dirigida, por ejemplo, reemplazando el resto de lisina en la posición 58 o 65 de la proteína CyaA nativa de *Bordetella pertussis* (Glaser et al., 1989) por un resto de Gln.

La invención también se refiere a un derivado polipeptídico que comprende o que consiste en el polipéptido mutante de acuerdo con la invención que está adicionalmente combinado con una o más moléculas de interés. En una realización preferida, una molécula de interés es una molécula biológicamente activa ya sea en solitario o combinada con el polipéptido de la invención. Dichas moléculas pueden ser especialmente de valor profiláctico o

valor terapéutico es decir, pueden tener una actividad profiláctica o terapéutica, o pueden potenciar una actividad profiláctica o terapéutica.

5 En realizaciones específicas, las moléculas de interés se seleccionan del grupo que comprende: péptidos, glucopéptidos, lipopéptidos, polisacáridos, oligosacáridos, ácidos nucleicos, lípidos y agentes químicos.

10 En una realización específica, la una o más moléculas de interés son moléculas polipeptídicas o contienen moléculas polipeptídicas. Su secuencia de aminoácidos puede comprender de 2 a 1000, preferiblemente 5 - 800, 5 a 500, 5 a 200, 5 a 100, 8 a 50, 5 a 25, 5 a 20 u 8 a 16, o 300 - 600, 400 - 500, restos aminoácidos.

15 En una realización preferida, la una o más moléculas de interés son secuencias de aminoácidos heterólogas adecuadas para provocar una respuesta inmune (también mencionadas como "antígenos heterólogos"), en particular secuencias de aminoácidos que comprenden o consisten en un epítipo, incluyendo antígenos. Como se usa en este documento, el término "heterólogo" se refiere a un antígeno diferente al polipéptido mutante que se usa en el propio vector. Como se usa en este documento, el término "epítipo" se refiere a una molécula heteróloga y especialmente un péptido heterólogo que puede provocar una respuesta inmune, cuando se presenta al sistema inmune de un hospedador. En particular, dicho epítipo puede comprender o consistir en un tramo de 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 ó 20 16 restos aminoácidos. Puede consistir alternativamente en un antígeno de longitud completa o consistir en fragmento o fragmentos antigénicos.

25 En una realización específica, un derivado polipeptídico de acuerdo con la invención puede estar codificado por un plásmido que corresponde con el plásmido OVA-QR-AC depositado con el número de acceso CNCM I-4137 (figura 12) en que la secuencia de ADN que codifica la secuencia antigénica "OVA" está remplazada por una secuencia de ADN que codifica una secuencia antigénica que comprende uno o más epítipos.

30 La molécula polipeptídica adecuada para provocar una respuesta inmune es especialmente una que provoca una respuesta inmune de células T, incluyendo como ejemplo una respuesta CTL. La molécula polipeptídica adecuada para provocar una respuesta inmune también puede ser una que provoca una respuesta inmune de células B.

35 En realizaciones específicas, el antígeno heterólogo se selecciona entre el grupo que consiste en un antígeno de un patógeno bacteriano, un antígeno de célula tumoral, un antígeno viral, un antígeno retroviral, un antígeno fúngico o un antígeno de célula parasitaria.

40 Una molécula de interés puede ser especialmente un antígeno seleccionado entre el grupo que consiste en: un antígeno de Chlamidia, un antígeno de micoplasma, un antígeno de virus de la hepatitis, un antígeno de poliovirus, un antígeno de virus VIH, un antígeno de virus de la influenza, un antígeno de virus de la coriomeningitis, un antígeno tumoral, o una parte de cualquiera de estos antígenos que comprenda al menos un epítipo.

45 En una realización preferida del derivado polipeptídico de la invención, la secuencia de aminoácidos de cada una de dichas moléculas adecuadas para provocar una respuesta inmune comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos de un antígeno de Chlamidia, un antígeno de micoplasma, un antígeno de virus de la hepatitis, un antígeno de poliovirus, un antígeno de virus VIH, un antígeno de virus de la influenza, un antígeno de virus de la coriomeningitis, un antígeno tumoral, o comprende o consiste en una parte de una secuencia de aminoácidos de cualquiera de estos antígenos que comprende al menos un epítipo.

50 En una realización particularmente preferida, la molécula de interés es un antígeno asociado a tumor (TAA). Los antígenos asociados a tumor se han caracterizado para varios tumores tales como por ejemplo: melanoma, especialmente melanoma metastásico; carcinoma de pulmón; carcinoma de cabeza y cuello; carcinoma cervical, carcinoma esofágico; carcinoma de vejiga, especialmente carcinoma de vejiga infiltrante; carcinoma de próstata; carcinoma de mama; carcinoma colorrectal; carcinoma de células renales; sarcoma; leucemia; mieloma. Para estos diversos tipos histológicos de cáncer, se ha demostrado que los péptidos antigénicos se expresan específicamente en muestras de tumor y se reconocen por células T, especialmente por células T CD8⁺ o células T CD4⁺.

55 Se hizo una revisión de péptidos hallados como antígenos asociados a tumor en estos tipos de tumores por Van der Bruggen P. et al. (Immunological Reviews, 2002, vol 188:51 - 64). Especialmente, la descripción de los péptidos contenidos en la tabla 3 de dicha revisión se remite en este documento para proporcionar ejemplos de dichos antígenos asociados a tumor y dicha tabla 3 se incorpora por referencia en la presente solicitud.

60 Se citan los siguientes antígenos como ejemplos de antígenos asociados a tumor reconocidos por células T, de acuerdo con la publicación de Kawakami Y. et al. (Cancer Sci, octubre 2004, vol. 95, nº 10, pág. 784 - 791) que también proporciona métodos para seleccionar estos antígenos o además uno: antígenos compartidos por diversos cánceres, incluyendo MAGE (especialmente en melanoma), NY-ESO-1, Her2/neu, WT1, Survivina, hTERT, CEA, AFP, SART3, GnT-V, antígenos específicos para algunos cánceres particulares tales como β beta-catenina, CDK4, MART-2, MUM3, gp100, MART-1, tirosinasa para melanoma; bcr-abl, TEL-AML1 para leucemia; PSA, PAP, PSM, PSMA para cáncer de próstata; Proteínasa 3 para leucemia mielógena; MUC-1 para cáncer de mama, de ovario o páncreas ; EBV-EBNA, HTLV-1 tax para linfoma, ATL o cáncer cervical; HLA-A2 mutado para cáncer de células

renales; HA1 para leucemia/linfoma. También se han descrito antígenos asociados a tumor en animales tales como Ciclina D1 y Ciclina D2 en tumores que afectan a gatos o perros.

5 Los antígenos asociados a tumor reconocidos por células T también se han descrito en Newlino L. et al. (Immunol Immunother 2004, 54:187 - 207).

Más en general, los TAA de interés en la presente invención son aquellos correspondiente a antígenos mutados, o a antígenos que se sobre-expresan en células tumorales, a antígenos compartidos, antígenos de diferenciación específicos de tejido o a antígenos virales.

10 En una realización particular de la invención, el antígeno asociado a tumor es un antígeno de papilomavirus (HPV) o es tirosinasa.

15 De acuerdo con otra realización particular de la invención, las secuencias de aminoácidos de las moléculas polipeptídicas que comprenden o consisten en un epítipo se han modificado con respecto a su secuencia de aminoácidos nativa, por ejemplo para disminuir la cantidad de restos aminoacídicos cargados negativamente dentro de la secuencia. Dicha modificación puede obtenerse eliminando algunos de estos restos aminoacídicos cargados negativamente o también añadiendo algunos restos aminoacídicos cargados positivamente, especialmente como restos flanqueantes de los epítipos. Los polipéptidos que por tanto comprenden menos restos cargados negativamente podrían favorecer la translocación del dominio catalítico del derivado polipeptídico de la invención al citosol de células diana.

25 Las secuencias de aminoácidos de las moléculas polipeptídicas que comprenden o consisten de un epítipo o un antígeno también pueden diseñarse de tal forma que estén desplegadas cuando se insertan en el derivado polipeptídico de la invención, lo que mejora la eficacia de la internalización de la molécula o moléculas de interés de acuerdo con la invención en las células diana. Dicho despliegue en polipéptidos que experimentan plegamiento como consecuencia de su contenido de aminoácidos, puede obtenerse por ejemplo, eliminando o sustituyendo restos de cisteína para evitar la formación de enlaces disulfuro que pueden estar implicados en el plegamiento de los polipéptidos. En algunos casos, es posible evitar el plegamiento de los polipéptidos preparándolos en presencia de agentes reductores que permiten evitar el replegamiento *in vivo*.

30 En una realización particular, las secuencias de aminoácidos, especialmente el antígeno, pueden comprender o consistir en epítipos crípticos.

35 Los inventores de hecho han determinado que construcciones de derivados polipeptídicos, que comprenden (i) un polipéptido de la invención que es un mutante de una proteína CyaA (polipéptido mutante) de acuerdo con las definiciones descritas en este documento y (ii) una molécula polipeptídica que tiene una secuencia de aminoácidos que alberga uno o varios fragmentos antigénicos de uno o varios antígenos, posibilita que epítipos crípticos de dichos antígenos lleguen a ser inmunogénicos como resultado de su presentación en las construcciones. Especialmente, dichas construcciones que implican polipéptidos mutantes definidos en la presente invención que comprenden molécula o moléculas polipeptídicas derivadas de antígenos de interés para aplicaciones especialmente profilácticas o terapéuticas, incluyendo propósitos de vacunación inmunoterapéutica, se procesan en células diana donde se permite que la molécula o moléculas polipeptídicas se internalicen como resultado de la translocación del dominio N-terminal del polipéptido mutante. Dicho procesamiento posibilita la presentación de epítipos a través de las moléculas MHC de clase I de las células diana, y dichos epítipos pueden comprender epítipos crípticos del antígeno que se permite que lleguen a ser inmunogénicos y en particular que establezcan una respuesta de células T en un hospedador, especialmente una respuesta CTL.

50 La invención por tanto también se refiere a un derivado polipeptídico, en particular a una proteína recombinante que comprende uno o varias moléculas polipeptídicas que tienen una secuencia de aminoácidos que alberga uno o varios epítipos de uno o varios antígenos, o que alberga dicho o dichos antígenos, insertándose dicha secuencia o secuencias de aminoácidos de dicha molécula o moléculas polipeptídicas en el mismo sitio o en diferentes sitios, especialmente en diferentes sitios permisivos de un polipéptido mutante de acuerdo con la invención, reteniendo dicha proteína recombinante la propiedad de la toxina CyaA de abordar células presentadoras de antígeno (APC), donde al menos uno de dichos epítipos es un epítipo críptico subdominante de células T y donde dicho derivado polipeptídico, especialmente dicha proteína recombinante, es capaz de provocar una respuesta de específica de antígeno contra dicha molécula o moléculas polipeptídicas.

60 En una realización específica del derivado polipeptídico de acuerdo con la invención, la una o más secuencias de aminoácidos se insertan en uno o más sitios, especialmente sitios permisivos.

65 Para la presente invención, un "sitio permisivo" es un sitio de la secuencia de la proteína CyaA donde puede insertarse un polipéptido sin afectar sustancialmente a la propiedades funcionales deseadas de la proteína CyaA especialmente sin afectar sustancialmente al direccionamiento celular, especialmente el direccionamiento a células presentadoras de antígeno (APC) por CyaA, incluyendo sin afectar sustancialmente a la unión específica al receptor

CD11b/CD18 y ventajosamente sin afectar sustancialmente a los dominios de la proteína implicados en el proceso de translocación del dominio N-terminal de CyaA al interior de una célula diana.

Se presentan métodos para seleccionar sitios permisivos por ejemplo en el documento WO93/21324, en Ladant et al., 1992, y en Osicka et al., 2000 (Infection and Immunity, 2000, 68(1):247 - 256). En particular, una metodología usando una doble selección (resistencia a antibiótico y ensayo colorimétrico en placas por α -complementación) posibilita identificar fácilmente inserciones de oligonucleótidos (que conservan la fase de lectura) en la parte del gen que codifica el dominio catalítico N-terminal de la toxina. La consecuencias funcionales de estas mutaciones sobre la actividad catalítica de la toxina se pueden analizar fácilmente, tanto genéticamente (complementación funcional de una cepa *E. coli cya⁻* cepa) como bioquímicamente (caracterización de la estabilidad de las adenilciclasas modificadas, de su actividad enzimática, de su interacción con caM, etc.). Esta metodología ha posibilitado seleccionar una gran cantidad de mutaciones para identificar los sitios que son potencialmente ventajosos para la inserción de determinantes antigénicos.

Lo sitios permisivos de la adenilato ciclasa de *Bordetella pertussis* que permiten la translocación del dominio catalítico CyaA y por lo tanto la translocación de secuencias de aminoácidos insertadas en dicho sitios permisivos incluyen, aunque sin limitación, los restos 137 - 138 (Val-Ala), los restos 224 - 225 (Arg-Ala), los restos 228 - 229 (Glu-Ala), los restos 235 - 236 (Arg-Glu), y los restos 317 - 318 (Ser-Ala) (Sebo et al., 1995). También se incluyen los siguientes sitios permisivos adicionales en realizaciones de la invención: los restos 107 - 108 (Gly-His), los restos 132 - 133 (Met-Ala), los restos 232 - 233 (Gly-Leu), y los 335 - 336 (Gly-Gln) y 336 - 337. Sin embargo, pueden usarse otros sitios permisivos en la presente invención, que se pueden identificar por ejemplo usando la metodología indicada anteriormente, especialmente sitios entre los restos 400 y 1700 de la proteína CyaA.

Para otras especies *Bordetella* los sitios permisivos correspondientes se pueden definir por comparación de secuencias y determinación de los restos correspondientes.

Como se describe en este documento, el uno o más polipéptidos de secuencia de aminoácidos puede también o alternativamente insertarse en uno y/o el otro extremos (finales) del polipéptido de la invención, preferiblemente en el extremo N-terminal del polipéptido CyaA mutante que carece de todo o parte del dominio catalítico N-terminal de la proteína CyaA de *Bordetella pertussis*, y más particularmente que carece de los restos 1 - 373.

De acuerdo con una realización específica, la una o más secuencias de aminoácidos adecuadas para provocar una respuesta inmune, se injertan en un resto aminoacídico de dicho polipéptido.

De acuerdo con la invención, la "combinación" (o inserción) de una secuencia de aminoácidos con el polipéptido mutante CyaA para proporcionar un llamado derivado polipeptídico, también mencionada como "proteína recombinante" o una "proteína híbrida", abarca la inserción genética especialmente por tecnología de ADN disponible. Como alternativa, "combinación" también abarca inserción no genética, incluyendo por ejemplo inserción química por ejemplo acoplamiento covalente realizado especialmente en un extremo de la secuencia de aminoácidos, o acoplamiento no covalente. La inserción no genética puede ser especialmente de interés cuando la secuencia de aminoácidos a insertar es sintética o semi-sintética. Los métodos para acoplar un fármaco a un polipéptido son bien conocidos en la técnica y comprenden por ejemplo enlace disulfuro usando sulfhidrilo activado por N-piridil sulfonilo.

En particular, es posible injertar moléculas a los polipéptidos de la invención por enlace químico o por inserción genética para direccionamiento *in vivo* a células diana de CyaA, tales como APC, por ejemplo células CD11b/CD18 positivas y especialmente al citosol de dichas células. De hecho, cuando se acopla una molécula correspondiente a un epítipo de célula T CD8+ dado al dominio catalítico de CyaA destoxificada, mediante un enlace disulfuro o por inserción genética, se ha descubierto que la molécula modificada por ingeniería puede provocar una respuesta CTL específica *in vivo*, mostrando de este modo que dicho epítipo de células T CD8+ se transloca al citosol de células que expresan CD11b.

En una realización preferida de la invención, el polipéptido CyaA mutante se usa en la fabricación de un vector proteico o en la preparación de una composición específicamente diseñada para cebar una respuesta de células T citotóxicas CD8+ (respuesta CTL) cuando dicha respuesta sigue al abordamiento del polipéptido CyaA mutante modificado (especialmente recombinado o conjugado) con una molécula de interés a células que expresan CD11b, seguido por la translocación de la molécula de interés al citosol de dichas células que expresan CD11b, y en particular a células dendríticas mieloides. En este contexto, la molécula de interés es o comprende preferiblemente un epítipo o un antígeno.

En otra realización preferida de la invención, el polipéptido CyaA mutante se usa en la fabricación del vector proteico o en la preparación de una composición específicamente diseñada para cebar una respuesta de células CD4+ cuando dicha respuesta sigue al abordamiento focalización de la adenilciclasa modificada (especialmente recombinada o conjugada) con una molécula de interés a células que expresan CD11b, en particular células dendríticas mieloides. En este contexto, la molécula de interés es o comprende preferiblemente un epítipo o un antígeno.

Los polipéptidos mutantes pueden usarse también en la fabricación de un vector proteico para el direccionamiento de un compuesto profiláctico o terapéutico a células que expresan CD11b. En este contexto, en una realización específica de la invención, la molécula llamada de interés tiene un valor profiláctico o terapéutico y en particular es un fármaco. Dicho compuesto profiláctico o terapéutico y en particular dicho fármaco puede estar genéticamente o químicamente acoplado al polipéptido mutante. El método para acoplar un compuesto a un polipéptido es bien conocido en la técnica y comprende por ejemplo enlace disulfuro usando sulfhidrilo activado por N-piridil sulfonilo. En una realización, una molécula de interés es un compuesto antiinflamatorio que se dirige, cuando está acoplado al polipéptido mutante, específicamente a la superficie de las células implicadas de la respuesta inflamatoria, tales como células dendríticas o neutrófilos.

Más específicamente, la presentación de antígeno para el cebado de células citotóxicas CD8⁺ selectivas se realiza principalmente realizada por células dendríticas mieloides.

Por consiguiente, en una realización específica, el polipéptido CyaA mutante usado para la fabricación del vector proteico es una adenilciclase modificada genéticamente que contiene una o más moléculas químicamente acopladas mediante un enlace disulfuro a uno o más restos insertados de cisteína localizados dentro del dominio catalítico del polipéptido CyaA mutante. De hecho, se pueden acoplar químicamente múltiples moléculas al polipéptido CyaA mutante mediante un enlace de disulfuro a diferentes restos de cisteína localizados en diferentes sitios permisivos dentro del dominio catalítico.

Los polipéptidos mutantes o derivados polipeptídicos de acuerdo con la invención son adecuados para su uso en terapia o profilaxis.

Por terapia o efecto terapéutico se entiende cualquier efecto que sea beneficioso para la afección de un paciente, que sea curativo o suficiente para limitar los síntomas o las consecuencias de una afección patológica, incluyendo limitación de la progresión de una afección patológica. Por terapia o efecto terapéutico también se abarca la prevención del comienzo de una afección patológica.

Los polipéptidos mutantes o derivados polipeptídicos de acuerdo con la invención son en particular adecuados para provocar una respuesta inmune mediada por células tal como una respuesta inmune de células T o una respuesta inmune de células B en un hospedador que lo necesite. Incluye respuesta CTL y Th, especialmente Th1, incluyendo respuesta de células T CD4⁺ y/o respuesta de células T CD8⁺.

La capacidad de un polipéptido derivado de proteína CyaA de provocar una respuesta inmune mediada por células puede ser suficiente para prevenir el crecimiento tumoral *in vivo* o incluso para posibilita la regresión tumoral en un animal. También puede potenciarse por activación del componente innato de la respuesta inmune a través de la activación TLR y por activación negativa del componente regulador de la respuesta inmune a través del uso de agentes quimioterapéuticos. La invención proporciona medios que posibilitarán que se obtengan dichos resultados en condiciones mejoradas de de seguridad como resultado de la mutaciones combinadas E570Q y K86oR, que se han seleccionado.

La solicitud describe métodos terapéuticos que comprenden la administración a un paciente animal o humano del polipéptido mutante o derivado polipeptídico de acuerdo con la invención a un paciente para provocar una respuesta inmune de células T o una respuesta inmune de células B en un hospedador que lo necesite.

Los polipéptidos mutantes o derivados polipeptídicos de acuerdo con la invención pueden usarse en particular para la prevención o el tratamiento de una enfermedad seleccionada entre neoplasia, cánceres y enfermedades infecciosas seleccionadas entre enfermedades inducidas virales, retrovirales, bacterianas o fúngicas. En particular, los derivados polipeptídicos pueden usarse para el tratamiento de infecciones por VIH en un paciente.

Se proporciona especialmente que en una realización particular de la invención, el polipéptido mutante o derivado polipeptídico de CyaA es adecuado para el tratamiento de tumores infiltrantes o vascularizados frente a tumores superficiales o para el tratamiento de tumores metastásicos frente a tumores primarios, de acuerdo con los criterios clínicos conocidos para la clasificación de tumores.

Los tumores sólidos son especialmente una diana para el tratamiento a través del uso del derivado polipeptídico de la invención.

Entre los tumores que pueden ser candidatos para el tratamiento con el derivado polipeptídico de la invención, se describen los siguientes, para los cuales se han caracterizado antígenos asociados a tumor, como ejemplos:

melanoma, especialmente melanoma metastásico; carcinoma de pulmón; carcinoma de cabeza y cuello; carcinoma cervical, carcinoma esofágico; carcinoma de vejiga, especialmente carcinoma de vejiga infiltrante; carcinoma de próstata; carcinoma de mama; carcinoma colorrectal; carcinoma de células renales; sarcoma; leucemia; mieloma. Para estos diversos tipos histológicos de cánceres, se ha demostrado que los péptidos

antigénicos se expresan específicamente en muestras de tumor y se reconocen por células T, especialmente por células T CD8⁺ o células T CD4⁺.

5 La invención además se refiere al uso de un derivado polipeptídico de acuerdo con la invención, para la preparación de una composición terapéutica para el tratamiento de una enfermedad seleccionada entre neoplasia, cánceres y enfermedades infecciosas seleccionadas entre enfermedades inducidas virales o retrovirales.

10 En una realización preferida, el polipéptido o derivado polipeptídico de acuerdo con la invención se puede administrar al paciente en combinación con un adyuvante y/o en combinación con otra molécula o agente terapéuticamente activo.

15 En el contexto de la presente invención dicha "otra molécula o agente terapéuticamente activo" es uno que puede ser beneficioso para la afección de un paciente al cual se administra. Es especialmente un principio activo adecuado para su uso en la fabricación de un fármaco. Puede ser un compuesto adecuado para potenciar, aumentar o modular el efecto de un principio terapéuticamente activo.

El polipéptido CyaA mutante o el polipéptido derivado del mismo se puede administrar con una molécula o agente terapéuticamente activo, en particular una adecuada para provocar una respuesta inmune en un paciente.

20 En particular, el polipéptido CyaA mutante o el polipéptido derivado del mismo se puede administrar con un agente terapéuticamente activo adecuado para modular una respuesta celular en un paciente, en particular por reducir o bloquear la capacidad inmunosupresora de células T reguladoras.

25 De acuerdo con una realización particular de la invención, dicho efecto sobre una respuesta celular reguladora se puede obtener con un agente que modula una célula T reguladora y/o que modula otra respuesta supresora celular, tal como la respuesta celular supresora mieloide, dirigiendo dicho agente a dichas células reguladoras, especialmente células T, agotando o inactivando estas células (tal como con anticuerpo CD25-específico, o ciclofosfamida), alterando el tráfico de dichas células, especialmente células T reguladoras (tal como anticuerpo CCL22-específico) o alterando diferenciación y señalización de dichas células (tal como por bloqueo de señal FOXP3 (forkhead box P3)).

30 De acuerdo con una realización particular de la invención, el agente modulador de una respuesta celular reguladora aborda moléculas supresoras, especialmente dichas moléculas presentes en APC (tales como B7-H1, B7-H4, IDO (indolamina 2,3-dioxigenasa) o arginasa) o en células T (tales como CTLA4 (antígeno 4 asociado a linfocitos T citotóxicos) o PD1 (muerte celular programada 1)), o aborda moléculas inmunosupresoras solubles (tales como TGF beta (factor de crecimiento transformante), IL-10, VEGF (factor de crecimiento del endotelio vascular), COX2 (ciclooxigenasa 2)).

35 Como ejemplos de agentes que tienen un efecto sobre una respuesta celular reguladora, se proponen agentes citotóxicos, que pueden eliminar células T reguladoras u otras células inmunosupresoras, o que pueden bloquear su actividad y/o desarrollo y/o acumulación.

40 En una realización particular de la invención, el agente que modula la respuesta celular reguladora, especialmente una respuesta de células T reguladoras, es un agente quimioterapéutico. Especialmente se selecciona entre agentes quimioterapéuticos conocidas como agentes antineoplásicos y usados en quimioterapia. Dichos agentes incluyen aquellos que ayudan a reducir la carga del tumor, aquellos que actúan aumentando la sensibilidad de las células tumorales al tratamiento o aquellos que posibilitan la eliminación o inactivación de células reguladoras inmunes. Los agentes quimioterapéuticos usados dentro del marco de la invención de este modo potencian la inmunidad antitumoral.

45 En una realización particular de la invención, el agente quimioterapéutico es un agente alquilante. Especialmente, es ciclofosfamida (CTX) (Sigma, Steinheim, Alemania). La ciclofosfamida es capaz de agotar o inactivar células T reguladoras.

50 En otra realización particular de la invención, el agente quimioterapéutico es un agente intercalante.

En una realización particular, el agente quimioterapéutico es doxorubicina (DOX) (Calbiochem, La Jolla, CA, EEUU).

55 El agente quimioterapéutico se administra ventajosamente por dosis bajas.

El polipéptido CyaA mutante o el polipéptido derivado del mismo se puede administrar también con un componente adyuvante, adecuado para activar la respuesta inmune innata cebada por un tumor en un paciente.

60 En una realización particular de la invención, el componente adyuvante se selecciona en el grupo de componentes que consisten en ácidos nucleicos, peptidoglucanos, carbohidratos, péptidos, citoquinas, hormonas y moléculas

pequeñas, donde dicho componente adyuvante es capaz de señalar a través de receptores de reconocimiento de patrones (PRR).

Los PRR son conocidos por mediar la respuesta inmune innata a patógenos, y a tumores, por reconocimiento de las llamadas marcas conservadas evolutivamente de patógenos (patrones moleculares asociados a patógenos, PAMP). Los PRR están presentes en una diversidad de células inmunes incluyendo células dendríticas, células citolíticas naturales, células B, y también en algunas células no inmunes tales como células epiteliales o células endoteliales. Los PRR y su implicación en la respuesta inmune innata se describen en Pashine A. et al. (Nature medicine supplement volumen 11, N° 4, abril 2005).

En particular un componente adyuvante para la activación de la respuesta inmune innata puede abordar PRR y por lo tanto activar la señalización a través de PRR, donde dichos PRR abarcan receptores tipo Toll o dominio de oligomerización de unión a nucleótido (NOD) o lectina tipo C.

En una realización particular de la invención, el componente de adyuvante es un agonista de receptor tipo Toll (TLR). El agonista de receptor tipo Toll se formula especialmente para activar de forma eficaz el sistema inmune innato de un paciente. Dicho agonista TLR es capaz de unirse al TLR, es decir, es un ligando del TLR y además es capaz de potenciar la respuesta inmune provocada bajo el control de dicho TLR.

Por motivos de ilustración, los agonistas TLR se seleccionan entre el grupo de agonistas TLR-9, TLR-8, TLR-3 y TLR-7. Sin embargo pueden usarse agonistas de otros receptores TLR para realizar la invención, tales como agonistas de los receptores TLR2, TLR4, TLR5.

El agonista TLR usado en la invención puede ser un agonista natural o sintético. Puede ser una combinación de diferentes agonistas del mismo o de diferentes receptores tipo toll.

De acuerdo con una realización particular de la invención, el agonista TLR es una secuencia de nucleótidos inmunoestimuladora, especialmente una secuencia de nucleótidos estabilizada, por ejemplo estabilizada como resultado de modificación estructural tal como modificación fosforotioato. La secuencia de nucleótidos puede protegerse también contra degradación por formulación específica. Especialmente formulación de liposoma de la misma, por ejemplo, suspensión de liposoma, puede ser ventajosa para la administración eficaz de la secuencia de nucleótidos inmunoestimuladora.

En una realización particular de la invención, la secuencia de ácido nucleico inmunoestimuladora es un ARN monocatenario.

En una realización particular de la invención, la secuencia de nucleótidos inmunoestimuladora comprende un motivo CpG y especialmente es un oligonucleótido CpG (CpG ODN). Como ejemplo de oligonucleótidos CpG adecuados la invención proporciona ligandos TLR-9 tales como CpG ODN tipo A, es decir, CpG 2216 que tiene la secuencia de nucleótidos 5'-GGGGGACGATCGTCGGGGG-3' o CpG ODN tipo B, es decir, CpG 1826 que tiene la secuencia de nucleótidos 5'-TCCATGACGTTCTGACGTT-3'.

El oligonucleótido CpG puede usarse después de complejarse con DOTAP (Roche Mannheim, Alemania), para protegerlo contra la degradación y para facilitar su captación.

De acuerdo con otra realización particular de la invención, el agonista TLR es una molécula pequeña. Las moléculas pequeñas adecuadas como agonistas TLR son, por ejemplo, derivados amina de imidazoquinolina, tales como el llamado R848 (resiquimod), es decir, 4-amino-2-etoximetil-a,a, dimetil-1-H-imidazo[4,5c]quinolina -1-etanol disponible en Invivogen, como ligando TLR-7, o el llamado R837 (imiqimod) disponible en Aldara como agonista TLR-7.

Otras moléculas adecuadas como agonistas TLR son poliuridina (pU) como ligando TLR-3, o ácido policitidílico (PICO) como ligando TLR-7.

Estas moléculas pueden formularse para facilitar su captación y/o para protegerlos de la degradación. Estas moléculas se pueden preparar también como una formulación de liposoma, especialmente como una suspensión de liposoma, para administración a un paciente.

De acuerdo con otra realización particular de la invención, el componente adyuvante puede ser un componente adyuvante basado en células. Un ejemplo del mismo es células dendríticas que se sabe que son capaces de cebar una respuesta de linfocitos, estando dichas células dendríticas posiblemente condicionadas *ex vivo* antes de su administración, para aumentar su actividad de estimulación de la respuesta de células T. Las células dendríticas por tanto pueden estimularse con adyuvantes que interaccionan con los PRR, incluyendo ligandos o agonistas TLR (Pashine A. et al. Nature Medicine Supplement volumen 11, N° 4, abril 2005 pág. S63-S68).

Como alternativa, el polipéptido o derivado polipeptídico de acuerdo con la invención se puede administrar al paciente sin un adyuvante.

De hecho los inventores han demostrado previamente que puede cebarse la CTL específica para el antígeno vectorizado *in vivo* después de una inyección intravenosa única de la toxina recombinante, especialmente sin necesidad de proporcionar un adyuvante heterólogo. Estos resultados y en particular el direccionamiento específico del epítipo a células dendríticas mieloides posibilita eludir la necesidad de adyuvante y célula T CD4+ auxiliar.

Por lo tanto, la invención también se refiere al uso de un polipéptido CyaA mutante recombinado con una molécula y especialmente un péptido de interés para la preparación de una composición formulada para administración intravenosa y que posibilite una respuesta inmune de células T CD8+ *in vivo*, estando dicha composición libre de un adyuvante heterólogo. La invención también se refiere esta composición como tal.

La solicitud describe métodos terapéuticos que comprenden la administración del polipéptido mutante o derivado polipeptídico de acuerdo con la invención a un paciente animal o humano que padece una enfermedad seleccionada entre neoplasia, cánceres y enfermedades infecciosas seleccionados entre enfermedades inducidas virales, retrovirales, bacterianas o fúngicas.

El polipéptido mutante o derivado polipeptídico se puede administrar en particular con una molécula terapéuticamente activa y/o un adyuvante.

El polipéptido CyaA mutante o el derivado polipeptídico, la molécula terapéuticamente activa y/o un adyuvante pueden administrarse juntos como parte de una composición farmacéutica que comprende además un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.

Como alternativa, los diversos tipos de moléculas descritas en este documento para realizar la invención usada, pueden administrarse por separado o simultáneamente en el tiempo (especialmente para el polipéptido CyaA mutante o el derivado polipeptídico y el adyuvante) o por separado en el tiempo (especialmente para el polipéptido CyaA mutante).

La administración de la molécula terapéuticamente activa se puede realizar alternativamente antes y después de la administración del polipéptido CyaA mutante o el derivado polipeptídico y/o el adyuvante. También puede ser secuencial en el tiempo.

Un régimen particular que puede adoptarse es un protocolo de administración repetida, especialmente en un protocolo que comprende dos rondas o más de administración de al menos uno de los compuestos seleccionados entre el polipéptido CyaA mutante o el derivado polipeptídico, el agente terapéuticamente activo y/o el adyuvante.

La invención también se refiere a una composición farmacéutica que comprende un polipéptido CyaA mutante o un derivado polipeptídico de acuerdo con la invención, un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable, y opcionalmente un adyuvante y/u otra molécula terapéuticamente activa.

La solicitud describe un kit de partes que comprenden el polipéptido CyaA mutante o el derivado polipeptídico, una molécula terapéuticamente activa y/o un adyuvante.

Los compuestos del kit de partes o la composición de la invención pueden darse al paciente especialmente a través de administración intravenosa, administración intratumoral o administración subcutánea.

El kit de partes o la composición tiene la capacidad de abordar (i) la respuesta inmune adaptativa, a través del polipéptido CyaA mutante o el derivado polipeptídico descrito en la presente solicitud, (ii) regular negativamente la respuesta inmune reguladora a través del agente terapéuticamente activo, y si el adyuvante está presente, abordar (iii) el componente innato de la respuesta inmune, activando dicha respuesta innata a través del adyuvante.

La solicitud describe un método de tratamiento de un paciente en necesidad del mismo, un paciente humano o animal, que comprende la etapa de administrar los componentes del kit de partes o de la composición descrita en este documento.

La invención en particular también se refiere a una nueva composición inmunogénica formulada para su administración, especialmente administración intravenosa, a un hospedador animal o humano, caracterizada por que comprende un derivado polipeptídico CyaA recombinante que comprende un antígeno insertado en el dominio catalítico.

La invención además se refiere a una composición farmacéutica para su administración a un ser humano o animal formulada para dirigir una molécula de interés específicamente a células que expresan CD11b caracterizada por que dicha molécula de interés está acoplada a un polipéptido CyaA mutante descrito en este documento.

En otra realización específica, la composición farmacéutica o inmunogénica comprende una construcción de ácido nucleico que codifica el derivado polipeptídico CyaA recombinante que comprende un polipéptido mutante CyaA como se define en este documento acoplado a una molécula de interés.

5 Además, la invención también se refiere al uso de la composición inmunogénica definida anteriormente para la preparación de una vacuna o una composición inmunoterapéutica, para su administración a un hospedador animal o humano.

10 Como se usa en este documento, la expresión "composición inmunoterapéutica" se refiere a una composición que conduce a una respuesta inmunológica y que está asociada a tratamientos terapéuticos, tales como tratamiento contra neoplasia, cánceres, infecciones virales, infecciones fúngicas, infecciones por parásitos o infecciones bacterianas.

15 La solicitud describe un método para inmunizar a un hospedador animal o humano, donde dicho método comprende las etapas de:

a) proporcionar una composición inmunogénica como se ha definido anteriormente;

20 b) administrar dicha composición inmunogénica, preferiblemente mediante vía intravenosa, a dicho hospedador para promover una respuesta inmune.

En particular, las composiciones inmunogénicas de la invención son capaces de inducir o estimular, *in vivo* o *in vitro* una respuesta celular inmune que implique específicamente células dendríticas. Las composiciones inmunogénicas de la invención pueden usarse para vacunación preventiva o terapéutica de un paciente.

25 Como consecuencia, en una realización específica, la composición inmunogénica o farmacéutica está ventajosamente desprovista de adyuvantes cebadores usados habitualmente en la técnica, tales como hidróxido de aluminio.

30 La invención además se refiere a un método para la preparación de un vector proteico adecuado para el suministro de una molécula de interés a una célula que comprende la unión la molécula de interés a un polipéptido mutante CyaA definido en este documento.

35 La solicitud describe moléculas de ácido nucleico, en particular moléculas de ADN o ARN, que codifican un polipéptido o derivado polipeptídico definido anteriormente.

La solicitud describe células eucariotas o procariotas que comprenden las moléculas de ácido nucleico definidas anteriormente.

40 La solicitud describe células eucariotas, preferiblemente células de mamífero, que comprenden un polipéptido CyaA mutante o derivado polipeptídico definido anteriormente. Como se describe en este documento, las células son células humanas.

45 La solicitud describe células eucariotas, preferiblemente células de mamífero, transformadas con el vector proteico definido anteriormente.

Figuras

50 Fig. 1. Sustituciones en los dominios de formación de poros y de acilación sinergizan en la disminución de la actividad hemolítica específica de CyaA. (A) Se incubaron eritrocitos de oveja (5×10^8 /ml) en tampón TNC con 5 μ g/ml de proteínas CyaA enzimáticamente activas a 37°C. Después de 30 min, se lavaron alícuotas de suspensiones celulares repetidamente para retirar la CyaA no unida y se usaron para determinar la cantidad de actividad AC asociada a células e invasiva de células. La actividad hemolítica se midió después de 5 horas de incubación como la cantidad de hemoglobina liberada por determinación fotométrica (A_{541}). La actividad de CyaA intacta se tomó como el 100%. (B) La reducida actividad de unión celular de las proteínas con la sustitución K860R se compensó aumentando su concentración de 5 μ g/ml a 25 μ g/ml. Las actividades de CyaA/233OVA (CyaA/OVA) en presencia se tomaron como el valor del 100%. Los resultados representan valores promedio de al menos tres experimentos independientes realizados por duplicado. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas (**, $p < 0,001$) de actividades de CyaA (Fig. 1A) o CyaA/OVA (Fig. 1B).

60 Fig. 2. CyaAIOVA/E570Q+K860R se une y se transloca al interior de monocitos CD11b⁺. (A) Se incubaron células J774A.1 (10^6 /ml) en D-MEM durante 30 min a 4°C con 2,5 μ g/ml de CyaA, se lavaron repetidamente, y se determinó la cantidad de actividad AC asociada a las células en lisados celulares. Para bloquear el receptor CD11b/CD18, las células se incubaron durante 30 min con el anticuerpo M1/70 específico de CD11b (Exbio, República Checa) a una concentración final de 10 μ g/ml antes de la adición de CyaA (**, $p < 0,001$). (B) La capacidad de translocación del dominio AC de las construcciones se evaluó como la capacidad de penetrar en las células y convertir ATP citosólico en AMPc. Las células J774A.1 se incubaron con construcciones de CyaA

durante 30 minutos a 37°C y se determinaron las cantidades de AMPc acumuladas en lisados celulares (41). El receptor CD11b/CD18 se bloqueó con M1/70 como anteriormente. Se muestran los resultados representativos de tres determinaciones independientes realizadas por duplicado.

Fig. 3. El toxoide E570Q+K860R no permeabiliza células J774A.1. Se realizaron mediciones de pinzamiento zonal de célula completa sobre células J774A.1 individuales a temperatura ambiente expuestas a 1 µg/ml de proteínas (A) CyaA/233OVA/AC⁻ o (B) CyaA/2330VA/E570Q+K860R/AC⁻ como se describe en materiales y métodos. Las curvas mostradas son representativas de seis determinaciones en 3 experimentos independientes.

Fig. 4. El toxoide con sustituciones E570Q+K860R suministra el epítipo de células T OVA para su presentación por moléculas MHC de clase I e inducción de CTL CD8⁺. (A) Se incubaron BMDC (3 x 10⁵ células/pocillo) usadas como APC en presencia de concentraciones indicadas (0 a 60 nM) de los toxoides que albergan el epítipo OVA o con CyaA/AC⁻ simulado. Tras el co-cultivo durante 24 horas con células T B3Z (1 x 10⁵ células/pocillo), se determinó la secreción de IL-2 por las células B3Z estimuladas por el método de proliferación de CTLL. Los resultados se expresan como Δcpm de [³H]timidina incorporada (cpm en presencia de toxoide - cpm en ausencia de toxoide) ± SD y son representativos de cinco experimentos independientes. (B) Análisis de la inducción de respuestas CTL específicas de OVA (SIINFEKL) por ensayo de eliminación *in vivo*. En el día 0, los ratones recibieron 50 µg i.v. de toxoides simulador AC⁻ u OVA/AC⁻ y en el día 7, se les inyectó i.v. una mezcla (1:1) de esplenocitos CFSE^{high} cargados con péptido OVA (SIINFEKL) y CFSE^{low} no cargados. Se determinó la cantidad de células CFSE-positivas restantes en el bazo después de 20 h por análisis FACS, documentado para un ensayo de eliminación *in vivo* representativo en el ensamblaje de panel superior de diagramas, donde se indican los porcentajes de células en las entradas. El panel inferior muestra resultados combinados de ensayos de eliminación *in vivo* para tres experimentos independientes. Se determinó la significancia estadística por el ensayo t de Student (p= 0,75 para OVA/AC⁻ frente a OVA/E570Q+K860R/AC⁻).

Fig. 5. Modelo de acción de CyaA sobre la membrana. (A) El modelo predice un equilibrio entre dos conforméromos de CyaA en solución, insertándose cada uno de ellos en la membrana celular en diferente conformación. Uno produciría un precursor de translocación de CyaA monomérica, suministro del dominio AC al citosol y flujo entrante concomitante de iones calcio a las células. El conforméromo se insertaría como precursor de poro que oligomeriza en un poro de CyaA. (B) El efecto sinérgico de las sustituciones E570Q y K860R bloquearía selectivamente la capacidad de los precursores de poro CyaA de oligomerizar en un poro, mientras que la capacidad de los precursores de translocación de suministrar el dominio AC a través la membrana permanecería sin afectar.

Fig. 6. Secuencia de aminoácidos de la toxina CyaA de *Bordetella pertussis* (SEC ID N° 1).

Fig. 7. Secuencia de aminoácidos del mutante CyaA/E570Q+K860R de *Bordetella pertussis* (SEC ID N° 2).

Fig. 8. Secuencia de aminoácidos del mutante CyaA/E570Q+K860R/AC⁻ de *Bordetella pertussis* (SEC ID N° 3).

Fig. 9. Secuencia de aminoácidos del mutante CyaA/2330VA/E570Q+K860R/AC⁻ de *Bordetella pertussis* (SEC ID N° 4).

Fig. 10. Plásmido que codifica el mutante CyaA/E570Q+K86OR/AC⁻ (QR-AC⁻).

Fig. 11. Secuencia de ADN del plásmido QR-AC⁻ que codifica el mutante CyaA/E570Q+K860R/AC⁻ (SEC ID N° 5).

Fig. 12. Plásmido que codifica el mutante CyaA/2330VA/E670Q+K86OR/AC⁻ (OVA-QR-AC⁻).

Fig. 13. Secuencia de ADN del plásmido OVA-QR-AC⁻ que codifica el mutante CyaA/2330VA/E570Q+K860R/AC⁻ (SEC ID N° 6).

Ejemplos

La toxina adenilatociclasa se transloca a través de la membrana de la célula diana sin formación de un poro

Materiales y métodos

Construcción, producción y purificación de proteínas CyaA. Las modificaciones que producen las construcciones CyaA/AC⁻, CyaA/233OVA, CyaA/E570Q y CyaA/K860R se han descrito previamente (13, 20, 21) y se introdujeron en CyaA/233OVA/AC⁻ individualmente o en combinación. Las proteínas derivadas de CyaA se produjeron en *E. coli* XL-1 Blue y se purificaron cerca de homogeneidad como se ha descrito previamente (29). Durante la cromatografía hidrófoba, la resina con toxina unida se lavó repetidamente con isopropanol al 60% (30) para reducir el contenido de endotoxinas de las muestras de CyaA por debajo de 100 UI/mg de proteína, determinado por ensayo LAL QCL-1 000 (Cambrex).

Se depositó una cepa de *Escherichia coli* XL1-Blue (Stratagene) que contenía el plásmido QR-AC⁻ (figura 10) que codifica el mutante CyaA/E570Q+K860R/AC⁻ el 18 de marzo de 2009 a la CNCM (Collection Nationale de Cultures de Microorganismes, Francia) con el número de acceso CNCM I-4136 (figura 10). La secuencia de ADN del plásmido QR-AC⁻ (SEC ID N° 5) se describe en la figura 11.

Se depositó una cepa de *Escherichia coli* cepa XL1-Blue (Stratagene) que contenía el plásmido OVA-QR-AC⁻ (figura 12) que codifica el mutante CyaA/233OVA/E570Q+K860R/AC⁻ el 18 de marzo de 2009 a la CNCM (Collection Nationale de Cultures de Microorganismes, Francia) con el número de acceso CNCM I-4137. La secuencia de ADN del plásmido OVA-QR-AC⁻ (SEC ID N° 6) se describe en la figura 13.

Unión a las células y actividades hemolíticas sobre eritrocitos de oveja. Se incubaron 5×10^8 eritrocitos de oveja lavados en Tris 50 mM pH 7,4, NaCl 150 mM y CaCl₂ 2 mM (tampón TNC) a 37°C con 5 µg/ml de proteínas CyaA y se determinó la unión a las células, la AC invasiva de células y las actividades hemolíticas de CyaA como se ha descrito en detalle previamente (13). Se analizó la significancia de diferencias en valores de actividad usando un análisis de la varianza de un factor (ANOVA) con el post-ensayo de Bonferroni (SigmaStat v. 3.11, Systat, San Jose, CA).

Unión a macrófagos, elevación de AMPc y capacidades de lisis celular de CyaA. Se incubaron macrófagos J774A.1 (10^6) en D-MEM con 2,5 µg/ml de variantes de CyaA durante 30 min a 4°C, antes de eliminación de toxina sin unir por tres lavados en D-MEM. Las células se lisaron con Triton X-100 al 0,1% para la determinación de la actividad AC unida a las células. Para ensayos de AMPc intracelular, se incubaron 10^5 células con CyaA durante 30 minutos en D-MEM con IBMX (3-isobutil-1-metilxantina) 100 µM, la reacción se detuvo por adición de Tween-20 al 0,2% en HCl 100 mM, las muestras se hirvieron durante 15 min a 100°C, se neutralizaron por adición de imidazol no tamponado 150 mM y se midió el AMPc como se ha descrito (29). Para bloquear el receptor CD11b/CD18, las células se preincubaron durante 30 min en hielo con el MAb M1/70 de bloqueo CD11b-específico (Exbio, República Checa) a una concentración final de 10 µg/ml antes de la adición de CyaA. La lisis inducida por toxina de las células J774A.1 se determinó usando el kit de ensayo CytoTox 96 (Promega) como la cantidad de lactato deshidrogenasa liberada de 10^5 células en 3 horas de incubación con 10 µg/ml de la proteína apropiada a 37°C en D-MEM como se ha descrito (8). La significancia de las diferencias en los valores de actividad se analizó como anteriormente.

Mediciones de pinzamiento zonal. Las mediciones de pinzamiento zonal de célula completa se realizaron sobre células J774A.1 en baño en HBS (NaCl 140 mM, KCl 5 mM, CaCl₂ 2 mM, MgCl₂ 3 mM, Hepes-Na 10 mM, glucosa 50 mM; pH 7,4). Se cargaron micropipetas de vidrio pulidas al fuego con diámetro exterior de aproximadamente 3 µm con una solución de gluconato de potasio 125 mM, KCl 15 mM, CaCl₂ 0,5 mM, MgCl₂ 1 mM, EGTA 5 mM, HEPES-KOH 10 mM pH 7,2. Las resistencias resultantes de los microelectrodos fueron 3 a 5 MΩ. Las células se pinzaron a -40 mV, los datos se filtraron a 1 kHz y se digitalizaron a 2 kHz usando el amplificador Axopatch 200A, el digitalizador Digidata 1320A y el paquete de software PClamp-9 (Axon Instruments, Foster City, CA).

Ratones y líneas celulares. Se mantuvieron C57BL/6 hembra obtenidos de Charles River Laboratorys en condiciones específicas libres de patógenos y se manipularon de acuerdo con las directrices institucionales. Las células CTLL-2 se obtuvieron de la ATCC. El hibridoma B3Z específico de células T CD8⁺ para el epítipo OVA K^b restringido (SIINFEKL), se proporcionó por N. Shastri (Universidad de California, Berkeley) y se mantuvo en presencia de 1 mg/ml de G418 y 400 µg/ml de higromicina B en medio RPMI 1640 completo (Invitrogen Life Technologies) con FCS inactivado por calor al 10%, 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomina, y 2-ME 5×10^{-5} M.

Estudios de presentación de antígeno. Se incubaron células dendríticas de médula ósea (BMDC, 3×10^5 por pocillo) usadas como APC en presencia de diversas concentraciones (0 a 60 nM) del CyaA/OVA/AC⁻ recombinante que porta el epítipo OVA (SIINFEKL) o el CyaA/AC⁻ simulado y se cocultivaron durante 24 horas con células T B3Z (1×10^5 por pocillo), se reconociendo selectivamente los complejos OVA SIINFEKL/H-2K^b MHC clase I. Después de 18 h de cultivo, se congelaron los sobrenadantes durante al menos 2 h a -80°C. La cantidad de IL-2 producida por las células B3Z estimuladas se determinó después por el método de proliferación CTLL. En resumen, se cultivaron 10^4 células de la línea CTLL IL-2-dependiente por pocillo con 100 µl de sobrenadante en 200 µl de volumen final. Veinticuatro horas después, se añadió [³H]-timidina (50 µCi/pocillo) y se recogieron las células 6 h después con un recolector automatizado de células. La [³H]-timidina incorporada se detectó por recuento de centelleo. Cada punto se hizo por duplicado y el experimento se repitió cinco veces. Los resultados se expresan en Δcpm de [³H]-timidina incorporada (cpm en presencia de toxoide - cpm en ausencia de toxoide).

Ensayo de eliminación *in vivo*. Para el cebador CTL, se inmunizaron ratones por inyección i.v. con 50 µg de CyaA/OVA/AC⁻ recombinante que porta el epítipo OVA (SIINFEKL) o CyaA/AC⁻ simulado. Siete días después de la inmunización, se pulsaron esplenocitos vírgenes singénicos con péptido OVA (SIINFEKL) (10 µg/ml) (30 min, 37°C), le lavaron extensivamente y se marcaron con una elevada concentración (1,25 µM) de succinimidil éster de carboxifluoresceína (CFSE; *Molecular Probes*, Eugene, OR). La población de control no pulsada se marcó con una concentración baja (0,125 µM) de CFSE. Las células marcadas CFSE^{high}-y CFSE^{low} se mezclaron en una proporción 1:1 (5×10^6 células de cada población) y se inyectaron i.v. en ratones. Las células esplénicas se recogieron 20 h

después, se lavado y se resuspendieron en tampón FACS (PBS suplementado con BSA al 1% y NaN₃ al 0,1%). El número de células CFSE-positivas restante en el bazo después de 20 h se determinó por FACS. El porcentaje de lisis específica se calculó del siguiente modo: porcentaje de lisis específica = $100 - [100 \times (\% \text{ de ratones inmunizados CFSE}^{\text{high}}/\% \text{ de ratones vírgenes CFSE}^{\text{high}})/(\% \text{ ratones vírgenes CFSE}^{\text{low}})]$.

Análisis estadístico: La significancia de diferencias en los valores se analizó usando un análisis de la varianza de un factor (ANOVA) con post-ensayo de Bonferroni (SigmaStat v. 3.11, Systat, San Jose, CA).

10 Resultados

Eliminación combinada de glutamato 570 cargado negativamente y lisina 860 acilada extirpa la capacidad de permeabilización celular de CyaA. El modelo de trabajo de acción de CyaA predice que CyaA se puede modificar para perder su actividad de formación de poros (hemolítico) conservando al mismo tiempo la capacidad de suministrar el dominio AC al de células diana. Para ensayar esta hipótesis, los inventores buscaron producir construcciones de CyaA que mostraran como actividades hemolíticas y citolíticas los más bajas posibles, sobre la observación anterior de que la capacidad de los toxoides CyaA/AC⁻ de lisar células puede modularse tanto positiva como negativamente por sustituciones dentro del dominio de formación de poros (8, 12 - 14, 18). Para posibilitar la evaluación de la penetración en células diana también para los toxoides CyaA/AC⁻, los inventores obtuvieron dichos mutantes de una toxina CyaA/233OVA que se había marcado previamente por inserción del péptido SIINFEKL de ovalbúmina (OVA). Esta variante de CyaA se eligió ya que la inserción del epítipo indicado de células T CD8⁺ K^b-restringido en el resto 233 no afecta a la actividad AC y permite cuantificar la translocación de la enzima OVA/AC en células como elevación del AMPc citosólico. De forma más importante, la presencia del epítipo OVA permite evaluar también la capacidad de toxoides CyaA/233OVA/AC⁻ a enzimáticamente inactivos de suministrar su dominio OVA/AC⁻ al citosol de células presentadoras de antígeno (APC) CD11b⁺, ya que esto posibilita el procesamiento por el proteasoma y la presentación en superficie celular del epítipo OVA en glucoproteínas MHC clase I que puede determinarse como estimulación de células T CD8⁺ OVA-específicas, tanto *in vitro* como *in vivo* (20).

Para generar toxoides de CyaA/AC⁻ que posiblemente carecen de actividad citolítica, los inventores combinaron las sustituciones E570Q y K860R que previamente han demostrado reducir la actividad hemolítica específica de CyaA sobre eritrocitos de oveja, con la sustitución E570Q que se ha descubierto que reduce también la actividad citolítica de CyaA/AC⁻ en monocitos J774A.1 CD11b⁺ (8, 13). Estas sustituciones se realizaron por ingeniería en CyaA/233OVA/AC⁻ individualmente y en combinación y las actividades específicas hemolítica y citolíticas de los toxoides resultantes se compararon usando eritrocitos de oveja como diana CD11b⁻ modelo y J774A.1 como diana CD11b⁺ modelo en paralelo (tabla I). De acuerdo con los resultados obtenidos previamente con toxoides que carecen del epítipo OVA (4, 8, 13, 21), en la condiciones usadas los toxoides OVA/AC⁻ que portan individualmente las sustituciones E570Q y K860R mostraron respectivamente una actividad hemolítica relativa dos veces reducida (55 ± 8) y nula (1 ± 1) en eritrocitos y la actividad citolítica relativa del toxoide E570Q hacia células J774A.1 que expresan CD11b también estaba reducida (37 ± 10), en comparación con OVA/AC⁻. A su vez, como se esperaba de los resultados obtenidos con una construcción K860R enzimáticamente activa, a pesar de la baja actividad hemolítica sobre eritrocitos CD11b⁻, el toxoide K860R mostró una actividad citolítica relativa sólo ligeramente reducida sobre células J774A.1 CD11b⁺ ($72 \pm 22\%$), confirmando que el defecto estructural causado por la sustitución K860R se rescataba por interacción con el receptor CD11b/CD18 (4). Sin embargo, cuando se combina con E570Q, la sustitución K860R mostró un claro efecto sinérgico en reducir la actividad citolítica relativa de la construcción E570Q+K860R hacia células J774A.1 hasta $14 \pm 7\%$

Tabla I: actividades citolíticas de OVA/AC⁻ y derivados sobre eritrocitos de oveja y macrófagos J774A.1.

Proteína	Lisis de eritrocitos (% de AC ⁻) ^a	Lisis de células J774A.1 (% de AC ⁻) ^b
AC ⁻	100 ± 5	100 ± 10
OVA/AC ⁻	93 ± 4	93 ± 12
OVA/E570Q/AC ⁻	55 ± 8**	37 ± 10**
OVA/K860R/AC ⁻	1 ± 1**	72 ± 22**
OVA-L247Q-AC ⁻	97 ± 3	41 ± 9
OVA/E570Q+K860R/AC ⁻	1 ± 1**	14 ± 7**
OVA-E570Q-L247Q-AC ⁻	50 ± 12	40 ± 11
OVA-K860R-L247Q-AC ⁻	1 ± 1	45 ± 11
OVA-E570Q-K860R-L247Q-AC ⁻	0 ± 1	16 ± 10

Leyendas de la tabla

50 - ^aLa lisis de eritrocitos de oveja se determinó después de 4,5 horas como la cantidad de hemoglobina liberada tras incubación de 5×10^8 RBC a 37°C en presencia de Ca²⁺ 2 mM con 5 µg/ml de la proteína dada (31). La actividad hemolítica de CyaA/AC⁻ se tomó como el 100% de actividad. Los resultados representan el promedio

de valores obtenidos en cuatro experimentos independientes realizados en duplicados \pm S.D con dos diferentes preparaciones de proteína.

- ^bLa lisis de células J774A.1 se determinó como la cantidad de lactato deshidrogenasa liberada de 10^5 células tras 3 horas de incubación celular con $10 \mu\text{g/ml}$ de la proteína apropiada a 37°C en D-MEM. La lisis de células J774A.1 por CyaA/AC⁻ se tomó como el 100%. Los resultados representan el promedio de valores obtenidos en cuatro experimentos diferentes realizados en duplicados \pm S.D con dos diferentes preparaciones de proteína (*, $p < 0,05$; **, $p < 0,001$).

Para posibilitar la cuantificación de la capacidad de la construcción E570Q+K860R de suministrar el dominio AC al citosol de células, las sustituciones E570Q y K860R se transfirieron a construcciones enzimáticamente activas derivado de CyaA/233OVA (CyaA/OVA). Éstas se produjeron y purificaron en la misma forma que los toxoides AC⁻ (no mostrados) y se caracterizaron para la unión celular, las capacidades hemolítica y de translocación de AC en eritrocitos de oveja. Como se muestra en la Fig. 1A y esperado a partir de los resultados con toxinas que carecen del epítipo OVA (4, 13, 21), la sustitución E570Q no tuvo impacto sobre la unión a eritrocitos o la capacidad de CyaA/OVA de suministrar el dominio AC al citosol de eritrocitos y de reducir selectivamente sólo su actividad hemolítica relativa. Como se esperaba adicionalmente (4), la sustitución K860R redujo significativamente la capacidad de CyaA/OVA de unirse y penetrar en eritrocitos, causando una aguda reducción de las actividades AC relativas hemolítica e invasiva de células de los mutantes E570Q y E570Q+K860R sobre eritrocitos.

Debe observarse, que la actividad hemolítica de CyaA es una función muy cooperativa de la cantidad de CyaA asociado a células (número de Hill >3), lo que sugiere que la oligomerización de CyaA es un pre-requisito para la formación de poros (22). Por lo tanto, para evaluar el impacto de combinar sustituciones E570Q+K860R sobre la actividad hemolítica, la pérdida de capacidad de unión a eritrocito de las construcciones K860R tuvo que compensarse aumentando su concentración en el ensayo hasta $25 \mu\text{g/ml}$ ($5 \mu\text{g/ml}$ para toxina intacta), para conseguir la unión de cantidades iguales de todas proteínas a los eritrocitos, como se muestra en la Fig. 1B. En estas condiciones la combinación de las sustituciones E570Q y K860R demostraron una clara sinergia en reducción adicional en un factor de dos las ya alteradas actividades hemolíticas de las construcciones que portan las sustituciones E570Q ($\sim 50\%$) y K860R ($\sim 30\%$) individualmente. Esto sugiere que la combinación de las sustituciones afectaba a la capacidad de permeabilización celular específica de CyaA.

La actividad de formación de poros de CyaA es dispensable para la translocación en membrana del dominio AC. En contraste con el impacto de la sustitución K860R sobre la actividad de toxina sobre eritrocitos, se descubrió previamente que las sustituciones tanto E570Q como K860R no tienen efecto sobre la capacidad de CyaA de unirse y penetrar en monocitos J774A.1 que expresan el receptor CD11b/CD18 (4, 8). Además, como se documenta en la Fig. 2, cuando las sustituciones se combinaban en la misma molécula de toxina, la construcción CyaA/OVA/E570Q+K860R mostraba una capacidad igual para unirse a células J774A.1 (Fig. 2A) y para suministrar el dominio AC a su citosol para elevar las concentraciones citosólicas de AMPc (Fig. 2B), a la de CyaA intacta. Al mismo tiempo, sin embargo, el toxoide doblemente mutado E570Q+K860R mostró una capacidad citolítica relativa aproximadamente siete veces reducida ($14 \pm 7\%$) sobre estas células (cf. Tabla I). Esto sugirió que la combinación de las sustituciones E570Q y K860R alteraba selectivamente sólo la capacidad del toxoide de permeabilizar células J774A.1 y no su capacidad de translocar el dominio AC a través de la membrana celular.

Para ensayar esto, los inventores analizaron la capacidad de permeabilización celular de la construcción E570Q+K860R en experimentos de pinzamiento zonal de célula completa. Aquí otra vez tuvieron que usarse los toxoides AC⁻, para evitar la alteración masiva de células J774A.1 provocada por el AMPc generado por la toxina (23). Como se muestra en la Fig. 3A mediante un registro representativo de las corrientes de iones a través de la membrana de células J774A.1 individuales con pinzamiento zonal expuestas a $1 \mu\text{g/ml}$ de CyaA/OVA/AC⁻, tras una demora inicial de aproximadamente 3 minutos, las células J774A.1 se permeabilizaron de forma progresiva y masiva por CyaA/OVA/AC⁻ y las corrientes a través de la membrana celular alcanzaron -3000 pA en 10 minutos. En contraste, como se muestra en la Fig. 3B, la exposición al CyaA/OVA/E570Q+K860R/AC⁻ causó de forma reproducible una permeabilización inicial solamente transitoria y mínima de las células, con corrientes a través de la membrana celular que no excedieron los -200 pA y volviendo cerca de cero en 10 minutos después de la adición de toxoide. Los registros mostrados fueron representativos de al menos seis determinaciones de 3 experimentos independientes y demuestran que la combinación de las sustituciones E570Q y K860R tuvo un mayor impacto sobre la capacidad del toxoide de permeabilizar la membrana de células J774A.1. Dado que la versión enzimáticamente activa de la misma construcción fue completamente capaz de translocar el dominio AC al interior de células J774A.1 (cf. Fig. 2B), estos resultados sugieren fuertemente que la actividad de permeabilización celular (formación de poros) de CyaA no era necesaria para la translocación del dominio AC a través de la membrana celular.

La actividad de permeabilización de membrana de CyaA es dispensable para suministrar de antígenos pasajeros a la vía MHC clase I citosólica. Como el ensayo para el AMPc citosólico no pudo usarse para evaluar la capacidad de penetración celular de los toxoides AC⁻, se usó el ensayo afín para su capacidad de suministrar el epítipo OVA indicador al sitio de procesamiento citosólico de la vía de presentación de antígenos MHC clase I (7, 24). Hacia este fin, los inventores determinaron la capacidad de células dendríticas derivadas de médula ósea de ratón C57BL/6 (BMDC), cargado con los toxoides, de estimular la liberación de IL-2 por células T B3Z que reconocen selectivamente el complejo de moléculas K^b MHC clase I con el péptido SIINFEKL (OVA) sobre APC. Como se

muestra en la Fig. 4A, las células de hibridoma B3Z se estimularon eficazmente tras co-incubación con BMDC y cualquiera de los toxoides que portan el epítipo OVA, pero no con el toxoide simulado. Además, los toxoides OVA/E570Q/AC⁻ y OVA/E570Q+K860R/AC⁻ indujeron estimulación de los linfocitos B3Z por APC *in vitro* con una eficacia tan elevada como el OVA/AC⁻ intacto. Estos resultados confirman que el doble mutante E570Q+K860R era completamente capaz de translocar su dominio AC al citosol de BMDC para el procesamiento y presentación del epítipo OVA por moléculas K^b MHC clase I, mientras que es esencialmente incapaz de permeabilizar las células J774A.1. Estos resultados sugieren que la actividad de permeabilización celular (formación de poros) de CyaA no era necesaria para la translocación del dominio AC a través de la membrana celular, no para desempeñar ninguna tarea en la capacidad de CyaA de suministrar epítopos pasajeros al citosol de APC.

Para corroborar la capacidad observada *in vitro* de suministro de antígeno de los toxoides no citolíticos, los inventores evaluaron su capacidad *in vivo* de cebar linfocitos T CD8⁺ citotóxico (CTL) OVA-específicos. Se inyectaron 50 µg de los diversos toxoides OVA- por vía intravenosa en ratones C57BL/6 y una semana después se evaluaron las respuestas CTL OVA-específicas en ratones inmunizados por un ensayo de eliminación *in vivo*. Los ratones C57BL/6 recibieron inyección i.v. de una mezcla (1:1) de esplenocitos CFSE^{high} cargados con péptido OVA (SIINFEKL) y CFSE^{low} no cargados, seguido una día más tarde por análisis FACS de células marcadas con CFSE. Como se muestra en la Fig. 4B, la inmunización de ratones con el toxoide simulado no indujo ninguna actividad CTL SIINFEKL-específica *in vivo*. A su vez, la inmunización con el toxoide E570Q+K860R indujo la misma respuesta de eliminación por CTL OVA-específica *in vivo* que el toxoide no mutado usado como control positivo, no siendo la ligera diferencia en los valores de respuesta media en los toxoides intacto y doblemente mutado estadísticamente significativa (p=0,065). Estos resultados muestran que la actividad de permeabilización celular de CyaA era dispensable para la capacidad *in vivo* de los toxoides CyaA/233OVA/AC⁻ de suministrar un antígeno pasajero insertado en AC al citosol de APC.

25 Discusión

Los inventores aquí demuestran que la translocación del dominio AC de CyaA a través de la membrana de células diana mieloides que expresan el receptor CD11b/CD18 no depende de la capacidad de la toxina de formar poros y permeabilizar la membrana celular.

Como se resumen en el modelo propuesto en la Fig. 5, los inventores han informado previamente de que el equilibrio entre la dos actividades de CyaA puede desplazarse por mutaciones o acilación alternativa de CyaA. La potenciación de la actividad de formación de poros (hemolítica) a expensas de la capacidad de suministrar AC al interior de las células se observó, de hecho, tras sustituciones con lisina de los glutamatos 509, 516 y 581 (13, 18), o tras el bloqueo de la translocación de AC por el anticuerpo monoclonal (MAb) 3D1 (25). A su vez, se observó un desplazamiento en la dirección opuesta para la *r-Ec-CyaA* recombinante, acilada en *E. coli* por restos de palmitoleilo (C16:1), en comparación con la *Bp-CyaA* palmitilada (C16:0) nativa producida por *B. pertussis*. Se descubrió que la *r-Ec-CyaA* mostraba actividad hemolítica aproximadamente cuatro veces reducida y actividad de formación de poros aproximadamente diez veces inferior en bicapas lipídicas planas que *Bp-CyaA* (12), mientras ambas formas de CyaA eran igual de activas en penetración de la membrana celular y translocación del dominio AC al interior del eritrocito (17, 26). Además, recientemente se descubrió que la construcción CyaA/E570Q muestra una capacidad completa de suministrar el dominio AC al interior tanto de eritrocitos como de macrófagos J774A.1, mostrando al mismo tiempo actividad hemolítica reducida y capacidad de formación de poros específica inferior en bicapas lipídicas planas que CyaA intacta, mostrando el toxoide CyaA/E570Q/AC⁻ una actividad citolítica dos veces reducida sobre células J774A.1 (8, 13).

A pesar de lo mencionado anteriormente y las muchas CyaA mutantes que los inventores caracterizaron, la pregunta sigue siendo si la formación de un poro de membrana por CyaA es necesaria para la translocación del dominio AC a través de la membrana de células que expresan CD11b. El mutante CyaA/233OVA/E570Q+K860R aquí descrito es la primera construcción con una capacidad reducida de forma importante de permeabilizar células que sigue siendo completamente capaz de translocar el dominio AC a través de la membrana celular. Esto demuestra que en su camino al citosol celular el dominio AC que se está translocando puede eludir el poro selectivo de cationes formado por CyaA.

El modo y trayecto de la translocación del dominio AC a través de la membrana celular, sin embargo, sigue teniendo que definirse en más detalle. Dados los diferentes efectos de las sustituciones de los glutamatos 509, 516, 570 y 581 sobre el formación de poros y las actividades de suministro de AC de CyaA (8, 13, 18), donde el equilibrio entre la dos actividades puede desplazarse casi completamente en cualquier dirección por sustituciones específicas, las hélices anfipáticas que albergan estos restos de glutamato parecen estar implicadas en ambas actividades de CyaA de una manera alternativa. Esto está apoyado por el efecto de la sustitución E509K+E516K combinada, que produce una CyaA hiper-hemolítica incapaz de suministrar el dominio AC al interior de las células (8, 18), mientras que la combinación E570Q+K860R aquí descrita produce lo opuesto, una CyaA esencialmente no citolítica que es completamente competente para translocar el dominio AC al interior de células J774A.1 (CD11b⁺). Estas observaciones corroboran adicionalmente el modelo propuesto de que las dos actividades de membrana de CyaA dependerían de diferentes conformeros que se insertan en la membrana, produciendo uno la translocación del dominio AC por monómeros de toxina y conduciendo el otro a la formación de poros de CyaA oligoméricos (13, 18).

5 Sigue por definir cuales fuera de los segmentos de CyaA fuera del dominio de formación de poros están implicados en la translocación del dominio AC a través de la membrana. Dada la necesidad para su integridad estructural (27), el dominio de repetición RTX grande (restos 1006 a 1706) probablemente toma parte en la translocación de AC al interior de las células. Tendría un tamaño suficiente (700 restos) para formar una interfaz de translocación hidrófila dentro de la membrana celular que podría dejar un paso de un dominio AC no plegado a través de la membrana sin la formación concomitante de un poro de permeabilización celular real. Como alternativa, CyaA podría promover la formación de estructuras lipídicas no lamelares invertidas (fase hexagonal invertida) (28), que podrían tomar parte potencialmente en una interfaz proteína-lípido bien sellada a través de la cual el dominio AC podría deslizar al citosol celular.

15 Por último, un descubrimiento práctico informado en este documento es que el toxoide CyaA/E570Q+K860R/AC⁻ con la actividad de permeabilización celular (citólítico) muy reducida, sigue completamente activo en el suministro de antígeno a APC CD11b⁺. Esto es de importancia a la luz de su uso potencial como herramienta con perfil de seguridad potenciada para el suministro de antígenos de específicos de tumor en vacunas de segunda generación derivadas de CyaA/AC⁻ para inmunoterapia de cáncer.

Referencias

- 20 1. Vojtova J, Kamanova J, Sebo P (2006) Bordetella adenylate cyclase toxin: a swift saboteur of host defense. *Curr Opin Microbiol* 9: 69-75.
2. Glaser P, Sakamoto H, Bellalou J, Ullmann A, Danchin A (1988) Secretion of cyclolysin, the calmodulin-sensitive adenylate cyclase-haemolysin bifunctional protein of Bordetella pertussis. *Embo J* 7: 3997-4004.
- 25 3. Rose T, Sebo P, Bellalou J, Ladant D (1995) Interaction of calcium with Bordetella pertussis adenylate cyclase toxin. Characterization of multiple calcium-binding sites and calcium-induced conformational changes. *J Biol Chem* 270: 26370-26376.
4. Masin J, et al. (2005) Acylation of lysine 860 allows tight binding and cytotoxicity of Bordetella adenylate cyclase on CD11b-expressing cells. *Biochemistry* 44: 12759-12766.
- 30 5. Guermonprez P, et al. (2001) The adenylate cyclase toxin of Bordetella pertussis binds to target cells via the alpha(M)beta(2) integrin (CD11b/CD18). *J Exp Med* 193: 1035-1044.
6. Gordon VM, Leppla SH, Hewlett EL (1988) Inhibitors of receptor-mediated endocytosis block the entry of Bacillus anthracis adenylate cyclase toxin but not that of Bordetella pertussis adenylate cyclase toxin. *Infect Immun* 56: 1066-1069.
- 35 7. Schlecht G, Loucka J, Najar H, Sebo P, Leclerc C (2004) Antigen targeting to CD11b allows efficient presentation of CD4+ and CD8+ T cell epitopes and in vivo Th1-polarized T cell priming. *J Immunol* 173: 6089-6097.
8. Basler M, Masin J, Osicka R, Sebo P (2006) Pore-forming and enzymatic activities of Bordetella pertussis adenylate cyclase toxin synergize in promoting lysis of monocytes. *Infect Immun* 74: 2207-2214.
- 40 9. Khelef N, Zychlinsky A, Guiso N (1993) Bordetella pertussis induces apoptosis in macrophages: role of adenylate cyclase-hemolysin. *Infect Immun* 61: 4064-4071.
10. Morova J, Osicka R, Masin J, Sebo P (2008) RTX cytotoxins recognize beta2 integrin receptors through N-linked oligosaccharides. *Proc Natl Acad Sci U S A*.
11. Paccani SR, et al. (2008) Suppression of T-lymphocyte activation and chemotaxis by the adenylate cyclase toxin of Bordetella pertussis. *Infect Immun* 76: 2822-2832.
- 45 12. Benz R, Maier E, Ladant D, Ullmann A, Sebo P (1994) Adenylate cyclase toxin (CyaA) of Bordetella pertussis. Evidence for the formation of small ion-permeable channels and comparison with HlyA of Escherichia coli. *J Biol Chem* 269: 27231-27239.
13. Basler M, et al. (2007) Segments crucial for membrane translocation and pore-forming activity of Bordetella adenylate cyclase toxin. *J Biol Chem* 282: 12419-12429.
- 50 14. Hewlett EL, Donato GM, Gray MC (2006) Macrophage cytotoxicity produced by adenylate cyclase toxin from Bordetella pertussis: more than just making cyclic AMP! *Mol Microbiol* 59: 447-459.
15. Fayolle C, Sebo P, Ladant D, Ullmann A, Leclerc C (1996) In vivo induction of CTL responses by recombinant adenylate cyclase of Bordetella pertussis carrying viral CD8+ T cell epitopes. *J Immunol* 156: 4697-4706.
16. Rogel A, Hanski E (1992) Distinct steps in the penetration of adenylate cyclase toxin of Bordetella pertussis into sheep erythrocytes. Translocation of the toxin across the membrane. *J Biol Chem* 267: 22599-22605.
- 55 17. Havlicek V, et al. (2001) Mass spectrometric analysis of recombinant adenylate cyclase toxin from Bordetella pertussis strain 18323/pHSP9. *J Mass Spectrom* 36: 384-391.
18. Osickova A, Osicka R, Maier E, Benz R, Sebo P (1999) An amphipathic alpha-helix including glutamates 509 and 516 is crucial for membrane translocation of adenylate cyclase toxin and modulates formation and cation selectivity of its membrane channels. *J Biol Chem* 274: 37644-37650.
- 60 19. Fiser R, et al. (2007) Third activity of Bordetella adenylate cyclase (AC) toxin-hemolysin. Membrane translocation of AC domain polypeptide promotes calcium influx into CD11b+ monocytes independently of the catalytic and hemolytic activities. *J Biol Chem* 282: 2808-2820.
20. Osicka R, et al. (2000) Delivery of CD8(+) T-cell epitopes into major histocompatibility complex class I antigen presentation pathway by Bordetella pertussis adenylate cyclase: delineation of cell invasive structures and permissive insertion sites. *Infect Immun* 68: 247-256.

21. Basar T, et al. (1999) The conserved lysine 860 in the additional fatty-acylation site of *Bordetella pertussis* adenylate cyclase is crucial for toxin function independently of its acylation status. *J Biol Chem* 274: 10777-10783.
- 5 22. Szabo G, Gray MC, Hewlett EL (1994) Adenylate cyclase toxin from *Bordetella pertussis* produces ion conductance across artificial lipid bilayers in a calcium- and polarity-dependent manner. *J Biol Chem* 269: 22496-22499.
23. Kamanova J, et al. (2008) Adenylate cyclase toxin subverts phagocyte function by RhoA inhibition and unproductive ruffling. *J Immunol* 181: 5587-5597.
- 10 24. Guermonprez P, Ladant D, Karimova G, Ullmann A, Leclerc C (1999) Direct delivery of the *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin to the MHC class I antigen presentation pathway. *J Immunol* 162: 1910-1916.
25. Gray MC, et al. (2001) Translocation-specific conformation of adenylate cyclase toxin from *Bordetella pertussis* inhibits toxin-mediated hemolysis. *J Bacteriol* 183: 5904-5910.
26. Hackett M, et al. (1995) Hemolytic, but not cell-invasive activity, of adenylate cyclase toxin is selectively affected by differential fatty-acylation in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 270: 20250-20253.
- 15 27. Iwaki M, Ullmann A, Sebo P (1995) Identification by in vitro complementation of regions required for cell-invasive activity of *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin. *Mol Microbiol* 17: 1015-1024.
28. Martin C, et al. (2004) Membrane restructuring by *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin, a member of the RTX toxin family. *J Bacteriol* 186: 3760-3765.
- 20 29. Karimova G, Pidoux J, Ullmann A, Ladant D (1998) A bacterial two-hybrid system based on a reconstituted signal transduction pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 5752-5756.
30. Franken KL, et al. (2000) Purification of his-tagged proteins by immobilized chelate affinity chromatography: the benefits from the use of organic solvent. *Protein Expr Purif* 18: 95-99.
31. Bellalou J, Sakamoto H, Ladant D, Geoffroy C, Ullmann A (1990) Deletions affecting hemolytic and toxin activities of *Bordetella pertussis* adenylate cyclase. *Infect Immun* 58: 3242-3247.

25

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> INSTITUT PASTEUR
- 30 <120> Polipéptidos de CyaA mutantes y derivados polipeptídicos adecuados para el suministro de moléculas inmunogénicas a una célula
- <130> B08142
- 35 <140> aún no conocido
<141> 23-03-2009
- <160> 6
- 40 <170> PatentIn versión 3.1
- <210> 1
<211> 1706
<212> PRT
- 45 <213> *Bordetella pertussis*
- <400> 1

ES 2 505 324 T3

Met Gln Gln Ser His Gln Ala Gly Tyr Ala Asn Ala Ala Asp Arg Glu
 1 5 10 15

Ser Gly Ile Pro Ala Ala Val Leu Asp Gly Ile Lys Ala Val Ala Lys
 20 25 30

Glu Lys Asn Ala Thr Leu Met Phe Arg Leu Val Asn Pro His Ser Thr
 35 40 45

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

Lys Ser Ser Asp Trp Gly Leu Gln Ala Gly Tyr Ile Pro Val Asn Pro
 65 70 75 80

Asn Leu Ser Lys Leu Phe Gly Arg Ala Pro Glu Val Ile Ala Arg Ala
 85 90 95

Asp Asn Asp Val Asn Ser Ser Leu Ala His Gly His Thr Ala Val Asp
 100 105 110

Leu Thr Leu Ser Lys Glu Arg Leu Asp Tyr Leu Arg Gln Ala Gly Leu
 115 120 125

Val Thr Gly Met Ala Asp Gly Val Val Ala Ser Asn His Ala Gly Tyr
 130 135 140

ES 2 505 324 T3

Glu Gln Phe Glu Phe Arg Val Lys Glu Thr Ser Asp Gly Arg Tyr Ala
 145 150 155 160
 Val Gln Tyr Arg Arg Lys Gly Gly Asp Asp Phe Glu Ala Val Lys Val
 165 170 175
 Ile Gly Asn Ala Ala Gly Ile Pro Leu Thr Ala Asp Ile Asp Met Phe
 180 185 190
 Ala Ile Met Pro His Leu Ser Asn Phe Arg Asp Ser Ala Arg Ser Ser
 195 200 205
 Val Thr Ser Gly Asp Ser Val Thr Asp Tyr Leu Ala Arg Thr Arg Arg
 210 215 220
 Ala Ala Ser Glu Ala Thr Gly Gly Leu Asp Arg Glu Arg Ile Asp Leu
 225 230 235 240
 Leu Trp Lys Ile Ala Arg Ala Gly Ala Arg Ser Ala Val Gly Thr Glu
 245 250 255
 Ala Arg Arg Gln Phe Arg Tyr Asp Gly Asp Met Asn Ile Gly Val Ile
 260 265 270
 Thr Asp Phe Glu Leu Glu Val Arg Asn Ala Leu Asn Arg Arg Ala His
 275 280 285
 Ala Val Gly Ala Gln Asp Val Val Gln His Gly Thr Glu Gln Asn Asn
 290 295 300
 Pro Phe Pro Glu Ala Asp Glu Lys Ile Phe Val Val Ser Ala Thr Gly
 305 310 315 320
 Glu Ser Gln Met Leu Thr Arg Gly Gln Leu Lys Glu Tyr Ile Gly Gln
 325 330 335
 Gln Arg Gly Glu Gly Tyr Val Phe Tyr Glu Asn Arg Ala Tyr Gly Val
 340 345 350
 Ala Gly Lys Ser Leu Phe Asp Asp Gly Leu Gly Ala Ala Pro Gly Val
 355 360 365

ES 2 505 324 T3

Pro Ser Gly Arg Ser Lys Phe Ser Pro Asp Val Leu Glu Thr Val Pro
 370 375 380

Ala Ser Pro Gly Leu Arg Arg Pro Ser Leu Gly Ala Val Glu Arg Gln
 385 390 395 400

Asp Ser Gly Tyr Asp Ser Leu Asp Gly Val Gly Ser Arg Ser Phe Ser
 405 410 415

Leu Gly Glu Val Ser Asp Met Ala Ala Val Glu Ala Ala Glu Leu Glu
 420 425 430

Met Thr Arg Gln Val Leu His Ala Gly Ala Arg Gln Asp Asp Ala Glu
 435 440 445

Pro Gly Val Ser Gly Ala Ser Ala His Trp Gly Gln Arg Ala Leu Gln
 450 455 460

Gly Ala Gln Ala Val Ala Ala Ala Gln Arg Leu Val His Ala Ile Ala
 465 470 475 480

Leu Met Thr Gln Phe Gly Arg Ala Gly Ser Thr Asn Thr Pro Gln Glu
 485 490 495

Ala Ala Ser Leu Ser Ala Ala Val Phe Gly Leu Gly Glu Ala Ser Ser
 500 505 510

Ala Val Ala Glu Thr Val Ser Gly Phe Phe Arg Gly Ser Ser Arg Trp
 515 520 525

Ala Gly Gly Phe Gly Val Ala Gly Gly Ala Met Ala Leu Gly Gly Gly
 530 535 540

Ile Ala Ala Ala Val Gly Ala Gly Met Ser Leu Thr Asp Asp Ala Pro
 545 550 555 560

Ala Gly Gln Lys Ala Ala Ala Gly Ala Glu Ile Ala Leu Gln Leu Thr
 565 570 575

Gly Gly Thr Val Glu Leu Ala Ser Ser Ile Ala Leu Ala Leu Ala Ala
 580 585 590

ES 2 505 324 T3

Ala Arg Gly Val Thr Ser Gly Leu Gln Val Ala Gly Ala Ser Ala Gly
 595 600 605

Ala Ala Ala Gly Ala Leu Ala Ala Ala Leu Ser Pro Met Glu Ile Tyr
 610 615 620

Gly Leu Val Gln Gln Ser His Tyr Ala Asp Gln Leu Asp Lys Leu Ala
 625 630 635 640

Gln Glu Ser Ser Ala Tyr Gly Tyr Glu Gly Asp Ala Leu Leu Ala Gln
 645 650 655

Leu Tyr Arg Asp Lys Thr Ala Ala Glu Gly Ala Val Ala Gly Val Ser
 660 665 670

Ala Val Leu Ser Thr Val Gly Ala Ala Val Ser Ile Ala Ala Ala Ala
 675 680 685

Ser Val Val Gly Ala Pro Val Ala Val Val Thr Ser Leu Leu Thr Gly
 690 695 700

Ala Leu Asn Gly Ile Leu Arg Gly Val Gln Gln Pro Ile Ile Glu Lys
 705 710 715 720

Leu Ala Asn Asp Tyr Ala Arg Lys Ile Asp Glu Leu Gly Gly Pro Gln
 725 730 735

Ala Tyr Phe Glu Lys Asn Leu Gln Ala Arg His Glu Gln Leu Ala Asn
 740 745 750

Ser Asp Gly Leu Arg Lys Met Leu Ala Asp Leu Gln Ala Gly Trp Asn
 755 760 765

Ala Ser Ser Val Ile Gly Val Gln Thr Thr Glu Ile Ser Lys Ser Ala
 770 775 780

Leu Glu Leu Ala Ala Ile Thr Gly Asn Ala Asp Asn Leu Lys Ser Val
 785 790 795 800

Asp Val Phe Val Asp Arg Phe Val Gln Gly Glu Arg Val Ala Gly Gln
 805 810 815

Pro Val Val Leu Asp Val Ala Ala Gly Gly Ile Asp Ile Ala Ser Arg

ES 2 505 324 T3

			820						825									830
Lys	Gly	Glu	Arg	Pro	Ala	Leu	Thr	Phe	Ile	Thr	Pro	Leu	Ala	Ala	Pro			
		835					840					845						
Gly	Glu	Glu	Gln	Arg	Arg	Arg	Thr	Lys	Thr	Gly	Lys	Ser	Glu	Phe	Thr			
	850					855					860							
Thr	Phe	Val	Glu	Ile	Val	Gly	Lys	Gln	Asp	Arg	Trp	Arg	Ile	Arg	Asp			
865					870					875					880			
Gly	Ala	Ala	Asp	Thr	Thr	Ile	Asp	Leu	Ala	Lys	Val	Val	Ser	Gln	Leu			
				885					890					895				
Val	Asp	Ala	Asn	Gly	Val	Leu	Lys	His	Ser	Ile	Lys	Leu	Asp	Val	Ile			
			900					905					910					
Gly	Gly	Asp	Gly	Asp	Asp	Val	Val	Leu	Ala	Asn	Ala	Ser	Arg	Ile	His			
		915					920					925						
Tyr	Asp	Gly	Gly	Ala	Gly	Thr	Asn	Thr	Val	Ser	Tyr	Ala	Ala	Leu	Gly			
	930					935					940							
Arg	Gln	Asp	Ser	Ile	Thr	Val	Ser	Ala	Asp	Gly	Glu	Arg	Phe	Asn	Val			
945					950					955					960			
Arg	Lys	Gln	Leu	Asn	Asn	Ala	Asn	Val	Tyr	Arg	Glu	Gly	Val	Ala	Thr			
				965					970					975				
Gln	Thr	Thr	Ala	Tyr	Gly	Lys	Arg	Thr	Glu	Asn	Val	Gln	Tyr	Arg	His			
			980					985						990				
Val	Glu	Leu	Ala	Arg	Val	Gly	Gln	Val	Val	Glu	Val	Asp	Thr	Leu	Glu			
		995					1000					1005						
His	Val	Gln	His	Ile	Ile	Gly	Gly	Ala	Gly	Asn	Asp	Ser	Ile	Thr				
	1010					1015					1020							
Gly	Asn	Ala	His	Asp	Asn	Phe	Leu	Ala	Gly	Gly	Ser	Gly	Asp	Asp				
	1025					1030					1035							
Arg	Leu	Asp	Gly	Gly	Ala	Gly	Asn	Asp	Thr	Leu	Val	Gly	Gly	Glu				
	1040					1045					1050							

ES 2 505 324 T3

Gly Gln Asn Thr Val Ile Gly Gly Ala Gly Asp Asp Val Phe Leu
1055 1060 1065

Gln Asp Leu Gly Val Trp Ser Asn Gln Leu Asp Gly Gly Ala Gly
1070 1075 1080

Val Asp Thr Val Lys Tyr Asn Val His Gln Pro Ser Glu Glu Arg
1085 1090 1095

Leu Glu Arg Met Gly Asp Thr Gly Ile His Ala Asp Leu Gln Lys
1100 1105 1110

Gly Thr Val Glu Lys Trp Pro Ala Leu Asn Leu Phe Ser Val Asp
1115 1120 1125

His Val Lys Asn Ile Glu Asn Leu His Gly Ser Arg Leu Asn Asp
1130 1135 1140

Arg Ile Ala Gly Asp Asp Gln Asp Asn Glu Leu Trp Gly His Asp
1145 1150 1155

Gly Asn Asp Thr Ile Arg Gly Arg Gly Gly Asp Asp Ile Leu Arg
1160 1165 1170

Gly Gly Leu Gly Leu Asp Thr Leu Tyr Gly Glu Asp Gly Asn Asp
1175 1180 1185

Ile Phe Leu Gln Asp Asp Glu Thr Val Ser Asp Asp Ile Asp Gly
1190 1195 1200

Gly Ala Gly Leu Asp Thr Val Asp Tyr Ser Ala Met Ile His Pro
1205 1210 1215

Gly Arg Ile Val Ala Pro His Glu Tyr Gly Phe Gly Ile Glu Ala
1220 1225 1230

Asp Leu Ser Arg Glu Trp Val Arg Lys Ala Ser Ala Leu Gly Val
1235 1240 1245

Asp Tyr Tyr Asp Asn Val Arg Asn Val Glu Asn Val Ile Gly Thr
1250 1255 1260

ES 2 505 324 T3

Ser Met Lys Asp Val Leu Ile Gly Asp Ala Gln Ala Asn Thr Leu
 1265 1270 1275

Met Gly Gln Gly Gly Asp Asp Thr Val Arg Gly Gly Asp Gly Asp
 1280 1285 1290

Asp Leu Leu Phe Gly Gly Asp Gly Asn Asp Met Leu Tyr Gly Asp
 1295 1300 1305

Ala Gly Asn Asp Thr Leu Tyr Gly Gly Leu Gly Asp Asp Thr Leu
 1310 1315 1320

Glu Gly Gly Ala Gly Asn Asp Trp Phe Gly Gln Thr Gln Ala Arg
 1325 1330 1335

Glu His Asp Val Leu Arg Gly Gly Asp Gly Val Asp Thr Val Asp
 1340 1345 1350

Tyr Ser Gln Thr Gly Ala His Ala Gly Ile Ala Ala Gly Arg Ile
 1355 1360 1365

Gly Leu Gly Ile Leu Ala Asp Leu Gly Ala Gly Arg Val Asp Lys
 1370 1375 1380

Leu Gly Glu Ala Gly Ser Ser Ala Tyr Asp Thr Val Ser Gly Ile
 1385 1390 1395

Glu Asn Val Val Gly Thr Glu Leu Ala Asp Arg Ile Thr Gly Asp
 1400 1405 1410

Ala Gln Ala Asn Val Leu Arg Gly Ala Gly Gly Ala Asp Val Leu
 1415 1420 1425

Ala Gly Gly Glu Gly Asp Asp Val Leu Leu Gly Gly Asp Gly Asp
 1430 1435 1440

Asp Gln Leu Ser Gly Asp Ala Gly Arg Asp Arg Leu Tyr Gly Glu
 1445 1450 1455

Ala Gly Asp Asp Trp Phe Phe Gln Asp Ala Ala Asn Ala Gly Asn
 1460 1465 1470

ES 2 505 324 T3

Leu Leu Asp Gly Gly Asp Gly Arg Asp Thr Val Asp Phe Ser Gly
 1475 1480 1485

Pro Gly Arg Gly Leu Asp Ala Gly Ala Lys Gly Val Phe Leu Ser
 1490 1495 1500

Leu Gly Lys Gly Phe Ala Ser Leu Met Asp Glu Pro Glu Thr Ser
 1505 1510 1515

Asn Val Leu Arg Asn Ile Glu Asn Ala Val Gly Ser Ala Arg Asp
 1520 1525 1530

Asp Val Leu Ile Gly Asp Ala Gly Ala Asn Val Leu Asn Gly Leu
 1535 1540 1545

Ala Gly Asn Asp Val Leu Ser Gly Gly Ala Gly Asp Asp Val Leu
 1550 1555 1560

Leu Gly Asp Glu Gly Ser Asp Leu Leu Ser Gly Asp Ala Gly Asn
 1565 1570 1575

Asp Asp Leu Phe Gly Gly Gln Gly Asp Asp Thr Tyr Leu Phe Gly
 1580 1585 1590

Val Gly Tyr Gly His Asp Thr Ile Tyr Glu Ser Gly Gly Gly His
 1595 1600 1605

Asp Thr Ile Arg Ile Asn Ala Gly Ala Asp Gln Leu Trp Phe Ala
 1610 1615 1620

Arg Gln Gly Asn Asp Leu Glu Ile Arg Ile Leu Gly Thr Asp Asp
 1625 1630 1635

Ala Leu Thr Val His Asp Trp Tyr Arg Asp Ala Asp His Arg Val
 1640 1645 1650

Glu Ile Ile His Ala Ala Asn Gln Ala Val Asp Gln Ala Gly Ile
 1655 1660 1665

Glu Lys Leu Val Glu Ala Met Ala Gln Tyr Pro Asp Pro Gly Ala
 1670 1675 1680

Ala Ala Ala Ala Pro Pro Ala Ala Arg Val Pro Asp Thr Leu Met

ES 2 505 324 T3

1685

1690

1695

Gln Ser Leu Ala Val Asn Trp Arg
1700 1705

5 <210> 2
<211> 1706
<212> PRT
<213> Artificial

10 <220>
<223> CyaA/E570Q
<400> 2

Met Gln Gln Ser His Gln Ala Gly Tyr Ala Asn Ala Ala Asp Arg Glu
1 5 10 15

Ser Gly Ile Pro Ala Ala Val Leu Asp Gly Ile Lys Ala Val Ala Lys
20 25 30

Glu Lys Asn Ala Thr Leu Met Phe Arg Leu Val Asn Pro His Ser Thr
35 40 45

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

Lys Ser Ser Asp Trp Gly Leu Gln Ala Gly Tyr Ile Pro Val Asn Pro
65 70 75 80

Asn Leu Ser Lys Leu Phe Gly Arg Ala Pro Glu Val Ile Ala Arg Ala
85 90 95

Asp Asn Asp Val Asn Ser Ser Leu Ala His Gly His Thr Ala Val Asp
100 105 110

Leu Thr Leu Ser Lys Glu Arg Leu Asp Tyr Leu Arg Gln Ala Gly Leu
115 120 125

Val Thr Gly Met Ala Asp Gly Val Val Ala Ser Asn His Ala Gly Tyr
130 135 140

Glu Gln Phe Glu Phe Arg Val Lys Glu Thr Ser Asp Gly Arg Tyr Ala
145 150 155 160

ES 2 505 324 T3

Val Gln Tyr Arg Arg Lys Gly Gly Asp Asp Phe Glu Ala Val Lys Val
 165 170 175

Ile Gly Asn Ala Ala Gly Ile Pro Leu Thr Ala Asp Ile Asp Met Phe
 180 185 190

Ala Ile Met Pro His Leu Ser Asn Phe Arg Asp Ser Ala Arg Ser Ser
 195 200 205

Val Thr Ser Gly Asp Ser Val Thr Asp Tyr Leu Ala Arg Thr Arg Arg
 210 215 220

Ala Ala Ser Glu Ala Thr Gly Gly Leu Asp Arg Glu Arg Ile Asp Leu
 225 230 235 240

Leu Trp Lys Ile Ala Arg Ala Gly Ala Arg Ser Ala Val Gly Thr Glu
 245 250 255

Ala Arg Arg Gln Phe Arg Tyr Asp Gly Asp Met Asn Ile Gly Val Ile
 260 265 270

Thr Asp Phe Glu Leu Glu Val Arg Asn Ala Leu Asn Arg Arg Ala His
 275 280 285

Ala Val Gly Ala Gln Asp Val Val Gln His Gly Thr Glu Gln Asn Asn
 290 295 300

Pro Phe Pro Glu Ala Asp Glu Lys Ile Phe Val Val Ser Ala Thr Gly
 305 310 315 320

Glu Ser Gln Met Leu Thr Arg Gly Gln Leu Lys Glu Tyr Ile Gly Gln
 325 330 335

Gln Arg Gly Glu Gly Tyr Val Phe Tyr Glu Asn Arg Ala Tyr Gly Val
 340 345 350

Ala Gly Lys Ser Leu Phe Asp Asp Gly Leu Gly Ala Ala Pro Gly Val
 355 360 365

Pro Ser Gly Arg Ser Lys Phe Ser Pro Asp Val Leu Glu Thr Val Pro
 370 375 380

Ala Ser Pro Gly Leu Arg Arg Pro Ser Leu Gly Ala Val Glu Arg Gln

ES 2 505 324 T3

385					390						395					400
Asp	Ser	Gly	Tyr	Asp	Ser	Leu	Asp	Gly	Val	Gly	Ser	Arg	Ser	Phe	Ser	
				405					410					415		
Leu	Gly	Glu	Val	Ser	Asp	Met	Ala	Ala	Val	Glu	Ala	Ala	Glu	Leu	Glu	
			420					425					430			
Met	Thr	Arg	Gln	Val	Leu	His	Ala	Gly	Ala	Arg	Gln	Asp	Asp	Ala	Glu	
		435					440					445				
Pro	Gly	Val	Ser	Gly	Ala	Ser	Ala	His	Trp	Gly	Gln	Arg	Ala	Leu	Gln	
	450					455						460				
Gly	Ala	Gln	Ala	Val	Ala	Ala	Ala	Gln	Arg	Leu	Val	His	Ala	Ile	Ala	
465					470					475					480	
Leu	Met	Thr	Gln	Phe	Gly	Arg	Ala	Gly	Ser	Thr	Asn	Thr	Pro	Gln	Glu	
				485					490					495		
Ala	Ala	Ser	Leu	Ser	Ala	Ala	Val	Phe	Gly	Leu	Gly	Glu	Ala	Ser	Ser	
			500					505						510		
Ala	Val	Ala	Glu	Thr	Val	Ser	Gly	Phe	Phe	Arg	Gly	Ser	Ser	Arg	Trp	
		515					520					525				
Ala	Gly	Gly	Phe	Gly	Val	Ala	Gly	Gly	Ala	Met	Ala	Leu	Gly	Gly	Gly	
	530					535					540					
Ile	Ala	Ala	Ala	Val	Gly	Ala	Gly	Met	Ser	Leu	Thr	Asp	Asp	Ala	Pro	
545					550					555					560	
Ala	Gly	Gln	Lys	Ala	Ala	Ala	Gly	Ala	Gln	Ile	Ala	Leu	Gln	Leu	Thr	
				565					570					575		
Gly	Gly	Thr	Val	Glu	Leu	Ala	Ser	Ser	Ile	Ala	Leu	Ala	Leu	Ala	Ala	
			580					585					590			
Ala	Arg	Gly	Val	Thr	Ser	Gly	Leu	Gln	Val	Ala	Gly	Ala	Ser	Ala	Gly	
		595					600						605			
Ala	Ala	Ala	Gly	Ala	Leu	Ala	Ala	Ala	Leu	Ser	Pro	Met	Glu	Ile	Tyr	
	610					615					620					

ES 2 505 324 T3

Gly Leu Val Gln Gln Ser His Tyr Ala Asp Gln Leu Asp Lys Leu Ala
625 630 635 640

Gln Glu Ser Ser Ala Tyr Gly Tyr Glu Gly Asp Ala Leu Leu Ala Gln
645 650 655

Leu Tyr Arg Asp Lys Thr Ala Ala Glu Gly Ala Val Ala Gly Val Ser
660 665 670

Ala Val Leu Ser Thr Val Gly Ala Ala Val Ser Ile Ala Ala Ala Ala
675 680 685

Ser Val Val Gly Ala Pro Val Ala Val Val Thr Ser Leu Leu Thr Gly
690 695 700

Ala Leu Asn Gly Ile Leu Arg Gly Val Gln Gln Pro Ile Ile Glu Lys
705 710 715 720

Leu Ala Asn Asp Tyr Ala Arg Lys Ile Asp Glu Leu Gly Gly Pro Gln
725 730 735

Ala Tyr Phe Glu Lys Asn Leu Gln Ala Arg His Glu Gln Leu Ala Asn
740 745 750

Ser Asp Gly Leu Arg Lys Met Leu Ala Asp Leu Gln Ala Gly Trp Asn
755 760 765

Ala Ser Ser Val Ile Gly Val Gln Thr Thr Glu Ile Ser Lys Ser Ala
770 775 780

Leu Glu Leu Ala Ala Ile Thr Gly Asn Ala Asp Asn Leu Lys Ser Val
785 790 795 800

Asp Val Phe Val Asp Arg Phe Val Gln Gly Glu Arg Val Ala Gly Gln
805 810 815

Pro Val Val Leu Asp Val Ala Ala Gly Gly Ile Asp Ile Ala Ser Arg
820 825 830

Lys Gly Glu Arg Pro Ala Leu Thr Phe Ile Thr Pro Leu Ala Ala Pro
835 840 845

ES 2 505 324 T3

Gly Glu Glu Gln Arg Arg Arg Thr Lys Thr Gly Arg Ser Glu Phe Thr
850 855 860

Thr Phe Val Glu Ile Val Gly Lys Gln Asp Arg Trp Arg Ile Arg Asp
865 870 875 880

Gly Ala Ala Asp Thr Thr Ile Asp Leu Ala Lys Val Val Ser Gln Leu
885 890 895

Val Asp Ala Asn Gly Val Leu Lys His Ser Ile Lys Leu Asp Val Ile
900 905 910

Gly Gly Asp Gly Asp Asp Val Val Leu Ala Asn Ala Ser Arg Ile His
915 920 925

Tyr Asp Gly Gly Ala Gly Thr Asn Thr Val Ser Tyr Ala Ala Leu Gly
930 935 940

Arg Gln Asp Ser Ile Thr Val Ser Ala Asp Gly Glu Arg Phe Asn Val
945 950 955 960

Arg Lys Gln Leu Asn Asn Ala Asn Val Tyr Arg Glu Gly Val Ala Thr
965 970 975

Gln Thr Thr Ala Tyr Gly Lys Arg Thr Glu Asn Val Gln Tyr Arg His
980 985 990

Val Glu Leu Ala Arg Val Gly Gln Val Val Glu Val Asp Thr Leu Glu
995 1000 1005

His Val Gln His Ile Ile Gly Gly Ala Gly Asn Asp Ser Ile Thr
1010 1015 1020

Gly Asn Ala His Asp Asn Phe Leu Ala Gly Gly Ser Gly Asp Asp
1025 1030 1035

Arg Leu Asp Gly Gly Ala Gly Asn Asp Thr Leu Val Gly Gly Glu
1040 1045 1050

Gly Gln Asn Thr Val Ile Gly Gly Ala Gly Asp Asp Val Phe Leu
1055 1060 1065

ES 2 505 324 T3

Gln Asp Leu Gly Val Trp Ser Asn Gln Leu Asp Gly Gly Ala Gly
1070 1075 1080

Val Asp Thr Val Lys Tyr Asn Val His Gln Pro Ser Glu Glu Arg
1085 1090 1095

Leu Glu Arg Met Gly Asp Thr Gly Ile His Ala Asp Leu Gln Lys
1100 1105 1110

Gly Thr Val Glu Lys Trp Pro Ala Leu Asn Leu Phe Ser Val Asp
1115 1120 1125

His Val Lys Asn Ile Glu Asn Leu His Gly Ser Arg Leu Asn Asp
1130 1135 1140

Arg Ile Ala Gly Asp Asp Gln Asp Asn Glu Leu Trp Gly His Asp
1145 1150 1155

Gly Asn Asp Thr Ile Arg Gly Arg Gly Gly Asp Asp Ile Leu Arg
1160 1165 1170

Gly Gly Leu Gly Leu Asp Thr Leu Tyr Gly Glu Asp Gly Asn Asp
1175 1180 1185

Ile Phe Leu Gln Asp Asp Glu Thr Val Ser Asp Asp Ile Asp Gly
1190 1195 1200

Gly Ala Gly Leu Asp Thr Val Asp Tyr Ser Ala Met Ile His Pro
1205 1210 1215

Gly Arg Ile Val Ala Pro His Glu Tyr Gly Phe Gly Ile Glu Ala
1220 1225 1230

Asp Leu Ser Arg Glu Trp Val Arg Lys Ala Ser Ala Leu Gly Val
1235 1240 1245

Asp Tyr Tyr Asp Asn Val Arg Asn Val Glu Asn Val Ile Gly Thr
1250 1255 1260

Ser Met Lys Asp Val Leu Ile Gly Asp Ala Gln Ala Asn Thr Leu
1265 1270 1275

Met Gly Gln Gly Gly Asp Asp Thr Val Arg Gly Gly Asp Gly Asp

ES 2 505 324 T3

1280						1285						1290			
Asp	Leu	Leu	Phe	Gly	Gly	Asp	Gly	Asn	Asp	Met	Leu	Tyr	Gly	Asp	
1295						1300					1305				
Ala	Gly	Asn	Asp	Thr	Leu	Tyr	Gly	Gly	Leu	Gly	Asp	Asp	Thr	Leu	
1310						1315					1320				
Glu	Gly	Gly	Ala	Gly	Asn	Asp	Trp	Phe	Gly	Gln	Thr	Gln	Ala	Arg	
1325						1330					1335				
Glu	His	Asp	Val	Leu	Arg	Gly	Gly	Asp	Gly	Val	Asp	Thr	Val	Asp	
1340						1345					1350				
Tyr	Ser	Gln	Thr	Gly	Ala	His	Ala	Gly	Ile	Ala	Ala	Gly	Arg	Ile	
1355						1360					1365				
Gly	Leu	Gly	Ile	Leu	Ala	Asp	Leu	Gly	Ala	Gly	Arg	Val	Asp	Lys	
1370						1375					1380				
Leu	Gly	Glu	Ala	Gly	Ser	Ser	Ala	Tyr	Asp	Thr	Val	Ser	Gly	Ile	
1385						1390					1395				
Glu	Asn	Val	Val	Gly	Thr	Glu	Leu	Ala	Asp	Arg	Ile	Thr	Gly	Asp	
1400						1405					1410				
Ala	Gln	Ala	Asn	Val	Leu	Arg	Gly	Ala	Gly	Gly	Ala	Asp	Val	Leu	
1415						1420					1425				
Ala	Gly	Gly	Glu	Gly	Asp	Asp	Val	Leu	Leu	Gly	Gly	Asp	Gly	Asp	
1430						1435					1440				
Asp	Gln	Leu	Ser	Gly	Asp	Ala	Gly	Arg	Asp	Arg	Leu	Tyr	Gly	Glu	
1445						1450					1455				
Ala	Gly	Asp	Asp	Trp	Phe	Phe	Gln	Asp	Ala	Ala	Asn	Ala	Gly	Asn	
1460						1465					1470				
Leu	Leu	Asp	Gly	Gly	Asp	Gly	Arg	Asp	Thr	Val	Asp	Phe	Ser	Gly	
1475						1480					1485				
Pro	Gly	Arg	Gly	Leu	Asp	Ala	Gly	Ala	Lys	Gly	Val	Phe	Leu	Ser	
1490						1495					1500				

ES 2 505 324 T3

Leu Gly Lys Gly Phe Ala Ser Leu Met Asp Glu Pro Glu Thr Ser
 1505 1510 1515

Asn Val Leu Arg Asn Ile Glu Asn Ala Val Gly Ser Ala Arg Asp
 1520 1525 1530

Asp Val Leu Ile Gly Asp Ala Gly Ala Asn Val Leu Asn Gly Leu
 1535 1540 1545

Ala Gly Asn Asp Val Leu Ser Gly Gly Ala Gly Asp Asp Val Leu
 1550 1555 1560

Leu Gly Asp Glu Gly Ser Asp Leu Leu Ser Gly Asp Ala Gly Asn
 1565 1570 1575

Asp Asp Leu Phe Gly Gly Gln Gly Asp Asp Thr Tyr Leu Phe Gly
 1580 1585 1590

Val Gly Tyr Gly His Asp Thr Ile Tyr Glu Ser Gly Gly Gly His
 1595 1600 1605

Asp Thr Ile Arg Ile Asn Ala Gly Ala Asp Gln Leu Trp Phe Ala
 1610 1615 1620

Arg Gln Gly Asn Asp Leu Glu Ile Arg Ile Leu Gly Thr Asp Asp
 1625 1630 1635

Ala Leu Thr Val His Asp Trp Tyr Arg Asp Ala Asp His Arg Val
 1640 1645 1650

Glu Ile Ile His Ala Ala Asn Gln Ala Val Asp Gln Ala Gly Ile
 1655 1660 1665

Glu Lys Leu Val Glu Ala Met Ala Gln Tyr Pro Asp Pro Gly Ala
 1670 1675 1680

Ala Ala Ala Ala Pro Pro Ala Ala Arg Val Pro Asp Thr Leu Met
 1685 1690 1695

Gln Ser Leu Ala Val Asn Trp Arg
 1700 1705

<210> 3
 <211> 1708
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>

5

ES 2 505 324 T3

<223> CyaA/E570Q 呉ffl

<400> 3

Met Gln Gln Ser His Gln Ala Gly Tyr Ala Asn Ala Ala Asp Arg Glu
 1 5 10 15

Ser Gly Ile Pro Ala Ala Val Leu Asp Gly Ile Lys Ala Val Ala Lys
 20 25 30

Glu Lys Asn Ala Thr Leu Met Phe Arg Leu Val Asn Pro His Ser Thr
 35 40 45

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

Lys Ser Ser Asp Trp Gly Leu Gln Ala Gly Tyr Ile Pro Val Asn Pro
 65 70 75 80

Asn Leu Ser Lys Leu Phe Gly Arg Ala Pro Glu Val Ile Ala Arg Ala
 85 90 95

Asp Asn Asp Val Asn Ser Ser Leu Ala His Gly His Thr Ala Val Asp
 100 105 110

Leu Thr Leu Ser Lys Glu Arg Leu Asp Tyr Leu Arg Gln Ala Gly Leu
 115 120 125

Val Thr Gly Met Ala Asp Gly Val Val Ala Ser Asn His Ala Gly Tyr
 130 135 140

Glu Gln Phe Glu Phe Arg Val Lys Glu Thr Ser Asp Gly Arg Tyr Ala
 145 150 155 160

Val Gln Tyr Arg Arg Lys Gly Gly Asp Asp Phe Glu Ala Val Lys Val
 165 170 175

Ile Gly Asn Ala Ala Gly Ile Pro Leu Thr Ala Asp Gly Ser Ile Asp
 180 185 190

ES 2 505 324 T3

Met Phe Ala Ile Met Pro His Leu Ser Asn Phe Arg Asp Ser Ala Arg
 195 200 205

Ser Ser Val Thr Ser Gly Asp Ser Val Thr Asp Tyr Leu Ala Arg Thr
 210 215 220

Arg Arg Ala Ala Ser Glu Ala Thr Gly Gly Leu Asp Arg Glu Arg Ile
 225 230 235 240

Asp Leu Leu Trp Lys Ile Ala Arg Ala Gly Ala Arg Ser Ala Val Gly
 245 250 255

Thr Glu Ala Arg Arg Gln Phe Arg Tyr Asp Gly Asp Met Asn Ile Gly
 260 265 270

Val Ile Thr Asp Phe Glu Leu Glu Val Arg Asn Ala Leu Asn Arg Arg
 275 280 285

Ala His Ala Val Gly Ala Gln Asp Val Val Gln His Gly Thr Glu Gln
 290 295 300

Asn Asn Pro Phe Pro Glu Ala Asp Glu Lys Ile Phe Val Val Ser Ala
 305 310 315 320

Thr Gly Glu Ser Gln Met Leu Thr Arg Gly Gln Leu Lys Glu Tyr Ile
 325 330 335

Gly Gln Gln Arg Gly Glu Gly Tyr Val Phe Tyr Glu Asn Arg Ala Tyr
 340 345 350

Gly Val Ala Gly Lys Ser Leu Phe Asp Asp Gly Leu Gly Ala Ala Pro
 355 360 365

Gly Val Pro Ser Gly Arg Ser Lys Phe Ser Pro Asp Val Leu Glu Thr
 370 375 380

Val Pro Ala Ser Pro Gly Leu Arg Arg Pro Ser Leu Gly Ala Val Glu
 385 390 395 400

Arg Gln Asp Ser Gly Tyr Asp Ser Leu Asp Gly Val Gly Ser Arg Ser
 405 410 415

ES 2 505 324 T3

Phe Ser Leu Gly Glu Val Ser Asp Met Ala Ala Val Glu Ala Ala Glu
 420 425 430

Leu Glu Met Thr Arg Gln Val Leu His Ala Gly Ala Arg Gln Asp Asp
 435 440 445

Ala Glu Pro Gly Val Ser Gly Ala Ser Ala His Trp Gly Gln Arg Ala
 450 455 460

Leu Gln Gly Ala Gln Ala Val Ala Ala Ala Gln Arg Leu Val His Ala
 465 470 475 480

Ile Ala Leu Met Thr Gln Phe Gly Arg Ala Gly Ser Thr Asn Thr Pro
 485 490 495

Gln Glu Ala Ala Ser Leu Ser Ala Ala Val Phe Gly Leu Gly Glu Ala
 500 505 510

Ser Ser Ala Val Ala Glu Thr Val Ser Gly Phe Phe Arg Gly Ser Ser
 515 520 525

Arg Trp Ala Gly Gly Phe Gly Val Ala Gly Gly Ala Met Ala Leu Gly
 530 535 540

Gly Gly Ile Ala Ala Ala Val Gly Ala Gly Met Ser Leu Thr Asp Asp
 545 550 555 560

Ala Pro Ala Gly Gln Lys Ala Ala Ala Gly Ala Gln Ile Ala Leu Gln
 565 570 575

Leu Thr Gly Gly Thr Val Glu Leu Ala Ser Ser Ile Ala Leu Ala Leu
 580 585 590

Ala Ala Ala Arg Gly Val Thr Ser Gly Leu Gln Val Ala Gly Ala Ser
 595 600 605

Ala Gly Ala Ala Ala Gly Ala Leu Ala Ala Ala Leu Ser Pro Met Glu
 610 615 620

Ile Tyr Gly Leu Val Gln Gln Ser His Tyr Ala Asp Gln Leu Asp Lys
 625 630 635 640

ES 2 505 324 T3

Leu Ala Gln Glu Ser Ser Ala Tyr Gly Tyr Glu Gly Asp Ala Leu Leu
645 650 655

Ala Gln Leu Tyr Arg Asp Lys Thr Ala Ala Glu Gly Ala Val Ala Gly
660 665 670

Val Ser Ala Val Leu Ser Thr Val Gly Ala Ala Val Ser Ile Ala Ala
675 680 685

Ala Ala Ser Val Val Gly Ala Pro Val Ala Val Val Thr Ser Leu Leu
690 695 700

Thr Gly Ala Leu Asn Gly Ile Leu Arg Gly Val Gln Gln Pro Ile Ile
705 710 715 720

Glu Lys Leu Ala Asn Asp Tyr Ala Arg Lys Ile Asp Glu Leu Gly Gly
725 730 735

Pro Gln Ala Tyr Phe Glu Lys Asn Leu Gln Ala Arg His Glu Gln Leu
740 745 750

Ala Asn Ser Asp Gly Leu Arg Lys Met Leu Ala Asp Leu Gln Ala Gly
755 760 765

Trp Asn Ala Ser Ser Val Ile Gly Val Gln Thr Thr Glu Ile Ser Lys
770 775 780

Ser Ala Leu Glu Leu Ala Ala Ile Thr Gly Asn Ala Asp Asn Leu Lys
785 790 795 800

Ser Val Asp Val Phe Val Asp Arg Phe Val Gln Gly Glu Arg Val Ala
805 810 815

Gly Gln Pro Val Val Leu Asp Val Ala Ala Gly Gly Ile Asp Ile Ala
820 825 830

Ser Arg Lys Gly Glu Arg Pro Ala Leu Thr Phe Ile Thr Pro Leu Ala
835 840 845

Ala Pro Gly Glu Glu Gln Arg Arg Arg Thr Lys Thr Gly Arg Ser Glu
850 855 860

Phe Thr Thr Phe Val Glu Ile Val Gly Lys Gln Asp Arg Trp Arg Ile

ES 2 505 324 T3

865 870 875 880

Arg Asp Gly Ala Ala Asp Thr Thr Ile Asp Leu Ala Lys Val Val Ser
 885 890 895

Gln Leu Val Asp Ala Asn Gly Val Leu Lys His Ser Ile Lys Leu Asp
 900 905 910

Val Ile Gly Gly Asp Gly Asp Asp Val Val Leu Ala Asn Ala Ser Arg
 915 920 925

Ile His Tyr Asp Gly Gly Ala Gly Thr Asn Thr Val Ser Tyr Ala Ala
 930 935 940

Leu Gly Arg Gln Asp Ser Ile Thr Val Ser Ala Asp Gly Glu Arg Phe
945 950 955 960

Asn Val Arg Lys Gln Leu Asn Asn Ala Asn Val Tyr Arg Glu Gly Val
 965 970 975

Ala Thr Gln Thr Thr Ala Tyr Gly Lys Arg Thr Glu Asn Val Gln Tyr
 980 985 990

Arg His Val Glu Leu Ala Arg Val Gly Gln Val Val Glu Val Asp Thr
 995 1000 1005

Leu Glu His Val Gln His Ile Ile Gly Gly Ala Gly Asn Asp Ser
 1010 1015 1020

Ile Thr Gly Asn Ala His Asp Asn Phe Leu Ala Gly Gly Ser Gly
 1025 1030 1035

Asp Asp Arg Leu Asp Gly Gly Ala Gly Asn Asp Thr Leu Val Gly
 1040 1045 1050

Gly Glu Gly Gln Asn Thr Val Ile Gly Gly Ala Gly Asp Asp Val
 1055 1060 1065

Phe Leu Gln Asp Leu Gly Val Trp Ser Asn Gln Leu Asp Gly Gly
 1070 1075 1080

Ala Gly Val Asp Thr Val Lys Tyr Asn Val His Gln Pro Ser Glu
 1085 1090 1095

ES 2 505 324 T3

Glu Arg Leu Glu Arg Met Gly Asp Thr Gly Ile His Ala Asp Leu
 1100 1105 1110

 Gln Lys Gly Thr Val Glu Lys Trp Pro Ala Leu Asn Leu Phe Ser
 1115 1120 1125

 Val Asp His Val Lys Asn Ile Glu Asn Leu His Gly Ser Arg Leu
 1130 1135 1140

 Asn Asp Arg Ile Ala Gly Asp Asp Gln Asp Asn Glu Leu Trp Gly
 1145 1150 1155

 His Asp Gly Asn Asp Thr Ile Arg Gly Arg Gly Gly Asp Asp Ile
 1160 1165 1170

 Leu Arg Gly Gly Leu Gly Leu Asp Thr Leu Tyr Gly Glu Asp Gly
 1175 1180 1185

 Asn Asp Ile Phe Leu Gln Asp Asp Glu Thr Val Ser Asp Asp Ile
 1190 1195 1200

 Asp Gly Gly Ala Gly Leu Asp Thr Val Asp Tyr Ser Ala Met Ile
 1205 1210 1215

 His Pro Gly Arg Ile Val Ala Pro His Glu Tyr Gly Phe Gly Ile
 1220 1225 1230

 Glu Ala Asp Leu Ser Arg Glu Trp Val Arg Lys Ala Ser Ala Leu
 1235 1240 1245

 Gly Val Asp Tyr Tyr Asp Asn Val Arg Asn Val Glu Asn Val Ile
 1250 1255 1260

 Gly Thr Ser Met Lys Asp Val Leu Ile Gly Asp Ala Gln Ala Asn
 1265 1270 1275

 Thr Leu Met Gly Gln Gly Gly Asp Asp Thr Val Arg Gly Gly Asp
 1280 1285 1290

 Gly Asp Asp Leu Leu Phe Gly Gly Asp Gly Asn Asp Met Leu Tyr
 1295 1300 1305

ES 2 505 324 T3

Gly Asp Ala Gly Asn Asp Thr Leu Tyr Gly Gly Leu Gly Asp Asp
1310 1315 1320

Thr Leu Glu Gly Gly Ala Gly Asn Asp Trp Phe Gly Gln Thr Gln
1325 1330 1335

Ala Arg Glu His Asp Val Leu Arg Gly Gly Asp Gly Val Asp Thr
1340 1345 1350

Val Asp Tyr Ser Gln Thr Gly Ala His Ala Gly Ile Ala Ala Gly
1355 1360 1365

Arg Ile Gly Leu Gly Ile Leu Ala Asp Leu Gly Ala Gly Arg Val
1370 1375 1380

Asp Lys Leu Gly Glu Ala Gly Ser Ser Ala Tyr Asp Thr Val Ser
1385 1390 1395

Gly Ile Glu Asn Val Val Gly Thr Glu Leu Ala Asp Arg Ile Thr
1400 1405 1410

Gly Asp Ala Gln Ala Asn Val Leu Arg Gly Ala Gly Gly Ala Asp
1415 1420 1425

Val Leu Ala Gly Gly Glu Gly Asp Asp Val Leu Leu Gly Gly Asp
1430 1435 1440

Gly Asp Asp Gln Leu Ser Gly Asp Ala Gly Arg Asp Arg Leu Tyr
1445 1450 1455

Gly Glu Ala Gly Asp Asp Trp Phe Phe Gln Asp Ala Ala Asn Ala
1460 1465 1470

Gly Asn Leu Leu Asp Gly Gly Asp Gly Arg Asp Thr Val Asp Phe
1475 1480 1485

Ser Gly Pro Gly Arg Gly Leu Asp Ala Gly Ala Lys Gly Val Phe
1490 1495 1500

Leu Ser Leu Gly Lys Gly Phe Ala Ser Leu Met Asp Glu Pro Glu
1505 1510 1515

ES 2 505 324 T3

Thr Ser Asn Val Leu Arg Asn Ile Glu Asn Ala Val Gly Ser Ala
 1520 1525 1530

Arg Asp Asp Val Leu Ile Gly Asp Ala Gly Ala Asn Val Leu Asn
 1535 1540 1545

Gly Leu Ala Gly Asn Asp Val Leu Ser Gly Gly Ala Gly Asp Asp
 1550 1555 1560

Val Leu Leu Gly Asp Glu Gly Ser Asp Leu Leu Ser Gly Asp Ala
 1565 1570 1575

Gly Asn Asp Asp Leu Phe Gly Gly Gln Gly Asp Asp Thr Tyr Leu
 1580 1585 1590

Phe Gly Val Gly Tyr Gly His Asp Thr Ile Tyr Glu Ser Gly Gly
 1595 1600 1605

Gly His Asp Thr Ile Arg Ile Asn Ala Gly Ala Asp Gln Leu Trp
 1610 1615 1620

Phe Ala Arg Gln Gly Asn Asp Leu Glu Ile Arg Ile Leu Gly Thr
 1625 1630 1635

Asp Asp Ala Leu Thr Val His Asp Trp Tyr Arg Asp Ala Asp His
 1640 1645 1650

Arg Val Glu Ile Ile His Ala Ala Asn Gln Ala Val Asp Gln Ala
 1655 1660 1665

Gly Ile Glu Lys Leu Val Glu Ala Met Ala Gln Tyr Pro Asp Pro
 1670 1675 1680

Gly Ala Ala Ala Ala Ala Pro Pro Ala Ala Arg Val Pro Asp Thr
 1685 1690 1695

Leu Met Gln Ser Leu Ala Val Asn Trp Arg
 1700 1705

<210> 4
 <211> 1720
 <212> PRT
 <213> ARTIFICIAL

<220>
 <223> CyaA/2330VA/E570Q 異株

<400> 4

5

10

ES 2 505 324 T3

Met Gln Gln Ser His Gln Ala Gly Tyr Ala Asn Ala Ala Asp Arg Glu
1 5 10 15

Ser Gly Ile Pro Ala Ala Val Leu Asp Gly Ile Lys Ala Val Ala Lys
20 25 30

Glu Lys Asn Ala Thr Leu Met Phe Arg Leu Val Asn Pro His Ser Thr
35 40 45

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

Lys Ser Ser Asp Trp Gly Leu Gln Ala Gly Tyr Ile Pro Val Asn Pro
65 70 75 80

Asn Leu Ser Lys Leu Phe Gly Arg Ala Pro Glu Val Ile Ala Arg Ala
85 90 95

Asp Asn Asp Val Asn Ser Ser Leu Ala His Gly His Thr Ala Val Asp
100 105 110

Leu Thr Leu Ser Lys Glu Arg Leu Asp Tyr Leu Arg Gln Ala Gly Leu
115 120 125

Val Thr Gly Met Ala Asp Gly Val Val Ala Ser Asn His Ala Gly Tyr
130 135 140

Glu Gln Phe Glu Phe Arg Val Lys Glu Thr Ser Asp Gly Arg Tyr Ala
145 150 155 160

Val Gln Tyr Arg Arg Lys Gly Gly Asp Asp Phe Glu Ala Val Lys Val
165 170 175

Ile Gly Asn Ala Ala Gly Ile Pro Leu Thr Ala Asp Gly Ser Ile Asp
180 185 190

Met Phe Ala Ile Met Pro His Leu Ser Asn Phe Arg Asp Ser Ala Arg
195 200 205

ES 2 505 324 T3

Ser Ser Val Thr Ser Gly Asp Ser Val Thr Asp Tyr Leu Ala Arg Thr
 210 215 220

Arg Arg Ala Ala Ser Glu Ala Thr Gly Gly Val Leu Ser Ile Ile Asn
 225 230 235 240

Phe Glu Lys Leu Val His Leu Asp Arg Glu Arg Ile Asp Leu Leu Trp
 245 250 255

Lys Ile Ala Arg Ala Gly Ala Arg Ser Ala Val Gly Thr Glu Ala Arg
 260 265 270

Arg Gln Phe Arg Tyr Asp Gly Asp Met Asn Ile Gly Val Ile Thr Asp
 275 280 285

Phe Glu Leu Glu Val Arg Asn Ala Leu Asn Arg Arg Ala His Ala Val
 290 295 300

Gly Ala Gln Asp Val Val Gln His Gly Thr Glu Gln Asn Asn Pro Phe
 305 310 315 320

Pro Glu Ala Asp Glu Lys Ile Phe Val Val Ser Ala Thr Gly Glu Ser
 325 330 335

Gln Met Leu Thr Arg Gly Gln Leu Lys Glu Tyr Ile Gly Gln Gln Arg
 340 345 350

Gly Glu Gly Tyr Val Phe Tyr Glu Asn Arg Ala Tyr Gly Val Ala Gly
 355 360 365

Lys Ser Leu Phe Asp Asp Gly Leu Gly Ala Ala Pro Gly Val Pro Ser
 370 375 380

Gly Arg Ser Lys Phe Ser Pro Asp Val Leu Glu Thr Val Pro Ala Ser
 385 390 395 400

Pro Gly Leu Arg Arg Pro Ser Leu Gly Ala Val Glu Arg Gln Asp Ser
 405 410 415

Gly Tyr Asp Ser Leu Asp Gly Val Gly Ser Arg Ser Phe Ser Leu Gly
 420 425 430

Glu Val Ser Asp Met Ala Ala Val Glu Ala Ala Glu Leu Glu Met Thr

ES 2 505 324 T3

435		440		445											
Arg	Gln	Val	Leu	His	Ala	Gly	Ala	Arg	Gln	Asp	Asp	Ala	Glu	Pro	Gly
450						455					460				
Val	Ser	Gly	Ala	Ser	Ala	His	Trp	Gly	Gln	Arg	Ala	Leu	Gln	Gly	Ala
465					470					475					480
Gln	Ala	Val	Ala	Ala	Ala	Gln	Arg	Leu	Val	His	Ala	Ile	Ala	Leu	Met
				485					490					495	
Thr	Gln	Phe	Gly	Arg	Ala	Gly	Ser	Thr	Asn	Thr	Pro	Gln	Glu	Ala	Ala
			500					505					510		
Ser	Leu	Ser	Ala	Ala	Val	Phe	Gly	Leu	Gly	Glu	Ala	Ser	Ser	Ala	Val
		515					520					525			
Ala	Glu	Thr	Val	Ser	Gly	Phe	Phe	Arg	Gly	Ser	Ser	Arg	Trp	Ala	Gly
	530					535					540				
Gly	Phe	Gly	Val	Ala	Gly	Gly	Ala	Met	Ala	Leu	Gly	Gly	Gly	Ile	Ala
545					550					555					560
Ala	Ala	Val	Gly	Ala	Gly	Met	Ser	Leu	Thr	Asp	Asp	Ala	Pro	Ala	Gly
				565					570					575	
Gln	Lys	Ala	Ala	Ala	Gly	Ala	Gln	Ile	Ala	Leu	Gln	Leu	Thr	Gly	Gly
			580					585					590		
Thr	Val	Glu	Leu	Ala	Ser	Ser	Ile	Ala	Leu	Ala	Leu	Ala	Ala	Ala	Arg
		595					600					605			
Gly	Val	Thr	Ser	Gly	Leu	Gln	Val	Ala	Gly	Ala	Ser	Ala	Gly	Ala	Ala
	610					615					620				
Ala	Gly	Ala	Leu	Ala	Ala	Ala	Leu	Ser	Pro	Met	Glu	Ile	Tyr	Gly	Leu
625					630					635					640
Val	Gln	Gln	Ser	His	Tyr	Ala	Asp	Gln	Leu	Asp	Lys	Leu	Ala	Gln	Glu
				645					650					655	
Ser	Ser	Ala	Tyr	Gly	Tyr	Glu	Gly	Asp	Ala	Leu	Leu	Ala	Gln	Leu	Tyr
			660					665					670		

ES 2 505 324 T3

Arg Asp Lys Thr Ala Ala Glu Gly Ala Val Ala Gly Val Ser Ala Val
675 680 685

Leu Ser Thr Val Gly Ala Ala Val Ser Ile Ala Ala Ala Ala Ser Val
690 695 700

Val Gly Ala Pro Val Ala Val Val Thr Ser Leu Leu Thr Gly Ala Leu
705 710 715 720

Asn Gly Ile Leu Arg Gly Val Gln Gln Pro Ile Ile Glu Lys Leu Ala
725 730 735

Asn Asp Tyr Ala Arg Lys Ile Asp Glu Leu Gly Gly Pro Gln Ala Tyr
740 745 750

Phe Glu Lys Asn Leu Gln Ala Arg His Glu Gln Leu Ala Asn Ser Asp
755 760 765

Gly Leu Arg Lys Met Leu Ala Asp Leu Gln Ala Gly Trp Asn Ala Ser
770 775 780

Ser Val Ile Gly Val Gln Thr Thr Glu Ile Ser Lys Ser Ala Leu Glu
785 790 795 800

Leu Ala Ala Ile Thr Gly Asn Ala Asp Asn Leu Lys Ser Val Asp Val
805 810 815

Phe Val Asp Arg Phe Val Gln Gly Glu Arg Val Ala Gly Gln Pro Val
820 825 830

Val Leu Asp Val Ala Ala Gly Gly Ile Asp Ile Ala Ser Arg Lys Gly
835 840 845

Glu Arg Pro Ala Leu Thr Phe Ile Thr Pro Leu Ala Ala Pro Gly Glu
850 855 860

Glu Gln Arg Arg Arg Thr Lys Thr Gly Arg Ser Glu Phe Thr Thr Phe
865 870 875 880

Val Glu Ile Val Gly Lys Gln Asp Arg Trp Arg Ile Arg Asp Gly Ala
885 890 895

ES 2 505 324 T3

Ala Asp Thr Thr Ile Asp Leu Ala Lys Val Val Ser Gln Leu Val Asp
 900 905 910

Ala Asn Gly Val Leu Lys His Ser Ile Lys Leu Asp Val Ile Gly Gly
 915 920 925

Asp Gly Asp Asp Val Val Leu Ala Asn Ala Ser Arg Ile His Tyr Asp
 930 935 940

Gly Gly Ala Gly Thr Asn Thr Val Ser Tyr Ala Ala Leu Gly Arg Gln
 945 950 955 960

Asp Ser Ile Thr Val Ser Ala Asp Gly Glu Arg Phe Asn Val Arg Lys
 965 970 975

Gln Leu Asn Asn Ala Asn Val Tyr Arg Glu Gly Val Ala Thr Gln Thr
 980 985 990

Thr Ala Tyr Gly Lys Arg Thr Glu Asn Val Gln Tyr Arg His Val Glu
 995 1000 1005

Leu Ala Arg Val Gly Gln Val Val Glu Val Asp Thr Leu Glu His
 1010 1015 1020

Val Gln His Ile Ile Gly Gly Ala Gly Asn Asp Ser Ile Thr Gly
 1025 1030 1035

Asn Ala His Asp Asn Phe Leu Ala Gly Gly Ser Gly Asp Asp Arg
 1040 1045 1050

Leu Asp Gly Gly Ala Gly Asn Asp Thr Leu Val Gly Gly Glu Gly
 1055 1060 1065

Gln Asn Thr Val Ile Gly Gly Ala Gly Asp Asp Val Phe Leu Gln
 1070 1075 1080

Asp Leu Gly Val Trp Ser Asn Gln Leu Asp Gly Gly Ala Gly Val
 1085 1090 1095

Asp Thr Val Lys Tyr Asn Val His Gln Pro Ser Glu Glu Arg Leu
 1100 1105 1110

ES 2 505 324 T3

Glu Arg Met Gly Asp Thr Gly Ile His Ala Asp Leu Gln Lys Gly
 1115 1120 1125

 Thr Val Glu Lys Trp Pro Ala Leu Asn Leu Phe Ser Val Asp His
 1130 1135 1140

 Val Lys Asn Ile Glu Asn Leu His Gly Ser Arg Leu Asn Asp Arg
 1145 1150 1155

 Ile Ala Gly Asp Asp Gln Asp Asn Glu Leu Trp Gly His Asp Gly
 1160 1165 1170

 Asn Asp Thr Ile Arg Gly Arg Gly Gly Asp Asp Ile Leu Arg Gly
 1175 1180 1185

 Gly Leu Gly Leu Asp Thr Leu Tyr Gly Glu Asp Gly Asn Asp Ile
 1190 1195 1200

 Phe Leu Gln Asp Asp Glu Thr Val Ser Asp Asp Ile Asp Gly Gly
 1205 1210 1215

 Ala Gly Leu Asp Thr Val Asp Tyr Ser Ala Met Ile His Pro Gly
 1220 1225 1230

 Arg Ile Val Ala Pro His Glu Tyr Gly Phe Gly Ile Glu Ala Asp
 1235 1240 1245

 Leu Ser Arg Glu Trp Val Arg Lys Ala Ser Ala Leu Gly Val Asp
 1250 1255 1260

 Tyr Tyr Asp Asn Val Arg Asn Val Glu Asn Val Ile Gly Thr Ser
 1265 1270 1275

 Met Lys Asp Val Leu Ile Gly Asp Ala Gln Ala Asn Thr Leu Met
 1280 1285 1290

 Gly Gln Gly Gly Asp Asp Thr Val Arg Gly Gly Asp Gly Asp Asp
 1295 1300 1305

 Leu Leu Phe Gly Gly Asp Gly Asn Asp Met Leu Tyr Gly Asp Ala
 1310 1315 1320

 Gly Asn Asp Thr Leu Tyr Gly Gly Leu Gly Asp Asp Thr Leu Glu

ES 2 505 324 T3

1325						1330						1335			
Gly	Gly	Ala	Gly	Asn	Asp	Trp	Phe	Gly	Gln	Thr	Gln	Ala	Arg	Glu	
1340						1345					1350				
His	Asp	Val	Leu	Arg	Gly	Gly	Asp	Gly	Val	Asp	Thr	Val	Asp	Tyr	
1355						1360					1365				
Ser	Gln	Thr	Gly	Ala	His	Ala	Gly	Ile	Ala	Ala	Gly	Arg	Ile	Gly	
1370						1375					1380				
Leu	Gly	Ile	Leu	Ala	Asp	Leu	Gly	Ala	Gly	Arg	Val	Asp	Lys	Leu	
1385						1390					1395				
Gly	Glu	Ala	Gly	Ser	Ser	Ala	Tyr	Asp	Thr	Val	Ser	Gly	Ile	Glu	
1400						1405					1410				
Asn	Val	Val	Gly	Thr	Glu	Leu	Ala	Asp	Arg	Ile	Thr	Gly	Asp	Ala	
1415						1420					1425				
Gln	Ala	Asn	Val	Leu	Arg	Gly	Ala	Gly	Gly	Ala	Asp	Val	Leu	Ala	
1430						1435					1440				
Gly	Gly	Glu	Gly	Asp	Asp	Val	Leu	Leu	Gly	Gly	Asp	Gly	Asp	Asp	
1445						1450					1455				
Gln	Leu	Ser	Gly	Asp	Ala	Gly	Arg	Asp	Arg	Leu	Tyr	Gly	Glu	Ala	
1460						1465					1470				
Gly	Asp	Asp	Trp	Phe	Phe	Gln	Asp	Ala	Ala	Asn	Ala	Gly	Asn	Leu	
1475						1480					1485				
Leu	Asp	Gly	Gly	Asp	Gly	Arg	Asp	Thr	Val	Asp	Phe	Ser	Gly	Pro	
1490						1495					1500				
Gly	Arg	Gly	Leu	Asp	Ala	Gly	Ala	Lys	Gly	Val	Phe	Leu	Ser	Leu	
1505						1510					1515				
Gly	Lys	Gly	Phe	Ala	Ser	Leu	Met	Asp	Glu	Pro	Glu	Thr	Ser	Asn	
1520						1525					1530				
Val	Leu	Arg	Asn	Ile	Glu	Asn	Ala	Val	Gly	Ser	Ala	Arg	Asp	Asp	
1535						1540					1545				

ES 2 505 324 T3

Val Leu Ile Gly Asp Ala Gly Ala Asn Val Leu Asn Gly Leu Ala
 1550 1555 1560

Gly Asn Asp Val Leu Ser Gly Gly Ala Gly Asp Asp Val Leu Leu
 1565 1570 1575

Gly Asp Glu Gly Ser Asp Leu Leu Ser Gly Asp Ala Gly Asn Asp
 1580 1585 1590

Asp Leu Phe Gly Gly Gln Gly Asp Asp Thr Tyr Leu Phe Gly Val
 1595 1600 1605

Gly Tyr Gly His Asp Thr Ile Tyr Glu Ser Gly Gly Gly His Asp
 1610 1615 1620

Thr Ile Arg Ile Asn Ala Gly Ala Asp Gln Leu Trp Phe Ala Arg
 1625 1630 1635

Gln Gly Asn Asp Leu Glu Ile Arg Ile Leu Gly Thr Asp Asp Ala
 1640 1645 1650

Leu Thr Val His Asp Trp Tyr Arg Asp Ala Asp His Arg Val Glu
 1655 1660 1665

Ile Ile His Ala Ala Asn Gln Ala Val Asp Gln Ala Gly Ile Glu
 1670 1675 1680

Lys Leu Val Glu Ala Met Ala Gln Tyr Pro Asp Pro Gly Ala Ala
 1685 1690 1695

Ala Ala Ala Pro Pro Ala Ala Arg Val Pro Asp Thr Leu Met Gln
 1700 1705 1710

Ser Leu Ala Val Asn Trp Arg
 1715 1720

<210> 5
 <211> 8825
 <212> ADN
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> QR AC-

10

<400> 5

ES 2 505 324 T3

cggaagagcg cccaatacgc aaaccgcctc tccccgcgcg ttggccgatt cattaatgca 60
 gctggcacga caggtttccc gactggaaag cgggcagtga gcgcaacgca attaattgtga 120
 gttagctcac tcattaggca cccaggctt tacactttat gcttccggct cgtatgttgt 180
 gtggaattgt gagcggataa caatttcaca caggaaacag ctatgaccat gattacgaat 240
 ttaatacgcac tcactatagg gaaagctcta gaaataattt tgtttaactt taagaaggag 300
 atatacatat gcttccgctc gcccaagcgc cctccctcct caatcccacc gacgacttcg 360
 cggcactggg caatattgcc tggctgtgga tgaactctcc catgcaccgc gactggccgg 420
 tgcactctgct cgcacgcaac acgctcgcgc cgattcaact gggccaatac attctgctgc 480
 gatgcaatga cgtgccggtt gcatactgca gctgggccct aatggacgcc gacaccgaac 540
 tctcctatgt catggcgccc tcgtcgtggy gcgggaatgc ctggaactgc ggcgaccgac 600
 tgtggatcat cgactggatc gcgccattct cgcgcgacga caatcgtgcy ctgcgcgcg 660
 cgctggccga acggcaccce gacagcgtgg gccgttcgct gcgcgttcgg cgcggcggcg 720
 acaccgcgcy cgtcaaggag taccgaggcc gcgcgctgga cgcggccgcc actcgcgcgc 780
 agctggaccg ctaccatgcc gaactgatcy caggactgcy cgcgagcaac ggcggatacy 840
 cgccgcgagg ccggggcacc gcctaaggat cctctagagc ttgcatgccc tggcacgaca 900
 ggtttcccgga ctggaaagcy ggcagtgagc gcaacgcaat taatgtgagt tagctcactc 960
 attaggcacc ccaggttta cactttatgc ttccggctcg tatgttgtgt ggaattgtga 1020
 gcggataaca atttcacaca ggaaacagct atgaccatgc agcaatcga tcaggctggt 1080
 tacgcaaacy ccgccgaccg ggagtctggc atccccgcag ccgtactcga tggcatcaag 1140
 gccgtggcga aggaaaaaaaa cgcacattg atgttccgcc tggtaacccc ccattccacc 1200
 agcctgattg ccgaaggggt ggccaccaa ggattgggcy tgcacgcaa gtcgtccgat 1260
 tgggggttgc aggcgggcta cattcccgtc aaccogaatc tttccaaact gttcggccgt 1320
 gcgcccgagg tgatcgcgcy ggcgcacaac gacgtcaaca gcagcctggc gcatggccat 1380
 accgcggtcy acctgacgct gtcgaaagag cggcttgact atctgcccga agcgggcctg 1440
 gtcaccggca tggccgatgg cgtggtcgcy agcaaccacy caggctacy gcagttcag 1500
 tttcgcgtga aggaaacctc ggacgggcgc tatgccgtgc agtatcgcy caagggcggc 1560
 gacgatttcy aggcgtcaa ggtgatcggc aatgcgcgcy gtattccact gacggcggat 1620
 ggatccatcy acatgttcgc cattatgccc catctgtcca acttccgcga ctcggcgcgc 1680

ES 2 505 324 T3

agttcgggtga ccagcggcga ttcgggtgacc gattacctgg cgcgcacgcg gcgggcccgc 1740
 agcgaggcca cgggcgggtgt acacctggat cgcgaacgca tcgacttggt gtggaaaatc 1800
 gctcgcgcgcg gcgcccgttc cgcagtgggc accgaggcgc gtcgccagtt ccgetacgac 1860
 ggcgacatga atatcggcgt gatcaccgat ttcgagctgg aagtgcgcaa tgcgctgaac 1920
 aggcggggcgc acgcgcctgg cgcgcaggac gtggtccagc atggcactga gcagaacaat 1980
 cctttcccgg aggcagatga gaagattttc gtcgtatcgg ccaccggtga aagccagatg 2040
 ctcacgcgcg ggcaactgaa ggaatacatt ggccagcagc gcggcgaggg ctatgtcttc 2100
 tacgagaacc gtgcatacgg cgtggcgggg aaaagcctgt tcgacgatgg gctgggagcc 2160
 gcgcccggcg tgccgagcgg acgttcgaag ttctcgcgg atgtactgga aacggtgccg 2220
 gcgtcaccgc gattgcggcg gccgtcgcgt ggcgcagtg aacgccagga ttccggctat 2280
 gacagccttg atgggggtgg atcgcgatcg ttctcgttgg gcgaggtgtc cgacatggcc 2340
 gccgtggaag cggcggaaact ggaaatgacc cggcaagtct tgcagcgcgg gcgcggcag 2400
 gacgatgccg agccgggcgt gagcgggtgc tcggcgcact gggggcagcg ggcgctgcag 2460
 ggcgcccagg cgggtggcggc ggcgcagcgg ctggttcatt ccattgccct gatgacgcaa 2520
 ttcggccggg ccggttccac caacacgcgc caggaagcgg cctcgttgtc ggcgcccggtg 2580
 ttcggcttg ggcgagccag cagcgcctg gccgaaaccg tgagcggttt tttccgcggg 2640
 tcttcgcgct gggccggcgg tttcggcgtg gctggcggcg cgatggcgtc gggaggcggc 2700
 atcgcgcgcg ccggttggcgc cgggatgtcg ttgaccgatg acgcgcgcggc cggacagaag 2760
 gccgcgcgcg gagctccgat cgcgctgcag ttaacgggtg gaacggtcga gctggcttct 2820
 tccatcgcgt tggegetggc cgcggcgcgc ggcgtgacca gcggcttgca ggtggccggg 2880
 gcgtcggcgc gggcggetgc cggcgcattg gccgcggcgc tcagtcccat ggagatctac 2940
 ggctcgtgc agcaatcgca ctatgcggat cagctggaca agctggcga ggaatcgagc 3000
 gcatacgggt acgagggcga cgccttgcgt gccagctgt atcgcgacaa gacggcccgc 3060
 gagggcgcgc tcgcggcgt ctcgcgcgtc ctgagcacgg tgggggcggc ggtgtcgatc 3120
 gccgcggcgc ccagcgtggt aggggccccg gtggcgggtg teacttcctt gctgaccggg 3180
 gctctcaacg gcatacctgc cggcgtgcag cagcccatca tcgaaaagct ggccaacgat 3240
 tacgctcgca agatcgacga gctgggcggg ccgcaagcgt acttcgagaa aaacctgcag 3300
 gcgcgtcacg aacaactggc caattcggac ggccctcggg aaatgctggc cgacctgcag 3360

ES 2 505 324 T3

gccggttgga acgccagcag cgtgatcggg gtgcagacga cagagatctc caagtccggcg 3420
 ctccaactgg ccgccattac cggcaacgcg gacaacctga aatccgtcga cgtgttcgtg 3480
 gaccgcttcg tccagggcga gcgggtggcc ggcacgcggg tggtcctcga cgtcgcggcc 3540
 ggcggcatcg atatcgccag ccgcaagggc gagcggccgg cgctgacgtt catcacgccc 3600
 ctggccgcgc caggagaaga gcagcgcggg cgcacgaaaa cgggcagatc tgaattcacc 3660
 acattcgtcg agatcgtggg caagcaggac cgctggcgca tccgggacgg cgcggccgac 3720
 accaccatcg atctggccaa ggtggtgtcg caactggtcg acgccaatgg cgtgctcaag 3780
 cacagcatca aactggatgt gatcggcgga gatggcgatg acgtcgtgct tgccaatgct 3840
 tcgcgcatcc attatgacgg cggcgcgggc accaacacgg tcagctatgc cgcctgggt 3900
 cgacaggatt ccattaccgt gtccgccgac ggggaacggt tcaacgtgcg caagcagttg 3960
 aacaacgcca acgtgtatcg cgaaggcgtg gctaccacaga caaccgccta cggcaagcgc 4020
 acggagaatg tccaataaccg ccatgtcgag ctggcccgtg tggggcaagt ggtggaggtc 4080
 gacacgctcg agcatgtgca gcacatcadc ggcggggccg gcaacgattc gatcacggcc 4140
 aatgcgcacg acaacttcc tgcggcgggg tcgggcgacg acaggctgga tggcggcgcc 4200
 ggcaacgaca ccctggttg cggcgagggc caaaacacgg tcatcggcgg cgcggcgac 4260
 gacgtattcc tgcaggacct gggggtatgg agcaaccagc tcgatggcgg cgcggggcgc 4320
 gataccgtga agtacaacgt gcaccagcct tccgaggagc gcctcgaacg catggggcgc 4380
 acgggcatcc atgcgatct tcaaaagggc acggtcgaga agtggccggc cctgaacctg 4440
 ttcagcgtcg accatgtcaa gaatatcgag aatctgcacg gctcccgcct aaacgaccgc 4500
 atcggcggcg acgaccagga caacgagctc tggggccacg atggcaacga cacgatacgc 4560
 ggccggggcg gcgacgacat cctgcgcggc ggccctgggccc tggacacgct gtatggcgag 4620
 gacggcaacg acatcttcc gcaggacgac gagaccgtca gcgatgacat cgacggcggc 4680
 gcggggctgg acaccgtcga ctactccgcc atgatccatc caggcaggat cgttgcgccg 4740
 catgaatacg gcttcgggat cgaggcggac ctgtccaggg aatgggtgcg caaggcgtcc 4800
 gcgctgggcg tggactatta cgataatgct cgcaatgtcg aaaacgtcat cggctacgagc 4860
 atgaaggatg tgctcatcgg cgacgcgcaa gccaatacce tgatgggcca gggcggcgac 4920
 gataccgtgc gcggcggcga cggcgatgat ctgctgttcg gcggcgacgg caacgacatg 4980
 ctgtatggcg acgcccgcaa cgacaccctc tacggggggc tgggcgacga taccctttaa 5040
 ggcggcgcgg gcaacgattg gttcggccag acgcagggcg gcgagcatga cgtgctgcgc 5100

ES 2 505 324 T3

ggcgagatg gggtagatac cgtcgattac agccagaccg gcgcgatgc cggcattgcc 5160
 gcgggtcgca tcgggtcggg catcctggct gacctgggcg ccggcccgct cgacaagctg 5220
 ggcgaggccg gcagcagcgc ctacgatacg gtttcgggta tcgagaacgt ggtgggcacg 5280
 gaactggccg accgcattac gggcgatgcg caggccaacg tgctgcgcgg cgcgggtggc 5340
 gccgacgtgc ttgcgggcgg cgagggcgac gatgtgctgc tgggcggcga cggcgacgac 5400
 cagctgtcgg gcgacgccgg acgcgatgc ttgtaaggcg aagccggtga cgactggttc 5460
 ttccaggatg ccgccaatgc cggcaatctg ctgcagggcg gcgacggccg cgataccgtg 5520
 gatttcagcg gcccgggccg gggcctcgac gccggcgcaa agggcgattt cctgagcttg 5580
 ggcaaggggt tcgccagcct gatggacgaa cccgaaacca gcaacgtggt gcgcaatctc 5640
 gagaacgccg tgggcagcgc gcgtgatgac gtgctgatcg gcgacgcagg cgccaacgtc 5700
 ctcaatggcc tggcgggcaa cgacgtgctg tccggcgggc ctggcgacga tgtgctgctg 5760
 ggcgacgagg gctcggacct gctcagcggc gatgcgggca acgacgatct gttcggcggg 5820
 cagggcgatg atacttatct gttcggggtc gggtagggc acgacacgat ctacgaatcg 5880
 ggcgcgggcc atgacaccat ccgcattcaac gcggggcgcg accagctgtg gttcgcgcgc 5940
 cagggcaacg acctggagat ccgcattctc ggcaccgacg atgcacttac cgtgcacgac 6000
 tggtagcgcg acgccgatca ccgggtggaa atcatccatg ccgccaacca ggcggtagac 6060
 caggcaggca tcgaaaagct ggtcgaggca atggcgagc atccggacce cggcgcgggc 6120
 gcggctgccc cgcggcgggc gcgcgtgcgg gacacgctga tgcagtcctt ggtgtcaac 6180
 tggcgtgaa gcgccgtgaa tcacggcccg cctgcctcgc gcggcgggcg cgtctcttg 6240
 cgttctctc cgaggtatct cccatcatga attcactggc cgtcgtttta caacgtcgtg 6300
 actgggaaaa ccctggcggt acccaactta atgccttgc agcacatccc ctttcgcca 6360
 gctggcgtaa tagcgaagag gcccgaccg atgcctctc ccaacagttg cgcagcctga 6420
 atggcgaatg ggaaattgta aacgttaata ttttgtaat attttgtaa aatcgcgtt 6480
 aaatcttctg taaatcagct catctttta ccaataggcc gaaatcggca aaatccctta 6540
 taaatcaaaa gaatagaccg agatagggtt gagggttgtt ccagtttgga acaagagtc 6600
 actattaaag aacgtggact ccaacgtcaa agggcgaaaa accgtctatc agggcgatgg 6660
 cccactacgt gaaccattac cctaatacag tttttgggg tcgaggtgcc gtaaagcact 6720
 aaatcggaac cctaaaggga tgccccgatt tagagcttga cggggaaagc cggcgacgt 6780

ES 2 505 324 T3

ggcgagaaag gaaggaaga aagcgaaagg agcgggcgct agggcgctgg caagtgtagc 6840
 ggtcacgctg cgcgtaacca ccacaccgc cgcgcttaat gcgccgctac agggcgctc 6900
 aggtggcact ttccggggaa atgtgcgcgg aaccctatt tgtttatfff tctaaataca 6960
 ttcaaatatg tatccgctca tgagacaata accctgataa atgcttcaat aatattgaaa 7020
 aaggaagagt atgagtattc aacatttccg tgtgcgccct attccctfff ttgcggcatt 7080
 ttgccttctt gtttttgctc acccagaaac gctggtgaaa gtaaaagatg ctgaagatca 7140
 gttgggtgca cgagtgggtt acatcgaact ggatctcaac agcggtaaga tccttgagag 7200
 ttttcgcccc gaagaacgtt ttccaatgat gagcactfff aaagttctgc tatgtggcgc 7260
 ggtattatcc cgtattgacg ccgggcaaga gcaactcggc cgcgcatac actattctca 7320
 gaatgacttg gttgagtact caccagtcac agaaaagcat cttacggatg gcatgacagt 7380
 aagagaatta tgcagtgctg ccataacatc gactgataac actgcggcca acttacttct 7440
 gacaacgata ggaggaccga aggagctaac cgtttttttg cacaacatgg gggatcatgt 7500
 aactcgcctt gatcgttggg aaccggagct gaatgaagcc ataccaaacg acgagcgtga 7560
 caccacgatg cctgtagcaa tggcaacaac gttgcgcaaa ctattaactg gcgaactact 7620
 tactctagct tcccggcaac aattaataga ctggatggag gcggataaag ttgcaggacc 7680
 acttctgcgc tcggcccttc cggctggctg gtttattgct gataaatctg gagccgggta 7740
 gcgtgggtct cgcggtatca ttgcagcact ggggccagat ggtaagccct ccgatatcgt 7800
 agttatctac acgacgggga gtcaggcaac tatggatgaa cgaaatagac agatcgcctga 7860
 gataggtgcc tcaactgatta agcattggta actgtcagac caagtttact catatatact 7920
 ttagattgat ttaaaaactc atttttaatt taaaaggatc taggtgaaga tcctttttga 7980
 taatctcatg accaaaatcc cttaacgtga gttttcgttc cactgagcgt cagaccctgt 8040
 agaaaagatc aaaggatctt cttgagatcc tttttttctg cgcgtaatct gctgcttgca 8100
 aacaaaaaaaa ccaccgctac cagcgggtgt ttgtttgccc gatcaagagc taccaactct 8160
 ttttccgaag gtaactgget tcagcagagc gcagatacca aatactgtcc ttctagtgta 8220
 gccgtagtta ggccaccact tcaagaactc tgtagcaccg cctacatacc tcgctctgct 8280
 aatcctgta ccagtggctg ctgccagtgg cgataagtcg tgtcttaccg ggttggaactc 8340
 aagacgatag ttaccggata aggcgcagcg gtcgggctga acgggggggt cgtgcacaca 8400
 gccagcttg gagcgaacga cctacaccga actgagatac ctacagcgtg agctatgaga 8460
 aagcgcacg ctccccgaag ggagaaaggc ggacaggtat ccggtaagcg gcagggtcgg 8520

ES 2 505 324 T3

aacaggagag cgcacgaggg agcttccagg gggaaacgcc tggatcttt atagtcctgt 8580
 cgggtttcgc cacctctgac ttgagcgtcg atttttgtga tgctcgtcag gggggcggag 8640
 cctatggaaa aacgccagca acgcggcctt tttacggttc ctggcctttt gctggccttt 8700
 tgctcacatg ttctttcctg cgttatcccc tgattctgtg gataaccgta ttaccgctt 8760
 tgagtgagct gataccgctc gccgcagccg aacgaaccgag cgcagcaggt cagtgagcga 8820
 ggaag 8825

5 <210> 6
 <211> 8855
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> OVA QR AC-
 10 <400> 6

cggaagagcg cccaatacgc aaaccgcctc tccccgcgcg ttggccgatt cattaatgca 60
 gctggcacga caggtttccc gactggaaag cgggcagtga gcgcaacgca attaatgtga 120
 gttagctcac tcattaggca ccccaggctt tacactttat gcttccggct cgtatgttgt 180
 gtggaattgt gagcggataa caatttcaca caggaaacag ctatgaccat gattacgaat 240
 ttaatacgcac tcactatagg gaaagctcta gaaataattt tgtttaactt taagaaggag 300
 atatacatat gcttccgtcc gcccaagcgc cctccctcct caatcccacc gacgacttcg 360
 cggcactggg caatattgcc tggtctgtga tgaactctcc catgcaccgc gactggccgg 420
 tgcactctgt cgcacgcaac acgctcgcgc cgattcaact gggccaatac attctgctgc 480
 gatgcaatga cgtgccggtt gcatactgca gctgggccct aatggacgcc gacaccgaac 540
 tctcctatgt catggcgcgc tcgtcgtg gcgggaatgc ctggaactgc ggcgaccgac 600
 tgtggatcat cgactggatc gcgccattct cgcgcgacga caatcgtgcg ctgcgccgcg 660
 cgctggccga acggcaccac gacagcgtgg gccgttcgct gcgcggttcgg cgcggcggcg 720
 acaccgcgcg cgtcaaggag taccgaggcc gcgcgctgga cgcggccgcc actcgcgcgc 780
 agctggaccg ctaccatgcc gaactgatcg caggactgcg cgcgagcaac ggcggatacg 840
 cgccgcgagg ccggggcacc gcctaaggat cctctagagc ttgcatgccc tggcacgaca 900
 ggtttccoga ctggaagcg ggcagtgagc gcaacgcaat taatgtgagt tagctcactc 960
 attaggcacc ccaggcttta cactttatgc ttccggctcg tatgttgtgt ggaattgtga 1020

ES 2 505 324 T3

gcggataaca atttcacaca ggaaacagct atgacccatgc agcaatcgca tcaggctggt 1080
 tacgcaaacg cegccgaccg ggagtctggc atccccgcag cegtactcga tggcatcaag 1140
 gccgtggcga aggaaaaaaa cgccacattg atgttccgcc tggteaacec ccattccacc 1200
 agcctgattg ccgaaggggt ggccaccaa ggattggggc tgcacgcca gtcgtccgat 1260
 tgggggttgc aggcgggcta cattcccgtc aaccocgaatc tttccaaact gttcggccgt 1320
 gcgcccagag tgatcgcgcg gcccgacaac gacgtcaaca gcagcctggc gcatggccat 1380
 accgcggtcg acctgacgct gtcgaaagag cggcttgact atctgcccga agcgggectg 1440
 gtcaccggca tggccgatgg cgtggctcgc agcaaccacg caggctacga gcagttcgag 1500
 tttcgcgtga aggaaacctc ggacggggcg tatgccgtgc agtatcgccg caaggggcgc 1560
 gacgatttcg aggcggtcaa ggtgatcggc aatgccgccg gtattccact gacggcggat 1620
 ggatccatcg acatgttcgc cattatgccg catctgtcca acttcocgca ctccggcgcg 1680
 agttcgggtga ccagcggcga ttcggtgacc gattacctgg cgcgcaocgc gcgggcgcc 1740
 agcgaggcca cgggcgggtg actctcaata attaatctcg aaaagcttgt acacctggat 1800
 cgcgaacgca tcgacttgtt gtggaaaatc gctcgcgccg gcgcccgttc cgcagtgggc 1860
 accgagggcg gtcgccagtt ccgctacgac ggcgacatga atatcggcgt gatcaccgat 1920
 ttcgagctgg aagtgcgcaa tgcgctgaac aggcggggcg acgcccgtcg cgcgcaggac 1980
 gtggctcagc atggcactga gcagaacaat cctttcccgg aggcagatga gaagattttc 2040
 gtcgtatcgg ccaccgggtga aagccagatg ctcacgcgcg ggcaactgaa ggaatacatt 2100
 gccagcagc gcggcgaggg ctatgtcttc tacgagaacc gtgcatacgg cgtggcgggg 2160
 aaaagcctgt tcgacgatgg gctgggagcc gcgcccggcg tgcgagcgg acgttcgaag 2220
 ttctcgcgg atgtactgga aacgggtccg gcgtcacccg gattgcggcg gccgtcgtg 2280
 ggcgcagtgg aacgccagga ttccggctat gacagccttg atgggggtgg atcgcgatcg 2340
 ttctcgttgg gcgaggtgtc cgacatggcc gccgtggaag cggcggaact ggaatgacc 2400
 cggcaagtct tgcacgcccg gccgcggcag gacgatgccg agcccggcgt gagcgggtgcg 2460
 tcggcgcact gggggcagcg gccgctgcag gccgcccagg cggtggcggc gccgcagcgg 2520
 ctggttcatg ccattgccct gatgacgcaa ttoggccggg ccggttccac caacacgccg 2580
 caggaagcgg cctcgttctc gccggccgtg ttccgcttgg gcgaggccag cagcgcctg 2640
 gccgaaaccg tgagcggttt tttccgggg tcttcgcgtc gggccggcgg tttcggcgtg 2700
 gctggcggcg cgatggcgtc gggagggcgc atcgcocgcg ccgttggcgc cgggatgtcg 2760

ES 2 505 324 T3

ttgaccgatg acgcgcgcgc cggacagaag gccgcgcgcg gagctccgat cgcgctgcag 2820
 ttaacgggtg gaacggtcga gctggcttct tccatcgcgt tggcgctggc cgcggcgcgc 2880
 ggcgtgacca gcggttgcg ggtggccggg gcgtcggccg gggcggtgc cggcgcattg 2940
 gccgcggcgc tcagtcccat ggagatctac ggccctggtgc agcaatcgcg ctatgcggat 3000
 cagctggaca agctggcgcg ggaatcgagc gcatacgggt acgagggcga cgccttgcctg 3060
 gccagctgt atcgcgacaa gacggccgcc gagggcgccg tcgccggcgt ctccgcgcctc 3120
 ctgagcacgg tgggggcggc ggtgtcgatc gccgcggcgg ccagcgtggt aggggccccg 3180
 gtggcggttg tcacttcctt gctgaccggg gctctoaacg gcacctcgcg cggcgtgcag 3240
 cagcccatca tcgaaaagct ggccaacgat tacgctcgcg agatcgacga gctgggcccg 3300
 ccgcaagcgt acttcgagaa aaacctgcag gcgcgtcacg aacaactggc caattcggac 3360
 ggcttacgga aaatgctggc cgacctgcag gccggttggg accccagcag cgtgatcggg 3420
 gtgcagacga cagagatctc caagtccggc ctogaactgg ccgccattac cggcaacgcg 3480
 gacaacctga aatccgtcga cgtgttcgtg gaccgcttcg tccagggcga gcgggtggcc 3540
 ggccagccgg tggctcctcga cgtcgcgcc gccggcgcgc atatcgcag ccgcaagggc 3600
 gagcggccgg cgctgacgtt catcacgccg ctggccgcgc caggagaaga gcagcgcgg 3660
 cgcacgaaaa cgggcagatc tgaattcacc acattcgtcg agatcgtggg caagcaggac 3720
 cgctggcgcg tccgggacgg cgcggccgac accaccatcg atctggccaa ggtggtgctg 3780
 caactggtcg acgccaatgg cgtgctcaag cacagcatca aactggatgt gatcggcggg 3840
 gatggcgatg acgtcgtgct tgccaatgct tcgcgcctcc attatgacgg cggcgcgggc 3900
 accaacacgg tcagctatgc cgccctgggt cgacaggatt ccattaccgt gtccgcgcag 3960
 ggggaacggt tcaacgtgcg caagcagttg aacaacgccg acgtgtatcg cgaaggcgtg 4020
 gctaccaga caaccgccta cggcaagcgc accggagaatg tccaataccg ccatgtcgag 4080
 ctggcccgtg tcgggcaagt ggtggaggtc gacacgctcg agcatgtgca gcacatcctc 4140
 ggcggggccg gcaacgattc gatcaccggc aatgcgcacg acaacttctt agccggcggg 4200
 tcgggcgacg acaggctgga tggcggcgc gccaacgaca ccctggttgg cggcagggc 4260
 caaacacgg tcatcggcgg cgcggcgcag gacgtattcc tgcaggacct gggggtatgg 4320
 agcaaccagc tcgatggcgg cgcgggcgct gataccgtga agtacaacgt gcaccagcct 4380
 tccgaggagc gcctcgaacg catgggcgac accggcctcc atgccgatct tcaaaagggc 4440

ES 2 505 324 T3

acggtcgaga agtggccggc cctgaacctg ttcagcgtcg accatgtcaa gaatatogag 4500
 aatctgcacg gctccccct aaacgaccgc atcgccggcg acgaccagga caacgagctc 4560
 tggggccacg atggcaacga cacgatacgc ggccggggcg gcgacgacat cctgcgoggc 4620
 ggcttgggccc tggacacgct gtatggcgag gacggcaacg acatcttctc gcaggaogac 4680
 gagaccgtca gcgatgacat cgacggcggc gcggggtgag acaccgtcga ctactcggc 4740
 atgatccatc caggcaggat cgttgcgccg catgaatacg gcttcgggat cgaggcggac 4800
 ctgtccaggg aatgggtgcg caaggcgtcc gcgctgggcg tggactatta cgataatgtc 4860
 cgcaatgtcg aaaacgtcat cggtaogagc atgaaggatg tgctcatcgg cgacgcgcaa 4920
 gccaatacc cctgatggcca gggcggcgac gataccgtgc gggcggcga cggcgatgat 4980
 ctgctgttcg gcgggcagcg caacgacatg ctgtatggcg acgccggcaa cgacaccctc 5040
 tacggggggc tgggcgacga tacccttga ggcggcggcg gcaacgattg gttcggccag 5100
 acgcaggcgc gcgagcatga cgtgctgcgc ggcggagatg ggggtgatac cgtcogattac 5160
 agccagaccg gcgcgcatgc cggcattgcc gcgggtcgca tcgggctggg catcctggct 5220
 gacctgggcg ccggcccgct cgacaagctg ggcgaggccg gcagcagcgc ctacgatacg 5280
 gtttccggta tcgagaacgt ggtgggcacg gaactggccg accgcatcac gggcgatgcg 5340
 caggccaacg tgctgcgcg cgcggtggc gccgacgtgc ttgcgggccc cgaggggcagc 5400
 gatgtgctgc tgggcggcga cggcgacgac cagctgtcgg gcgacgccgg acgcgatcgc 5460
 ttgtacggcg aagccggtga cgactggtc ttccaggatg ccgccaatgc cggcaatctg 5520
 ctcgacggcg gcgacggccg cgataccgtg gatttcagcg gcccgggccc gggcctcgac 5580
 gccggcgcaa agggcgatt cctgagcttg ggcaagggtg tcgccagcct gatggaogaa 5640
 cccgaaacca gcaacgtgtt gcgcaatac gagaacgccg tgggcagcgc gcgtgatgac 5700
 gtgctgatcg gcgacgcagg cgccaacgtc ctcaatggcc tggcgggcaa cgacgtgctg 5760
 tccggcggcg ctggcgacga tgtgctgctg ggcgacgagg gctcggacct gctcagcggc 5820
 gatgcgggca acgacgatct gttcggcggg cagggcgatg atacttatct gttcggggtc 5880
 gggtacgggc acgacacgat ctacgaatcg ggcggcggcc atgacaccat ccgcatcaac 5940
 gcggggggcg accagctgtg gttcgcgcgc cagggcaacg acctggagat ccgcattctc 6000
 ggcaccgacg atgcacttac cgtgcacgac tggtatcgcg acgccgatca ccgggtggaa 6060
 atcatccatg ccgccaacca ggcggtagac caggcaggca tcgaaaagct ggtcagggca 6120
 atggcgcagt atccggacc cggcgcggcg gcggtgccc cgccggcggc gcgctgccc 6180

ES 2 505 324 T3

gacacgctga tgcagtcctt ggctgtcaac tggcgctgaa gcgccgtgaa tcacggcccc 6240
cctgcctcgc gggggggcgc cgtctctttg cgttctcttc cgaggtatct cccatcatga 6300
attcactggc cgtcgtttta caacgtcgtg actgggaaaa ccttggcggt acccaactta 6360
atcgccttgc agcacatccc cctttcgcca gctggcgtaa tagcgaagag gcccgaccgc 6420
atcgccttgc ccaacagttg cgcagcctga atggcgaatg ggaaattgta aacgttaata 6480
ttttgttaat atttgttaa aattcgcgtt aaatttttgt taaatcagct cattttttaa 6540
ccaataggcc gaaatcggca aaatccctta taaatcaaaa gaatagaccg agatagggtt 6600
gagtgttggt ccagtttggg acaagagtcc actattaagc aacgtggact ccaacgtcaa 6660
agggcgaaaa accgtctatc agggcgatgg cccactacgt gaaccatcac cctaatacaag 6720
ttttttgggg tcgaggtgcc gtaaagcact aaatcggaac cctaaagggg tgccccgatt 6780
tagagcttga cggggaaagc cggcgaacgt ggcgagaaaag gaaggggaaga aagcgaaggg 6840
agcgggcgct agggcgctgg caagtgtagc ggtcacgctg cgcgtaacca ccacaccgcg 6900
cgcgcttaat gcgccgctac agggcgcgtc aggtggcact ttccggggaa atgtgcgcgg 6960
aaccctatt tgtttatctt tctaaataca ttcaaatatg tatccgctca tgagacaata 7020
accctgataa atgcttcaat aatattgaaa aaggaagagt atgagtattc aacatttccg 7080
tgtcgcctt attccctttt ttgcggcatt ttgccttctt gtttttgcct acccagaaac 7140
gctggtgaaa gtaaaagatg ctgaagatca gttgggtgca cgagtgggtt acatcgaact 7200
ggatctcaac agcggtaaga tccttgagag ttttcgcccc gaagaacggt ttccaatgat 7260
gagcactttt aaagtctctg tatgtggcgc ggtattatcc cgtattgacg ccgggcaaga 7320
gcaactcggc cgcgcatac actattctca gaatgacttg gttgagtact caccagtcac 7380
agaaaagcat cttacggatg gcatgacagt aagagaatta tgcagtgctg ccataacat 7440
gagtgataac actgcggcca acttacttct gacaacgata ggaggaccga aggagctaac 7500
cgcttttttg cacaacatgg gggatcatgt aactcgcctt gatcgttggg aaccggagct 7560
gaatgaagcc ataccaaagc acgagcgtga caccacgatg cctgtagcaa tggcaacaac 7620
gttgcgcaaa ctattaactg gcgaactact tactctagct tcccggcaac aattaataga 7680
ctggatggag gcggataaag ttgcaggacc acttctgcgc tgggcccctc cggctggctg 7740
gtttattgct gataaatctg gagccggtga gcgtgggtct cgcggtatca ttgcagcact 7800
ggggccagat ggtaagccct cccgtatcgt agttatctac acgacgggga gtcaggcaac 7860

ES 2 505 324 T3

tatggatgaa	cgaaatagac	agatcgctga	gataggtgcc	tcaactgatta	agcattggta	7920
actgtcagac	caagtttact	catatatact	ttagattgat	ttaaaacttc	atTTTTaatt	7980
taaaaggatc	taggtgaaga	tectTTTTga	taatctcatg	acaaaaatcc	cttaacgtga	8040
gttttcgttc	cactgagcgt	cagacccccg	agaaaagatc	aaaggatott	cttgagatcc	8100
TTTTTTctg	cgcgtaatct	gctgcttgca	aacaaaaaaa	ccaccgctac	cagcggtggt	8160
ttgtttgccg	gatcaagagc	taccaactct	TTTTccgaag	gtaactggct	tcagcagagc	8220
gcagatacca	aatactgtcc	ttctagtgtg	gccgtagtta	ggccaccact	tcaagaactc	8280
tgtagcaccg	cctacatacc	tcgctctgct	aatcctgtta	ccagtggctg	ctgccagtgg	8340
cgataagtgc	tgtettaccg	ggttggaactc	aagacgatag	ttaccggata	aggcgcagcg	8400
gtcgggctga	acgggggggt	cgtgcacaca	gcccgcttg	gagcgaacga	cctacaccga	8460
actgagatac	ctacagcgtg	agctatgaga	aagcgcacg	cttcccgaag	ggagaaaggc	8520
ggacaggtat	ccggttaagc	gcagggtcgg	aacaggagag	cgcacgaggg	agcttccagg	8580
gggaaacgcc	tggtatcttt	atagtcctgt	cgggtttcgc	caactctgac	ttgagcgtcg	8640
atTTTTgtga	tgctcgtcag	gggggcggag	cctatggaaa	aacgccagca	acgcggcctt	8700
tttacggttc	ctggcctttt	gctggccttt	tgctcacatg	tttttctctg	cgttatcccc	8760
tgattctgtg	gataaccgta	ttaccgcctt	tgagtgagct	gataccgctc	gccgcagccg	8820
aacgaccgag	cgcagcgagt	cagtgagcga	ggaag			8855

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido cuya secuencia de aminoácidos comprende o consiste en una de las siguientes secuencias:

5 (a) una secuencia de aminoácidos que es un fragmento que tiene un tramo de aminoácidos que comprende los restos aminoacídicos 1 a 860 o 2 a 860 de la SEC ID N° 1, en que:

(i) el resto de ácido glutámico, correspondiente a la posición 570 en la secuencia del CyaA nativo de *Bordetella pertussis* definida en la SEC ID N° 1, está sustituido por un resto de glutamina; y

10 (ii) el resto de lisina, correspondiente a la posición 860 en la secuencia del CyaA nativo de *Bordetella pertussis* definida en la SEC ID N° 1, está sustituido por un resto de arginina,

15 teniendo dicho fragmento la capacidad de la proteína CyaA de *Bordetella pertussis* de unirse al receptor CD11b/CD18 de células que expresan el mismo, la capacidad de translocar su dominio enzimático adenilato ciclasa N-terminal al interior de dichas células y teniendo una actividad de formación de poros que está reducida o suprimida en comparación con la de la toxina CyaA nativa; o,

b) una secuencia de aminoácidos que difiere de un fragmento que tiene un tramo de aminoácidos que comprende los restos aminoacídicos 1 a 860 o 2 a 860 de la SEC ID N° 1, por:

20 (i) la sustitución del resto de ácido glutámico, correspondiente a la posición 570 en la secuencia de CyaA nativo de *Bordetella pertussis* definida en la SEC ID N° 1, por un resto de glutamina;

(ii) la sustitución del resto de lisina, correspondiente a la posición 860 en la secuencia de CyaA nativo de *Bordetella pertussis* definida en la SEC ID N° 1, por un resto de arginina; y

25 (iii) de 1 a 50 sustituciones adicionales;

30 consistiendo el polipéptido en dicha secuencia que tiene la capacidad de la proteína CyaA de *Bordetella pertussis* de unirse al receptor CD11b/CD18 de células que expresan el mismo, la capacidad a translocar su dominio enzimático adenilato ciclasa N-terminal al interior de dichas células y teniendo una actividad de formación de poros que está reducida o suprimida en comparación con la de la toxina CyaA nativa.

35 2. Polipéptido de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho fragmento es de al menos 900, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400, 1500 o 1600 restos aminoacídicos de la SEC ID N° 1, de tamaño.

3. Polipéptido de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, que es un mutante de un toxoide de adenilato ciclasa cuya actividad adenilato ciclasa en células está parcial o totalmente suprimida en comparación con la de la toxina CyaA de *Bordetella pertussis*.

4. Polipéptido de acuerdo con la reivindicación 3, en el que dicha supresión parcial o total de actividad adenilato ciclasa se consigue por inserción de un dipéptido entre los restos aminoacídicos correspondiente a las posiciones 188 y 189 de la SEC ID N° 1.

5. Polipéptido de acuerdo con la reivindicación 1, cuya secuencia de aminoácidos es la SEC ID N° 2.

45 6. Polipéptido de acuerdo con la reivindicación 1, que es la secuencia de aminoácidos descrita como la SEC ID N° 2 en que se ha insertado un dipéptido entre las posiciones 188 y 189, preferiblemente que es la secuencia de aminoácidos descrita como la SEC ID N° 3.

50 7. Derivado polipeptídico que comprende o que consiste en el polipéptido definido en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 adicionalmente combinado con una o más moléculas de interés.

8. Derivado polipeptídico de acuerdo con la reivindicación 7, en el que cada una de dichas una o más moléculas de interés consiste en una secuencia de aminoácidos adecuada para provocar una respuesta inmune.

55 9. Derivado polipeptídico de acuerdo con la reivindicación 8, en el que la secuencia de aminoácidos de cada una de dichas moléculas adecuadas para provocar una respuesta inmune consiste en 5 a 800 especialmente 300 a 600, o 400 a 500 restos aminoacídicos.

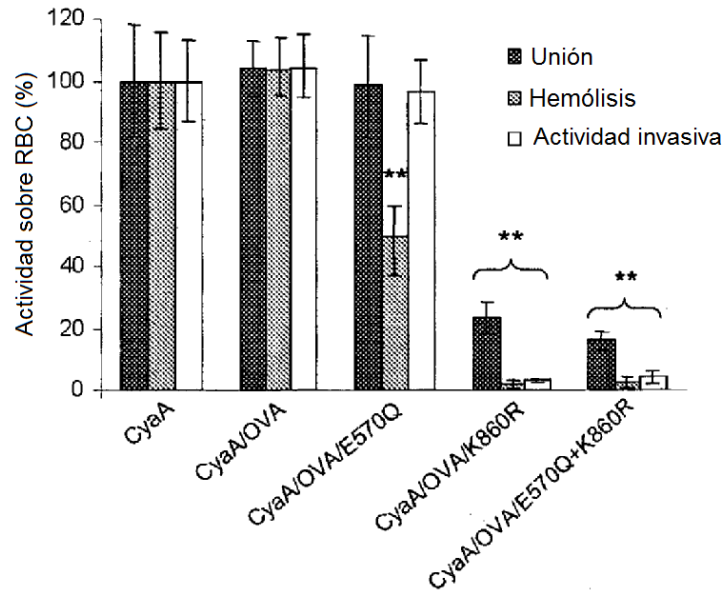
60 10. Derivado polipeptídico de acuerdo con la reivindicación 8 ó 9, en el que la secuencia de aminoácidos de cada una de dichas moléculas adecuadas para provocar una respuesta inmune comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos de un antígeno de poliovirus, un antígeno de virus VIH, un antígeno de virus de la influenza, una secuencia del virus de la coriomeningitis, un antígeno tumoral, o comprende o consiste en una parte de una secuencia de aminoácidos de cualquiera de estos antígenos que comprende al menos uno epítipo.

65 11. Derivado polipeptídico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, que es un polipéptido recombinante en el que la secuencia de aminoácidos de cada una de dichas moléculas adecuadas para provocar una respuesta inmune se inserta en un sitio permisivo de dicho polipéptido, siempre que se conserve la capacidad

de dicho polipéptido de translocar su dominio enzimático adenilato ciclasa N-terminal en las células que expresan CD11b/CD18.

- 5 12. Derivado polipeptídico de acuerdo con la reivindicación 8 ó 9, en el que cada una de dichas secuencias de aminoácidos adecuadas para provocar una respuesta inmune está injertada, especialmente injertada químicamente, en un resto de aminoácido de dicho polipéptido.
- 10 13. Polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 o derivado polipeptídico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 12, para su uso en terapia.
- 15 14. Polipéptido o derivado polipeptídico de acuerdo con la reivindicación 13, para su uso en terapia para provocar una respuesta inmune de células T y/o para provocar una respuesta inmune de células B en un hospedador que lo necesite.
- 20 15. Derivado polipeptídico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 12, para su uso en la prevención o el tratamiento de una enfermedad seleccionada entre neoplasia, cánceres y enfermedades infecciosas seleccionadas entre enfermedades inducidas virales, retrovirales, bacterianas, por parásitos o fúngicas.
- 25 16. Polipéptido o derivado polipeptídico para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 15, en el que dicho polipéptido tiene que administrarse en combinación con un adyuvante y/o en combinación con otra molécula terapéuticamente activa.
- 30 17. Polipéptido o derivado polipeptídico para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 15, en el que dicho polipéptido no tiene que administrarse en combinación con un adyuvante.
- 35 18. Composición farmacéutica que comprende un polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 o un derivado polipeptídico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 12 y un vehículo farmacéuticamente aceptable, y opcionalmente un adyuvante y/o una molécula terapéuticamente activa.
19. Uso de un derivado polipeptídico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 12, para la preparación de una composición terapéutica para el tratamiento de una enfermedad seleccionado entre neoplasia, cánceres y enfermedades infecciosas seleccionadas entre enfermedades inducidas virales, retrovirales, bacterianas, por parásitos o fúngicas.
20. Método para la preparación de un vector proteico adecuado para el suministro de una molécula a una célula que expresa CD11b/CD18 que comprende unir dicha molécula a un polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.

A



B

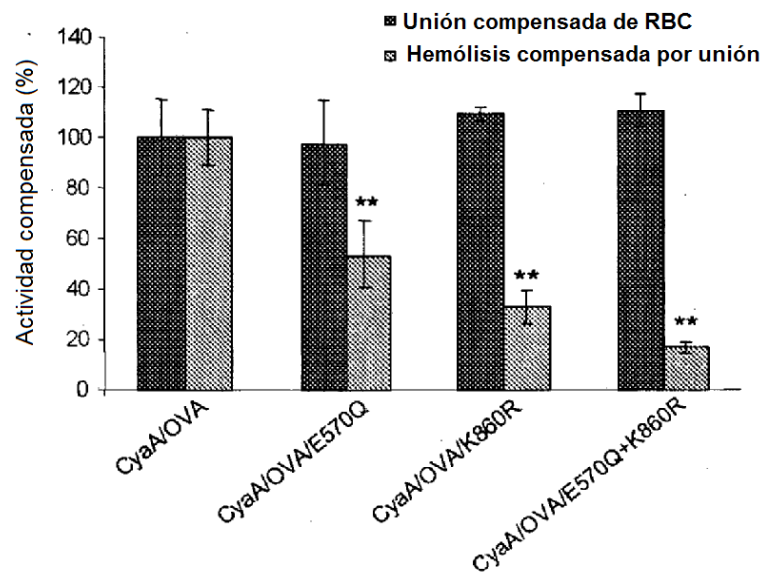


Figura 1

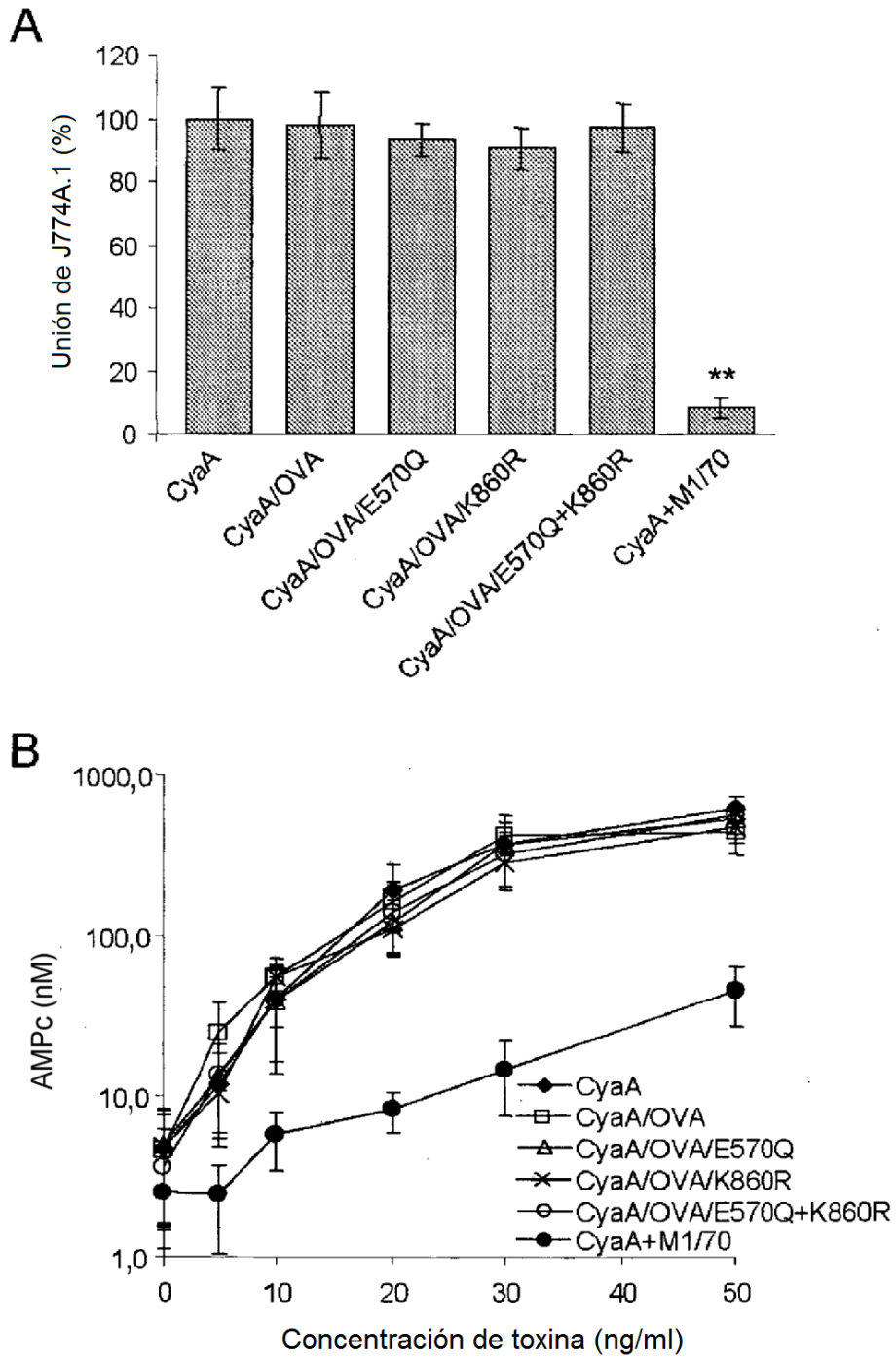
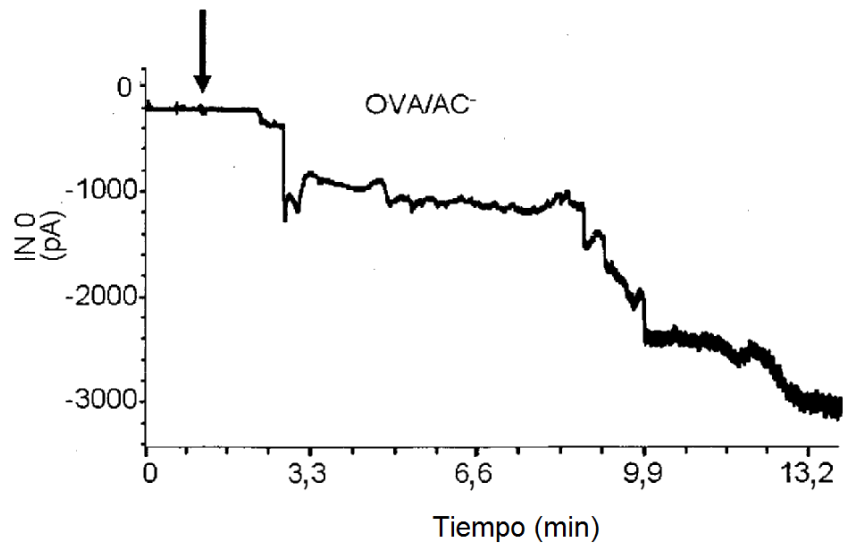


Figura 2

A



B

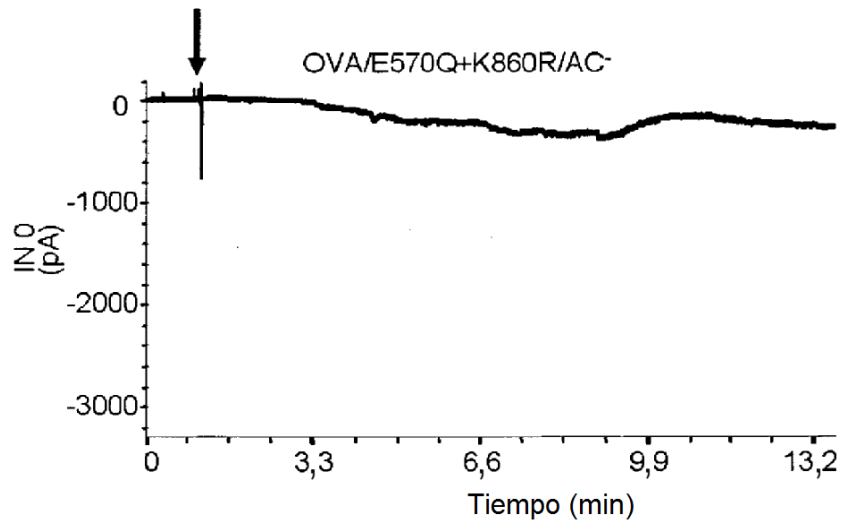


Figura 3

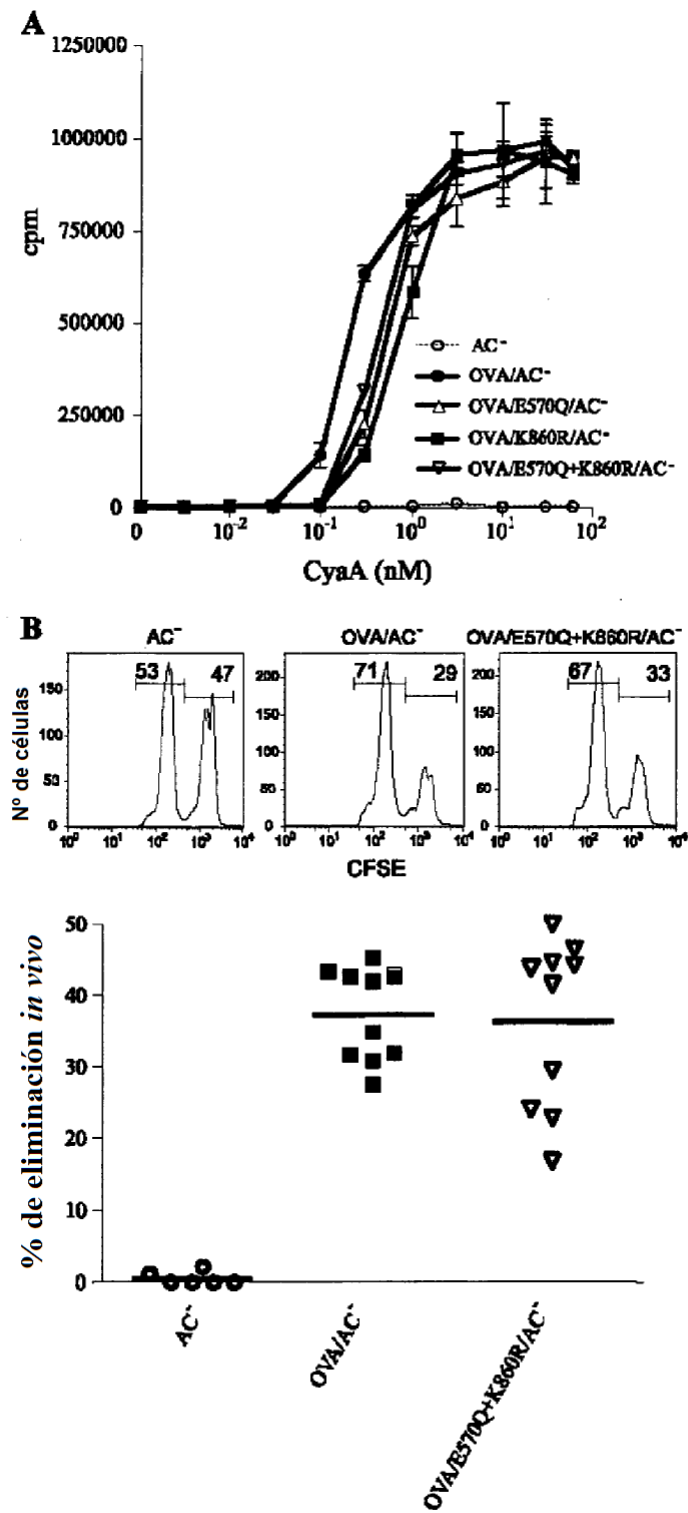


Figura 4

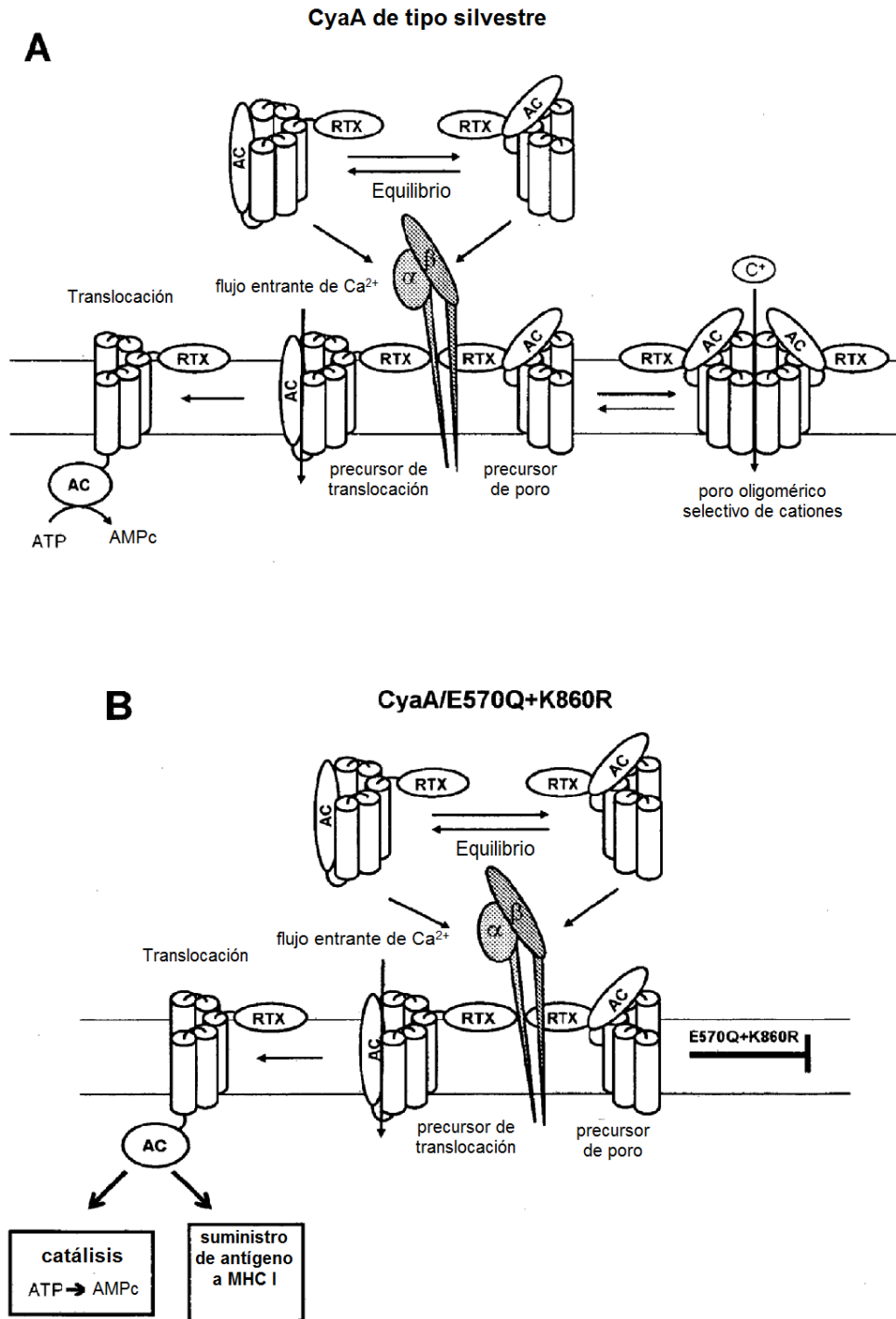


Figura 5

1 MQQSHQAGYA NAADRESGIP AAVLDGIKAV AKEKNATLMF RLVNPHSTSL IAEGVATKGL
 61 GVHAKSSDWG LQAGYIPVNP NLSKLFGRAP EVIARADNDV NSSLAHGHTA VDLTLSKERL
 121 DYLRQAGLVT GMADGVVASN HAGYEQFEFR VKETSDGRYA VQYRRKGGDD FEAVKVIIGNA
 181 AGIPLTADID MFAIMPHLSN FRDSARSSVT SGDSVTDYLA RTRRAASEAT GGLDRERIDL
 241 LWKIARAGAR SAVGTEARRQ FRYDGD MNIG VITDFELEV R NALNRRRAHAV GAQDVVQHGT
 301 EQNNPFPEAD EKIFVVSATG ESQMLTRGQL KEYIGQORGE GYVFFYENRAY GVAGKSLFDD
 361 GLGAAPGVPS GRSKFSPDVL ETVPASPLR RPSLGAVERQ DSGYDSL DGV GSRFSLGEV
 421 SDMAAVEAAE LEMTRQVLHA GARQDDAEPG VSGASAHWGQ RALQGAQAVA AAQRLVHAIA
 481 LMTQFGRAGS TNTPQEAAASL SAAVFGLGEEA SSVAVAETVSG FFRGSSRWAG GFGVAGGAMA
 541 LGGGIAA AVG AGMSLTDDAP AGQKAAAGAE IALQLTGGTV ELASSIALAL AAARGVTSGL
 601 QVAGASAGAA AGALAAALSP MEIYGLVQSS HYADQLDKLA QESSAYGYEG DALLAQLYRD
 661 KTAAEGAVAG VSAVLSTVGA AVSIAAAASV VGAPVAVVTS LLTGALNGIL RGVQQPIIEK
 721 LANDYARKID ELGGPQAYFE KNLQARHEQL ANSDGLR KML ADLQAGWNAS SVIGVQTTEI
 781 SKSALELAAI TGNADNLKSV DVFVDRFVQG ERVAGQP VVL DVAAGGIDIA SRKGERPALT
 841 FITPLAAPGE EQRRRTKTGK SEFTTFVEIV GKQDRWRIRD GAADTTIDLA KVVSQLVDAN
 901 GVLKHSIKLD VIGGDGDDVV LANASRIHYD GGAGTNTVSY AALGRQDSIT VSADGERFNV
 961 RKQLNNANVY REGVATQTTA YGKRTE NVQY RHVELARV GQ VVEVD TLEHV QHIIGGAGND
 1021 SITGNAHDFN LAGGSGDDRL DGGAGNDTLV GGEGQNTVIG GAGDDVFLQD LGVWSNQLDG
 1081 GAGVDTVKYN VHQPSEERLE RMGDTGIHAD LQKGTVEKWP ALNLFSVDHV KNIENTLHGSR
 1141 LNDRIAGDDQ DNELWGH DGN DTIRGRGGDD ILRGGLGLDT LYGEDGNDIF LQDDETVSDD
 1201 IDGGAGLDTV DYSAMIHPGR IVAPHEYGFG IEADLSREWV RKASALGV DY YDNVRN VENV
 1261 IGTSMKDVLI GDAQANTLMG QGGDDTVRGG DGDDLLFGGD GNDMLYGDAG NDTLYGGLGD
 1321 DTLEGGAGND WFGQTQAREH DVLRRGGDGD TVDYSQTGAH AGIAAGRIGL GILADLGAGR
 1381 VDKLGEAGSS AYDTVSGIEN VVGTELADRI TGDAQANVLR GAGGADVLAG GEGDDVLLGG
 1441 DGDDQLSGDA GRDRLYGEAG DDWFFQDAAN AGNLLDGGDG RDTVDFSGPG RGLDAGAKGV
 1501 FLSLKGKGFAS LMDEPETS NV LRNIENAVGS ARDDVLIGDA GANVLNGLAG NDVLSGGAGD
 1561 DVLLGDEGSD LLSGDAGNDD LFGGQDDTY LFGVGYGHDT IYESGGGHDT IRINAGADQL
 1621 W FARQGN DLE IRILGTDDAL TVHDWYRDAD HRVEI IHAAN QAVDQAGIEK LVEAMAQYPD
 1681 PGAAAAAPPA ARVPDTLMQS LAVNWR

Figura 6

ES 2 505 324 T3

1 MQQSHQAGYA NAADRESGIP AAVLDGIKAV AKEKNATLMF RLVNPHSTSL IAEGVATKGL
61 GVHAKSSDWG LQAGYIPVNP NLSKLFGRAP EVIARADNDV NSSLAHGHTA VDLTLSKERL
121 DYLRQAGLVT GMADGVVASN HAGYEQFEFR VKETS DGRYA VQYRRKGGDD FEAVKVIGNA
181 AGIPLTADID MFAIMPHLSN FRDSARSSVT SGDSVTDYLA RTRRAASEAT GGLDRERIDL
241 LWKIARAGAR SAVGTEARRQ FRYDGD MNIG VITDFELEV R NALNRRHAV GAQDVVQHGT
301 EQNNPFPEAD EKIFVVSATG ESQMLTRGQL KEYIGQQRGE GYVFYENRAY GVAGKSLFDD
361 GLGAAPGVPS GRSKFS PDVL ETVPASPGLR RPSLGAVERQ DSGYDSLGDV GSRSFSLGEV
421 SDMAAVEAAE LEMTRQVLHA GARQDDAEPG VSGASAHWGQ RALQGAQAVA AAQRLVHAIA
481 LMTQFGRAGS TNTPQEAASL SAAVFLGGEA SSAVEAETVSG FFRGSSRWAG GFGVAGGAMA
541 LGGGIAA AVG AGMSLTDDAP AGQKAAAGA Q IALQLTGCTV ELASSIALAL AAARGVTSGL
601 QVAGASAGAA AGALAAAALSP MEIYGLVQOS HYADQLDKLA QESSAYGYEG DALLAQLYRD
661 KTAAEGAVAG VSAVLSTVGA AVSIAAAASV VGAPVAVVTS LLTGALNGIL RGVOQPIIEK
721 LANDYARKID ELGGPQAYFE KNLQARHEQL ANSDGLRKML ADLQAGWNAS SVIGVQTTEI
781 SKSALELAAI TGNADNLKSV DVFVDRFVQG ERVAGQP VVL DVAAGGIDIA SRKGERPALT
841 FITPLAAPGE EQRRRTKTGR SEFTTFVEIV GKQDRWRIRD GAADTTIDLA KVVSQLVDAN
901 GVLKHSIKLD VIGGDGDDV L ANASRIHYD GGAGTNTVSY AALGRQDSIT VSADGERFNV
961 RKQLNNANVY REGVATQTTA YGKRTENVQY RHVELARVGG VVEVDTLEHV QHIIGGAGND
1021 SITGNAHDF LAGGSGDDRL DGGAGNDTLV GGEGQNTVIG GAGDDVFLQD LGVWSNQLDG
1081 GAGVDTVKYN VHQPSEERLE RMGDTGIHAD LQKGTVEKWP ALNLFSDHV KNIENTLHGSR
1141 LNDRIAGDDQ DNELWGH DGN DTIRGRGGDD ILRGGLGLDT LYGEDGNDIF LQDDETVSDD
1201 IDGGAGLDTV DYSAMIHPGR IVAPHEYGFG IEADLSREVV RKASALGVDY YDNVRN VENV
1261 IGTSMKDVLI GDAQANTLMG QGGDDTVRGG DGDDLLFGGD GNDMLYGDAG NDTLYGGLGD
1321 DTLEGGAGND WFGQTQAREH DVLRGGDGD TVDYSQTGAH AGIAAGRIGL GILADLGAGR
1381 VDKLGEAGSS AYDTVSGIEN VVGTELADRI TGDAQANVLR GAGGADVLG GEGDDVLLGG
1441 DGDDQLSGDA GRDRLYGEAG DDWFFQDAAN AGNLLDGGDG RDTVDFSGPG RGLDAGAKGV
1501 FLSLGKGFAS LMDEPETS NV LRNIENAVGS ARDDVLIGDA GANVLNGLAG NDVLSGGAGD
1561 DVLLGDEGSD LLSGDAGNDD LFGGQGGDTY LFGVGYGHDT IYESGGGHDT IRINAGADQL
1621 WFARQGN DLE IRILGTDDAL TVHDWYRDAD HRVEIIHAAN QAVDQAGIEK LVEAMAQYPD
1681 PGAAAAAPPA ARVPDTLMQS LAVNWR

Figura 7

ES 2 505 324 T3

1 MQQSHQAGYA NAADRESGIP AAVLDGIKAV AKEKNATLMF RLVNPHSTSL IAEGVATKGL
61 GVHAKSSDWG LQAGYIPVNP NLSKLFGRAP EVIARADNDV NSSLAHGHTA VDLTLSKERL
121 DYLRQAGLVT GMADGVVASN HAGYEQFEFR VKETSDGRYA VQYRRKGGDD FEAVKVIGNA
181 AGIPLTADGS IDMFAIMPHL SNFRDSARSS VTSGDSVTDY LARTRRAASE ATGGLDRERI
241 DLLWKIARAG ARSAVGTEAR RQFRYDGMN IGVITDFELE VRNALNRRAH AVGAQDVVQH
301 GTEQNNPFPE ADEKIFVUSA TGESQMLTRG QLKEYIGQOR GEGYVFFYENR AYGVAGKSLF
361 DDGLGAAPGV PSGRSKFSPD VLETVPASPG LRRPSLGAVE RQDSGYDSL D GVGSRFSLSG
421 EVSDMAAVEA AELEMTRQVL HAGARQDDAE PGVSGASAHW GQRALQGAQA VAAAQRLVHA
481 IALMTQFGRA GSTNTPQAAA SLSAAVFLG EASSAVAETV SGFFRGSSRW AGGFGVAGGA
541 MALGGGIAAA VGAGMSLTDD APAGQKAAAG AQIALQLTGG TVELASSIAL ALAAAARGVTS
601 GLQVAGASAG AAAGALAAAL SPMEIYGLVQ QSHYADQLDK IAQESSAYGY EGDALLAQLY
661 RDKTAAEGAV AGVSAVLSTV GAAVSIAAAA SVVGAPVAVV TSLLTGALNG ILRGVQQPII
721 EKLANDYARK IDELGGPQAY FEKNLQARHE QLANS DGLRK MLADLQAGWN ASSVIGVQTT
781 EISKSALELA AITGNADNLK SVDVVFDRFV QGERVAGQPV VLDVAAGGID IASRKGERPA
841 LTFITPLAAP GEEQRRRTKT GRSEFTTFVE IVGKQDRWRI RDGAADTTID LAKVVSQLV D
901 ANGLV KHSIK LDVIGGDGDD VVLANASRIH YDGGAGTNTV SYAALGRQDS ITVSADGERF
960 NVRKQLNNAN VYREGVATQT TAYGKRTENV QYRHVELARV GQVVEVDTLE HVQHI IGGAG
1021 NDSITGNAHD NFLAGGSGDD RLDGGAGNDT LVGGEGQNTV IGGAGDDVFL QDLGVWSNQL
1081 DGGAGVDTV K YNVHQPSEER LERMGDTGIH ADLQKGTVEK WPALNLFSD HVKNIENLHG
1141 SRLNDR IAGD DQDNELWGH D GNDTIRGRGG DDILRGGLGL DTLYGEDGND IFLQDDETVS
1201 DDIDGGAGLD TVDYSAMIHP GRIVAPHEYG FGIEADLSRE WVRKASALGV DYYDNVRNVE
1261 NVIGTSMKDV LIGDAQANTL MGQGGDDTVR GGDGDDLLFG GDGNDMLYGD AGNDTLYGGL
1321 GDDTLEGGAG NDWFGQTQAR EHDVLRGGDG VDTV DYSQTG AHAGIAAGRI GLGILADLGA
1381 GRVDKLGEAG SSAYDTVSGI ENNVGTELAD RITGDAQANV LRGAGGADV L AGGEGDDVLL
1441 GGDGDDQLSG DAGRDRLYGE AGDDWFFQDA ANAGNLLDGG DGRDTVDFSG PGRGLDAGAK
1501 GVFLSLGKGF ASLMDEPETS NVLRNIENAV GSARDDVLIG DAGANVLNGL AGNDVLSGGA
1561 GDDVLLGDEG SDLLSGDAGN DDLFGGQGD TYLFGVGYGH DTIYESGGGH DTIRINAGAD
1621 QLWFARQGND LEIRILGTDD ALTVDHWYRD ADHRVEIHA ANQAVDQAGI EKLVEAMAQY
1681 PDPGAAAAAP PAARVPDTLM QSLAVNWR

Figura 8

ES 2 505 324 T3

1 MQQSHQAGYA NAADRESGIP AAVLDGIKAV AKEKNATLMF RLVNPHSTSL IAEGVATKGL
 61 GVHAKSSDWG LQAGYIPVNP NLSKLFGRAP EVIARADNDV NSSLAHGHTA VDLTLSKERL
 121 DYLRQAGLVT GMADGVVASN HAGYEQFEFR VKETSDGRYA VQYRRKGGDD FEAVKVIGNA
 181 AGIPLTADGS IDMFAIMPHL SNFRDSARSS VTSGDSVTDY LARTRRAASE ATGGVLSIIIN
 241 FEKLVHLDRE RIDLLWKIAR AGARSAVGTE ARRQFRYDGD MNIGVITDFE LEVRNALNRR
 301 AHAVGAQDVV QHGTEQNNPF PEADEKIFVV SATGESQMLT RGQLKEYIGQ QRGEGYVFYE
 361 NRAYGVAGKS LFDDGLGAAP GVPSGRSKFS PDVLETVPAS PGLRRRPSLGA VERQDSGYDS
 421 LDGVGSRFSFS LGEVSDMAAV EAAELEMTRQ VLHAGARQDD AEPGVSGASA HWGQRALQGA
 481 QAVAAAQRLV HAIALMTQFG RAGSTNTPQE AASLSAAVFG LGEASSAVAE TVSGFFRGSS
 541 RWAGGFGVAG GAMALGGGIA AAVGAGMSLT DDAPAGQKAA AGAQIALQLT GGTVELASSI
 601 ALALAAARGV TSGLQVAGAS AGAAAGALAA ALSPMEIYGL VQQSHYADQL DKLAQESSAY
 661 GYEGDALLAQ LYRDKTAAEG AVAGVSAVLS TVGAAVSIAA AASVVGAPVA VVTSLLTGAL
 721 NGILRGVQQP IIEKLANDYA RKIDELGGPQ AYFEKNLQAR HEQLANS DGL RKM LADLQAG
 781 WNASSVIGVQ TTEISKSALE LAAITGNADN LKSVDV FVDR FVQGERVAGQ PVVLDVAAGG
 841 IDIASRKGER PALTFITPLA APGEEQRRRT KTGRSEFTTF VEIVGKQDRW RIRDGAADTT
 901 IDLAKVVSQ LVDANGVLKHS IKLDVIGGDG DDVVLANASR IHYDGGAGTN TVSYAALGRQ
 961 DSITVSADGE RFNVRKQLNN ANVYREGVAT QTTAYGKRTE NVQYRHVELA RVGQVVEVDT
 1021 LEHVQHIIIGG AGNDSITGNA HDNFLAGGSG DDRLDGGAGN DTLVGGEGQN TVIGGAGDDV
 1081 FLQDLGVWSN QLDGGAGVDT VKYNVHQPSE ERLERMGTG IHADLQKGTV EKWPALNLFS
 1141 VDHVKNIENL HGSRLNDRIA GDDQDNELWG HDGNDTIRGR GGDDILRGGL GLDTLYGEDG
 1201 NDIFLQDDET VSDDIDGGAG LDTV DYSAMI HPGRIVAPHE YFGFIEADLS REWVRKASAL
 1261 GVDYYDNVRN VENVIGTSMK DVLIGDAQAN TLMGQGGDDT VRGGDGDLL FGGDNDMLY
 1321 GDAGNDTLYG GLGDDTLEGG AGNDWFGQTQ AREHDVLRGG DGVDTV DYSQ TGAHAGIAAG
 1381 RIGLGILADL GAGRVDKLGE AGSSAYDVS GIENVVGTTEL ADRITGDAQA NVLRGAGGAD
 1441 VLGGEGDDV LLGGDGDQL SGDAGRDRLY GEAGDDWFFQ DAANAGNLLD GGDGRDTVDF
 1501 SGPGRGLDAG AKGVFLSLGK GFASLMDEPE TSNVLRNIEN AVGSARDDVL IGDAGANVLN
 1561 GLAGNDVLSG GAGDDVLLGD EGSDLLSGDA GNDDLFGGQG DDTYLFVGVY GHDTIYESGG
 1621 GHDTIRINAG ADQLWFARQG NDLEIRILGT DDALTVHDWY RDADHRVEII HAANQAVDQA
 1681 GIEKLVEAMA QYPDPGAAAA APPAARVPDT LMQSLAVNWR

Figura 9

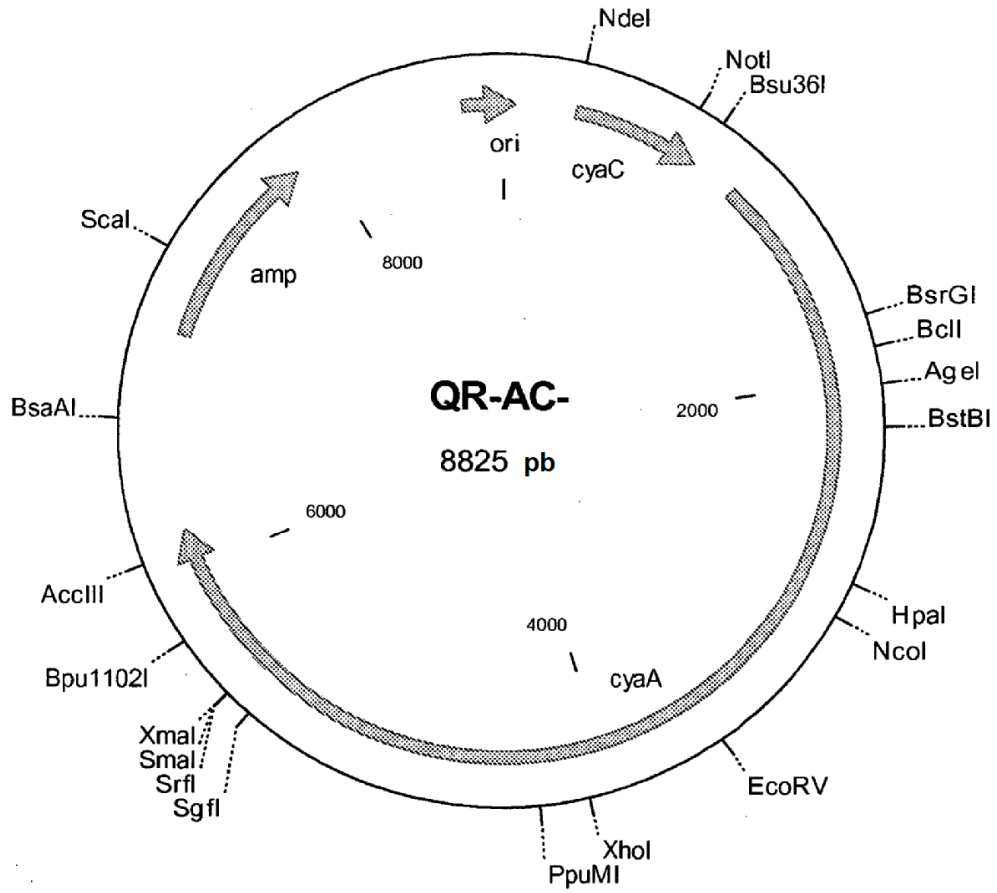


Figura 10

CGGAAGAGCGCCCAATACGCAAACCGCCTCTCCCCGCGCGTTGGCCGATTCAATTAATGCA
GCTGGCACGACAGGTTTCCCGACTGGAAAGCGGGCAGTGAGCGCAACGCAATTAATGTGA
GTTAGCTCACTCATTAGGCACCCAGGCTTTACACTTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTGT
GTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTTACACACAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGAAT
TTAATACGACTCACTATAGGGAAAGCTCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAG
ATATACATATGCTTCCGTCCGCCAAGCGCCCTCCCTCCTCAATCCCACCGACGACTTCG
CGGCACTGGGCAATATTGCCTGGCTGTGGATGAACTCTCCCATGCACCGCGACTGGCCGG
TGCATCTGCTCGCACGCAACACGCTCGCGCCGATTCAACTGGGCCAATACATTCTGCTGC
GATGCAATGACGTGCCGGTTGCATACTGCAGCTGGGCCCTAATGGACGCCGACACCGAAC
TCTCCTATGTCATGGCGCCCTCGTCGCTGGGCGGGAATGCCTGGAAGTGCGGCGACCGAC
TGTGGATCATCGACTGGATCGCGCCATTCTCGCGCGACGACAATCGTGCCTGCGCCGCG
CGCTGGCCGAACGGCACCCCGACAGCGTGGGCCGTTTCGCTGCGCGTTCCGGCGGGCGGGC
ACACCGCGCGCGTCAAGGAGTACCGAGGCCGCGCGCTGGACGCGGCCGCCACTCGCGCGC
AGCTGGACCGCTACCATGCCGAAGTGCAGGACTGCGCGCGAGCAACGGCGGATACG
CGCCGCGAGGCCGGGGCACCGCCTAAGGATCCTCTAGAGCTTGCATGCCCTGGCACGACA
GGTTTCCCGACTGGAAAGCGGGCAGTGAGCGCAACGCAATTAATGTGAGTTAGCTCACTC
ATTAGGCACCCAGGCTTTACACTTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTGGAATTTGTA
GCGGATAACAATTTACACACAGGAAACAGCTATGACCATGCAGCAATCGCATCAGGCTGGT
TACGCAAACGCCGCCGACCGGGAGTCTGGCATCCCCGACGCCGTACTCGATGGCATCAAG
GCCGTGGCGAAGGAAAAAACGCCACATTGATGTTCCGCCTGGTCAACCCCCATTCCACC
AGCCTGATTGCCGAAGGGGTGGCCACCAAAGGATTGGGCGTGCACGCCAAGTCGTCCGAT
TGGGGGTGTCAGGCGGGTACATTTCCCGTCAACCCGAATCTTTCCAACTGTTCCGGCCGT
GCGCCCGAGGTGATCGCGCGGGCCGACAACGACGTC AACAGCAGCCTGGCGCATGGCCAT
ACCGCGGTGACCTGACGCTGTGCGAAAGAGCGGCTTGACTATCTGCGGCAAGCGGGCCGTG
GTCACCGGCATGGCCGATGGCGTGGTTCGCGAGCAACCACGCAGGCTACGAGCAGTTCGAG
TTTCGCGTGAAGGAAACCTCGGACGGGCGCTATGCCGTGCAGTATCGCCGCAAGGGCGGC
GACGATTTCCGAGCGGTCAAGGTGATCGGCAATGCCGCCGGTATTCCTACTGACGGCGGAT
GGATCCATCGACATGTTCCGCATTATGCCGCATCTGTCCAACCTCCGCGACTCGGCGCGC
AGTTCGGTGACCAGCGCGGATTCGGTGACCGATTACCTGGCGCGCACGCGGGCGGGCCGCC
AGCGAGGCCACGGGCGGTGTACACCTGGATCGCGAACGCATCGACTTGTGTGAAAATC
GCTCGCGCCGGCGCCCGTTCCGCACTGGGACCCGAGGCGCGTCCGAGTTCCGCTACGAC
GGCGACATGAATATCGGCGTGATCACCGATTTCCGAGCTGGAAGTGGCAATGCGCTGAAC
AGGCGGGCGCACGCCGTCCGGCGCGCAGGACGTTGGTCCAGCATGGCACTGAGCAGAACAAT
CCTTTCCCGGAGGCAGATGAGAAGATTTTCGTGCTATCGGCCACCGGTGAAAGCCAGATG
CTCACGCGGGGCAACTGAAGGAATACATTGGCCAGCAGCGCGGGCGAGGGCTATGCTTC
TACGAGAACCGTGCATACGGCGTGGCGGGGAAAAGCCTGTTTCGACGATGGGCTGGGAGCC
GCGCCCGGCGTGGCGAGCGGACGTTTCGAAGTTCTCGCCGGATGTACTGGAACGGTGCCG
GCGTACCCGGATTGCGGGCGCCGTCCGCTGGGCGCAGTGGAACGCCAGGATTCCGGCTAT
GACAGCCTTGATGGGGTGGGATCGCGATCGTTCTCGTTGGGCGAGGTGTCCGACATGGCC
GCCGTGGAAGCGGCGGAACTGGAAATGACCCGGCAAGTCTTGACGCCGGGGCGCGGCAG
GACGATGCCGAGCCGGGCGTGAGCGGTGCGTCCGGCGACTGGGGGCGAGCGGGCGCTGCAG
GGCGCCAGGCGGTGGCGGGCGCGCAGCGGCTGGTTCATGCCATTGCCCTGATGACGCAA
TTCGGCCGGGCCGGTTCACCAACACGCCGACAGGAAGCGGCCCTCGTTGTCCGGCGGCCGTG
TTCGGCTTGGGCGAGGCCAGCAGCGCCGTGGCCGAAACCGTGAGCGGTTTTTTCCGCGGG
TCTTCGCGCTGGGCGGGCGGTTCGCGCTGGCTGGCGGGCGGATGGCGCTGGGAGGCGGC
ATCGCCGCGGCCGTTGGCGCCGGGATGTGCTTGACCGATGACCGCGCCGGCCGGACAGAAG
GCCGCCGCCGAGCTCCGATCGCGCTGCAGTTAACGGGTGGAACGGTCGAGCTGGCTTCT
TCCATCGCGTTGGCGCTGGCCGCGGCGCGCGGCGTGACCAGCGGCTTGACGGTGGCCGGG
GCGTCCGGCCGGGGCGGCTGCCGGCGCATGGCCGCGGCGCTCAGTCCCATGGAGATCTAC
GGCCTGGTGCAGCAATCGCACTATGCGGATCAGCTGGACAAGCTGGCGCAGGAATCGAGC
GCATACGGTTACGAGGGCGACGCCTTGCTGGCCAGCTGTATCGCGACAAGACGGCCGCC
GAGGGCGCCGTCCGCCGCGTCTCCGCCGCTCCTGAGCACGGTGGGGGCGGCGGTGTGATC
GCCGCGGGCCAGCGTGGTAGGGGCCCGGTGGCGGTGGTCACTTCCTTGCTGACCGGG

GCTCTCAACGGCATCCTGCGCGGCGTGCAGCAGCCCATCATCGAAAAGCTGGCCAACGAT
TACGCTCGCAAGATCGACGAGCTGGGCGGGCCGCAAGCGTACTTCGAGAAAAACCTGCAG
GCGCGTCACGAACAACTGGCCAATTCGGACGGCCTACGGAAAATGCTGGCCGACCTGCAG
GCCGGTTGGAACGCCAGCAGCGTGATCGGGGTGCAGACGACAGAGATCTCCAAGTCGGCG
CTCGAACTGGCCGCCATTACGGGCAACGCGGACAACCTGAAAATCCGTCGACGTGTTTCGTG
GACCGCTTCGTCCAGGGCGAGCGGGTGGCCGGCCAGCCGGTGGTTCCTCGACGTGCGCCGC
GGCGGCATCGATATCGCCAGCCGCAAGGGCGAGCGGCCGGCGCTGACGTTTCATCAGCCG
CTGGCCGCGCCAGGAGAAGAGCAGCGCCGGCGCACGAAAACGGGCAGATCTGAATTCACC
ACATTCGTTCGAGATCGTGGGCAAGCAGGACCGCTGGCGCATCCGGGACGGCGCGGCCGAC
ACCACCATCGATCTGGCCAAGGTGGTGTTCGCAACTGGTTCGACGCCAATGGCGTGTCAAG
CACAGCATCAAACCTGGATGTGATCGGCGGAGATGGCGATGACGTTCGTGCTTGCCAATGCT
TCGCGCATCCATTATGACGGCGGCGCGGGCACCAACACGGTCAGCTATGCCGCCCTGGGT
CGACAGGATTCATTACCGTGTCCGCCGACGGGGAACGTTTCAACGTGCGCAAGCAGTTG
AACAAACGCCAACGTGTATCGCGAAGGCGTGGCTACCCAGACAACCGCCTACGGCAAGCGC
ACGGAGAATGTCCAATACCGCCATGTTCGAGCTGGCCCGTGTTCGGGCAAGTGGTGGAGGTC
GACACGCTCGAGCATGTGCAGCACATCATCGGCGGGGCCGGCAACGATTTCGATCACCGGC
AATGCGCACGACAACCTTCTAGCCGGCGGGTTCGGGCGACGACAGGCTGGATGGCGGCGCC
GGCAACGACACCCTGGTTGGCGGCGAGGGCCAAAACACGGTCATCGGCGGCGCCGGCGAC
GACGTATTCCTGCAGGACCTGGGGGTATGGAGCAACCAGCTCGATGGCGGCGCGGGCGTC
GATACCGTGAAGTACAACGTGCACCAGCCTTCCGAGGAGCGCCTCGAACGCATGGGCGAC
ACGGGCATCCATGCCGATCTTCAAAGGGCACGGTCGAGAAGTGGCCGGCCCTGAACCTG
TTCAGCGTCGACCATGTCAAGAATATCGAGAATCTGCACGGCTCCCGCCTAAACGACCGC
ATCGCCGGCGACGACCAGGACAACGAGCTCTGGGGCCACGATGGCAACGACACGATACGC
GGCCGGGGCGGCGACGACATCCTGCGCGGCGGCTGGGCTGGACACGCTGTATGGCGAG
GACGGCAACGACATCTTCTGCAGGACGACGAGACCGTCAGCGATGACATCGACGGCGGC
GCGGGGCTGGACACCGTCGACTACTCCGCCATGATCCATCCAGGCAGGATCGTTGCGCCG
CATGAATACGGCTTCGGGATCGAGGCGGACCTGTCCAGGGAATGGGTGCGCAAGGCGTCC
GCGCTGGGCGTGGACTATTACGATAATGTCCGCAATGTTCGAAAACGTCATCGGTACGAGC
ATGAAGGATGTGCTCATCGGCGACGCGCAAGCCAATACCCTGATGGGCCAGGGCGGCGAC
GATACCGTGCAGGGCGGCGACGGCGATGATCTGCTGTTTCGGCGGCGACGGCAACGACATG
CTGTATGGCGACGCCGGCAACGACACCCTCTACGGGGGGCTGGGCGACGATAACCCTTGAA
GGCGGCGCGGGCAACGATTGGTTCGGCCAGACGCAGGCGCGGAGCATGACGTGCTGCGC
GGCGGAGATGGGGTGGATAACGTCGATTACAGCCAGACCGGCGCGCATGCCGGCATTGCC
GCGGGTCGCATCGGGCTGGGCATCCTGGCTGACCTGGGCGCCGGCCGCTCGACAAGCTG
GGCGAGGCCGGCAGCAGCGCCTACGATACGGTTTCCGGTATCGAGAACGTGGTGGGCACG
GAACTGGCCGACCGCATCAGGGCGATGCGCAGGCCAACGTGCTGCGCGGCGCGGGTGGC
GCCGACGTGCTTGGCGGCGGCGAGGGCGACGATGTGCTGCTGGGCGGCGACGGCGACGAC
CAGCTGTTCGGGCGACGCCGGACCGATCGCTTGTACGGCGAAGCCGGTGACGACTGGTTC
TTCCAGGATGCCGCCAATGCCGGCAATCTGCTCGACGGCGGCGACGGCCGCGATACCGTG
GATTTACGCGGCCCGGGCCGGGGCTCGACGCCGGCGCAAAGGGCGTATTCTGAGCTTG
GGCAAGGGGTTCCGACGCTGATGGACGAACCCGAAACCAGCAACGTGTTGCGCAATATC
GAGAACGCCGTGGGCAGCGCGCTGATGACGTGCTGATCGGCGACGACGGCGCCAACGTC
CTCAATGGCCTGGCGGGCAACGACGTGCTGTCCGGCGGCGCTGGCGACGATGTGCTGCTG
GGCGACGAGGGCTCGGACCTGCTCAGCGGCGATGCGGGCAACGACGATCTGTTGCGCGGG
CAGGGCGATGATACTTATCTGTTTCGGGGTGGGTACGGGCACGACACGATCTACGAATCG
GGCGGCGGCCATGACACCATCCGCATCAACGCGGGGGCGGACCAGCTGTGGTTCGCGCGC
CAGGGCAACGACCTGGAGATCCGCATTCTCGGCACCGACGATGCACTTACCCTGCACGAC
TGGTATCGCGACGCCGATCACCGGGTGGAAATCATCCATGCCGCCAACAGGCGGTAGAC
CAGGCAGGCATCGAAAAGCTGGTTCGAGGCAATGGCGCAGTATCCGGACCCCGGCGGGCG
GCGGCTGCCCGCCGGCGGCGCGCTGCCGACACGCTGATGCAGTCCCTGGCTGTCAAC
TGGCGCTGAAGCGCCGTGAATCACGGCCCGCCTGCCTCGCGCGGCGGCGCCGTCTCTTTG
CGTTCTTCTCCGAGGATTTCCCATCATGAATTCAGTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGTG
ACTGGGAAAACCCTGGCGTTACCCAACCTAATCGCCTTGCAGCACATCCCCCTTTCGCCA

GCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGA
 ATGGCGAATGGGAAATGTAAACGTTAATATTTTGTAAATATTTTGTAAATTCGCGTT
 AAATTTTGTAAATCAGCTCATTTTTTAACCAATAGGCCGAAATCGGCAAAATCCCTTA
 TAAATCAAAGAATAGACCGAGATAGGGTTGAGTGTGTCCAGTTTGAACAAGAGTCC
 ACTATTAAGAACGTGGACTCCAACGTCAAAGGGCGAAAAACCGTCTATCAGGGCGATGG
 CCCACTACGTGAACCATCACCTAATCAAGTTTTTTGGGGTTCGAGGTGCCGTAAAGCACT
 AAATCGGAACCCCTAAAGGGATGCCCGATTAGAGCTTGACGGGGAAAAGCCGGCGAACGT
 GCGGAGAAAGGAAGGGAAGAAAGCGAAAGGAGCGGGCGCTAGGGCGCTGGCAAGTGTAGC
 GGTACGCTGCGCGTAACCACCACACCCGCCGCGCTTAATGCGCCGCTACAGGGCGCGTC
 AGGTGGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTATTTTCTAAATACA
 TTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCCCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAA
 AAGGAAGAGTATGAGTATTCAACATTTCCGTGTCGCCCTTATTCCCTTTTTTTCGGCATT
 TTGCCTTCCTGTTTTTGTCTACCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAAAGATGCTGAAGATCA
 GTTGGGTGCACGAGTGGGTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAG
 TTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGC
 GGTATTATCCCGTATTGACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTGCGCCGCATACACTATTCTCA
 GAATGACTTGGTTGAGTACTCACAGTCCAGAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGT
 AAGAGAATTATGCAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAAACTGCGGCCAACTTACTTCT
 GACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCACAACATGGGGGATCATGT
 AACTCGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGA
 CACCACGATGCCTGTAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACATTAACGGCGAACTACT
 TACTCTAGCTTCCCGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACC
 ACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGA
 GCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGT
 AGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGA
 GATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAACTGTCAGACCAAGTTTACTCATATATACT
 TTAGATTGATTTAAAACCTCATTTTTAATTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGA
 TAATCTCATGACCAAAATCCCTAACGTGAGTTTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGT
 AGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCA
 AACAAAAAACCACCGCTACCAGCGGTGGTTTTGTTGCCGGATCAAGAGCTACCAACTCT
 TTTTCCGAAGGTAAGTGGCTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCCTACATACCTCGCTCTGCT
 AATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTTACCGGTTGGACTC
 AAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTGCGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACACA
 GCCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGA
 AAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCCG
 AACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGAAACGCCCTGGTATCTTTATAGTCTGT
 CGGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGCGGAG
 CCTATGGA AAAACGCCAGCAACGCGCCTTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGCTGGCCTTT
 TGCTCACATGTTCTTCTGCGTTATCCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTT
 TGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGACGCCAAGACCGAGCGCAGCGAGTCACTGAGCGA
 GGAAG

Figura 11

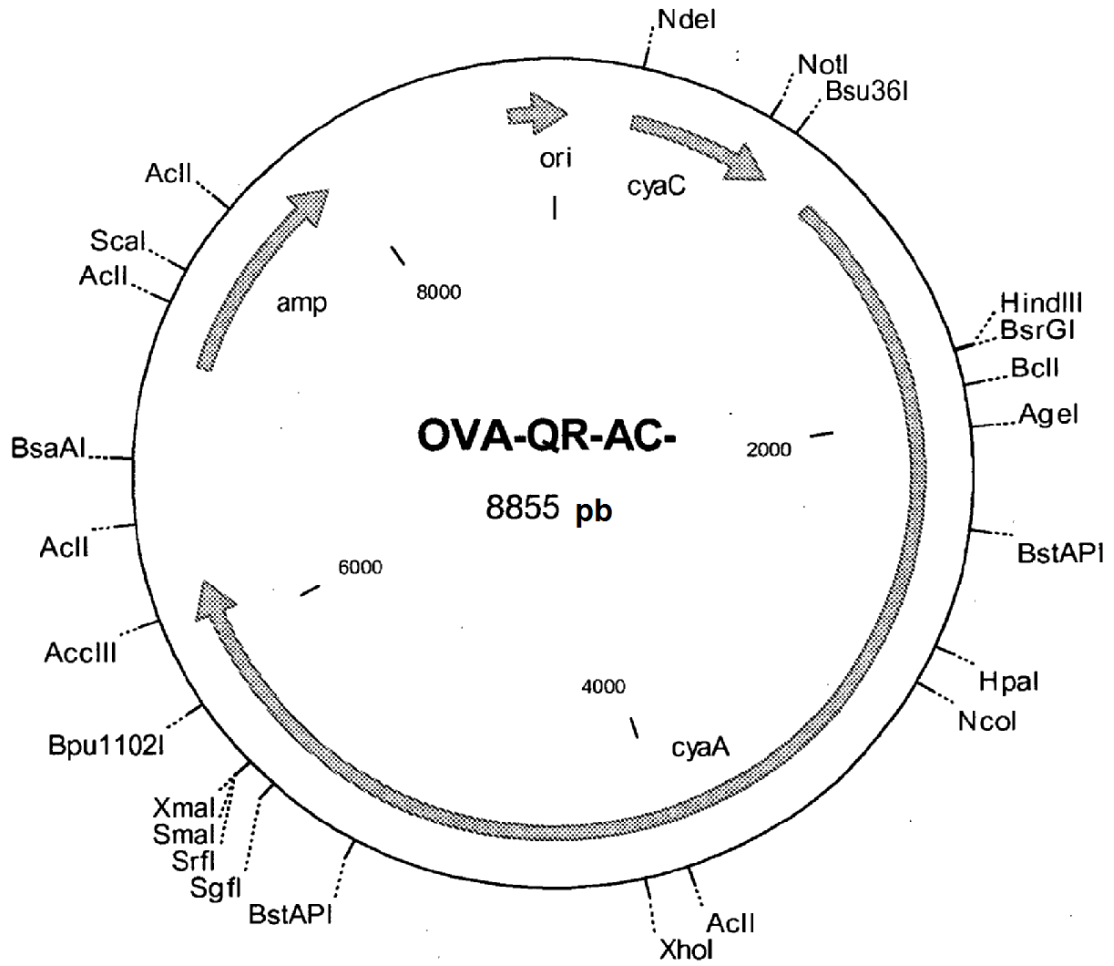


Figura 12

CGGAAGAGCGCCCAATACGCAAACCGCCTCTCCCCGCGCGTTGGCCGATTCAATTAATGCA
 GCTGGCACGACAGGTTTCCCGACTGGAAAGCGGGCAGTGAGCGCAACGCAATTAATGTGA
 GTTAGCTCACTCATTAGGCACCCAGGCTTTACACTTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTGT
 GTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTTACACACAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGAAT
 TTAATACGACTCACTATAGGGAAAGCTCTAGAAATAATTTGTTTAACTTTAAGAAGGAG
 ATATACATATGCTTCCGTCCGCCAAGCGCCCTCCCTCCTCAATCCCACCGACGACTTCG
 CGGCACTGGGCAATATTGCCTGGCTGTGGATGAACTCTCCATGCACCCGCGACTGGCCGG
 TGCATCTGCTCGCACGCAACACGCTCGCGCCGATTCAACTGGGCCAATACATTCTGCTGC
 GATGCAATGACGTGCCGTTGCATACTGCAGCTGGGCCCTAATGGACGCCGACACCGAAC
 TCTCCTATGTGATGGCGCCCTCGTCGCTGGGCGGGAATGCCGGAATGCGGCGACCGAC
 TGTGGATCATCGACTGGATCGCGCCATTCTCGCGCGACGACAATCGTGCCTGCGCCGCG
 CGCTGGCCGAACGGCACCCCGACAGCGTGGGCGGTTTCGCTGCGCGTTTCGGCGCGCCGGC
 ACACCGCGCGCTCAAGGAGTACCGAGGCCGCGCGCTGGACGCGGCCGCCACTCGCGCGC
 AGCTGGACCGCTACCATGCCGAATGATCGCAGGACTGCGCGCGAGCAACGGCGGATACG
 CGCCGCGAGGCCGGGGCACCGCTAAGGATCCTCTAGAGCTTGCATGCCCTGGCACGACA
 GGTTCGCCGACTGGAAAGCGGGCAGTGAGCGCAACGCAATTAATGTGAGTTAGCTCACTC
 ATTAGGCACCCAGGCTTTACACTTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTGGAATTGTGA
 GCGGATAACAATTTACACACAGGAAACAGCTATGACCATGCAGCAATCGCATCAGGCTGGT
 TACGCAAACGCCCGGACCGGGAGTCTGGCATCCCCGAGCCGTAATCGATGGCATCAAG
 GCCGTGGCGAAGGAAAAAACGCCACATTGATGTTCCGCTGGTCAACCCCATTCACC
 AGCCTGATTGCCGAAGGGTGGCCACCAAGGATTGGGCGTGACGCCAAGTCGTCGAT
 TGGGGGTTGCAGGCGGGCTACATTCCCGTCAACCCGAATCTTCCAAACTGTTCCGGCGT
 GCGCCCGAGGTGATCGCGCGGGCCGACAACGACGTCAACAGCAGCCTGGCGCATGGCCAT
 ACCGCGGTGACCTGACGCTGTCGAAAGAGCGGCTTGACTATCTGCGGCAAGCGGGCCTG
 GTCACCGGCATGGCCGATGGCGTGGTTCGCGAGCAACCACGAGGCTACGAGCAGTTCGAG
 TTTCCGCTGAAGGAAACCTCGGACGGGCGCTATGCCGTGCAGTATCGCCGCAAGGGCGGC
 GACGATTTGAGGCGGTCAAGGTGATCGGCAATGCCGCGGTATTCCACTGACGGCGGAT
 GGATCCATCGACATGTTCCGCCATTATGCCGCATCTGTCCAATTCGCGACTCGGCGCGC
 AGTTCGGTGACAGCGGGGATTCCGGTGACCGATTACCTGGCGCGCACGCGGGGGCCGCC
 AGCGAGGCCACGGGCGGTGTACTCTCAATAATTAATTTGAAAAGCTTGTACACCTGGAT
 CGCGAACGCATCGACTTGTGTGGAAAATCGCTCGCGCCGGCGCCCGTTCCGCGAGTGGG
 ACCGAGGCGCGTCCGAGTCCGCTACGACGGCGACATGAATATCGGCGTGATCACCGAT
 TTCGAGCTGGAAGTGCGCAATGCGCTGAACAGGCGGGCGCACGCCGTCGGCGCGCAGGAC
 GTGTTCCAGCATGGCACTGAGCAGAACAATCCTTTCCCGGAGGCAGATGAGAAGATTTT
 GTCGTATCGGCCACCGGTGAAAGCCAGATGCTCACGCGCGGGCAACTGAAGGAATACATT
 GGCCAGCAGCGCGGCGAGGGCTATGTCTTCTACGAGAACCCTGCATACGGCTGGCGGG
 AAAAGCCTGTTTCGACGATGGGCTGGGAGCCGCGCCCGCGTGGCCGAGCGGACGTTTGAAG
 TTCTCGCCGATGTAAGTGGAAACGGTGCCGGCGTACCCGATTGCGGGCGCCGTCGCTG
 GGCGCAGTGAACGCCAGGATTCGGCTATGACAGCCTTGATGGGGTGGGATCGCGATCG
 TTCTCGTTGGGCGAGGTGTCGGACATGGCCGCGTGAAGCGGCGGAACTGGAATGACC
 CGGCAAGTCTTGACAGCCGGGGCGCGGCAGGACGATGCCGAGCCGGCGTGAGCGGTGCG
 TCGGCGCACTGGGGGCGAGCGGGCGCTGCAGGGCGCCAGGCGGTGGCGGCGGCGCAGCGG
 CTGGTTCATGCCATTGCCCTGATGACGCAATTCGGCCGGCCGGTTCACCAACACGCCG
 CAGGAAGCGGCCTCGTTGTCGGCGGCGGTGTTCCGGCTTGGGCGAGGCCAGCAGCGCCGTG
 GCCGAAACCGTGAGCGGTTTTTCCGCGGGTCTTCGCGCTGGGCCGGCGGTTTTCCGGCGT
 GCTGGCGGCGCGATGGCGCTGGGAGGCGGCATCGCCGCGCCGTTGGCGCCGGGATGTCG
 TTGACCGATGACGCGCCGGCCGGACAGAAGGCCGCGCCGCGGAGCTCCGATCGCGCTGCAG
 TTAACGGGTGGAACGGTCGAGCTGGCTTCTTCATCGCGTTGGCGCTGGCCGCGGCGCGC
 GCGGTGACAGCGGCTTGCAGGTGGCCGGGGCGTGGCCGGGGCGGCTGCCGGCGCATTG
 GCCGCGGCGCTCAGTCCCATGGAGATCTACGGCCTGGTGCAGCAATCGCACTATGCCGAT
 CAGCTGGACAAGCTGGCGCAGGAATCGAGCGCATAACGGTTACGAGGGCGACGCTTGTG
 GCCAGCTGTATCGCGACAAGACGGCCGCCGAGGGCGCCGTCGCCGGCGTCTCCGCCGTC

CTGAGCACGGTGGGGGCGGGGTGTCGATCGCCGCGGGCCAGCGTGGTAGGGGCCCG
 GTGGCGGTGGTCACTTCCCTTGCTGACCGGGGCTCTCAACGGCATCCTGCGCGGCGTGCAG
 CAGCCCATCATCGAAAAGCTGGCCAACGATTACGCTCGCAAGATCGACGAGCTGGGCGGG
 CCGCAAGCGTACTTCGAGAAAAACCTGCAGGCGCGTACGAACAACCTGGCCAATTCGGAC
 GGCCTACGGAAAATGCTGCCCCGACCTGCAGGCCGGTTGGAACGCCAGCAGCGTGTATCGGG
 GTGCAGACGACAGAGATCTCCAAGTCGGCGCTCGAACTGGCCGCCATTACCGGCAACGCG
 GACAACCTGAAATCCGTGACGTGTTTCGTGGACCGCTTCGTCCAGGGCGAGCGGGTGGCC
 GGCCAGCCGGTGGTCCTCGACGTGCCCCGGCGGCATCGATATCGCCAGCCGCAAGGGC
 GAGCGGCCGGCGTGCAGTTCATCACGCCGCTGGCCGCGCCAGGAGAAGAGCAGCGCCGG
 CGCACGAAAACGGGCAGATCTGAATTCACCACATTCGTGAGATCGTGGGCAAGCAGGAC
 CGCTGGCGCATCCGGGACGGCGCGGGCCGACACCACCATCGATCTGGCCAAGGTGGTGTG
 CAACTGGTCGACGCCAATGGCGTGTCAAGCACAGCATCAAACCTGGATGTGATCGGCGGA
 GATGGCGATGACGTGCTGCTGCCAATGCTTCGCGCATCCATTATGACGGCGGCGCGGGC
 ACCAACACGGTCACTATGCCGCCCTGGGTGACAGGATTCATTACCGTGTCCGCCGAC
 GGGGAACGTTTCAACGTGCGCAAGCAGTTGAACAACGCCAACGTGTATCGCGAAGGCGTG
 GCTACCCAGACAACCGCCTACGGCAAGCGCACGGAGAATGTCCAATACCGCCATGTGAG
 CTGGCCCGTGTGCGGCAAGTGGTGGAGGTGACACGCTCGAGCATGTGCAGCACATCATC
 GGCGGGGCGGCAACGATTCGATCACCGGCAATGCGCACGACAACCTTCTAGCCGGCGGG
 TCGGGCGACGACAGGCTGGATGGCGGGCGCCGGCAACGACACCCTGGTTGGCGGCGAGGGC
 CAAAACACGGTCACTCGGCGGCGCCGGCGACGACGTATTCTGCAGGACCTGGGGGTATGG
 AGCAACCAGCTCGATGGCGGCGCGGGCGTGCATACCGTGAAGTACAACGTGCACCAGCCT
 TCCGAGGAGCGCCTCGAACGCATGGGCGACACGGGCATCCATGCCGATCTTCAAAGGGC
 ACGGTCGAGAAGTGGCCGGCCCTGAACCTGTTTCAGCGTCGACCATGTCAAGAATATCGAG
 AATCTGCACGGCTCCCGCCTAAACGACCGCATCGCCGGCGACGACCAGGACAACGAGCTC
 TGGGGCCACGATGGCAACGACACGATACGCGGCCGGGGCGGCGACGACATCCTGCGCGGC
 GGCCTGGGCCTGGACACGCTGTATGGCGAGGACGGCAACGACATCTTCTGCAGGACGAC
 GAGACCGTCAGCGATGACATCGACGCGCGCGGGGCTGGACACCGTCGACTACTCCGCC
 ATGATCCATCCAGGCAGGATCGTTGCGCCGCATGAATACGGCTTCGGGATCGAGGCGGAC
 CTGTCCAGGGAATGGGTGCGCAAGGCGTCCGCGCTGGGCGTGGACTATTACGATAATGTC
 CGCAATGTGAAAACGTGATCGGTACGAGCATGAAGGATGTGCTCATCGGCGACGCGCAA
 GCCAATACCCTGATGGGCCAGGGCGGCGACGATACCGTGCAGCGGCGGCGACGGCGATGAT
 CTGCTGTTGCGCGGCGACGGCAACGACATGCTGTATGGCGACGCCGGCAACGACACCCTC
 TACGGGGGGCTGGGCGACGATACCCTTGAAGGCGGCGCGGGCAACGATTGGTTGGCCAG
 ACGCAGGCGCGGAGCATGACGTGCTGCGCGGCGGAGATGGGGTGGATACCGTCGATTAC
 AGCCAGACCGGCGCGCATGCCGGCATTGCCGCGGGTGCATCGGGCTGGGCATCTGGCT
 GACCTGGGCGCCGGCGCGTGCACAAGCTGGGCGAGGCCGGCAGCAGCGCCTACGATACG
 GTTTCGGTATCGAGAACGTGGTGGGCACGGAACGGCCGACCGCATCACGGGCGATGCG
 CAGGCCAACGTGCTGCGCGGCGCGGGTGGCGCCGACGTGCTTGCGGGCGGCGAGGGCGAC
 GATGTGCTGCTGGGCGGCGACGGCGACGACCAGCTGTGCGGCGACGCCGGACGCGATCGC
 TTGTACGGCGAAGCCGGTACGACTGGTTCTTCCAGGATGCCGCCAATGCCGGCAATCTG
 CTCGACGGCGGCGACGGCCGCGATACCGTGGATTCAGCGGCCCGGGCGGGGCTCGAC
 GCCGGCGCAAAGGGCGTATTCTGAGCTTGGGCAAGGGGTTCGCCAGCCTGATGGACGAA
 CCCGAAACCAGCAACGTGTTGCGCAATATCGAGAACGCCGTGGGCAGCGCGGTGATGAC
 GTGCTGATCGGCGACGCGAGGCGCCAACGTCTCAATGGCCTGGCGGGCAACGACGTGCTG
 TCCGGCGGCGCTGGCGACGATGTGCTGCTGGGCGACGAGGGCTCGGACCTGCTCAGCGGC
 GATGCGGGCAACGACGATCTGTTGCGCGGGCAGGGCGATGATACTTATCTGTTGGGGTCT
 GGGTACGGGCACGACACGATCTACGAATCGGGCGGCGGCCATGACACCATCCGCATCAAC
 GCGGGGGCGGACCAGCTGTGGTTCGCGCGCCAGGGCAACGACCTGGAGATCCGCATTCTC
 GGCACCGACGATGCACTTACCGTGCACGACTGGTATCGCGACGCCGATCACCGGGTGGAA
 ATCATCCATGCCGCCAACCAGGCGGTAGACCAGGCAGGCATCGAAAAGCTGGTCGAGGCA
 ATGGCGCAGTATCCGGACCCCGGCGCGGGCGGGCTGCCCGCGGCGGCGCGGTGCCG
 GACACGCTGATGCAGTCCCTGGCTGTCAACTGGCGCTGAAGCGCCGTGAATCACGGCCCG
 CCTGCCTCGCGGGCGGGCGCGCTCTCTTTCGCTTCTTCTCCGAGGTATTTCCCATCATGA

ATTCACTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGTGACTGGGAAAACCCTGGCGTTACCCAACCTTA
 ATCGCCTTGCAGCACATCCCCCTTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCG
 ATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGGAAATTGTAAACGTTAATA
 TTTTGTTAATATTTTGTTAAAATTCGCGTTAAATTTTTGTTAAATCAGCTCATTTTTTAA
 CCAATAGGCCGAAATCGGCAAAATCCCTTATAAATCAAAAGAATAGACCGAGATAGGGTT
 GAGTGTGTCCAGTTTGGAAACAAGAGTCCACTATTAAGAACGTGGACTCCAACGTCAA
 AGGGCGAAAAACCGTCTATCAGGGCGATGGCCACTACGTGAACCATCACCCATAATCAAG
 TTTTTTGGGGTCGAGGTGCCGTAAAGCACTAAATCGGAACCCTAAAGGGATGCCCCGATT
 TAGAGCTTGACGGGGAAAGCCGGCGAACGTGGCGAGAAAGGAAGGAAGAAAGCGAAAGG
 AGCGGGCGCTAGGGCGCTGGCAAGTGTAGCGGTACGCTGCGCGTAACCACCACACCCCGC
 CGCGCTTAATGCGCCGCTACAGGGCGCGTCAGGTGGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGCGG
 AACCCCTATTTGTTTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATA
 ACCCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTATGAGTATTC AACATTTCCG
 TGTCGCCCTTATCCCTTTTTTGCGGCATTTCCTTCCTGTTTTTGTCTACCCAGAAAC
 GCTGGTGAAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTTACATCGAACT
 GGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTCCAATGAT
 GAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTATTGACGCCGGGCAAGA
 GCAACTCGGTGCGCGCATACTACTTCTCAGAATGACTTGTTGAGTACTCACCAGTCAC
 AGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGCTGCCATAACCAT
 GAGTGATAACACTGCGGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAAC
 CGCTTTTTTGCACAACATGGGGGATCATGTAACCTCGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCT
 GAATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGTAGCAATGGCAACAAC
 GTTGCGCAAACTATTAACCTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAATAGA
 CTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTG
 GTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACT
 GGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAAC
 TATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTA
 ACTGTCAGACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAACTTCATTTTTTAATT
 TAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTAACGTGA
 GTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCC
 TTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAAACCACCGCTACCAGCGGTGGT
 TTGTTTGCCGGATCAAGAGCTACCAACTTTTTTCCGAAGGTAACCTGGCTTCAGCAGAGC
 GCAGATACCAAATACTGTCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTCAAGAACTC
 TGTAGCACCGCTACATAACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGG
 CGATAAGTCGTGCTTACCAGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCG
 GTCGGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACACAGCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGA
 ACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGC
 GGACAGGTATCCGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGG
 GGGAAACGCTGGTATCTTTATAGTCCTGTGCGGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCG
 ATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGCGGAGCCTATGGAAAACGCCAGCAACGCGGCCCTT
 TTTACGGTTCCCTGGCCTTTTGCTGGCCTTTGCTCACATGTTCTTTCTGCGTTATCCCC
 TGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGAGCCG
 AACGACCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAG

Figura 13