

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 636 897**

51 Int. Cl.:

A61K 39/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.09.2013 PCT/EP2013/068365**

87 Fecha y número de publicación internacional: **13.03.2014 WO14037440**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.09.2013 E 13762423 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.06.2017 EP 2879700**

54 Título: **Una nueva vacuna de Shigella viva atenuada**

30 Prioridad:

06.09.2012 EP 12183347

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

10.10.2017

73 Titular/es:

**EVELIQUIRE BIOTECHNOLOGIES GMBH (100.0%)
Helmut-Qualtinger-Gasse 2
1030 Vienna, AT**

72 Inventor/es:

**NAGY, GÁBOR;
HENICS, TAMÁS;
SZIJÁRTO, VALERIA y
NAGY, ESZTER**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 636 897 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

Una nueva vacuna de *Shigella* viva atenuada

La invención se refiere a una cepa de la vacuna de *Shigella* viva atenuada generada con mutaciones específicas dirigidas para inducir protección cruzada independiente del serotipo y expresar antígenos heterólogos (no de *Shigella*).

Antecedentes

Las *Shigellas* son enterobacterias gram-negativas altamente adoptadas por humanos que causan disentería bacilar. La enfermedad se propaga exclusivamente por contacto personal directo o contaminación fecal humana de alimentos y agua. Como resultado, la disentería bacilar es endémica en regiones con condiciones higiénicas subóptimas. Se estima que hay 165 millones de casos en todo el mundo, con un máximo de 1 millón de muertes principalmente entre niños menores de cinco años, se descubrió que *Shigella* fue el patógeno bacteriano más predominante aislado en caso de un episodio diarreico agudo en niños de 1 -5 años en el sudeste asiático y el África subsahariana (Kotloff et al., Bull. W.H.O. 77: 651-666, 1999). La disentería bacilar también es común entre los viajeros y el personal militar que entra en los países endémicos. Se ha aceptado desde hace mucho tiempo que las vacunas serían cruciales para controlar la disentería pero el desarrollo de vacunas contra *Shigellas* se ve obstaculizado por la respuesta inmunitaria específica del serotipo, es decir, ante la exposición a *Shigella* (natural o mediada por la vacuna) la protección inmune generalmente se limita al serotipo dado. Las cuatro especies del género *Shigella* comprenden una suma de 50 serotipos y subserotipos, que se diferencian por sus antígenos O de LPS.

Hong et al. (Molecular Microbiology 24:779-91, 1997) describieron el efecto de mutaciones en genes cromosómicos y lipopolisacáridos codificados en plásmidos en la invasión y la resistencia al suero de *Shigella flexneri*. Las mutaciones en los genes *rfb* y *rfaL* o bien eliminaron todas las cadenas laterales del antígeno O o bien produjeron cadenas de longitud muy reducida.

Nagy et al. (J. Infect. Diseases 198: 1699-706, 2008) describieron el potencial de vacuna de un mutante regulador de lipopolisacáridos de *Salmonella enterica*. La pérdida del antiterminador transcripcional RfaH dio como resultado una longitud heterogénea de cadenas LPS, el fenotipo "ligeramente rugoso".

Se ha demostrado que la proteína reguladora RfaH está implicada en la regulación positiva dependiente de la fase de crecimiento de moléculas LPS de cadena larga (es decir, número elevado de repeticiones del antígeno O) de *S. flexneri* (Carter et al. Microbiology. 2007 Oct; 153 (Pt 10):3499-507).

Sorprendentemente se conservan importantes factores de virulencia de las *Shigellas* distintos de los antígenos O de LPS. Esto implica una falta de presión evolutiva mediada por el sistema inmune sobre estos antígenos que confirma la opinión aceptada de que el antígeno O es el único antígeno protector. Sin embargo, existe una respuesta de anticuerpos notable frente a los llamados "antígenos plasmídicos de invasión" (Ipa), especialmente después de una exposición repetida. Estos antígenos codificados en el plásmido de gran virulencia forman componentes de un sistema de secreción de tipo tres (T3SS) que es indispensable para la invasión y por lo tanto la virulencia.

El análisis estructura-función del factor de virulencia de *Shigella* antígeno plasmídico de invasión B (*ipaB*) fue descrito por Guichon et al. (J. Bacteriol. 183: 1269 - 76, 2001). Se generaron mutantes *ipaB* para correlacionar función con subdominios de la proteína.

Menard et al. (J. Bacteriol. 17518: 5899-5906, 1993) describieron que la mutagénesis de los genes *ipa ipaB*, *ipaC* e *ipaD* de *Shigella flexneri*, resultó en la pérdida de potencial invasivo de *Shigella*.

Los anticuerpos contra las proteínas Ipa (tales como los antígenos conservados menores) se consideran no protectores, ya que de lo contrario se podría desencadenar la protección cruzada entre los serotipos. Los enfoques actuales de la vacuna se basan casi exclusivamente en la inmunidad mediada por el antígeno O explotando el hecho de que cinco o seis serotipos proporcionarían alta protección contra la mayoría de los casos de disentería endémica y epidémica. Sin embargo, considerando el hecho de que la mayoría de las vacunas multivalentes sugeridas están basadas o bien en subunidades purificadas (antígenos O) o bien en varias bacterias vivas atenuadas con diferentes tipos de antígenos O de LSP, probablemente serían demasiado complejas y por lo tanto caras. Además, se espera que una cobertura parcial del serotipo induzca la sustitución del serotipo debido a la presión inmune basada en inmunidad de grupo en serotipos de vacunas y el escape y el aumento de la prevalencia de serotipos no vacunales, como se demuestra para otros patógenos multi-serotipo, como *Streptococcus pneumoniae*. Por lo tanto, se espera que una vacuna de *Shigella* ideal proporcione protección cruzada sustancial contra todos los serotipos en circulación.

Además de *Shigella*, la *Escherichia coli* enterotoxigénica (ETEC) es un importante patógeno bacteriano responsable de la diarrea de los viajeros y representa una de las principales causas de muerte en niños en países endémicos. Por lo tanto, se están realizando esfuerzos para desarrollar vacunas que aborden estos dos patógenos simultáneamente.

La diarrea de los viajeros actualmente se trata con antibióticos; sin embargo, existe una tasa creciente de resistencia entre las cepas de *Shigella* que hace que la gestión de la enfermedad sea cada vez más difícil. Además, las infecciones de ETEC pueden tener consecuencias a largo plazo relacionadas con el síndrome de colon irritable. Está ampliamente aceptado que la vacunación sería la forma más eficaz de abordar esta alta necesidad médica no cubierta; sin embargo, actualmente no hay vacunas disponibles para la prevención de estas enfermedades.

Se han identificado dos tipos de enterotoxinas en las cepas de ETEC, la toxina termolábil (LT) y la toxina termoestable (ST), ya sea como ST asociada con enfermedad porcina (STp) o ST asociada con enfermedad humana (STa). LT es altamente homóloga en estructura a la toxina del cólera. La subunidad A es el componente activo de la toxina, que funciona para aumentar la actividad de la adenilato ciclasa. Esta se libera en las células huésped por las subunidades B, que se unen a los gangliósidos en la superficie celular. STa es un pequeño polipéptido no inmunogénico (19 aminoácidos) que presenta actividad estimulante de la guanilato ciclasa. STm es una forma mutada de ST que no es tóxica, pero todavía inmunogénica. Se considera que dicha STm se utiliza de manera segura como antígeno de vacuna (Taxt et al. Infect. Immun. 78:1824-31, 2010).

Se ha demostrado que las cepas ETEC también producen EAST1, una toxina termoestable similar en tamaño y modo de acción a ST pero de diferente secuencia, originalmente identificada en cepas enteroagregativas de *E. coli* (Nataro and Kaper, Clin Microbiol Rev. 11: 142-201, 1998; Zhang et al., Vet Microbiol. 123: 145-152,2007).

Zheng et al. (World J. Gastroenterol. 11: 3411-18, 2005) construyeron una cepa de *Shigella* mutante *asd* que coexpresa CS3 y LTB/STm de *E. coli* enterotoxigénica. Tras la inmunización de ratones por vía oral, se generaron anticuerpos contra CS3, LTB, ST y lipopolisacárido de *Shigella*.

Xu et al. (Vaccine 21: 664-648, 2003) describieron un mutante *rfbF* del serotipo 2a de *Shigella flexneri* invasivo vivo atenuado como portador de una vacuna gag de VIH basada en ADN.

Noriega et al. (Infection and Immunity 67(2): 782-788, 1999) describieron una estrategia para la protección cruzada contra 14 serotipos de *Shigella flexneri*, que implica el uso de los dos serotipos 2a y 3a. Las cepas atenuadas descritas son la cepa 2a de *S. flexneri* CVD1207 (Δ guaB-A Δ set1 Δ sen) y la cepa 3a de *S. flexneri* CVD 1211 (Δ guaB-A Δ virG Δ sen).

Bernardini et al. (Infection and Immunity 69(2): 1072-1083, 2001) describen mutantes de *Shigella flexneri* 5, que son un mutante *aroC* y un doble mutante *aroC purE*.

Hong M et al. (Molecular Microbiology 1997, 24(4):779-791) describen el efecto de determinadas mutaciones en genes de lipopolisacáridos cromosómicos y codificados en plásmidos de *Shigella flexneri* en la invasión y resistencia al suero. El análisis de LPS mostró que las mutaciones en los genes *rfb* y un gen *rfaL* o bien eliminaron todas las cadenas laterales del antígeno O o produjeron cadenas de longitud muy reducida.

Hong M et al. (Infection and Immunity 1998, 66(10):4700-4710) describen la identificación de los loci cromosómicos de *Shigella flexneri* implicados en la difusión intracelular. Se describen las proteínas de virulencia codificadas en plásmidos *ipaB*, *ipaC* e *ipaD* como necesarias para la entrada de bacterias en las células huésped (invasión).

Levine et al. (Behring Institute Mitteilungen 98: 120-123, 1997) describieron una cepa 2a de *S. flexneri* atenuada CVD 1203 que alberga mutaciones en el gen cromosómico *aroA* y el gen plásmido *virG*, así como un candidato a vacuna *S. flexneri* 2a CVD 1205 que alberga una mutación de delección en *guaB-A* haciéndolo defectuoso en la síntesis de ácidos nucleicos, y una mutación de delección en *virG*.

El objetivo de la presente invención es proporcionar vacunas de *Shigella* mejoradas, en particular para la prevención de enfermedades diarreicas que son altamente relevantes para los viajeros a países endémicos y niños pequeños que viven en países en desarrollo. Tales vacunas pueden basarse en una cepa de la vacuna de *Shigella flexneri* viva atenuada capaz de expresar heterogéneamente antígenos derivados de diferentes patógenos e inducir una protección amplia contra patógenos bacterianos, y particularmente shigelosis.

Compendio de la invención

El objetivo se consigue por medio del objeto tal y como se reivindica.

En la presente memoria se describe una vacuna de *Shigella* viva atenuada, que está basada en una cepa de *Shigella rugosa* que carece del antígeno O de LPS. La invención proporciona una vacuna de *Shigella* viva atenuada que confiere protección cruzada contra distintos serotipos y especies de *Shigella* que comprende una cepa de *Shigella* que es rugosa y no invasiva por una delección del gen *rfbF*, y una delección de los genes *ipaB* e *ipaC* en el plásmido de invasión.

Específicamente, la cepa de *Shigella* es no invasiva por mutagénesis, en particular una mutación del plásmido de invasión.

Específicamente la vacuna según la invención se atenúa mediante mutagénesis del gen *rfbF* y/o de uno o más genes implicados en la síntesis, transporte y expresión de LPS, preferiblemente seleccionados del grupo que

5 consiste en genes en el complejo del operón *rfb*, por ejemplo localizados en el cromosoma entre los genes Gnd (6-fosfogluconato deshidrogenasa, 2089155-2090561) y GalF (UTP-glucosa-1-fosfato uridiltransferasa, 2101928-2102821) de la cepa *Shigella flexneri* 2a 2457T (Wei et al. Complete genome sequence and comparative genomics of *Shigella flexneri* serotype 2^a strain 2457T. Infect Immun. 2003 May; 71(5):2775-86.) o localizados en el plásmido de virulencia (*Shigella sonnei*). Se prefiere específicamente la mutagénesis del gen *rfbF* y de uno o más genes dentro del complejo génico *rfb/wbb* que codifica la síntesis del antígeno O, *waaL* que codifica la ligasa del antígeno O, *wzx* que codifica la flipasa del antígeno O implicada en el transporte del antígeno O, *wzy/rfc* implicados en la polimerización del antígeno O, genes dentro del complejo génico *rfa/waa* que codifican la síntesis del núcleo de LPS, genes reguladores que afectan a la expresión del antígeno O, tales como *rfaH*, o a la pérdida de función la cual resulta en una reducción de al menos 90% de la expresión del antígenos O.

10 Según un aspecto específico, dicha mutagénesis se realiza por delección del gen *rfbF* y de uno o más de los genes *rfb* D, C, E, J y/o I, o una delección de una parte de los mismos, o de los genes correspondientes en varios serotipos de *Shigella*. Alternativamente, se puede utilizar la mutagénesis por inactivación, por ejemplo transitoria, condicional o inactivación constitutiva.

15 Dicha cepa de *Shigella* se selecciona preferiblemente del género *Shigella*, por ejemplo de cualquier serotipo o especie de *Shigella*, en particular *S. flexneri*, *S. sonnei*, *S. dysenteriae* y *S. boydii*.

Específicamente, dicha cepa de *Shigella* expresa proteínas de la membrana externa, que pueden inducir anticuerpos de reactividad cruzada, en particular proteínas conservadas, que incluyen OmpC, OmpA y OmpX, o aquellas codificadas en el plásmido de invasión.

20 La vacuna según la invención particularmente confiere protección cruzada contra diferentes serotipos y especies de *Shigella*, en particular contra cualquiera de *S. flexneri* 2a, *S. flexneri* 6 y *S. sonnei*, o *Escherichia coli* enteroinvasiva.

Según un aspecto específico, dicha *Shigella* no es invasiva por mutagénesis adicional del plásmido de invasión, en particular una mutación del plásmido de invasión, que comprende una delección de los genes *ipaB* e *ipaC* y otros genes *ipa*.

25 Específicamente, dicha *Shigella* comprende un plásmido de invasión endógeno recombinante que incorpora al menos un gen que codifica un antígeno heterólogo para secretar dicho antígeno o para expresar dicho antígeno sobre la superficie de la célula bacteriana.

Las realizaciones preferidas se refieren a dicha vacuna, en donde dicho antígeno es un antígeno protector derivado de un patógeno, por ejemplo seleccionado del grupo que consiste en:

- 30
- un antígeno bacteriano, preferiblemente una toxina o un factor de colonización,
 - un antígeno viral, preferiblemente de un patógeno que provoca infecciones entéricas o mucosas,
 - un antígeno fúngico, preferiblemente de un patógeno que provoca infecciones entéricas o mucosas, y
 - un antígeno parasitario, preferiblemente de un patógeno que causa infecciones entéricas.

35 Específicamente, el antígeno bacteriano proviene de bacterias enteropatógenas, preferiblemente seleccionadas del grupo que consiste en

- a. antígenos de *E. coli*, en particular una enterotoxina seleccionada del grupo que consiste en LTB, LTA mutada y ST de ETEC, subunidades, o fusiones de las mismas, antígenos de *E. coli* enteroagregativa (EAEC), o toxina 1 o 2 de tipo Shiga
- b. antígenos de *Campylobacter jejuni*,
- 40 c. antígenos de *Clostridium difficile*, específicamente las toxinas A y B
- d. antígenos de *Vibrio cholera*, específicamente el antígeno CT-B, y
- e. mutantes o proteínas de fusión de a), b) c) o d).

45 Específicamente, el antígeno bacteriano es una enterotoxina (ETEC) que comprende la subunidad B de la toxina termolábil (LTB), la toxina termoestable (ST) o subunidades o fusiones de las mismas, preferiblemente LTB/STm que comprende una STm con una secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID 1, que opcionalmente excluye la secuencia de tipo silvestre de ST humana.

En particular, dicho antígeno ETEC es una proteína de fusión de la subunidad B de LT y ST mutante, preferiblemente una proteína de fusión LTB/STm con una secuencia de aminoácidos como se deriva de la Figura 7 SEQ ID 11-18 (nucleótido terminador LTA-promotor-LTB-ST-LTB y secuencias de aminoácidos LTB-ST para 4

construcciones), por ejemplo con mutaciones ST en la posición 13 y/o 12, tales como P13F o P13G, y/o N12R o N12K.

Específicamente, el antígeno viral proviene de virus diarreicos, preferiblemente seleccionados del grupo que consiste en rotavirus y virus de Norwalk (calicivirus).

- 5 Específicamente, el antígeno parasitario proviene de protozoos que provocan diarrea, preferiblemente seleccionados del grupo que consiste en *Giardia lamblia*, especies de *Cryptosporidium* y *Entameba histolytica*.

Específicamente, el antígeno fúngico proviene de hongos que provocan diarrea, preferiblemente seleccionados del grupo que consiste en *Blastomyces dermatiditis* y *Histoplasma spp.*

- 10 Según un aspecto específico de la invención, la cepa de la vacuna de Shigella comprende además una delección de un gen cromosómico esencial y una inserción de dicho gen en el plásmido de invasión, en particular el gen *ppa*, o cualquiera de *accD*, *acpS*, *dapE*, *era*, *frr*, *ftsI*, *ftsL*, *ftsN*, *ftsZ*, *infA*, *lgt*, *lpxC*, *msbA*, *murA*, *murI*, *nadE*, *parC*, *proS*, *pyrB*, *rpsB*, *trmA*, *rho* y *rhoL*.

- 15 Sin embargo, según una realización específica de la invención, la vacuna se proporciona para uso en la profilaxis o inmunoprofilaxis de un sujeto para prevenir enfermedades infecciosas, en particular enfermedades entéricas, tales como enfermedades diarreicas. Específicamente, la enfermedad se selecciona del grupo que consiste en Shigelosis, disentería y diarrea.

Se describe posteriormente en la presente memoria un método de prevención de enfermedades infecciosas en un sujeto, en particular una enfermedad entérica, específicamente por vacunación e inmunización de dicho sujeto, respectivamente.

- 20 Específicamente, dicha enfermedad entérica está causada por cualquier serotipo o especie de Shigella. Preferiblemente, dicha (inmuno) profilaxis comprende la administración de la vacuna en una formulación mucosal u oral.

Específicamente, la vacuna se administra por vía oral o intranasal.

Una realización específica se refiere a una vacuna para uso según la invención, en donde

- 25 - se utiliza una vacuna polivalente que expresa antígenos protectores de Shigella y al menos un patógeno de una especie distinta de Shigella mediante la incorporación de un antígeno protector de dicho patógeno en el plásmido de invasión endógeno recombinante, y en donde
- dicha enfermedad infecciosa está causada por cualquier serotipo o especie de Shigella y/o dicho patógeno.

- 30 Según un aspecto adicional de la invención, se proporciona una cepa de Shigella, que es una cepa de *S. flexneri* 2a, tal como *S. flexneri* 2a 2457T, que comprende una delección de los genes *rfbF* y *ipaB* e *ipaC*.

Específicamente, dicha cepa de Shigella puede comprender además una delección de un gen cromosómico esencial y una inserción de dicho gen en el plásmido de invasión.

- 35 Preferiblemente, dicha cepa de Shigella comprende un plásmido de invasión recombinante que incorpora al menos un gen que codifica un antígeno heterólogo para expresar y/o secretar dicho antígeno. Específicamente, el antígeno heterólogo es una enterotoxina bacteriana (ETEC) que comprende una subunidad B de la toxina termolábil (LTB), la toxina termoestable (ST) o subunidades o fusiones de las mismas, preferiblemente LTB/STm que comprende una STm con una secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID 1.

- 40 Se describe posteriormente en la presente memoria un vector plasmídico recombinante basado en un plásmido de invasión de Shigella mutado que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica al menos un antígeno heterólogo, en donde el plásmido está mutado en al menos uno de los genes *ipaB* y/o *ipaC*. Esto se refiere específicamente a una mutación para la delección y/o inactivación de una región no codificante o codificante, tales como secuencias reguladoras unidas operativamente a un gen y un gen, respectivamente, preferiblemente una delección de los genes que hace que la célula huésped bacteriana no sea invasiva, en particular una delección de los genes *ipaB* e *ipaC*, o una delección de una parte (sustancial) de los mismos.

- 45 Se describe posteriormente en la presente memoria una célula huésped bacteriana que comprende el vector descrito en la presente memoria, en donde dicha célula huésped se selecciona específicamente de los géneros Shigella, Escherichia, Salmonella, Campylobacter o Yersinia.

- 50 Dicha célula huésped comprende específicamente una mutación en el plásmido de invasión endógeno. Específicamente, el vector descrito en la presente memoria es un plásmido de invasión endógeno, es decir, un plásmido endógeno u homólogo de la célula huésped.

Figuras**Figura 1. Capacidad de protección cruzada de cepas no invasoras vivas atenuadas de *S. flexneri* y *S. sonnei* que carecen de síntesis del antígeno O de LPS.**

5 Se inmunizaron por vía intranasal grupos de ratones BALB/c de 8 semanas de edad con variantes CRP (10^6 UFC) y CRN (10^8 UFC) de mutantes (a y b) de *S. flexneri* 2a o alternativamente variantes fase I ($10^{6.5}$ UFC) y fase II ($10^{7.5}$ UFC) de *S. sonnei* (c) dos veces con intervalos de dos semanas. Se vacunaron los grupos de control de forma simulada con disolución salina. Posteriormente, los ratones fueron desafiados con *S. flexneri* 6 (a y c) de tipo silvestre 10^6 UFC o *S. sonnei* (b) de tipo silvestre $10^{6.5}$ UFC por la misma vía. La supervivencia se monitorizó posteriormente durante 14 días. Las figuras muestran datos combinados de tres (b) o dos (a y c) experimentos independientes con 5 ratones en cada grupo y repeticiones. El análisis estadístico de las curvas de supervivencia se realizó mediante la prueba Log-rank (Mantel-Cox). En caso de que la supervivencia fuera significativamente diferente de la de los ratones vacunados de forma simulada, el valor de p se muestra en el gráfico.

Figura 2. Representación esquemática de los fenotipos antigénicos de los diversos mutantes utilizados así como la diferencia propuesta en los niveles de anticuerpos que pueden inducir.

15 Se muestran los antígenos O, sus determinantes genéticos, y los anticuerpos desencadenados por los mismos. Se muestran las Ipa y los antígenos menores conservados de superficie. Los mutantes que expresan tanto Ipa como antígenos O (*S. flexneri* Δ aroC CRP y *S. sonnei* Fase I) desencadenan una respuesta de anticuerpos principalmente contra estos antígenos principales. Por el contrario, la pérdida de estos antígenos en las cepas de la vacuna permite una mayor respuesta a los antígenos menores conservados, ip: plásmido de invasión, chr.: cromosoma, T3SS: sistema de secreción tipo tres, LPS: lipopolisacárido.

Figura 3. IgA mucosal de reactividad amplia obtenida de ratones vacunados con cepas vivas atenuadas de *S. flexneri* 2a.

25 Se determinó la reactividad inmune de sIgA en muestras de LBA recogidas tras 2 inmunizaciones con la cepa ipa positiva lisa (Δ aroC CRP) y el doble mutante (Δ rfbF CRN) con ELISA en diferentes células bacterianas diana. La reactividad se expresa como relación (reactividad de la muestra Δ aroC CRP dividida por la reactividad de la muestra Δ rfbF CRN) a la misma dilución para hacer comparables las repeticiones. El gráfico muestra promedios + error estándar de los promedios de cuatro experimentos realizados con muestras de LBA obtenidas de vacunas independientes. Los datos se compararon estadísticamente con la prueba no paramétrica de Mann-Whitney con el valor obtenido en la doble (ipa y antígeno O) diana positiva (Δ aroC CRP; columna negra).

Figura 4. Tabla complementaria 1: Oligonucleótidos utilizados para la generación y confirmación de mutantes de delección. (SEQ ID 3 - 10)**Figura 5. Presentación esquemática de una cepa de *Shigella flexneri* 2a 2457T atenuada.**

35 A. La cepa de *Shigella flexneri* 2a 2457T completamente secuenciada. El antígeno O es el serotipo determinante de Shigellae. El gen *rfbF* en el cromosoma de Shigella codifica un factor esencial para la síntesis del componente antígeno O de LPS. El plásmido de invasión presente en todas las cepas de Shigella patógenas codifica los antígenos del plásmido de invasión (IpaA-D) que son componentes moleculares importantes del sistema de secreción tipo III (T3SS). T3SS media los procesos clave de las interacciones célula diana-Shigella y eventualmente conduce a la transmisión de factores de Shigella a la célula diana que permite que el patógeno invada y se extienda. Ipa B e IpaC son componentes clave y esenciales de este sistema.

40 B. En el mutante de *Shigella flexneri* 2a T2457 *rfbF* ipaB/C se introducen dos delecciones. La delección del gen *rfbF* del cromosoma elimina la síntesis del antígeno O y da lugar a una cepa "rugosa" que está atenuada e induce inmunidad independiente del serotipo tras la vacunación. La delección de los genes ipaB y C en el plásmido de invasión interrumpe T3SS, haciendo así que el mutante de Shigella sea no invasivo (y Rojo Congo negativo).

45 C. Con el fin de estabilizar el plásmido de invasión de la cepa de Shigella mutante, se elimina un gen cromosómico esencial (pirofosfatasa inorgánica, ppa (Fig. 7 SEQ ID 24)) del cromosoma y se reintroduce como una parte de la construcción sintética en el plásmido de invasión.

50 **Figura 6: Ilustración esquemática del plásmido de invasión pCP301 de la cepa de *Shigella flexneri* 2a 301 con el conjunto ipa, las posiciones del cebador para la delección de ipaB/C (pKD1, 2) y los cebadores de control para monitorizar la delección de ipaB/C (ko1,2). También se indica la posición del sitio de inserción del gen sintético entre ipaJ y un elemento IS100.**

Figura 7: Secuencias

gen para la proteína de fusión LT-B/mST que codifica ST con una mutación en la posición de aminoácido 13 (de Pro a Phe) junto con el promotor y las secuencias de terminación *eltAB*

- GP-P13F (secuencia de nucleótidos, SEQ ID 11),
 proteína de fusión LT-B/mST con una mutación en ST en la posición de aminoácido 13 (de Pro a Phe)
 GP-P13F (secuencia de aminoácidos, SEQ ID 12),
 5 gen para la proteína de fusión LT-B/mST que codifica ST con una mutación en la posición del aminoácido 13 (de Pro a Gly) junto con el promotor y las secuencias de terminación *etAB*
 GS-P13G (secuencia de nucleótidos, SEQ ID 13),
 proteína de fusión LT-B/mST con una mutación en ST en la posición de aminoácido 13 (de Pro a Gly)
 GS-P13G (secuencia de aminoácidos, SEQ ID 14),
 10 gen para la proteína de fusión LT-B/mST que codifica ST con una mutación en la posición de aminoácido 12 (de Asn a Arg) junto con el promotor y las secuencias de terminación *etAB*
 GS-N12R (secuencia de nucleótidos, SEQ ID 15),
 proteína de fusión LT-B/mST con una mutación en ST en la posición de aminoácido 12 (de Asn a Arg)
 GS-N12R (secuencia de aminoácidos, SEQ ID 16),
 15 gen para la proteína de fusión LT-B/mST que codifica ST con una mutación en la posición de aminoácido 12 (de Asn a Lys) junto con el promotor y las secuencias de terminación *etAB*
 GS-N12K (secuencia de nucleótidos, SEQ ID 17),
 proteína de fusión LT-B / mST con una mutación en ST en la posición de aminoácido 12 (de Asn a Lys)
 GS-N12K (secuencia de aminoácidos, SEQ ID 18),
 Cebador PCR directo de control para confirmar las cepas mutantes de delección de ipa ipa co1 (SEQ ID 19),
 20 Cebador PCR inverso de control para confirmar las cepas mutantes de delección de ipa ipa co2 (SEQ ID 20),
 Cebador PCR directo para generar cepas mutantes de delección de ipa ipa pKD1 (SEQ ID 21),
 Cebador PCR directo para generar cepas mutantes de delección de ipa ipa pKD2 (SEQ ID 22),
 Secuencia de nucleótidos de los genes ipaB e ipC eliminada del plásmido de invasión
 ipaBC (SEQ ID 23).
 25 Secuencia de nucleótidos del gen ppa insertado del cromosoma al plásmido de invasión
 gen de *Shigella ppa* (SEQ ID 24).
 Cebador PCR directo para generar cepas mutantes de delección de ppa
 ppa pKD-F (SEQ ID 25)
 Cebador PCR inverso para generar cepas mutantes de delección de ppa
 30 ppa pKD-R (SEQ ID 26)
 Cebador PCR directo de control para confirmar las cepas mutantes de delección de ppa ppa ko1 (SEQ ID 27)
 Cebador PCR inverso de control para confirmar las cepas mutantes de delección de ppa ppa ko2 (SEQ ID 28)
 Péptido de enlace insertado entre LT-B y mST para el plegado flexible GGGGS (SEQ ID 29)

35 **Figura 8: amplificación PCR de la región cromosómica donde se elimina el gen *rfbF*.** M: marcador de tamaño de ADN; WT: *Shigella flexneri* 2a 2457T de tipo silvestre, gen *rfbF* con región flanqueante, fragmento de 1.100 pb; mt: mutante $\Delta rfbF$, sustitución genética con gen de cloranfenicol, 1.300 pb.

40 **Figura 9: amplificación PCR de la región del plásmido de invasión donde se eliminaron los genes ipaC e ipaB.** M: marcador de tamaño de ADN; WT: *Shigella flexneri* 2a 2457T de tipo silvestre, genes ipaB e ipaC con región flanqueante, fragmento de 1.600 pb; mt: plásmido de invasión mutante $\Delta ipaBC$, sustitución génica con gen de kanamicina, 2.570 pb.

Figura 10:

- 5 **A. Estructura de las construcciones de genes múltiples que codifican el gen esencial Ppa, la proteína de fusión LTB-mST y la proteína de resistencia a la kanamicina.** La expresión de la proteína de fusión LTB-mST está impulsada por el promotor LTA y la transcripción se termina con el terminador LTB. Se indican las secuencias de aminoácidos LTB-ST de 4 construcciones con mutaciones ST detoxificantes (P13F, P13G, N12R, N12K) (codones mutados subrayados). Abreviaciones: CS: sitio de clonación; H1 y H2: regiones homólogas 1 y 2 en el plásmido de invasión para ayudar a la recombinación homóloga; ppa: gen de la pirofosfatasa inorgánica; pro: promotor; term: terminador; GGGGS: Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID 29) penta-aminoácido de enlace entre LTB y mST; kan: gen de resistencia a la kanamicina.
- 10 **B. Inserción de genes ETEC en el plásmido de invasión de Shigella.** M: marcador de tamaño de ADN; WT: *Shigella flexneri* 2a 2457T de tipo silvestre, región intergénica del plásmido de invasión, fragmento de 450 pb; mt: plásmido de invasión mutante del gen LT-B + STm, sustitución génica con gen de kanamicina, 2.800 pb,
- 15 **C. Análisis de inmunotransferencia para detectar LTB.** Se separaron el recombinante LT-B, así como las fracciones de sobrenadante del cultivo de *E. coli* y *Shigella* (proteínas secretadas) mediante SDS-PAGE, las proteínas se transfirieron a la membrana de nitrocelulosa y se detectaron con el anticuerpo monoclonal anti-LTB. Carril 1: *Shigella flexneri* de tipo silvestre (control negativo); Carril 2: *Shigella flexneri* que porta el gen de fusión en el plásmido de invasión; Carril 3: *E. coli* DH5α transformada con el vector pGET que contiene la construcción sintética como se muestra en la Fig. 10A carril 4: cepa de ETEC que expresa LT (control positivo).

- 20 **Figura 11: Protección heteróloga inducida por la cepa de la vacuna de *Shigella flexneri* 2a con una mutación combinada rfbF e ipaC/ipaB de diseño.** Se inmunizaron grupos de 5 ratones por vía intranasal con dosis subletales de o bien la cepa de tipo silvestre de *Shigella flexneri* 2a 2457T (5×10^5 ufc/ratón) o sus mutantes de delección isogénicos 2457TΔrfb, 2457TΔipaBC, 2457TΔrfbAipaBC (todos a 10^8 ufc/ratón), o inmunizados de forma simulada con tampón PBS. Se realizaron tres inmunizaciones idénticas con intervalos de 2 semanas. Una semana después de la última inmunización de refuerzo, los ratones fueron desafiados con una dosis letal de una cepa de *S. sonnei* (2×10^6 ufc/ratón). La supervivencia de los animales se controló diariamente.

Descripción detallada de la invención

Los términos específicos según se emplean a lo largo de la descripción tienen el siguiente significado.

- 30 El término "atenuada" se emplea en esta memoria para describir una cepa virulenta de *Shigella* que ha sido modificada de manera que ya no es capaz de causar una enfermedad, es decir, la cepa modificada es avirulenta. El término "viva" con respecto a la *Shigella* atenuada se emplea en esta memoria para describir *Shigella* que es capaz de crecer y reproducirse. Por consiguiente, la cepa de *Shigella* viva de la presente invención se utiliza en la vacuna viva atenuada y específicamente es capaz de colonizar el colon de un sujeto, pero no causa los síntomas clínicos asociados con enfermedades entéricas causadas por los patógenos entéricos o diarreicos. Además, la cepa viva de la presente invención específicamente es capaz de replicarse limitadamente en el sujeto vacunado y de inducir una respuesta inmune protectora que es protectora contra cepas virulentas de *Shigella*. Una bacteria atenuada de la invención puede ser modificada genéticamente para expresar un antígeno heterólogo que no es expresado por la bacteria nativa, de manera que la bacteria atenuada actúa como un portador del antígeno heterólogo.

- 40 El término "antígeno", como se emplea según la presente invención se referirá en particular a cualquier determinante antigénico, que pueda ser posiblemente reconocido por un sitio de unión de un anticuerpo. Los antígenos específicamente preferidos son aquellas moléculas o estructuras, que ya han demostrado ser o son capaces de ser inmunológicamente o terapéuticamente relevantes, específicamente aquellas, para las cuales se ha probado una eficacia clínica. El término según se utiliza en la presente memoria comprenderá en particular moléculas o estructuras seleccionadas de antígenos que comprenden epítopos inmunoaccesibles e irrelevantes, en particular antígenos conservados que se encuentran en una o más especies o serotipos. Los epítopos inmunoaccesibles típicamente se presentan por o están comprendidos en antígenos expresados en una superficie celular. El término "antígeno protector" como se emplea en la presente memoria se referirá a aquellos antígenos que desencadenan una respuesta inmune *in vivo*, para inducir anticuerpos neutralizantes contra el antígeno. Esto proporciona la protección efectiva tras la inmunización activa con el antígeno. Los antígenos proteicos son los antígenos preferidos debido a su capacidad inherente de provocar respuestas inmunes tanto celulares como humorales.

- 50 El término "heterólogo" se emplea en la presente memoria específicamente con respecto a un antígeno, y se entiende como un antígeno extraño a la célula que expresa dicho antígeno heterólogo. Con respecto a una célula o cepa de *Shigella*, el término se refiere específicamente a antígenos extraños a la célula o cepa de *Shigella*, respectivamente. Por tanto, dicho antígeno heterólogo o extraño no se expresaría en una célula o cepa de tipo silvestre, sino por la recombinante que comprende un gen heterólogo que codifica dicho antígeno. De este modo dicha célula o cepa recombinante expresaría dicho antígeno heterólogo, por ejemplo en la superficie celular. Las células de la invención pueden ser modificadas genéticamente para expresar un antígeno heterólogo, por ejemplo un componente no tóxico o una forma de LT y/o ST o STm. Tales células inducen una respuesta inmune contra el

antígeno heterólogo así como los antígenos nativos y por lo tanto mejoran la protección proporcionada por una vacuna.

5 El término "reactividad cruzada" con respecto a los antígenos como se emplea en la presente memoria significará antígenos con epítomos compartidos entre diferentes patógenos, que incluyen por ejemplo diferentes serotipos de la misma especie o de diferentes especies bacterianas. Los antígenos de reactividad cruzada normalmente son estructuras conservadas. Los epítomos de reactividad cruzada pueden originarse a partir de los mismos antígenos expresados por diferentes patógenos, o bien de diferentes antígenos con estructura similar.

10 Los antígenos de reactividad cruzada específicos son reconocidos por anticuerpos de reactividad cruzada, por ejemplo anticuerpos de antisueros, anticuerpos aislados o recombinantes. Tales anticuerpos de reactividad cruzada pueden reconocer los antígenos de reactividad cruzada de diferentes patógenos. Los anticuerpos de reactividad cruzada específicos son anticuerpos neutralizantes.

15 Una vacuna o respuesta inmune de "protección cruzada" se entiende como la que protege contra la infección por al menos un patógeno diferente, por ejemplo una especie o serotipo diferente, que no es idéntico al utilizado para provocar la respuesta. La eficacia de la protección cruzada normalmente puede ensayarse con diferentes antisueros de sujetos que habían sido expuestos a los diferentes patógenos.

20 Cuando se diseña un antígeno de reactividad cruzada para inducir inmunidad de protección cruzada, este puede ensayarse en modelos animales, por ejemplo inmunizando a los animales con el antígeno de reactividad cruzada derivado de un patógeno que desencadena una respuesta inmune, y desafiando a los animales con al menos un patógeno diferente del que se utilizó para provocar la respuesta. Como ejemplo, la inmunidad de protección cruzada contra más de un serotipo de Shigella u otras bacterias enteroinvasivas con antígenos de reacción cruzada, tales como *E. coli*, se refiere específicamente a la protección contra variaciones distintas dentro de las especies de bacterias de diferentes individuos, por ejemplo variaciones a nivel de subespecies. El grupo de serovariedades con antígenos comunes se denomina serogrupo o serotipo.

25 La base para el desarrollo de una vacuna de Shigella de amplio espectro, por ejemplo multi-cepa y/o multi-serotipo y/o multi-especie es la identificación de antígenos de reacción cruzada que son prevalentes en las serovariedades de Shigella. Esto incluye particularmente aislados asociados con infecciones humanas.

30 Cuando se diseña una vacuna polivalente para inducir inmunidad de protección cruzada contra diferentes patógenos, la respuesta inmunitaria normalmente es provocada por varios antígenos, por ejemplo antígenos individuales de los diferentes patógenos. Como ejemplo, la vacuna polivalente puede estar basada en al menos dos antígenos protectores diferentes de diferentes especies, tales como derivados de Shigella y Escherichia, pero también otros antígenos bacterianos, virales, fúngicos o parasitarios. La vacuna polivalente de protección cruzada puede por ejemplo probarse en un modelo animal mediante la inmunización de los animales con la vacuna que comprende diferentes antígenos protectores derivados de al menos dos patógenos diferentes que desencadenan una respuesta inmune, y que desafían a los animales con uno, dos o más de los patógenos.

35 La base para el desarrollo de un candidato a vacuna multi-especie basada en bacterias de Shigella atenuadas específicas, tal como se utiliza según la invención, es la identificación de antígenos protectores, ya sean de reactividad cruzada para tratar una serie de diferentes serotipos o no, que son prevalentes en las diferentes especies patógenas, contra las que se busca protección.

40 El término "enteral" también conocido como "entérico", como se emplea en la presente memoria específicamente en relación con una enfermedad o patógeno se referirá a una enfermedad o patógeno relacionada con, o que afecte a los intestinos, por ejemplo disentería o enfermedad diarreica. Específicamente dicha enfermedad enteral se refiere a una enfermedad infecciosa del colon. Los síntomas específicos incluyen diarrea sangrienta, llena de moco; dolor abdominal; fiebre y pérdida de líquidos del cuerpo. Enfermedad diarreica se refiere a enfermedades que producen tres o más deposiciones sueltas o líquidas por día, o a tener más heces de lo que es normal para esa persona. Se entiende que un patógeno enteral causa una enfermedad enteral en un sujeto, ya sea por infección con dicho patógeno, o por intoxicación del sujeto con una toxina, en particular una enterotoxina.

45 Hay muchas causas de enfermedades entéricas infecciosas, como disentería o diarrea, que incluyen virus, bacterias, hongos y parásitos. Se proporcionan los siguientes ejemplos: El norovirus es la causa más común de diarrea vírica en adultos, pero el rotavirus es la causa más común en niños menores de cinco años de edad. Los adenovirus tipo 40 y 41, y los astrovirus causan un número significativo de infecciones. La bacteria *Campylobacter* es una causa común de disentería bacteriana o diarrea, pero las infecciones por *Salmonellae*, *Shigellae* y algunas cepas de *Escherichia coli* (*E. coli*) son frecuentes en algunos territorios. En los ancianos, en particular los que han sido tratados con antibióticos para infecciones no relacionadas, una toxina producida por *Clostridium difficile* a menudo provoca diarrea severa. Ejemplos de parásitos incluyen *Giardia lamblia*, que puede causar infecciones crónicas, y *Entamoeba histolytica*. El ejemplo de enfermedad entérica posiblemente tratada por la vacuna de la invención es la shigelosis y diarrea relacionada con ETEC.

55 El término "endógeno" como se emplea en la presente memoria con respecto a un plásmido significará el plásmido que se origina en una célula huésped particular. Un plásmido endógeno puede ser modificado genéticamente para

obtener un plásmido endógeno recombinante, por ejemplo mediante técnicas de recombinación para diseñar el plásmido *in situ*, es decir dentro de la célula huésped que aloja el plásmido endógeno nativo, o bien tras retirarlo de la célula huésped, someterlo a manipulación de laboratorio, y luego reintroducirlo en una célula huésped del mismo tipo. El fenotipo invasivo de *Shigella* es conferido específicamente por el plásmido de virulencia endógeno 220 kb, también llamado plásmido de invasión, o plásmido de invasión nativo o endógeno. El plásmido de invasión endógeno de *Shigella* se proporciona específicamente según la invención con fines de recombinación, ya sea como plásmido de invasión aislado o para recombinación *in situ*.

El término "esencial" como se emplea en la presente memoria con respecto a un gen se entiende que se refiere a un gen necesario para que un organismo vivo sobreviva, por ejemplo para que una célula bacteriana se replique. La mutación de un gen esencial, como una delección y/o inactivación, produciría un fenotipo letal o una célula no replicable. Los genes esenciales de *Shigella* se pueden mutar para eliminar el gen del cromosoma de *Shigella*, y posteriormente incorporar el gen en el plásmido de invasión para estabilizar el plásmido de invasión. Esto proporciona el cultivo de una *Shigella* con un plásmido de invasión endógeno recombinante estable. Entre los genes esenciales de *Shigella* se encuentran los genes *ppa*, *accD*, *acpS*, *dapE*, *era*, *frr*, *ftsI*, *ftsL*, *ftsN*, *ftsZ*, *infA*, *lgt*, *lpxC*, *msbA*, *murA*, *murI*, *nadE*, *parC*, *proS*, *pyrB*, *RpsB*, *trmA*, *rho* y *rhoL*.

En la presente memoria la "inactivación" de un gen siempre se entiende que se refiere a la modulación a la baja transitoria, inducible o constitutiva de un gen, para reducir o inhibir la expresión de un producto génico. Esto se puede hacer específicamente por mutación de un gen o una secuencia reguladora operativamente unida al gen, como promotores, potenciadores, etc. que regulan la expresión de un gen. Entre las mutaciones de inactivación se encuentran particularmente aquellas que resultan en la reducción o supresión de la expresión de polinucleótidos o genes, por ejemplo genes que codifican factores de virulencia, o que conducen a la expresión de las respectivas proteínas no funcionales, por ejemplo factores de virulencia no funcionales.

El término "invasivo" o "no invasivo" como se emplea en la presente memoria con respecto a un gen se entiende de la siguiente manera. Las bacterias patógenas invasivas son capaces de invadir células eucariotas. Por ejemplo, después de la invasión, *Shigella* puede multiplicarse intracelularmente y propagarse a las células epiteliales vecinas, dando como resultado en la destrucción tisular y la patología característica de la shigelosis. Entre los genes que median la invasividad de *Shigella* se incluyen por ejemplo los genes *ipa* que codifican antígenos plasmídicos de invasión. La delección y/o inactivación de al menos uno de dichos genes puede conducir a una *Shigella* no invasiva.

La prueba de Sereny es una prueba estándar para determinar la invasividad de organismos como *Shigella* o *Escherichia coli*. (Wood et al. J. Clin. Microbiol. 24: 498-500, 1986). Se realiza mediante la inoculación de una suspensión de bacterias en el ojo de un conejillo de indias. Una conjuntivitis mucopurulenta severa y queratitis severa indican una prueba positiva.

El término "aislado" o "aislamiento" como se emplea en la presente memoria con respecto a un ácido nucleico, y en particular con respecto a un vector, plásmido y específicamente al plásmido de invasión de *Shigella*, se referirá a un compuesto que ha sido suficientemente separado del medio con el que naturalmente estaría asociado, de manera que existe en forma "sustancialmente pura". El término "sustancialmente puro" o "purificado" como se emplea en la presente memoria se referirá a una preparación que comprende al menos 50% (p/p), preferiblemente al menos 60%, 70%, 80%, 90% o 95% de un compuesto, como una molécula de ácido nucleico o un plásmido. La pureza se mide por métodos apropiados para el compuesto (por ejemplo métodos cromatográficos, electroforesis en gel de poliacrilamida, análisis de HPLC, y similares).

"Aislado" no significa necesariamente la exclusión de mezclas artificiales o sintéticas con otros compuestos o materiales, o la presencia de impurezas que no interfieren con la actividad fundamental, y que pueden estar presentes, por ejemplo, debido a una purificación incompleta. En particular, también se pretende que las moléculas de ácido nucleico aisladas de la presente invención incluyan aquellas sintetizadas químicamente.

Con referencia al plásmido de invasión aislado descrito en la presente memoria, este término se refiere a un plásmido que está separado del citoplasma en el que se originó. Un "plásmido aislado" puede además representar un plásmido producido directamente por medios biológicos o sintéticos, y separado de otros componentes presentes durante su producción.

El término "mutagénesis" con respecto a un gen como se emplea en la presente memoria significará la mutación de una secuencia genética, en particular una delección, sustitución, inserción de al menos un nucleótido, o cualquier combinación de las mismas, para obtener un gen mutado. Esto se referirá particularmente a un gen entero o a una parte significativa del mismo, por ejemplo una delección de al menos el 50% del gen. Los términos "mutagénesis" y "mutación" se emplean indistintamente en la presente memoria.

El término "rugosa" con respecto a una bacteria gram negativa, como *Shigella*, significa distinto de lisa, e incluirá específicamente bacterias "ligeramente rugosas" (es decir, síntesis del antígeno O regulada a la baja) o bacterias "intensamente rugosas". El término "rugosa" como se emplea en la presente memoria puede incluir características como una morfología de colonia irregular, y puede incluir por ejemplo una morfología ondulada y/o lobular. El término específicamente significa que una cepa es incapaz y/o sustancialmente incapaz de producir polisacárido O.

Un polímero de glicano repetitivo contenido dentro de un LPS se denomina antígeno O, polisacárido O, o cadena O- (lateral) de la bacteria. El antígeno O está unido al oligosacárido central, y comprende el dominio más externo de la molécula de LPS. La presencia o ausencia de las cadenas O determina si el LPS se considera rugoso o liso. Las cepas bacterianas con estructuras de antígeno O alteradas cambian su apariencia de liso a mate cuando se cultivan en placas de agar. Las cadenas O de longitud completa hacen que el LPS sea liso, mientras que la ausencia o reducción de cadenas O hace que el LPS sea rugoso. Las bacterias "lisas" incluyen el núcleo completo y el antígeno O. Las bacterias "rugosas" incluyen una falta de antígeno O de LPS, lo que significa que no hay antígeno O o hay una longitud de cadena reducida de antígeno O o hay un número reducido de cadenas LPS lisas. El término "ligeramente rugosa" se refiere a un subgrupo de bacterias rugosas, que tienen una longitud de cadena reducida de antígeno O o un número reducido de cadenas LPS lisas. Las bacterias "intensamente rugosas" han perdido partes del núcleo LPS, por lo tanto carecen de los antígenos O también.

El término "ausencia de antígenos O de LPS" como se emplea en la presente memoria con respecto a *Shigella* rugosa se referirá específicamente a menos de 50%, o menos de 40%, o menos de 30%, o menos de 20%, o menos de 10% , o esencialmente ninguno o ningún antígeno O de LPS como se determina en un ensayo estándar.

Se puede utilizar una prueba estándar para determinar las características rugosas de una cepa.

Por ejemplo, el fenotipo de mutantes de LPS se puede determinar por ejemplo por separación con SDS-PAGE de LPS y tinción con plata o pruebas de aglutinación utilizando suero inmune específico del serotipo.

La *Shigella* rugosa se puede producir por atenuación, por ejemplo por mutación de al menos un gen o una parte significativa del mismo, por delección y/o inactivación, este gen está implicado en la síntesis, transporte y/o expresión de LPS, preferiblemente seleccionado del grupo que consiste en genes del complejo del operón *rfb*, o uno o más genes dentro del complejo génico *rfb/wbb* que codifica la síntesis del antígeno O, *waaL* que codifica la ligasa del antígeno O, *wzx* que codifica la flipasa del antígeno O implicada en el transporte del antígeno O, *wzy/rfc* implicados en la polimerización del antígeno O, los genes del complejo génico *rfa/waa* que codifican la síntesis del núcleo de LPS, los genes reguladores que afectan a la expresión del antígeno O, tales como *rfaH*, o la pérdida de función que resulta en una reducción de al menos 90% en la expresión de antígenos O.

Ejemplos específicos de genes implicados en la síntesis de azúcares de LPS son *rfaA*, B, D y C.

Ejemplos específicos de genes implicados en la transferasa de azúcares de LPS son *rfaF* y G.

Un ejemplo específico de un gen implicado en la polimerasa del antígeno O de LPS es *rfaC/wzy*.

El complejo del operón *rfb* se localiza o bien en el cromosoma o en el plásmido de invasión (*Shigella sonnei*). Los genes específicos en este complejo son los genes *rfb* F, D, C, E, J y/o I.

Como se emplea en la presente memoria, el término "recombinante" se refiere a una molécula o construcción que no ocurre naturalmente en una célula huésped. En algunas realizaciones, las moléculas de ácido nucleico recombinantes contienen dos o más secuencias naturales que están unidas entre sí de una forma que no ocurre naturalmente. Una proteína recombinante se refiere a una proteína que es codificada y/o expresada por un ácido nucleico recombinante. En algunas realizaciones, las "células recombinantes" expresan genes que no se encuentran de forma idéntica dentro de la forma nativa (es decir, no recombinante) de la célula y/o expresan genes nativos que están de otro modo anormalmente sobreexpresados, subexpresados y/o no se expresan en absoluto debido a la intervención humana deliberada. Las células recombinantes contienen al menos un polinucleótido o un polipéptido recombinante. La "recombinación", "recombinar", y generar un ácido nucleico "recombinado" abarcan generalmente el ensamblaje de al menos dos fragmentos de ácido nucleico. En ciertas realizaciones, las proteínas recombinantes y los ácidos nucleicos recombinantes permanecen funcionales, es decir, retienen su actividad o exhiben una actividad mejorada en la célula huésped. En cualquier caso una bacteria atenuada, tal como la *Shigella* atenuada de la invención se considera una célula recombinante. Una construcción de ácido nucleico, como un plásmido o un vector, un ácido nucleico (por ejemplo, un polinucleótido), un polipéptido, o una célula huésped se denomina en la presente memoria como "recombinante" cuando ocurre de forma no natural, artificial o modificada. Un plásmido de invasión recombinante de *Shigella* está diseñado especialmente para incorporar una delección y/o inactivación específica de uno, dos o más polinucleótidos o genes, como al menos una delección de genes que codifican antígenos plasmídicos de invasión, y/o comprende además uno o más genes heterólogos, tales como los genes que codifican antígenos protectores.

Un plásmido de invasión recombinante "estable" de *Shigella* es un plásmido *Shigella* que presenta una retención de al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, al menos 90% o más de 90% en un cultivo celular de *Shigella* bajo condiciones seleccionadas para mantener el plásmido en el cultivo celular. Un ejemplo específico de un plásmido de invasión recombinante estable de *Shigella* se refiere a una célula huésped de *Shigella* recombinante que ha sido mutada para eliminar y/o inactivar un gen esencial localizado en un locus cromosómico, e integrado en un locus del plásmido de invasión. Mientras que una *Shigella* sin el plásmido de invasión no crecería o no se replicaría, la *Shigella* que lleva el plásmido de invasión endógeno podría ser capaz de crecer y replicarse *in vivo*.

Como se emplea en la presente memoria, el término "vector" se refiere a un vehículo mediante el cual una secuencia de ADN o ARN, por ejemplo un gen extraño (heterólogo), se puede introducir en una célula huésped, con el fin de transformar el huésped y promover la expresión (por ejemplo la transcripción y traducción) de la secuencia introducida. Los plásmidos son los vectores preferidos descritos en la presente invención, en particular el plásmido de invasión de Shigella, que incluye específicamente un plásmido de invasión endógeno.

Los vectores comprenden normalmente el ADN de un agente transmisible, en el que se inserta ADN extraño. Una forma común de insertar un segmento de ADN en otro segmento de ADN implica el uso de enzimas llamadas enzimas de restricción que parten el ADN en sitios específicos (grupos específicos de nucleótidos) llamados sitios de restricción. Un "cassette" se refiere a una secuencia de ADN codificante o segmento de ADN que codifica para un producto de expresión que se puede insertar en un vector en sitios de restricción definidos. Los sitios de restricción de cassette se diseñan para asegurar la inserción del cassette en el marco de lectura apropiado. Generalmente, el ADN extraño se inserta en uno o más sitios de restricción del ADN del vector, y luego es transportado por el vector a una célula huésped junto con el ADN transmisible del vector. Un segmento o secuencia de ADN que tiene ADN insertado o añadido, como un vector de expresión, también se puede denominar una "construcción de ADN". Un tipo común de vector es un "plásmido", que generalmente es una molécula independiente de ADN de cadena doble, generalmente de origen bacteriano, que puede aceptar fácilmente ADN adicional (extraño) y que puede introducirse fácilmente en una célula huésped adecuada.

La Shigella de la presente invención preferiblemente comprende el plásmido de invasión endógeno recombinante utilizado como vector para expresar uno o más genes heterólogos. De este modo, según una realización preferida, la Shigella es una cepa "sin vector artificial", lo que significa que la cepa no comprende un plásmido artificial, además de cualquier plásmido endógeno (recombinante).

Un plásmido vector a menudo contiene ADN codificante y ADN promotor y tiene uno o más sitios de restricción adecuados para insertar ADN extraño. El ADN codificante es una secuencia de ADN que codifica una secuencia de aminoácidos particular para una proteína o enzima particular. El ADN promotor es una secuencia de ADN que inicia, regula, o de otro modo media o controla la expresión del ADN codificante. El ADN promotor y el ADN codificante pueden ser del mismo gen o de genes diferentes, y pueden provenir de los mismos o diferentes organismos. Los vectores de clonación recombinantes incluirán a menudo uno o más sistemas de replicación para clonar o expresar, uno o más marcadores para selección en el huésped, por ejemplo resistencia a los antibióticos, y uno o más cassettes de expresión. El término "sistema de expresión" significa una célula huésped y un vector compatible bajo condiciones adecuadas, por ejemplo para la expresión de una proteína codificada por ADN extraño transportado por el vector e introducido en la célula huésped.

Por lo tanto, la Shigella atenuada según la invención se utiliza específicamente en el desarrollo de una vacuna viva.

La Shigella atenuada se obtiene específicamente de una cepa virulenta de cualquiera de las especies de Shigella y serogrupos (serotipos). Por ejemplo, cualquiera de los siguientes grupos:

- Serogrupo A: *S. dysenteriae* (12 serotipos)
- Serogrupo B: *S. flexneri* (15 serotipos y subserotipos)
- Serogrupo C: *S. boydii* (18 serotipos)
- Serogrupo D: *S. sonnei* (1 serotipo)

La cepa de Shigella virulenta como se emplea en la presente memoria con el propósito de atenuación puede ser una cepa virulenta conocida clínicamente o una cepa que se identifica como que contiene factores de virulencia. Específicamente, la cepa se selecciona de cualquiera de *S. flexneri*, *S. sonnei*, *S. dysenteriae* y *S. boydii*, en particular *S. flexneri 2a*, como *S. flexneri 2a* 2457T (ATCC 700930, ADN=700930D-5), o CIP 107659 (Institute Pasteur, France).

La cepa de Shigella virulenta se puede modificar por métodos conocidos en la técnica que incluyen pasos seriados múltiples, atenuación sensible a la temperatura, mutación, o similares de modo que la cepa resultante es atenuada, específicamente avirulenta, no capaz de causar enfermedad en un sujeto.

En algunas realizaciones, la modificación de la cepa virulenta da como resultado la delección y/o inactivación de un gen, que incluye la reducción o supresión de la expresión de polinucleótidos o genes que codifican factores de virulencia o conduce a la expresión de factores de virulencia no funcionales.

Hay una serie de técnicas bien conocidas en la técnica para obtener mutaciones atenuantes, por ejemplo para reducir o suprimir la expresión de polinucleótidos. Por ejemplo, se puede introducir una mutación en un sitio predeterminado, como la región promotora o dentro de la secuencia codificante para producir una mutación sin sentido, usando tecnología de ADN recombinante. Las técnicas de ADN recombinante comprenden clonar el gen de interés, la modificación de la secuencia génica por mutagénesis de sitio dirigido, la digestión con enzimas de restricción seguida de religación y la subsiguiente sustitución del gen de tipo silvestre por el gen mutante.

Se conocen en la técnica técnicas de ADN recombinante estándar adecuadas y se describen entre otros en Sambrook et al., "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" (1989), 2nd Edition (Cold Spring Harbor Laboratory press).

5 Las mutaciones atenuantes se pueden realizar utilizando métodos bien conocidos en la técnica, que incluyen clonar la secuencia de ADN del gen de tipo silvestre en un vector, por ejemplo un plásmido, insertar opcionalmente un marcador seleccionable en la secuencia de ADN clonada o eliminar una parte de la secuencia de ADN, dando como resultado su inactivación. Se puede introducir una delección mediante, por ejemplo, cortar la secuencia de ADN utilizando enzimas de restricción que cortan en dos puntos en o justo fuera de la secuencia codificante y ligar juntos los dos extremos en la secuencia restante. Alternativamente, se puede construir un alelo mutante en el que las regiones flanqueantes de un gen diana se amplifican por separado y se enlazan directamente juntas en una reacción de PCR de solapamiento separada, con omisión de la secuencia diana intermedia. Un plásmido portador de la secuencia de ADN mutada se puede transformar en la bacteria mediante técnicas conocidas como electroporación transformación química o conjugación. Entonces es posible mediante una selección adecuada identificar un mutante en donde la secuencia de ADN inactivada se ha recombinado en el cromosoma de la bacteria y la secuencia de ADN de tipo silvestre se ha vuelto no funcional mediante recombinación homóloga.

Además, si se utilizó un gen de resistencia a antibióticos, generalmente se elimina de la bacteria antes de que se utilicen en una vacuna. Según el método de Datsenko et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 97, 6640-6645 (2000)) la mutagénesis se basa en el sistema recombinasa Red del bacteriófago lambda que permite la disrupción específica tanto de genes codificados en plásmidos como cromosómicos. La estrategia es reemplazar estos genes, por ejemplo con un gen de resistencia a los antibióticos seleccionable, que se genera por PCR usando cebadores con extensiones homólogas de 40-60 nt en el gen diana. La recombinación Red está mediada en estas secuencias homólogas. Después de la selección, el gen de resistencia a antibióticos también se puede eliminar utilizando un vector auxiliar que expresa la recombinasa FLP, que usa repeticiones directas FRT (diana de reconocimiento FLP) que flanquean el gen de resistencia a antibióticos.

25 En algunas realizaciones, se puede introducir una mutación en un sitio predeterminado en ADN cromosómico o extracromosómico, por ejemplo un plásmido, a través de una inserción, una delección, o una sustitución de un nucleótido por otro, como una mutación puntual, que conduce a un gen mutado que tiene una expresión reducida o no se expresa. La mutación debe producir una cepa de *Shigella* que tiene una capacidad reducida para causar disentería. Preferiblemente, la mutación es una mutación de delección, en la que la disrupción del gen es causada por la escisión de ácidos nucleicos. Dicha mutación se produce, por ejemplo, mediante la supresión de un tramo contiguo de pares de bases. Incluso las delecciones muy pequeñas tales como tramos de 10 pares de bases pueden hacer que el gen no codifique ninguna proteína o una proteína no funcional. Incluso la delección de un único par de bases puede conducir a ninguna proteína o a una proteína no funcional, ya que como resultado de tal mutación, los otros pares de bases ya no están en el marco de lectura correcto o se ha inhibido o disminuido la transcripción. Más preferiblemente, se elimina un tramo más largo por ejemplo 100 pares de bases o al menos la parte significativa de un gen, por ejemplo al menos 50% del gen. Aún más preferiblemente, se suprime todo el gen.

Las mutaciones bien definidas y realizadas deliberadamente que implican la delección de fragmentos o el gen completo, o combinaciones de las mismas, tienen la ventaja, en comparación a las mutaciones inducidas de forma convencional, de que no revertirán al tipo silvestre. Por lo tanto, en algunas realizaciones de la invención la cepa de la vacuna comprende una cepa de *Shigella* viva atenuada en la que una mutación en un gen que codifica un factor de virulencia comprende una delección o una inserción para interrumpir la secuencia de polinucleótidos que codifica el factor de virulencia de modo que no se produce ninguna proteína correspondiente o la proteína no es funcional.

Ejemplos de factores de virulencia seleccionados para diseñar una cepa de *Shigella* atenuada son *rfb*, *ipaB*, *ipaC* o *aroC*.

45 La atenuación puede llevarse a cabo, por ejemplo, suprimiendo y/o inactivando uno o más de los siguientes genes, o una parte (significativa) de los mismos, o cualquiera de los moduladores de dicho gen que efectúa la atenuación de dichos genes: *rfb*, *aroA*, *AroC*, *aroD*, *aroE*, *virG* e *ipaA-D*. Las cepas de *Shigella* atenuadas de la invención son cepas dobles mutantes o mutantes múltiples con al menos tres o más mutaciones atenuantes. Las combinaciones preferidas de genes diana para las mutaciones atenuantes incluyen al menos un gen *rfb* (por ejemplo los genes *rfb* F, D, C, E, J y/o I) y al menos un gen *ipa* (por ejemplo *ipaB*, *ipaC*).

Como alternativa a las mutaciones atenuantes que resultan de la ingeniería genética, también sería posible identificar cepas de origen natural de *Shigella* que son avirulentas o que comprenden una o más mutaciones preexistentes en un polinucleótido o gen que codifica un factor de virulencia que se pueden utilizar como cepas de la vacunas vivas. Estas cepas de *Shigella* de origen natural, una vez aisladas mediante técnicas estándar, se pueden someter a mutagénesis o técnicas de ADN recombinante adicionales para construir cepas dobles mutantes o múltiples.

Las técnicas para identificar bacterias que tienen una o más mutaciones en genes que codifican factores de virulencia son conocidas por un experto en la técnica. De acuerdo con esto, las técnicas rutinarias para la detección de cepas de *Shigella* que han sido mutadas por las técnicas descritas anteriormente incluyen Northern blot,

inmunotransferencia, PCR, ELISA y ensayos de citotoxicidad como se describe en otra parte de la presente memoria. Las cepas mutantes sin genes funcionales que codifican factores de virulencia específicos se pueden seleccionar fácilmente utilizando técnicas estándar.

5 Los genes que codifican los factores de virulencia que van a ser atenuados pueden ser transmitidos por plásmidos. Por lo tanto, en algunas realizaciones la modificación de una cepa de *Shigella* virulenta comprende mutar uno o más plásmidos de *Shigella* endógenos. El término "plásmido", se refiere específicamente a ADN citoplasmático que se replica independientemente del cromosoma bacteriano. Se puede prever la mutación de partes del plásmido de virulencia o de invasión de *Shigella* o incluso la eliminación de un plásmido. Sin embargo, se prefiere que la *Shigella* atenuada siga comprendiendo el plásmido de invasión endógeno, más preferiblemente un plásmido de invasión estable. Esto asegura la estabilidad de la cepa atenuada, en particular con respecto a la pérdida potencial del plásmido de invasión por la célula atenuada, o la captación potencial de un plásmido de invasión (nativo) derivado de una *Shigella* de tipo silvestre, que puede ocurrir con una cepa inestable o un plásmido de invasión inestable.

15 El plásmido de invasión de *Shigella* es endógeno en la mayoría de las cepas de *Shigella*. Aunque el plásmido de invasión se puede perder al cultivar una cepa de *Shigella*, se puede diseñar para obtener uno recombinante que presente un alto nivel de estabilidad, lo que lo convierte en un objetivo atractivo para el desarrollo como vector útil para incorporar genes heterólogos que codifican antígenos, en particular antígenos protectores.

El plásmido de invasión recombinante descrito en la presente memoria obtenido en los ejemplos descritos de aquí en adelante tiene las características indicadas en las Figuras 5 y 10A.

20 El plásmido descrito en la presente memoria incluye derivados del mismo autónomamente replicables en *Shigella*. Este derivado puede ser uno que corresponde al plásmido de invasión del cual una parte distinta de la región responsable de la invasión se elimina del mismo, o uno que corresponde al plásmido de invasión del cual parte se inserta con otra secuencia de ADN (heteróloga). De este modo se puede obtener un vector lanzadera adecuado autónomamente replicable en *Shigella*. Dicho vector se puede utilizar en cualquiera de las cepas de la vacunas de *Shigella* vivas atenuadas según la invención, o en cualquier otra bacteria capaz de incorporar un plásmido de invasión, incluyendo *Escherichia enteroinvasiva*.

25 El plásmido de invasión de *Shigella* endógeno está bien descrito en la técnica, y este conocimiento describe la selección de sitios para recombinación en tales plásmidos, así como las condiciones de propagación apropiadas, por ejemplo en la posición entre los nucleótidos 10387-103328 entre los genes IS100 e *ipaJ* (estas posiciones se determinan para el plásmido de invasión pCP301 de la cepa de *Shigella flexneri 2a 301*)

30 El plásmido se utiliza preferiblemente como un plásmido de una sola copia.

El plásmido se puede suministrar de forma aislada, por ejemplo preparando una fracción de ADN del citoplasma de las células de *Shigella* por un método común para preparar un ADN plasmídico a partir de células. Además, la fracción de ADN se puede purificar mediante un método de centrifugación por gradiente de densidad, electroforesis en gel de agarosa y similares.

35 Para la construcción de un vector lanzadera, se puede usar toda la secuencia o una parte de la misma. Cuando se utiliza una parte de la misma, tal parte contiene normalmente la región responsable de la replicación del plásmido, pero puede excluirse una región innecesaria para la replicación. Por ejemplo, la región requerida para la replicación se puede determinar ligando una parte obtenida por digestión del plásmido con una enzima de restricción a un plásmido autónomamente replicable en *Shigella*, transformando otra bacteria, tal como otra cepa de *Shigella* o una cepa de *Escherichia*, con el plásmido recombinante obtenido, y determinar si el plásmido recombinante está albergado en el transformante.

45 La vacuna según la invención se puede formular utilizando técnicas conocidas para formular vacunas bacterianas atenuadas. La vacuna se presenta ventajosamente para administración oral, por ejemplo como una disolución acuosa o polvo seco para reconstituir en una disolución tampón adecuada antes de la administración. La reconstitución se efectúa ventajosamente en un tampón a un pH adecuado para asegurar la viabilidad de las bacterias. Con el fin de proteger las bacterias atenuadas y la vacuna contra la acidez gástrica, se administra ventajosamente un agente protector, tal como bicarbonato sódico con cada administración de la vacuna. Alternativamente la vacuna se presenta en forma encapsulada liofilizada.

50 Las cepas de la vacuna se pueden administrar en un vehículo farmacéuticamente aceptable, por ejemplo como un aerosol o mezclado en alimentos y/o agua o suministrado en mezcla con un portador, diluyente, adyuvante o excipiente adecuado tal como agua estéril, disolución salina fisiológica, glucosa o similares. Las cepas de la vacuna pueden contener sustancias auxiliares tales como agentes humectantes o emulsionantes, agentes amortiguadores de pH, adyuvantes, aditivos gelificantes o mejoradores de la viscosidad, conservantes, agentes saborizantes, colores, y similares, que dependen de la vía de administración y de la preparación deseada. Los vehículos farmacéuticos para la preparación de composiciones farmacéuticas y medicamentos son bien conocidos en la técnica, como se establece en libros de texto tales como "Remington's Pharmaceutical Sciences" (1990), 18th Edition (Mack Publishing Co.).

- Las cepas de la vacuna de la presente invención se pueden administrar en dosificaciones y mediante técnicas bien conocidas por los expertos en las técnicas médicas o veterinarias, teniendo en cuenta factores tales como la edad, sexo, peso, especie y condición del sujeto receptor y la vía de administración. La vía de administración puede ser percutánea, vía administración mucosal (por ejemplo, oral, nasal, anal, vaginal) o vía parenteral (intradérmica, intramuscular, subcutánea, intravenosa o intraperitoneal). Las cepas de la vacuna se pueden administrar solas, o se pueden coadministrar o administrarse secuencialmente con otros tratamientos o terapias. Las formas de administración pueden incluir suspensiones, jarabes o elixires, y preparaciones para administración parenteral, subcutánea, intradérmica, intramuscular o intravenosa (por ejemplo, administración inyectable) tal como suspensiones o emulsiones estériles.
- La vacuna se puede usar en la vacunación de un sujeto, particularmente un ser humano, o bien un mamífero de sangre caliente, que incluye específicamente cerdos.
- Una vez producida la cepa de la vacuna de la presente invención se puede administrar a un sujeto en el curso de una inmunoterapia activa, específicamente por vacunación, para prevenir la enfermedad enteral, específicamente disentería causada por *Shigella* y opcionalmente patógenos entéricos o diarreicos heterólogos. Esto puede conseguirse por medio de cualquiera de las vacunas de acuerdo con la invención, que son de protección cruzada y/o polivalentes.
- Una infección causada por *Shigella* y opcionalmente otro microorganismo, como microorganismos diarreicos que son diana de una vacuna de protección cruzada y/o polivalente de la invención, se puede por lo tanto prevenir o tratar administrando una dosis eficaz de la vacuna según la invención. La dosificación utilizada puede establecerse en última instancia a discreción del médico, pero dependerá de varios factores que incluyen el tamaño y el peso del sujeto y el tipo de vacuna formulada. Sin embargo, una dosificación que comprende la administración oral de desde 10^7 a 10^{11} , por ejemplo 10^8 a 10^{10} bacterias por dosis puede ser conveniente para un hospedador humano adulto de 70 kg.
- Una infección causada por *Shigella* y opcionalmente otro microorganismo, especialmente un patógeno, se puede por lo tanto prevenir o tratar administrando una dosis eficaz de la vacuna según la invención. La dosificación utilizada puede establecerse en última instancia a discreción del médico, pero dependerá de varios factores que incluyen el tamaño y el peso del sujeto y el tipo de vacuna formulada. Sin embargo, una dosificación que comprende la administración oral de desde 10^7 a 10^{11} , por ejemplo 10^8 a 10^{10} bacterias por dosis puede ser conveniente para un hospedador humano adulto de 70 kg.
- Según ejemplos específicos, se construyeron mutantes atenuados isogénicos de una cepa de *S. flexneri* 2a prototipo. Los mutantes eran o bien incapaces de sintetizar antígenos O ($\Delta rfbF$) o - que representa un enfoque de vacunas bien probado - eran auxótrofos ($\Delta aroC$). La virulencia de estos mutantes en el modelo de pulmón de ratón mostraron un nivel comparable de atenuación. Posteriormente, aislamos derivados de ambos mutantes que carecían del plásmido de invasión que codifica Ipa (Rojo Congo negativo /CRN/ mutantes). La pérdida del fenotipo invasivo en estos últimos mutantes aumentó la atenuación aún más hasta un nivel indetectable. Se utilizaron esta serie de mutantes de *S. flexneri* 2a que carecen de antígenos O ($\Delta rfbF$ CRP), o proteínas ipa ($\Delta aroC$ CRN), o ambos ($\Delta rfbF$ CRN) o ninguno de estos antígenos ($\Delta aroC$ CRP) para inmunizar ratones con dosis subletales por vía intranasal. Posteriormente, los ratones fueron desafiados con dosis letales de cepas de tipo silvestre de *S. flexneri* 6 heteróloga (Fig. 1a) o *S. sonnei* (Fig. 1b). El mutante atenuado que expresa tanto ipa como antígenos O ($\Delta aroC$ CRP) no pudo proporcionar protección sobre el nivel observado en ratones vacunados de forma simulada. En contraste, el doble mutante que carece de los dos grupos inmunogénicos principales de antígenos provocó una alta protección contra ambas cepas heterólogas de desafío. Incluso la pérdida del plásmido de virulencia solamente ($\Delta aroC$ CRN) parecía mejorar la protección cruzada. Para corroborar estos resultados, se inmunizaron también grupos de ratones con variantes de Fase I (Ipa y antígeno O positivo) y Fase II (Ipa y antígeno O negativo) de un aislado de *S. sonnei*. La cepa de la vacuna de Fase II proporcionó una alta protección contra un desafío con *S. flexneri* 6, mientras que la inmunización con la cepa de Fase I completamente virulenta no proporcionó una supervivencia significativamente diferente de la proporcionada por la disolución salina (figura 1c).
- Para sustentar el concepto de que la protección cruzada mejorada se origina a partir de una mayor inmunogenicidad de antígenos menores con estos antecedentes mutantes (es decir tras la pérdida de antígenos dominantes - véase Fig. 2), se comparó la reactividad inmune de muestras de suero y de lavado broncoalveolar (LBA) obtenidas de ratones con ELISA en células bacterianas enteras que expresaron ambos o ninguno de los grupos antigénicos mayores (Fig. 3).
- Los LBA obtenidos de ratones vacunados con el mutante $\Delta aroC$ CRP (tanto ipa como O-antígeno positivo) eran más reactogénicos a la diana homóloga lisa invasiva, verificando que estos antígenos, de hecho, dominaban la respuesta inmune. Por el contrario, la pérdida de los antígenos inmunodominantes en la cepa de la vacuna ($\Delta rfbF$ CRN) dio como resultado una reactogenicidad mejorada a la cepa diana homóloga carente tanto de antígenos O como Ipa.
- Además, la cepa heteróloga de *S. sonnei* fue reconocida más fácilmente por el LBA obtenido de ratones vacunados con el doble mutante. Estos resultados corroboran que hay una carga más alta de anticuerpos mucosales contra aquellos antígenos menores compartidos que son accesibles en estas dianas. Curiosamente, este fenómeno no fue

evidente en el caso de IgG en suero (datos no mostrados), lo que apoya los hallazgos anteriores que demuestran que sIgA en lugar de IgG en suero media la protección en este modelo.

5 Los enfoques de vacunas actuales (en general así como para *Shigella* en particular) se basan en la utilización de antígenos inmunogénicos principales. Sin embargo, para evadir la respuesta inmune, la presión evolutiva ha seleccionado múltiples variantes inmunológicamente distintas de estos antígenos, que forman la base para clasificar patógenos en serotipos. La utilización de antígenos principales determinantes de serotipos puede por lo tanto conferir sólo protección parcial contra un patógeno, a menos que todos los serotipos se puedan incluir en la vacuna (por ejemplo en el caso de vacunas contra el poliovirus). La combinación de los serotipos más prevalentes puede proporcionar una protección relativamente amplia, sin embargo, esto podría ser transitorio debido al reemplazo de serotipos (es decir que serotipos menos comunes emergen llenando la brecha abierta por la erradicación de los serotipos de la vacuna). Esto requiere la optimización de la vacuna de vez en cuando, por ejemplo incluyendo serotipos adicionales en las vacunas multivalentes. Sin embargo, debido a fenómenos como la competencia antigénica y la interferencia así como las consideraciones económicas, el número máximo de serotipos que se abarcan es limitado.

15 Por otro lado, varios serotipos de un patógeno bacteriano dado comparten un gran número de antígenos conservados en su superficie. El hecho de que pudieran haber permanecido conservados implica que o bien no son accesibles en la superficie (antígenos no protectores) y/o su función es tan indispensable para la patogénesis que no permite ninguna modificación en su estructura antigénica. En ejemplo de esto son las proteínas de *Shigella* ipa, que están altamente conservadas (debido a su sofisticada función en la invasión) y muy inmunogénicas, aunque no pueden provocar protección cruzada, probablemente porque sólo se expresan en contacto con la célula diana, por lo tanto probablemente no son accesibles para un mecanismo protector mediado por anticuerpos.

20 Específicamente se muestra (Fig. 2.), que los antígenos inmunodominantes tales como Ipa y los antígenos O interceptan la respuesta inmune de forma que permiten que se produzcan menos anticuerpos frente a antígenos menores. Dado que las Ipa no son protectoras y los antígenos O son muy variables, *Shigella* puede evadir eficazmente la respuesta inmune. Mostramos, sin embargo, que la supresión de estas clases de antígenos altamente mejora el potencial de protección cruzada de las cepas de la vacuna vivas.

25 En cuanto a la mutación del plásmido de invasión, en lugar de seleccionar para el mutante de delección espontánea del plásmido de invasión basado en la pérdida de la positividad al Rojo Congo, se pueden eliminar los genes *ipaB* y C, mientras que el resto del plásmido está intacto.

30 Además, el plásmido se puede estabilizar mediante la implantación de un gen esencial, como *ppa*, desde el cromosoma al plásmido de invasión.

Además, la expresión de antígenos extraños (heterólogos), tales como las toxinas ETEC LTB y STa mutada (STm) son viables. STm preferiblemente contiene una o más mutaciones puntuales. La STm específicamente preferida es

NSSNYCCELCCXXACTGCY (SEQ ID 1),

35 en donde

X en la posición 12 es N, K o R, y/o

X en la posición 13 es P, G, L o F,

en donde STm excluye la secuencia de tipo silvestre:

NSSNYCCELCCNPACTGCY (SEQ ID 2).

40 Las combinaciones preferidas de mutaciones puntuales son N12K o N12R combinadas con P13F.

Además, los ejemplos muestran que la inmunogenicidad relativa de los antígenos conservados compartidos había aumentado en ausencia de los antígenos principales en la cepa de la vacuna. Como estas delecciones no sólo mejoran el espectro de protección sino que también hacen que la cepa de la vacuna sea altamente avirulenta, el doble mutante se considera muy seguro, incluso en dosis extremadamente altas. Además, las vacunas orales vivas son relativamente baratas de fabricar, y no requieren personal médico entrenado para su administración, que son factores importantes al considerar la población diana en países endémicos.

45 Se consideran aspectos presente invención el objeto de las siguientes definiciones:

1. Una vacuna de *Shigella* viva atenuada, que se basa en una cepa de *Shigella* rugosa que carece del antígeno O de LPS, preferiblemente una cepa no invasiva.

50 2. Vacuna según la definición 1, que se atenúa por mutagénesis de uno o más genes implicados en la síntesis, transporte y expresión de LPS, preferiblemente seleccionados del grupo que consiste en genes en el conjunto de *rfb* o uno o más genes del conjunto génico *rfb/wbb* que codifica la síntesis del antígeno O, *waaL* que codifica la ligasa

del antígeno O, *wzx* que codifica la flipasa del antígeno O implicada en el transporte del antígeno O, *wzy/rfc* implicado en la polimerización del antígeno O, genes dentro del caonjunto génico *rfa/waa* que codifica la síntesis del núcleo de LPS, genes reguladores que afectan a la expresión del antígeno O, tales como *rfaH*, o a la pérdida de función de la cual tiene como resultado una reducción de al menos 90% en la expresión de los antígenos O.

- 5 3. Vacuna según la definición 1 o 2, en donde dicha mutagénesis es por una deleción de uno o más de los genes *rfb* F, D, C, E, J y/o I, o una deleción de una parte de los mismos, o genes correspondientes en diversos serotipos de Shigella.
- 10 4. Vacuna según cualquiera de las definiciones 1 a 3, en donde dicha cepa de Shigella se selecciona del género Shigella, por ejemplo de cualquier serotipo o especie de Shigella, en particular *S. flexneri*, *S. sonnei*, *S. dysenteriae* y *S. boydii*.
- 15 5. Vacuna según cualquiera de las definiciones 1 a 4, en donde dicha Shigella expresa proteínas de la membrana externa de reacción cruzada.
6. Vacuna según cualquiera de las definiciones 1 a 5, que confiere protección cruzada contra diferentes serotipos y especies de Shigella, en particular contra cualquiera de *S. flexneri 2a*, *S. flexneri 6* y *S. sonnei*, o *Escherichia coli* enteroinvasiva.
7. Vacuna según cualquiera de las definiciones 1 a 6, en donde dicha Shigella es no invasiva por mutagénesis adicional del plásmido de invasión, en particular una deleción de los genes *ipaB* y/o *ipaC* y/u otros genes *ipa*.
- 20 8. Vacuna según cualquiera de las definiciones 1 a 7, en donde dicha Shigella comprende un plásmido de invasión endógeno recombinante que incorpora al menos un gen que codifica un antígeno heterólogo para secretar dicho antígeno o para expresar dicho antígeno, por ejemplo en la superficie de la célula bacteriana.
9. Vacuna según la definición 8, en donde dicho antígeno se selecciona del grupo que consiste en
- un antígeno bacteriano preferiblemente una toxina o un factor de colonización,
 - un antígeno viral, preferiblemente de un patógeno que provoca infecciones entéricas o mucosas,
 - un antígeno fúngico, preferiblemente de un patógeno que provoca infecciones entéricas o mucosas, y
- 25 - un antígeno parasitario, preferiblemente de un patógeno que causa infecciones entéricas.
10. Vacuna según la definición 9, en donde el antígeno bacteriano proviene de bacterias enteropatógenas, preferiblemente seleccionado del grupo que consiste en
- a. antígenos de *E. coli*, en particular una enterotoxina seleccionada del grupo que consiste en LTB, LTA mutada y ST de ETEC, subunidades, o fusiones de las mismas, antígenos de *E. coli* enteroagregante (EAEC), o toxina tipo Shiga 1 o 2
 - b. antígenos de *Campylobacter jejuni*,
 - c. antígenos de *Clostridium difficile*, específicamente las toxinas A y B
 - d. antígenos de *Vibrio cholera*, específicamente el antígeno CT-B, y
 - e. mutantes o proteínas de fusión de a), b) c) o d).
- 30
- 35 11. Vacuna según la definición 10, en donde dicha ETEC es una enterotoxina de fusión de LTB y ST mutante (STm), en particular una proteína de fusión que comprende una STm con una secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID 1.
12. Vacuna según la definición 10, en donde el antígeno viral proviene de virus diarreicos, preferiblemente seleccionados del grupo que consiste en rotavirus y calicivirus, tales como el virus de Norwalk.
- 40 13. Vacuna según la definición 10, en donde el antígeno parásito proviene de protozoos que causan diarrea, preferiblemente seleccionados del grupo que consiste en *Giardia lamblia*, especies de *Cryptosporidium* y *Entameba histolytica*.
14. Vacuna según la definición 10, en donde el antígeno fúngico proviene de hongos que causan diarrea, preferiblemente seleccionados del grupo que consiste en *Blastomyces dermatitidis* y *Histoplasma spp.*
- 45 15. Vacuna según cualquiera de las definiciones 1 a 14, donde dicha Shigella comprende además una deleción de un gen cromosómico esencial y una inserción de dicho gen en el plásmido de invasión, en particular el gen *ppa* o cualquiera de *accD*, *acpS*, *dapE*, *era*, *frr*, *ftsI*, *ftsL*, *ftsN*, *ftsZ*, *infA*, *lgt*, *lpxC*, *msbA*, *murA*, *murl*, *nadE*, *parC*, *proS*, *pyrB*, *rpsB*, *trmA*, *rho* y *rhoL*.

16. Vacuna según cualquiera de las definiciones 1 a 15, para uso en la inmunoterapia activa de un sujeto para prevenir enfermedades infecciosas, en particular una enfermedad entérica, tales como enfermedades diarreicas o disentería.
- 5 17. Vacuna para uso según la definición 16, en donde dicha enfermedad entérica es provocada por cualquier serotipo o especie de *Shigella*.
18. Vacuna para uso según la definición 16 o 17, en donde la inmunoterapia comprende la administración de la vacuna en una formulación mucosal u oral.
19. Vacuna para uso según cualquiera de las definiciones 16 a 18, en donde la vacuna se administra por vía oral o intranasal.
- 10 20. Vacuna para uso según cualquiera de las definiciones 16 a 19, en donde
- se utiliza una vacuna polivalente que expresa antígenos protectores de *Shigella* y al menos un patógeno de una especie distinta de *Shigella* mediante la incorporación de un antígeno protector de dicho patógeno en el plásmido de invasión endógeno, y en donde
 - dicha enfermedad infecciosa es causada por cualquier serotipo o especie de *Shigella* y/o dicho patógeno.
- 15 21. Cepa de *Shigella*, que es una cepa de *S. flexneri* 2a con una delección de los genes *rfbF*, *ipaB* y/o *ipaC*, o una delección de partes esenciales de los mismos.
22. Cepa de *Shigella* según la definición 21, que comprende un plásmido de invasión recombinante que incorpora al menos un gen que codifica un antígeno heterólogo para expresar dicho antígeno o secretar dicho antígeno.
- 20 23. Cepa de *Shigella* según la definición 21 o 22, que comprende además una delección de un gen cromosómico esencial y una inserción de dicho gen en el plásmido de invasión.
24. Un vector plasmídico recombinante basado en un plásmido de invasión de *Shigella* mutado que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica al menos un antígeno heterólogo, en donde el plásmido está mutado en al menos uno de los genes *ipaB* y/o *ipaC*.
- 25 25. Célula huésped bacteriana que comprende el vector según la definición 24, en donde dicha célula huésped se selecciona de los géneros *Shigella*, *Escherichia*, *Salmonella*, *Campylobacter* o *Yersinia*.
26. Célula huésped según la definición 25, en donde el vector es un plásmido de invasión endógeno.

La descripción anterior se entenderá más completamente con referencia a los siguientes ejemplos. Tales ejemplos son, sin embargo, meramente representativos y no deben ser interpretados como limitantes del alcance de la invención.

30 Ejemplos

Ejemplo 1 Preparación de una cepa de *Shigella* atenuada

Métodos

Cepas bacterianas y condiciones de cultivo

- 35 Las bacterias se cultivaron rutinariamente en caldo de Luria Bertani (LB) o placas de agar. Para la detección de un plásmido de invasión intacto que expresa las proteínas *ipa* se usaron placas de agar de soja trípticas (TSA) suplementadas con colorante Rojo Congo de 0,01% (Sigma-Aldrich). Los cultivos frescos siempre se iniciaron a partir de una colonia Rojo Congo positiva (CRP) que garantiza la presencia plásmidos. Donde los medios apropiados se suplementaron con la siguiente concentración de antibióticos: ampicilina 100 µg/ml, kanamicina 100 µg/ml, cloranfenicol 25 µg/ml.
- 40 La cepa 2 de *Shigella flexneri* 2a prototipo secuenciada (cepa 2457T, ATCC 700930) se utilizó como cepa parental para la mutagénesis. La inactivación de los genes *aroC* y *rfbF* se realizó mediante la técnica de recombinasa Red descrita anteriormente (Levine, M.M., et al. Nat. Rev. Microbiol. 5, 540-553 (2007)). La delección de *aroC* da como resultado un mutante auxótrofo incapaz de sintetizar compuestos aromáticos. *RfbF* participa en la síntesis de las subunidades del antígeno O, cuya pérdida da como resultado un fenotipo de LPS rugoso. Los oligonucleótidos
- 45 utilizados para la generación y confirmación de las mutaciones se proporcionan como la Tabla 1 complementaria en la Figura 4 (SEQ ID 3 - 10). Los mutantes 2457TΔ*aroC*::*kan* y 2457TΔ*rfbF*::*cat* se cultivaron posteriormente en placas de agar Rojo Congo (CR) para seleccionar las colonias CR-positivas (CRP) y CR-negativas (CRN). La pérdida de determinantes de virulencia codificados en el plásmido de invasión se confirmó por PCR. De manera similar, las variantes de fase I y fase II de *S. sonnei* se diferenciaron en placas de CR. La fase I es la designación
- 50 tradicional de cepas de *S. sonnei* de tipo silvestre portadoras de plásmidos de invasión, mientras que la fase II se

refiere a cepas que han perdido los plásmidos. Como la síntesis del antígeno O también está codificada en el plásmido de virulencia en esta especie, las variantes de fase II son tanto no invasivas como rugosas. Las cepas de tipo silvestre de *Shigella flexneri* 6 y *S. sonnei* utilizadas para los estudios de desafío se habían aislado de casos clínicos de disentería bacilar. Los serotipos se determinaron por aglutinación en placa utilizando sueros de clasificación comerciales (Mast Assure™; Mast Group Ltd., Merseyside, UK).

Experimentos en animales

Todos los estudios *in vivo* se realizaron en el modelo de pulmón de ratón anteriormente descrito (van de Verg et al., Infect Immun 63: 1947-1954, 1995). Se anestesiaron por vía intraperitoneal ratones BALB/c hembra de 6-8 semanas con una mezcla de 5 mg/ml de ketamina (Calipsol, Richter Gedeon, Hungary) y 0,3 mg/ml de xilazina (Primasine, Alfasan).

Las infecciones se realizaron por vía intranasal con 50 µl de inóculo (diluidos en disolución salina) que contenía la UFC requerida de bacterias. Los recuentos de bacterias se justificaron por medio de diluciones en serie en placa del inóculo. Se calcularon dosis de letalidad del 50 por ciento (valores LD50) a partir de infecciones mediante diluciones en serie de 0,5 log (10⁵-10⁸ UFC) según Reed y Muench (Oaks, EV, et al. Infect. Immun. 53: 57-63, 1986). Las vacunaciones se realizaron con dosis subletales de bacterias (10⁶ UFC de mutantes CRP y 10⁸ ufc de mutantes CRN de la cepa 2457T; 10^{5,5} UFC de fase I y 10^{7,5} UFC de fase II de *S. sonnei*) dos veces con intervalos de 2 semanas. El grupo de control recibió disolución salina. En un estudio piloto se ha demostrado que todas las cepas de la vacuna fueron eliminadas en 3 días p.i. Dos semanas después de la inmunización de refuerzo los ratones fueron desafiados con una dosis letal de una cepa de tipo silvestre de o bien *S. flexneri* 6 o *S. sonnei*.

Posteriormente, se monitorizó la letalidad durante 14 días. Alternativamente, los ratones inmunizados se sacrificaron dos semanas después del refuerzo y se recogieron el lavado broncoalveolar (LBA) y muestras de fluidos y sangre. Para la recolección de LBA se preparó la tráquea de ratones eutanasiados para la canulación con una aguja embebida y se inyectaron 200 µl de disolución salina y se retiró de los bronquios de cada ratón.

ELISA

Las bacterias inoculadas de placas CR frescas se cultivaron durante la noche en caldo LB. Se recubrieron placas de 96 pocillos (C.E.B., France) con 0,1 ml de suspensiones bacterianas lavadas (5x10⁸ UFC/ml) en tampón carbonato (pH 9,5) a 4°C. Al día siguiente, las placas se lavaron con PBS que contenía Tween 20 al 0,05% y luego se bloquearon con PBS que contenía BSA al 2% (Sigma-Aldrich) durante 1 h a temperatura ambiente. Las muestras de LBA y suero se diluyeron en PBS que contenía BSA al 0,5% y se incubaron con las placas recubiertas de antígeno durante 1 h a 37°C. Se llevaron a cabo diluciones en serie a través de las placas. Después de tres lavados, se sondaron las placas con inmunoglobulina anti-IgG de ratón (para IgG en suero) o anti-IgA de ratón (para muestras de LBA) conjugada con HRPO (Dako A/S, Denmark). El sustrato de ELISA era o-fenilendiamina (Sigma-Aldrich) disuelta en tampón de ácido cítrico que contenía H₂O₂. La OD se midió a 492 nm en un lector de placas ELISA convencional. La inmunoreactividad se expresó en relación con la reactividad de la muestra de LBA de Δ aro CRP a la misma dilución (1:10). Los promedios + error estándar de los promedios se calcularon a partir de 4 ensayos independientes.

Análisis estadístico

La dosis de 50% de letalidad se calculó con el método estadístico de Reed y Muench 6. El análisis estadístico de las curvas de supervivencia se realizó con la prueba LogRank (Mantel-Cox) utilizando GraphPad Prism versión 5.00 para Windows. Las cargas de IgA del LBA se compararon con el análisis no paramétrico de Mann-Whitney. El valor de *p* se consideró significativo si era inferior a 0,05.

Resultados

Basándose en las curvas de supervivencia de animales inmunizados con las cepas de la vacuna de *Shigella flexneri* 2457T (serotipo 2a) y desafiados con las cepas de *Shigella* de tipo silvestre, se observó un efecto protector sinérgico combinando la delección del gen *rfbF* con la pérdida del plásmido de invasión en el escenario de desafío heterólogo. Se consiguió una protección significativamente mejor mediante la inmunización con la cepa Δ *rfbF* de *Shigella flexneri* 2457T (2a) Rojo Congo negativa (CNR, con la delección del plásmido de invasión) con respecto a la cepa Δ *rfbF* de *Shigella flexneri* 2a Rojo Congo positiva (CNP, plásmido de invasión intacto) cuando los animales fueron desafiados con la cepa de *Shigella flexneri* 6 heteróloga (Fig. 1 b). En el caso de un desafío homólogo con la cepa de *Shigella flexneri* 544 de tipo silvestre (2a), ambas cepas de la vacuna eran igualmente protectoras, lo que sugiere que para el desafío homólogo incluso la delección del gen *rfbF* es suficiente (Fig. 1a). Es probable que la diferencia en la eficacia de la vacunación esté parcialmente relacionada con la dosis de exposición subletal más alta permitida con el doble mutante del plásmido invasión Δ *rfbF*, pero no totalmente responsable, ya que la cepa (de control) Δ aro CRN utilizada en una dosis de desafío comparable a del doble mutante, indujo una protección parcial en ambos experimentos de desafío homólogo y heterólogo (Fig. 1a, b).

Se proporciona evidencia adicional del efecto beneficioso de mutaciones que inactivan el gen *rfbF* y el plásmido de invasión que consiguen una protección significativa contra un desafío heterólogo utilizando cepas de la vacuna de

Shigella sonnei. La inmunización con la variante de Fase II de *Shigella sonnei* (eliminado el plásmido de invasión responsable de la expresión tanto del complejo de invasión como del gen *rfbF*) proporcionó una protección de alto nivel contra un desafío letal con la cepa *Shigella flexneri* 542 de tipo silvestre (serotipo 6), mientras que la variante de la fase I de la cepa de *S. sonnei* de tipo silvestre (plásmido de invasión intacto que porta el complejo de invasión y el gen *rfbF*) presentaba un efecto protector (estadísticamente no significativo) bajo (Fig. 1c).

Ejemplo 2: Preparación del mutante de *Shigella flexneri* 2a 2457 con una construcción génica sintética en el plásmido de invasión

El material de base para la construcción mutante es la cepa ATCC de *Shigella flexneri* 2a 2457T como se ha descrito anteriormente. La delección de los genes *rfbF* e *ipaB* e *ipaC* así como del gen *ppa* se realiza utilizando la técnica de recombinasa Red (Datsenko, K.A. & Wanner, B.L. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 97, 6640-6645 (2000)).

Etapa 1: el gen *rfbF* se eliminó del cromosoma. La falta de RfbF se asocia con un cambio fenotípico: la cepa de *Shigella* se vuelve "rugosa", un cambio morfológico típico que se puede detectar a simple vista en placas de agar. Este cambio fenotípico se observó, pero la eliminación exitosa del gen *rfbF* también se confirmó mediante análisis de PCR. Se basó en la diferente longitud del producto de PCR obtenido con ADN genómico de *Shigella* de tipo silvestre o mutada (Fig. 8).

Etapa 2: se eliminaron los genes *ipaB* e *ipaC* del plásmido de invasión. Estos genes son vecinos y se suprimieron juntos con la misma técnica de recombinasa Red aplicada a la delección del gen *rfbF*. Esta delección génica también da como resultado un fenotipo: la *Shigella* pierde la capacidad de absorber el tinte Rojo Congo y por lo tanto forma una colonia blanca sobre placas de agar que contienen Rojo Congo en contraste con *Shigella* que contiene el plásmido de tipo silvestre que es roja. Dado que *Shigella* puede perder sus plásmidos espontáneamente durante el cultivo *in vitro*, la delección de los genes *ipaB* e *ipaC* se confirmó mediante análisis PCR de los mutantes, y se basó en fragmentos de PCR más cortos obtenidos con los mutantes, en comparación con el plásmido de tipo silvestre (Fig. 9).

Etapa 3: La inserción del gen sintético que impulsa la expresión de las toxinas ETEC LT-B y ST, así como el trasplante de un gen esencial (*ppa*) del cromosoma al plásmido de invasión (véase la Figura 10A). La introducción exitosa del gen de fusión LTB-mST se demostró mediante la amplificación PCR de sitio específico de la región de manipulación genética (Fig. 10B). La expresión del gen de fusión de la toxina de *Shigella* se ensayó mediante inmunotransferencia (Fig. 10C). La eliminación del gen *ppa* del cromosoma (esencial para el crecimiento de *Shigella*) se demostró mediante PCR en base a una longitud más corta del amplión de la cepa de la vacuna final.

Todas las manipulaciones genéticas implicaron la inserción de genes de resistencia a los antibióticos. Después de cada etapa los genes responsables de la resistencia a los antibióticos se eliminaron con plásmidos auxiliares como se describe por Datsenko y Wanner (Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 97, 6640-6645 (2000)).

Ejemplo 3: Estudios de protección animal para ensayar la cepa mutante del Ejemplo 2

Se demostró la atenuación de la virulencia de las cepas mutantes isogénicas frente a su cepa parental de tipo silvestre en el modelo de shigelosis de pulmón de ratón. Se infectaron grupos de ratones por vía intranasal con 10 diluciones en serie (entre 10^6 y 10^8 ufc) de las diferentes cepas bacterianas con el fin de determinar la dosis letal mínima para cada cepa. En el caso de la cepa de tipo silvestre, se encontró una letalidad de 30, 50 y 100% en dosis de 10^6 , 10^7 , y 10^8 ufc/ratón, respectivamente. Por el contrario, ningún ratón murió por ninguno de los mutantes isogénicos 2457T Δ r**fb**, 2457T Δ ipaBC, o el doble mutante 2457T Δ r**fb** Δ ipaBC con cualquiera de las dosis ensayadas. Estos resultados sugieren una alta atenuación de la virulencia en todos los mutantes tras la delección de los genes correspondientes.

Posteriormente, se inmunizaron grupos de ratones en el mismo modelo con dosis subletales de o bien la cepa de tipo silvestre 2457T (5×10^5 ufc/ratón) o sus mutantes de delección isogénicos 2457T Δ r**fb**, 2457T Δ ipaBC, 2457T Δ r**fb** Δ ipaBC (todos a 10^8 ufc/ratón), o se inmunizan de forma simulada solamente con PBS. Se realizaron tres inmunizaciones idénticas con intervalos de 2 semanas. Una semana después del último refuerzo, los ratones fueron desafiados con una dosis letal (previamente optimizada) (2×10^6 ufc/ratón) de una cepa de *S. sonnei*. Como se representa en la Fig. 11, la inmunización con la cepa de tipo silvestre no pudo proporcionar protección, mientras que cada uno de los mutantes de un único locus (ya sea 2457T Δ r**fb** o 2457T Δ ipaBC) proporcionaron protección parcial, solamente. Por el contrario, el doble mutante (2457T Δ r**fb** Δ ipaBC) pudo proporcionar protección completa contra la infección por la especie heteróloga de *Shigella*.

LISTA DE SECUENCIAS

<110> EvellQure Biotechnologies GmbH

<120> una novedosa vacuna de Shigella viva atenuada

<130> EQ001P

<160> 29

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 19

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> antígeno bacteriano

<220>

<221> PÉPTIDO

<222> (12)..(12)

<223> X puede ser N, K o R en donde se excluye la Secuencia NSSNYCCELCNPACTGCY

<220>

<221> PÉPTIDO

<222> (13)..(13)

ES 2 636 897 T3

<223> X puede ser P, G, L o F, en donde se excluye la Secuencia NSSNYCCELCCNPACTGCV

<400> 1

Asn Ser Ser Asn Tyr Cys Cys Glu Leu Cys Cys Xaa Xaa Ala Cys Thr
1 5 10 15

Gly Cys Tyr

<210> 2

<211> 19

<212> PRT

<213> Escherichia Sp.

<400> 2

Asn Ser Ser Asn Tyr Cys Cys Glu Leu Cys Cys Asn Pro Ala Cys Thr
1 5 10 15

Gly Cys Tyr

<210> 3

<211> 63

<212> DNA

<213> artificial

<220>

<223> Oligonucleótido

<400> 3

cgcacgggct ggcgctcggc tgctgcatcg tccgatggtgt tccgtgtagg ctggagctgc 60

ttc 63

<210> 4

<211> 70

<212> DNA

<213> artificial

<220>

<223> Oligonucleótido

<400> 4

tatcagtctt cacatcggca ttttgcgcc gctgccgtaa catatgaata tctccttag 60

ttcctattaa 70

<210> 5

<211> 61

<212> DNA

<213> artificial

<220>

<223> Oligonucleótido

<400> 5

gaatagtaat atttacgctg tcattgtgac atataatccc ggtgtaggct ggagctgctt 60

c 61

<210> 6

<211> 68

<212> DNA

<213> artificial

<220>

<223> Oligonucleótido

<400> 6

gcattataac gaccgcccc agtaattcct cttattccca tatgaatata ctccttagtt 60

cctaattcc 68

<210> 7

<211> 22

<212> DNA

<213> artificial

<220>

<223> Oligonucleótido

<400> 7

gagccgtgat ggctggaaac ac 22

<210> 8

<211> 22

<212> DNA

<213> artificial

<220>

<223> Oligonucleótido

<400> 8

agcgcaatcg cggttttgtt ca 22

<210> 9

<211> 24

<212> DNA

<213> artificial

<220>

<223> Oligonucleótido

<400> 9

gggttactgg gtgccgcaat atcc 24

<210> 10

<211> 27

<212> DNA

<213> artificial

ES 2 636 897 T3

<220>

<223> Oligonucleótido

<400> 10

cctcaatcca gcattcgcca ttatacg 27

<210> 11

<211> 796

<212> DNA

<213> artificial

<220>

<223> Construcción

<400> 11

```

gctgccgtgg ttcaagtgcg gactaataaa aataatcagg ttgccatgat tcaatgtaca 60
cctttctcac attcgtctcc ggcatgaaaa cgatgcactc tttctttatc gctttcacta 120
cacattttat cctcgcgatgg atgttttata aaaaacatga ttgacatcat gttgcatata 180
ggttaaacia aacaagtggc gttatctttt tccggattgt cttcttgat gatatataag 240
ttttcctcga tgaataaagt aaaatgttat gttttattta cggcgttact atcctctcta 300
tgtgcatacg gagctcccca gtctattaca gaactatggt cggaatatcg caacacacia 360
atatatacga taaatgacia gatactatca tatacggaaat cgatggcagg caaaagagaa 420
atggttatca ttacatttaa gagcggcgca acatttcagg tcgaagtccc gggcagtcaa 480
catatagact cccaaaaaaa agccattgaa aggatgaagg acacattaag aatcacatat 540

ctgaccgaga ccaaaattga taaattatgt gtatggaata ataaaacccc caattcaatt 600
gcggaatca gtatggaaaa cgggocgggg cccaattctt ctaactactg ctgtgaactt 660
tgttgtaatt ttgcctgtac aggatgttac tagtttgctt taaaagcatg tctaagtcta 720
ggaacctata taacaactac tgtacttata ctaatgagcc ttatgctgca tttgaaaagg 780
cggtagagga tgcaat 796

```

<210> 12

<211> 147

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> Construcción

<400> 12

Met Asn Lys Val Lys Cys Tyr Val Leu Phe Thr Ala Leu Leu Ser Ser
 1 5 10 15

Leu Cys Ala Tyr Gly Ala Pro Gln Ser Ile Thr Glu Leu Cys Ser Glu
 20 25 30

Tyr Arg Asn Thr Gln Ile Tyr Thr Ile Asn Asp Lys Ile Leu Ser Tyr
 35 40 45

Thr Glu Ser Met Ala Gly Lys Arg Glu Met Val Ile Ile Thr Phe Lys
 50 55 60

Ser Gly Ala Thr Phe Gln Val Glu Val Pro Gly Ser Gln His Ile Asp
 65 70 75 80

Ser Gln Lys Lys Ala Ile Glu Arg Met Lys Asp Thr Leu Arg Ile Thr
 85 90 95

Tyr Leu Thr Glu Thr Lys Ile Asp Lys Leu Cys Val Trp Asn Asn Lys
 100 105 110

Thr Pro Asn Ser Ile Ala Ala Ile Ser Met Glu Asn Gly Pro Gly Pro
 115 120 125

Asn Ser Ser Asn Tyr Cys Cys Glu Leu Cys Cys Asn Phe Ala Cys Thr
 130 135 140

Gly Cys Tyr
 145

<210> 13
 <211> 799
 <212> DNA
 <213> artificial

<220>
 <223> Construcción

<400> 13

```

gctgcccgtgg ttcaagtcgc gactaataaa aataatcagg ttgccatgat tcaatgtaca      60
cctttctcac attcgtctcc ggcataaaaa cgatgcactc tttctttatc gctttcacta      120
cacatthttat cctcgcgatgg atgttttata aaaaacatga ttgacatcat gttgcatata      180
ggttaaaciaa aacaagtggc gttatctttt tccggattgt cttcttgtat gatataaag      240
ttttcctcga tgaataaagt aaaatgttat gttttattta cggcgttact atcctctcta      300
tgtgcatacg gagctcccca gtctattaca gaactatggt cggaatatcg caacacaciaa      360
atatatacga taaatgaciaa gatactatca tatacggaat cgatggcagg caaaagagaa      420
atggttatca ttacatthaa gagcggcgca acatttcagg tcgaagtccc gggcagtcaa      480
catatagact ccaaaaaaaaa agccattgaa aggatgaagg acacattaag aatcacatat      540
ctgaccgaga ccaaattga taaattatgt gtatggaata ataaaacccc caattcaatt      600
ggggcaatca gtatggaaaa cggcgggagg ggctccaatt cttctaacta ctgctgtgaa      660
ctttgttgta atggcgctg tacaggatgt tactagtttg ctttaaaagc atgtctaatg      720
ctaggaacct atataaciaa tactgtactt atactaatga gccttatgct gcatttgaaa      780
aggcggtaga ggatgcaat      799

```

<210> 14
 <211> 148
 <212> PRT
 <213> artificial

<220>
 <223> Construcción

<400> 14

```

Met Asn Lys Val Lys Cys Tyr Val Leu Phe Thr Ala Leu Leu Ser Ser
 1                    5                10                15

Leu Cys Ala Tyr Gly Ala Pro Gln Ser Ile Thr Glu Leu Cys Ser Glu
                20                25                30

Tyr Arg Asn Thr Gln Ile Tyr Thr Ile Asn Asp Lys Ile Leu Ser Tyr
                35                40                45

Thr Glu Ser Met Ala Gly Lys Arg Glu Met Val Ile Ile Thr Phe Lys
 50                55                60

Ser Gly Ala Thr Phe Gln Val Glu Val Pro Gly Ser Gln His Ile Asp

```

ES 2 636 897 T3

65					70						75				80
Ser	Gln	Lys	Lys	Ala	Ile	Glu	Arg	Met	Lys	Asp	Thr	Leu	Arg	Ile	Thr
				85					90					95	
Tyr	Leu	Thr	Glu	Thr	Lys	Ile	Asp	Lys	Leu	Cys	Val	Trp	Asn	Asn	Lys
			100					105					110		
Thr	Pro	Asn	Ser	Ile	Ala	Ala	Ile	Ser	Met	Glu	Asn	Gly	Gly	Gly	Gly
		115					120					125			
Ser	Asn	Ser	Ser	Asn	Tyr	Cys	Cys	Glu	Leu	Cys	Cys	Asn	Gly	Ala	Cys
	130					135					140				
Thr	Gly	Cys	Tyr												
145															

<210> 15
 <211> 799
 <212> DNA
 <213> artificial

<220>
 <223> Construcción

<400> 15

gctgccgtgg ttcaagtcgc gactaataaa aataatcagg ttgccatgat tcaatgtaca	60
cctttctcac attcgtctcc ggcatgaaaa cgatgcactc tttctttatc gctttcacta	120
cacattttat cctcgcgatgg atgttttata aaaaacatga ttgacatcat gttgcatata	180
ggttaaacaa aacaagtggc gttatctttt tccggattgt cttcttgtat gatataataag	240
ttttcctcga tgaataaagt aaaatgttat gttttattta cggcgttact atcctctcta	300
tgtgcatacg gagctcccca gtctattaca gaactatggt cggaatatcg caacacacaa	360
atatatacga taaatgacaa gatactatca tatacggaat cgatggcagg caaaagagaa	420
atggttatca ttacatttaa gagcggcgca acatttcagg tcgaagtccc gggcagtcga	480
catatagact cccaaaaaaa agccattgaa aggatgaagg acacattaag aatcacatat	540
ctgaccgaga ccaaaattga taaattatgt gtatggaata ataaaacccc caattcaatt	600
gcggaatca gtatggaaaa cggcggagggt ggctccaatt cttctaacta ctgctgtgaa	660
ctttgttgc gccctgcctg tacaggatgt tactagtttg ctttaaaagc atgtctaata	720
ctaggaacct atataacaac tactgtactt atactaatga gccttatgct gcatttgaaa	780
aggcggtaga ggatgcaat	799

ES 2 636 897 T3

<210> 16
 <211> 148
 <212> PRT
 <213> artificial

<220>
 <223> Construcción

<400> 16

```

Met Asn Lys Val Lys Cys Tyr Val Leu Phe Thr Ala Leu Leu Ser Ser
 1           5           10           15

Leu Cys Ala Tyr Gly Ala Pro Gln Ser Ile Thr Glu Leu Cys Ser Glu
           20           25           30

Tyr Arg Asn Thr Gln Ile Tyr Thr Ile Asn Asp Lys Ile Leu Ser Tyr
           35           40           45

Thr Glu Ser Met Ala Gly Lys Arg Glu Met Val Ile Ile Thr Phe Lys
 50           55           60

Ser Gly Ala Thr Phe Gln Val Glu Val Pro Gly Ser Gln His Ile Asp
65           70           75           80

Ser Gln Lys Lys Ala Ile Glu Arg Met Lys Asp Thr Leu Arg Ile Thr
           85           90           95

Tyr Leu Thr Glu Thr Lys Ile Asp Lys Leu Cys Val Trp Asn Asn Lys
           100          105          110

Thr Pro Asn Ser Ile Ala Ala Ile Ser Met Glu Asn Gly Gly Gly Gly
           115          120          125

Ser Asn Ser Ser Asn Tyr Cys Cys Glu Leu Cys Cys Arg Pro Ala Cys
130          135          140

Thr Gly Cys Tyr
145
    
```

<210> 17
 <211> 799
 <212> DNA
 <213> artificial

<220>
 <223> Construcción

<400> 17

ES 2 636 897 T3

gctgccgtgg ttcaagtcgc gactaataaa aataatcagg ttgccatgat tcaatgtaca	60
cctttctcac attcgtctcc ggcataaaaa cgatgcactc tttctttatc gctttcacta	120
cacatthttat cctcgcgatgg atgtthttata aaaaacatga ttgacatcat gttgcatata	180
ggthaaacaa aacaagtggc gttatctthtt tccggattgt cttcttgat gatataaag	240
thttctcga tgaataaagt aaaatgthtt gthttatthta cggcgthtact atcctctcta	300
tgtgcatacg gagctcccca gtctattaca gaactatgtht cggaatatcg caacacacaa	360
atatatacga taaatgacaa gatactatca tatacggaat cgatggcagg caaaagagaa	420
atgthtatca ttacatthta gagcggcgca acatthcagg tcaagtccc gggcagthca	480
catatagact cccaaaaaaa agccattgaa aggatgaagg acacatthag aatcacatat	540
ctgaccgaga ccaaaattga taaattatgt gtatggaata ataaaacccc caattcaatt	600
gcccgaatca gtatggaaaa cggcggaggtht ggctccaatt cttctaaacta ctgctgtgaa	660
ctthgttgta aacctgcctg tacaggatgt tactagthttg cththaaagc atgtctaatg	720
ctaggaacct atataacaac tactgtactt atactaatga gccttatgct gcatttgaaa	780
aggcggtaga ggatgcaat	799

<210> 18
 <211> 148
 <212> PRT
 <213> artificial

<220>
 <223> Construcción

<400> 18

Met Asn Lys Val Lys Cys Tyr Val Leu Phe Thr Ala Leu Leu Ser Ser
 1 5 10 15

Leu Cys Ala Tyr Gly Ala Pro Gln Ser Ile Thr Glu Leu Cys Ser Glu
 20 25 30

Tyr Arg Asn Thr Gln Ile Tyr Thr Ile Asn Asp Lys Ile Leu Ser Tyr
 35 40 45

Thr Glu Ser Met Ala Gly Lys Arg Glu Met Val Ile Ile Thr Phe Lys
 50 55 60

Ser Gly Ala Thr Phe Gln Val Glu Val Pro Gly Ser Gln His Ile Asp
 65 70 75 80

Ser Gln Lys Lys Ala Ile Glu Arg Met Lys Asp Thr Leu Arg Ile Thr
 85 90 95

Tyr Leu Thr Glu Thr Lys Ile Asp Lys Leu Cys Val Trp Asn Asn Lys
 100 105 110

Thr Pro Asn Ser Ile Ala Ala Ile Ser Met Glu Asn Gly Gly Gly Gly
 115 120 125

Ser Asn Ser Ser Asn Tyr Cys Cys Glu Leu Cys Cys Lys Pro Ala Cys
 130 135 140

Thr Gly Cys Tyr
 145

<210> 19
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> artificial

<220>
 <223> Cebador

<400> 19
 gtaagcacca caaccactgg 20

<210> 20
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> artificial

<220>
 <223> Cebador

<400> 20
 ccagcaatct gactggctgt cg 22

<210> 21
 <211> 77
 <212> DNA
 <213> artificial

<220>
 <223> Construcción

<400> 21

gccaaaatat tggcttccac tgagcttggga gacaatacta tccaagccat atgaatatcc 60
 tccttagttc ctaatcc 77

<210> 22
 <211> 65
 <212> DNA
 <213> artificial

<220>
 <223> Construcción

<400> 22

gtattaattg atttgcgct tgggatgctt ctttagatac ttggggtgta ggctggagct 60
 gcttc 65

<210> 23
 <211> 2854
 <212> DNA
 <213> artificial

<220>
 <223> Gen

<400> 23

ES 2 636 897 T3

atgcataatg taagcaccac aaccactggt tttcctcttg ccaaaatatt ggcttccact	60
gagcttgag acaatactat ccaagctgca aatgatgcag ctaacaaatt attttctctt	120
acaattgctg atcttactgc taacccaaat attaatacaa ctaatgcaca ctcaacttca	180
aatatattaa tccttgaact taaagcacca aagtcattaa atgcaagttc ccaactaacg	240
ctttaattg gaaaccttat tcaaatactc ggtgaaaaat ctttaactgc attaacaaat	300
aaaattactg cttggaagtc ccagcaacag gcaagacagc aaaaaaacct agaattctcc	360
gataaaatta acactcttct atctgaaact gaaggactaa ccagagacta tgaaaaacaa	420
attaataaac taaaaaacgc agattctaaa ataaaagacc tagaaaataa aattaaccaa	480
attcaaacia gattatccga actcgacca gagtcaccag aaaagaaaaa attaagccgg	540
gaagaaatac aactcactat caaaaaagac gcagcagtta aagacaggac attgattgag	600
cagaaaacc tgtcaattca tagcaactt acagataaat caatgcaact cgaaaaagaa	660
atagactctt tttctgcatt ttcaaacaca gcatctgctg aacagctatc aaccagcag	720
aatcattaa cgggacttgc cagtgttact caattgatgg caacctttat tcaactagtt	780
ggaaaaata atgaagaatc tttaaaaaat gatctggctc tattccagtc tctccaagaa	840
tcaagaaaaa ctgaaatgga gagaaaatct gatgagtatg ctgctgaagt acgtaaagca	900
gaagaactca acagagtaat gggttgtgtt gggaaaaatac ttggggcact ttaactatc	960
gtagtggtg ttgcagcagc tttttctgga ggagcctctc tagcactggc agctgttgg	1020
ttagctctta tggttacgga tgctatagta caagcagcga ccggcaattc cttcatggaa	1080
caagccctga atccgatcat gaaagcagtc attgaaccct taatcaaact ctttcagat	1140
gcatttacia aatgctcga aggcttgggc gtcgactcga aaaaagccaa aatgattggc	1200
tctattctgg gggcaatcgc aggcgctctt gtccatagttg cagcagtcgt tctcgtagcc	1260
actgttgta aacaggcagc agcaaaactt gcagaaaata ttggcaaaat aataggtaaa	1320
accctcacag accttatacc aaagtttctc aagaattttt cttctcaact ggacgattta	1380
atcactaatg ctgttgccag attaaataaa tttcttgggtg cagcgggtga tgaagtaata	1440
tccaaacaaa ttatttccac ccattttaaac caagcagttt tattaggaga aagtgttaac	1500
tctgccacac aagcgggag aagtgtcgtc tctgctgttt tccagaacag cgcgtcgaca	1560
aatctagcag acctgacatt atcgaaatat caagttgaac aactgtcaaa atatatcagt	1620
gaagcaatag aaaaattcgg ccaattgcag gaagtaattg cagatctatt agcctcaatg	1680

ES 2 636 897 T3

tccaactctc aggctaatag aactgatggt gcaaaagcaa ttttgcaaca aactactgct	1740
tgatacaaat aaggagaatg ttatggaaat tcaaaacaca aaaccaaccc agattttata	1800
tacagatata tccacaaaac aaactcaaag ttcttccgaa acacaaaaat cacaaaatta	1860
tcagcagatt gcagcgcata ttccacttaa tgtcggtaaa aatcccgtat taacaaccac	1920
attaaatgat gatcaacttt taaagttatc agagcagggt cagcatgatt cagaaatcat	1980
tgctcgcctt actgacaaaa agatgaaaga tcgttcagag atgagtcaca cccttactcc	2040
agagaacact ctggatattt ccagtctttc ttctaattgct gtttctttaa ttattagtgt	2100
agccgttcta ctttctgctc tccgcactgc agaaactaaa ttgggctctc aattgtcatt	2160
gattgcgctc gatgctacaa aatcagctgc agagaacatt gttcggcaag gcctggcagc	2220
cctatcatca agcattactg gagcagtcac acaagtaggt ataacgggta tcggtgccaa	2280
aaaaacgcat tcagggatta gcgacaaaa aggagcctta agaaagaacc ttgccactgc	2340
tcaatctctt gaaaaagagc ttgcaggctc taaattagggt ttaaataaac aaatagatac	2400
aaatatcacc tcaccacaaa ctaactctag cacaaaattt ttaggtaaaa ataaactggc	2460
gccagataat atatccctgt caactgaaca taaaacttct cttagttctc ccgatatttc	2520
tttgcaggat aaaattgaca ccagagaag aacttacgag ctcaatacc tttctgcgca	2580
gcaaaaacaa aacattggcc gtgcaacaat ggaaacatca gcogttgctg gtaatatatc	2640
cacatcagga gggcgttatg catctgctct tgaagaagaa gaacaactaa tcagtcaggc	2700
cagcagtaaa caagcagagg aagcatccca agtatctaaa gaagcatccc aagcgacaaa	2760
tcaattaata caaaaattat tgaatataat tgacagcatc aaccaatcaa agaattcgac	2820
agccagtcag attgctggta acattcgagc ttaa	2854

<210> 24
 <211> 938
 <212> DNA
 <213> artificial

<220>
 <223> Gen

<400> 24

ES 2 636 897 T3

aagtaaataa aacgттаатс асааgттtgt аатсgттtс атctcactat gaaaaatgсg 60
gctacggtta tggattttcc tgctctgtat accgtcttaa aactggcgaa aaaggaaaat 120
gaagacgaaa асааgсаааg асattсggсg сgagttggct атааacttg gcacttgттt 180
gccacatatt tttaaaggaa асаgacatga gcttactcaa сgtccctgсg ggtaaagatc 240
tgccggaaga catctacgtt gttattgaga tcccggctaa сgcagatccg atcaaatacг 300
aaatcgacaa агagagсggс gcactgttcg ttgaccgctt catgtccacc гсgatgttct 360
atccgtgcaa ctacggttac atcaaccaca ccctgtctct ggacggtgac ссgттgacг 420
tactggтccc gactccgtac ссgctgcagc ctggттctgt gatccgttgс сgtccgттg 480
ccgttctgaa аатgaccgac gaagccggтg ааgatgcaaa actggттgсg gttccgcaca 540
gcaagctgag саааgааtаc gatcacatta ааgacgтааа сgatctgcct gaactgctga 600
aagcgcaaat сgctcacttc ttсgagcact асаааgacct сgааааaggс ааgtggгtga 660
aagttgaagg ttgggaaaac gcagaagccg ctaaagctga аатсgттgct tccttcgagc 720
гсgcaaaгaa тааатааgtt cttctagcгc аатаaccctg аасgссggгc ttсgгттagt 780
ааggгттттt ttatgcccгc gataaataaa ctctctатtс сaccatcatt атtctcagсg 840
gttgcaaggc ttgaacggta агаасааgса ааcccгacca ссattттgct gttcatagcc 900
acttgctgga агttagccga cctcactcat actcaccg 938

<210> 25
<211> 90
<212> DNA
<213> artificial
<220>
<223> Cebador
<400> 25

ttattattgg tgaaaagatg ttсgсgаааа аactatagac аатсgттat gтаacгgatt 60
гсgттacatc gtgtaggctg gagctgcttc 90

<210> 26
<211> 100
<212> DNA
<213> artificial
<220>
<223> Cebador
<400> 26

ES 2 636 897 T3

tccatattctg caatcgcata aaaaactctg ctggcgttca caaatgtgca ggggtaaaac 60
gggggcacgc catatgaata tcctccttag ttctaatcc 100

<210> 27
<211> 22
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> Cebador

<400> 27
catagggttg tcctcgtcgg gg 22

<210> 28
<211> 22
<212> DNA
<213> artificial

<220>
<223> Cebador

<400> 28
gttttatcgc atgtatctcg cg 22

<210> 29
<211> 5
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> Péptido de enlace

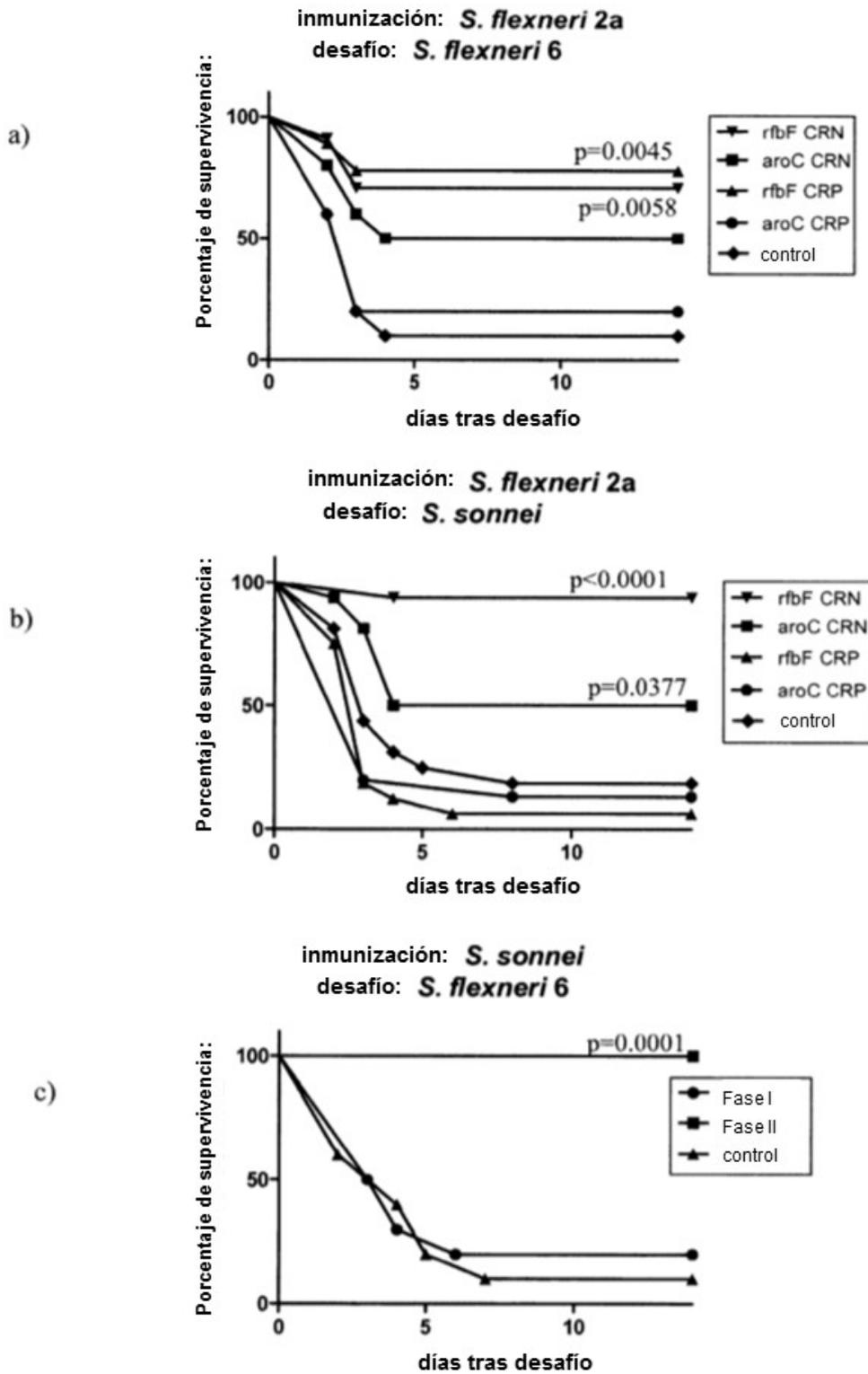
<400> 29

Gly Gly Gly Gly Ser
1 5

REIVINDICACIONES

1. Una vacuna de Shigella viva atenuada que confiere una protección cruzada contra diferentes serotipos y especies de Shigella que comprende una cepa de Shigella que es rugosa y no invasiva mediante una delección del gen *rfbF*, y una delección de los genes *ipaB* e *ipaC* en el plásmido de invasión.
- 5 2. Vacuna según la reivindicación 1, en donde dicha cepa de Shigella se selecciona del género Shigella, en particular *S. flexneri*, *S. sonnei*, *S. dysenteriae* y *S. boydii*.
3. Vacuna según la reivindicación 1 o 2, que confiere una protección cruzada contra cualquiera de *S. flexneri 2a*, *S. flexneri 6* y *S. sonnei*, o *Escherichia coli* enteroinvasiva.
- 10 4. Vacuna según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde dicho plásmido de invasión es un plásmido de invasión endógeno recombinante que incorpora al menos un gen que codifica un antígeno heterólogo para secretar dicho antígeno o para expresar dicho antígeno sobre la superficie celular bacteriana.
5. Vacuna según la reivindicación 4, en donde dicho antígeno se selecciona del grupo que consiste en
 - un antígeno bacteriano, preferiblemente una toxina o un factor de colonización,
 - un antígeno viral, preferiblemente de un patógeno que provoca infecciones entéricas o mucosas,
 - 15 - un antígeno fúngico, preferiblemente de un patógeno que provoca infecciones entéricas o mucosas, y
 - un antígeno parasitario, preferiblemente de un patógeno que causa infecciones entéricas.
6. Vacuna según la reivindicación 5, en donde el antígeno bacteriano es una enterotoxina (ETEC) que comprende la subunidad B de la toxina termolábil (LTB), la toxina termoestable (ST) o subunidades o fusiones de las mismas, preferiblemente LTB/STm que comprende una STm con una secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID 1
- 20 7. Vacuna según las reivindicaciones 1 a 6, en donde dicha Shigella comprende además una delección de un gen cromosómico esencial y una inserción de dicho gen en el plásmido de invasión.
8. Vacuna según las reivindicaciones 1 a 7, para uso en la profilaxis de un sujeto para prevenir enfermedades infecciosas.
- 25 9. Vacuna para uso según la reivindicación 8, para prevenir una enfermedad entérica.
10. Vacuna para uso según la reivindicación 8 o 9, donde la vacuna se administra por vía oral o intranasal.
11. Vacuna para uso según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, en donde
 - se utiliza una vacuna polivalente que expresa antígenos protectores de Shigella y al menos un patógeno de una especie distinta de Shigella mediante la incorporación de un antígeno protector de dicho patógeno en el
 - 30 plásmido de invasión endógeno, y en donde
 - dicha enfermedad infecciosa es provocada por cualquier serotipo o especie de Shigella y/o dicho patógeno.
12. Cepa de Shigella, que es una cepa de *S. flexneri 2a* que comprende una delección del gen *rfbF*, y los genes *ipaB* e *ipaC* en el plásmido de invasión.
- 35 13. Cepa de Shigella según la reivindicación 12, en donde dicho plásmido de invasión incorpora al menos un gen que codifica un antígeno heterólogo para expresar y/o secretar dicho antígeno.
14. Cepa de Shigella según la reivindicación 13, en donde el antígeno heterólogo es una enterotoxina bacteriana (ETEC) que comprende la subunidad B de la toxina termolábil (LTB), la toxina termoestable (ST) o subunidades o fusiones de las mismas, preferiblemente LTB/STm que comprende una STm con una secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID 1
- 40

Fig. 1



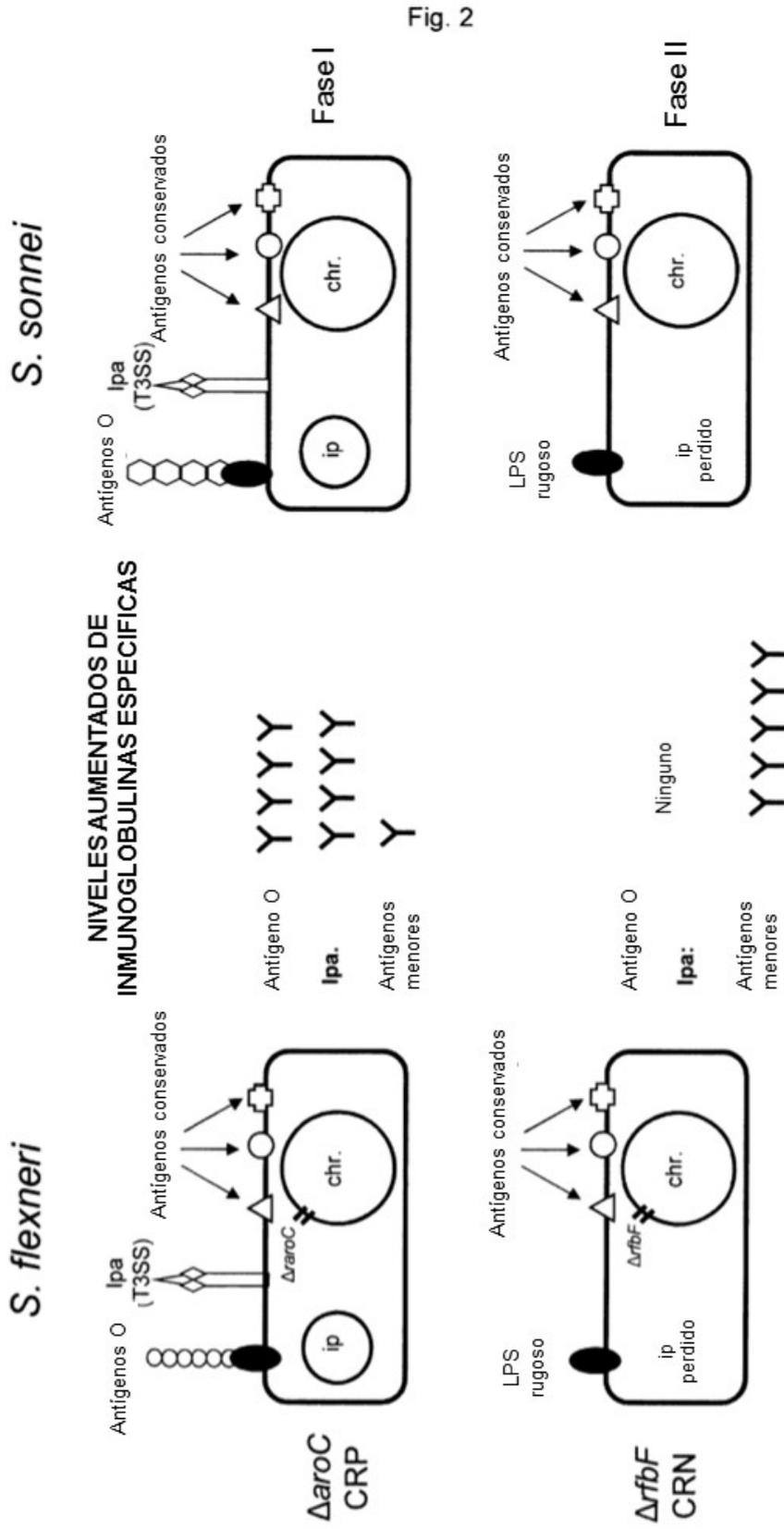


Fig. 2

Fig. 3

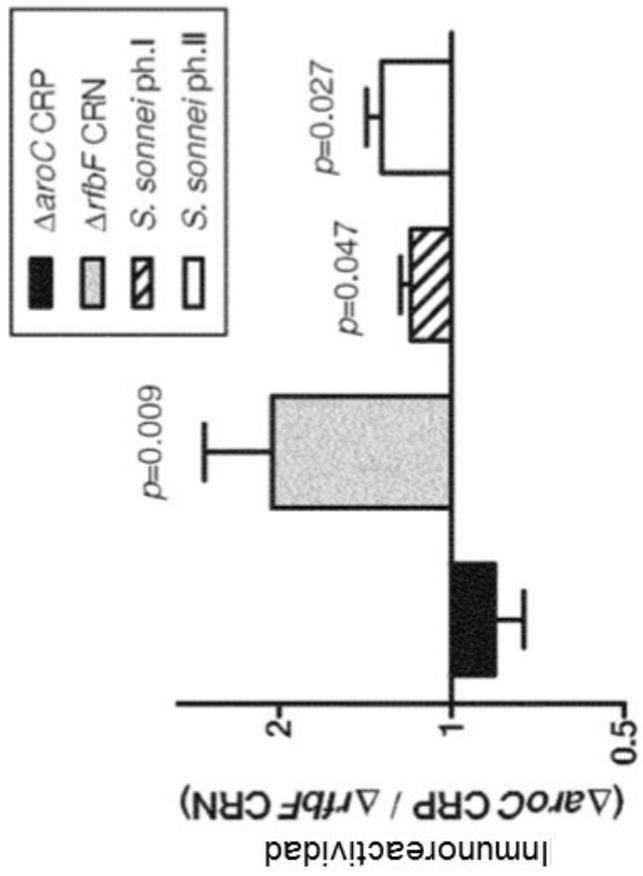


Fig. 4

Oligonucleótido	Función	Secuencia de oligonucleótidos ^a
aroCpKD-F	Producto de la amplificación PCR empleado para el intercambio alélico de <i>aroC</i>	5' CGC ACG GGC TGG CGC TCG GCT GCT GCA TCG TCG ATG GTG TTC <u>CGT</u> <u>GTA GGC TGG AGC TGC TTC</u> 3' (SEQ ID 3)
aroCpKD-R	Producto de la amplificación PCR empleado para el intercambio alélico de <i>aroC</i>	5' TAT CAG TCT TCA CAT CGG CAT TTT GCG CCC GCT GCC GTA <u>ACA TAT GAA</u> <u>TAT CCT CCT TAG TTC CTA TTA A</u> 3' (SEQ ID 4)
rfbFpKD-F	Producto de la amplificación PCR empleado para el intercambio alélico de <i>rfbF</i>	5' GAA TAG TAA TAT TTA CGC TGT CAT TGT GAC ATA TAA TCC CGG <u>TGT AGG</u> <u>CTG GAG CTG CTT C</u> 3' (SEQ ID 5)
rfbFpKD-R	Producto de la amplificación PCR empleado para el intercambio alélico de <i>rfbF</i>	5' GCA TTA TAA CGA CCG CCC CCA GTA ATT CCT CTT ATT <u>CCC ATA TGA</u> <u>ATA TCC TCC TTA GTT CCT AAT CC</u> 3' (SEQ ID 6)
aro-ko1	Confirmación del intercambio alélico en <i>aroC</i>	5' GAG CCG TGA TGG CTG GAA ACA C 3' (SEQ ID 7)
aro-ko2	Confirmación del intercambio alélico en <i>aroC</i>	5' AGC GCA ATC GCG GTT TTG TTC A 3' (SEQ ID 8)
rfbF-ko1	Confirmación del intercambio alélico en <i>rfbF</i>	5' GGG TTA CTG GGT GCC GCA ATA TCC 3' (SEQ ID 9)
rfbF-ko2	Confirmación del intercambio alélico en <i>rfbF</i>	5' CCT CAA TCC AGC ATT CGC CAT TAT ACG 3' (SEQ ID 10)

^a La secuencia subrayada es específica del plásmido auxiliar empleado para la amplificación del cassette de resistencia antibiótica para la mutagénesis

Fig. 5A, 5B, 5C

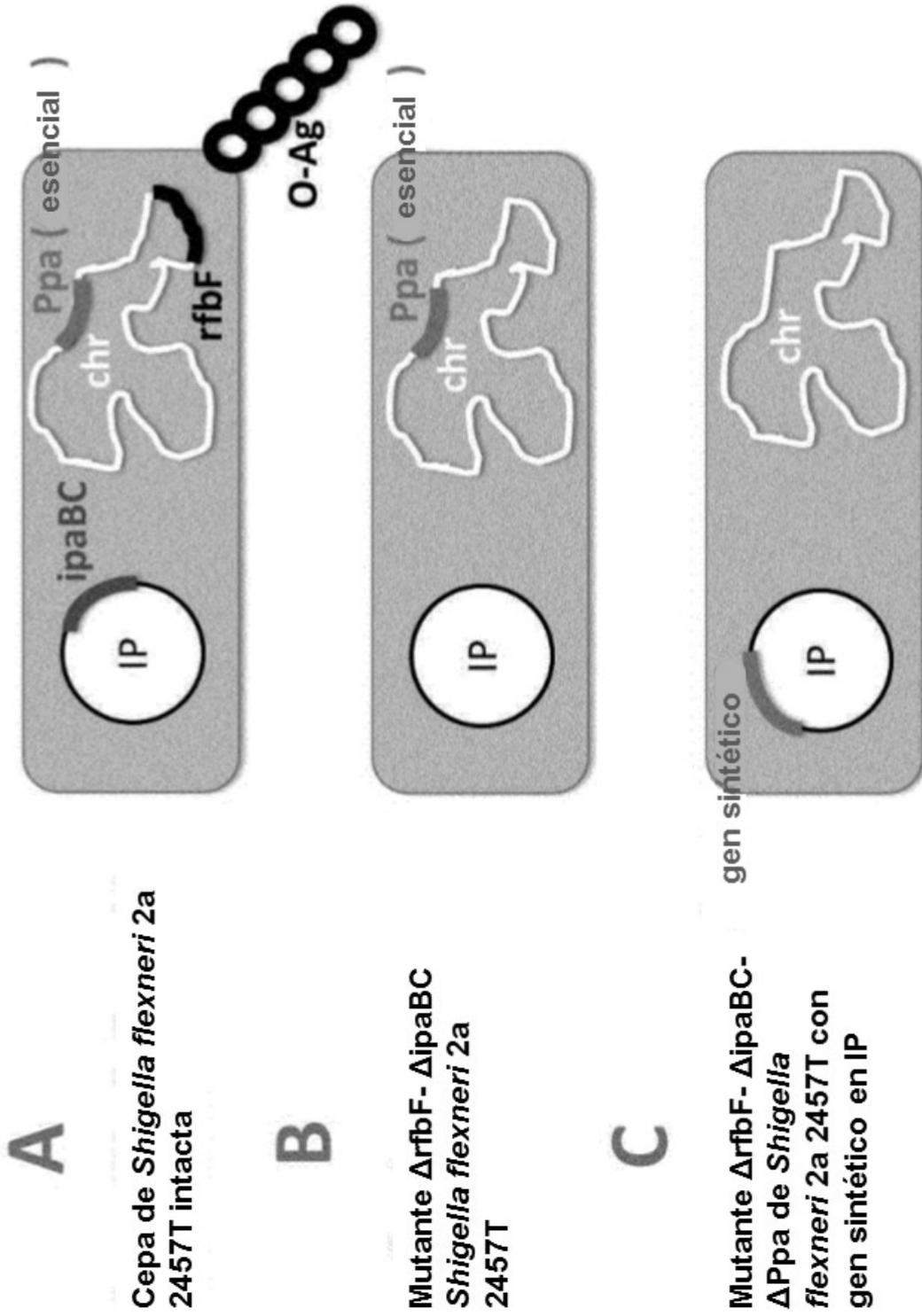


Fig. 6

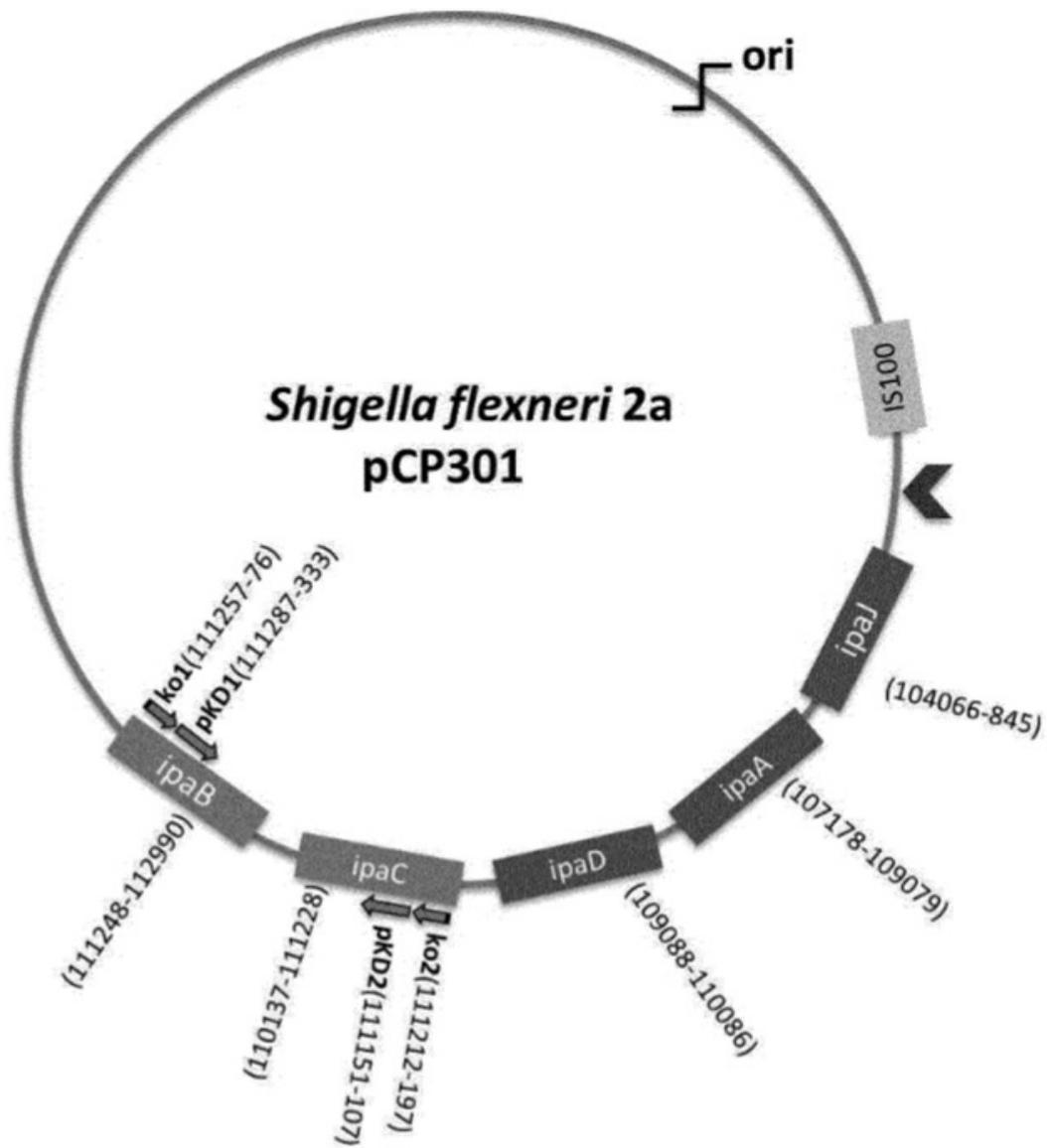


Fig. 7

>GP-P13F (SEQ ID 11)

GCTGCCGTGGTTCAAGTCGCGACTAATAAAAATAATCAGGTTGCCATGATTCAAT
GTACACCTTTCTCACATTCGTCTCCGGCATGAAAACGATGCACTCTTTCTTTATCG
CTTTCACTACACATTTTATCCTCGCATGGATGTTTTATAAAAAACATGATTGACATC
ATGTTGCATATAGGTTAAACAAAACAAGTGGCGTTATCTTTTTCCGGATTGTCTTCT
TGTATGATATATAAGTTTTCTCGATGAATAAAGTAAAATGTTATGTTTTATTTACG
GCGTACTATCCTCTCTATGTGCATACGGAGCTCCCCAGTCTATTACAGAACTATG
TTCGGAATATCGCAACACACAAAATATATACGATAAATGACAAGATACTATCATATA
CGGAATCGATGGCAGGCAAAGAGAAAATGGTTATCATTACATTTAAGAGCGGCGC
AACATTTCAAGTTCGAAGTCCCGGGCAGTCAACATATAGACTCCCAAAAAAAGCC
ATTGAAAGGATGAAGGACACATTAAGAATCACATATCTGACCGAGACCAAATTGA
TAAATTATGTGTATGGAATAATAAAACCCCAATTCAATTGCGGCAATCAGTATGG
AAAACGGGCGGGGCCCAATTCTTCTAACTACTGCTGTGAACTTTGTTGTAATTT
GCCTGTACAGGATGTTACTAGTTTGCTTTAAAAGCATGTCTAATGCTAGGAACCTA
TATAACAACACTGTACTTATACTAATGAGCCTTATGCTGCATTTGAAAAGGCGGT
AGAGGATGCAAT

>GP-P13F (SEQ ID 12)

MNKVKCYVLFALLSSL CAYGAPQSITELCSEYRNTQIYTINDKILSYTESMAGKREMV
IITFKSGATFQVEVPGSQHIDSQKKAIERMKDTRLITYLTETKIDKLCVWNNKTPNSIAAI
SMENGGPNSSNYCCELCCNFACTGCGY

>GS-P13G (SEQ ID 13)

GCTGCCGTGGTTCAAGTCGCGACTAATAAAAATAATCAGGTTGCCATGATTCAAT
GTACACCTTTCTCACATTCGTCTCCGGCATGAAAACGATGCACTCTTTCTTTATCG
CTTTCACTACACATTTTATCCTCGCATGGATGTTTTATAAAAAACATGATTGACATC
ATGTTGCATATAGGTTAAACAAAACAAGTGGCGTTATCTTTTTCCGGATTGTCTTCT
TGTATGATATATAAGTTTTCTCGATGAATAAAGTAAAATGTTATGTTTTATTTACG
GCGTACTATCCTCTCTATGTGCATACGGAGCTCCCCAGTCTATTACAGAACTATG
TTCGGAATATCGCAACACACAAAATATATACGATAAATGACAAGATACTATCATATA
CGGAATCGATGGCAGGCAAAGAGAAAATGGTTATCATTACATTTAAGAGCGGCGC
AACATTTCAAGTTCGAAGTCCCGGGCAGTCAACATATAGACTCCCAAAAAAAGCC
ATTGAAAGGATGAAGGACACATTAAGAATCACATATCTGACCGAGACCAAATTGA
TAAATTATGTGTATGGAATAATAAAACCCCAATTCAATTGCGGCAATCAGTATGG
AAAACGGCGGAGGTGGCTCCAATTCTTCTAACTACTGCTGTGAACTTTGTTGTAAT
GGCGCCTGTACAGGATGTTACTAGTTTGCTTTAAAAGCATGTCTAATGCTAGGAAC
CTATATAACAACACTGTACTTATACTAATGAGCCTTATGCTGCATTTGAAAAGGC
GGTAGAGGATGCAAT

>GS-P13G (SEQ ID 14)

MNKVKCYVLFALLSSL CAYGAPQSITELCSEYRNTQIYTINDKILSYTESMAGKREMV
IITFKSGATFQVEVPGSQHIDSQKKAIERMKDTRLITYLTETKIDKLCVWNNKTPNSIAAI
SMENGGGGSNSSNYCCELCCNFACTGCGY

Fig. 7 (continuación)

> GS-N12R (SEQ ID 15)

GCTGCCGTGGTTCAAGTCGCGACTAATAAAAATAATCAGGTTGCCATGATTCAAT
 GTACACCTTTCTCACATTTCGTCTCCGGCATGAAAACGATGCACTCTTTCTTTATCG
 CTTTCACTACACATTTTATCCTCGCATGGATGTTTTATAAAAAACATGATTGACATC
 ATGTTGCATATAGGTTAAACAAAACAAGTGCCGTTATCTTTTTCCGGATTGTCTTCT
 TGTATGATATATAAGTTTTCTCGATGAATAAAGTAAAATGTTATGTTTTATTTACG
 GCGTACTATCCTCTCTATGTGCATACGGAGCTCCCCAGTCTATTACAGAACTATG
 TTCGGAATATCGCAACACACAAATATATACGATAAATGACAAGATACTATCATATA
 CGGAATCGATGGCAGGCAAAAGAGAAATGGTTATCATTACATTTAAGAGCGGCGC
 AACATTTCAAGTTCGAAGTCCCGGGCAGTCAACATATAGACTCCCAAAAAAAGCC
 ATTGAAAGGATGAAGGACACATTAAGAATCACATATCTGACCGAGACCAAATTGA
 TAAATTATGTGTATGGAATAATAAAACCCCAATTCAATTGCGGCAATCAGTATGG
 AAAACGGCGGAGGTGGCTCCAATTCTTCTAACTACTGCTGTGAACTTTGTTGTGCG
 CCCTGCCTGTACAGGATGTTACTAGTTTGCTTTAAAAGCATGTCTAATGCTAGGAA
 CCTATATAACAACACTGTACTTATACTAATGAGCCTTATGCTGCATTTGAAAAGG
 CGGTAGAGGATGCAAT

> GS-N12R (SEQ ID 16)

MNKVKCYVLFALLSSLCAYGAPQSITELCSEYRNTQIYTINDKILSYTESMAGKREMV
 IITFKSGATFQVEVPGSQHIDSQKKAIERMKDTRLITYLTETKIDKLCVWNNKTPNSIAAI
 SMENGGGGSNSSNYCCELCCRPACTGCGY

> GS-N12K (SEQ ID 17)

GCTGCCGTGGTTCAAGTCGCGACTAATAAAAATAATCAGGTTGCCATGATTCAAT
 GTACACCTTTCTCACATTTCGTCTCCGGCATGAAAACGATGCACTCTTTCTTTATCG
 CTTTCACTACACATTTTATCCTCGCATGGATGTTTTATAAAAAACATGATTGACATC
 ATGTTGCATATAGGTTAAACAAAACAAGTGCCGTTATCTTTTTCCGGATTGTCTTCT
 TGTATGATATATAAGTTTTCTCGATGAATAAAGTAAAATGTTATGTTTTATTTACG
 GCGTACTATCCTCTCTATGTGCATACGGAGCTCCCCAGTCTATTACAGAACTATG
 TTCGGAATATCGCAACACACAAATATATACGATAAATGACAAGATACTATCATATA
 CGGAATCGATGGCAGGCAAAAGAGAAATGGTTATCATTACATTTAAGAGCGGCGC
 AACATTTCAAGTTCGAAGTCCCGGGCAGTCAACATATAGACTCCCAAAAAAAGCC
 ATTGAAAGGATGAAGGACACATTAAGAATCACATATCTGACCGAGACCAAATTGA
 TAAATTATGTGTATGGAATAATAAAACCCCAATTCAATTGCGGCAATCAGTATGG
 AAAACGGCGGAGGTGGCTCCAATTCTTCTAACTACTGCTGTGAACTTTGTTGAAA
 CCTGCCTGTACAGGATGTTACTAGTTTGCTTTAAAAGCATGTCTAATGCTAGGAAC
 CTATATAACAACACTGTACTTATACTAATGAGCCTTATGCTGCATTTGAAAAGGC
 GGTAGAGGATGCAAT

>-GS-N12K (SEQ ID 18)

MNKVKCYVLFALLSSLCAYGAPQSITELCSEYRNTQIYTINDKILSYTESMAGKREMV
 IITFKSGATFQVEVPGSQHIDSQKKAIERMKDTRLITYLTETKIDKLCVWNNKTPNSIAAI
 SMENGGGGSNSSNYCCELCKPACTGCGY

lpa co1 (SEQ ID 19)

GTAAGCACCACAACCACTGG

Fig. 7 (continuación)

lpa co2 (SEQ ID 20)
 CCAGCAATCTGACTGGCTGTCG

lpa pKD1 (SEQ ID 21)
 GCCAAAATATTGGCTTCCACTGAGCTTGGAGACAATACTATCCAAGCCATATGAAT
 ATCCTCCTTAGTTCCTAATCC

lpa pKD2 (SEQ ID 22)
 GTATTAATTGATTTGTCGCTTGGGATGCTTCTTTAGATACTTGGGGTGTAGGCTGG
 AGCTGCTTC

lpaBC (SEQ ID 23)
 ATGCATAATGTAAGCACCAACCACTGGTTTTCTCTTGCCAAAATATTGGCTTC
 CACTGAGCTTGGAGACAATACTATCCAAGCTGCAAATGATGCAGCTAACAAATTAT
 TTTCTCTTACAATTGCTGATCTTACTGCTAACCAAAATATTAATACAATAATGCAC
 ACTCAACTTCAAATATATTAATCCCTGAACTTAAAGCACCAAGTCATTAATGCAA
 GTTCCCAACTAACGCTTTTAATTGGAAACCTTATTCAAATACTCGGTGAAAAATCTT
 TAACTGCATTAACAAATAAAATTACTGCTTGGAAAGTCCCAGCAACAGGCAAGACA
 GCAAAAAAACCTAGAAATTCTCCGATAAAATTAACACTCTTCTATCTGAACTGAAG
 GACTAACCCAGAGACTATGAAAAACAAATTAATAAACTAAAAAACGCAGATTCTAAA
 ATAAAAGACCTAGAAAATAAAATTAACCAAAATCAAACAAGATTATCCGAACTCGA
 CCCAGAGTCACCAGAAAAGAAAAAATTAAGCCGGGAAGAAATACAACACTCACTATC
 AAAAAAGACGCAGCAGTTAAAGACAGGACATTGATTGAGCAGAAAACCCTGTCAA
 TTCATAGCAAACCTTACAGATAAATCAATGCAACTCGAAAAAGAAATAGACTCTTTTT
 CTGCATTTTCAAACACAGCATCTGCTGAACAGCTATCAACCCAGCAGAAATCATTAA
 ACCGGACTTGCCAGTGTTACTCAATTGATGGCAACCTTTATTCAACTAGTTGGAAA
 AAATAATGAAGAATCTTTAAAAAATGATCTGGCTCTATTCCAGTCTCTCCAAGAATC
 AAGAAAACTGAAATGGAGAGAAAATCTGATGAGTATGCTGCTGAAGTACGTAAA
 GCAGAAGAACTCAACAGAGTAATGGGTTGTGTTGGGAAAATACTTGGGGCACTTT
 TAACTATCGTTAGTGTGTTGCAGCAGCTTTTTCTGGAGGAGCCTCTCTAGCACTG
 GCAGCTGTTGTTTAGCTCTTATGGTTACGGATGCTATAGTACAAGCAGCGACCG
 GCAATTCCTTCATGGAACAAGCCCTGAATCCGATCATGAAAGCAGTCATTGAACC
 CTTAATCAAACCTCTTTCAGATGCATTTACAAAAATGCTCGAAGGCTTGGGCGTCTG
 ACTCGAAAAAGCCAAAATGATTGGCTCTATTCTGGGGGCAATCGCAGGCGCTCT
 TGTCCTAGTTGCAGCAGTCGTTCTCGTAGCCACTGTTGGTAAACAGGCAGCAGCA
 AAACCTTGCAGAAAATATTGGCAAATAATAGGTAACCCTCACAGACCTTATACC
 AAAGTTTCTCAAGAATTTTCTTCTCAACTGGACGATTTAATCACTAATGCTGTTGC
 CAGATTAATAAATTTCTTGGTGCAGCGGGTATGAAGTAATATCCAAACAAATTA
 TTTCCACCCATTTAAACCAAGCAGTTTTATTAGGAGAAAGTGTAACTCTGCCACA
 CAAGCGGGAGGAAGTGTGCTTCTGCTGTTTTCCAGAACAGCGCGTGCACAAAT
 CTAGCAGACCTGACATTATCGAAATATCAAGTTGAACAACACTGTCAAAATATATCAG
 TGAAGCAATAGAAAAATTTCGGCCAATTGCAGGAAGTAATTGCAGATCTATTAGCCT
 CAATGTCCAACCTCTCAGGCTAATAGAATGATGTTGCAAAAGCAATTTTGCACAA
 ACTACTGCTTGATACAAATAAGGAGAATGTTATGGAAATTCAAAACACAAAACCAA
 CCCAGATTTTATATACAGATATATCCACAAAACAACTCAAAGTTCTTCCGAAACAC
 AAAAAATCACAAAATTATCAGCAGATTGCAGCGCATATTCCAATTAATGTCGGTAAA
 AATCCCCTATTAACAACCACATTAATGATGATCAACTTTTAAAGTTATCAGAGCAG
 GTTCAGCATGATTCAGAAATCATTGCTCGCCTTACTGACAAAAAGATGAAAGATCG

Fig. 7 (continuación)

TTCAGAGATGAGTCACACCCTTACTCCAGAGAACACTCTGGATATTTCCAGTCTTT
CTTCTAATGCTGTTTCTTTAATTATTAGTGTAGCCGTTCTACTTTCTGCTCTCCGCA
CTGCAGAACTAAATTGGGCTCTCAATTGTCATTGATTGCGTTTCGATGCTACAAAA
TCAGCTGCAGAGAACATTGTTTCGGCAAGGCCTGGCAGCCCTATCATCAAGCATT
CTGGAGCAGTCACACAAGTAGGTATAACGGGTATCGGTGCCAAAAAACGCATTC
AGGGATTAGCGACCAAAAAGGAGCCTTAAGAAAGAACCTTGCCACTGCTCAATCT
CTTGAAAAAGAGCTTGCAGGTTCTAAATTAGGGTTAAATAAACAAATAGATACAAA
TATCACCTCACCAAACTAACTCTAGCACAAAATTTTTAGGTAAAAATAAACTGG
CGCCAGATAATATATCCCTGTCAACTGAACATAAACTTCTCTTAGTTCTCCCGAT
ATTTCTTTGCAGGATAAAATTGACACCCAGAGAAGAACTTACGAGCTCAATACCCT
TTCTGCGCAGCAAAAACAAAACATTGGCCGTGCAACAATGGAAACATCAGCCGTT
GCTGGTAATATATCCACATCAGGAGGGCGTTATGCATCTGCTCTTGAAGAAGAAG
AACAACTAATCAGTCAGGCCAGCAGTAAACAAGCAGAGGAAGCATCCCAAGTATC
TAAAGAAGCATCCCAAGCGACAAATCAATTAATACAAAAATTATTGAATATAATTGA
CAGCATCAACCAATCAAGAATTCGACAGCCAGTCAGATTGCTGGTAACATTCTGA
GCTTAA

PpA (SEQ ID: 24)

AAGTAAATAAAACGTTAATCACAAAGTTTGTAAATCGCTTTCATCTCACTATGAAAAAT
GCGGCTACGGTTATGGATTTTCTGCTCTGTATACCGTCTTAAACTGGCGAAAAA
GGAAAAATGAAGACGAAAACAAGCAAAGACATTCGGCGCGAGTTGGCTATAACT
TGGCACTTGTTTGCCACATATTTTTAAAGGAAACAGACATGAGCTTACTCAACGTC
CCTGCGGGTAAAGATCTGCCGGAAGACATCTACGTTGTTATTGAGATCCC GGCTA
ACGCAGATCCGATCAAAATACGAAATCGACAAAGAGAGCGGCGCACTGTTCTGTTGA
CCGCTTCATGTCCACCGCGATGTTCTATCCGTGCAACTACGGTTACATCAACCAC
ACCCTGTCTCTGGACGGTGACCCGGTTGACGTACTGGTCCC GACTCCGTACCCG
CTGCAGCCTGGTTCTGTGATCCGTTGCCGTCCGGTTGCCGTTCTGAAAATGACCG
ACGAAGCCGGTGAAGATGCAAACTGGTTGCGGTTCCGCACAGCAAGCTGAGCA
AAGAATACGATCACATTAAGACGTAAACGATCTGCCTGAACTGCTGAAAGCGCA
AATCGCTCACTTCTTCGAGCACTACAAAGACCTCGAAAAAGGCAAGTGGGTGAAA
GTTGAAGGTTGGGAAAACGCAGAAGCCGCTAAAGCTGAAATCGTTGCTTCTTTCG
AGCGCGCAAAGAATAAATAAGTTCTTCTAGCGCAATAACCCTGAACGCCGGGCTT
CGGTTAGTAAGGGTTTTTTTTATGCCCGCGATAAATAAACTCTCTATTCCACCATCA
TTATTCTCAGCGGTTGCAAGGCTTGAACGGTAAGAACAAGCAAACCCGACCACCA
TTTTGCTGTTCATAGCCACTTGCTGGAAGTTAGCCGACCTCACTCATACTCACCG

ppa pKD-F (SEQ ID: 25)

TTATTATTGGTGAAAAGATGTTTCGCGAAAAAACTATAGACAATTCGTTATGTAACG
GATTGCGTTACATCGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC

ppa pKD-R (SEQ ID: 26)

TCCATATCTGCAATCGCATAAAAACTCTGCTGGCGTTCACAAATGTGCAGGGGT
AAAACGGGGGCACGCCATATGAATATCCTCCTTAGTTCCCTAATCC

ppa ko1 (SEQ ID: 27)

CATAGGGTTGTCCTCGTCGGGG

Fig. 7(continuación)

ppa ko2 (SEQ ID: 28)
GTT TTA TGC GAT GTA TCT CGC G

Péptido de enlace (SEQ ID 29)
GGGS

Fig. 8

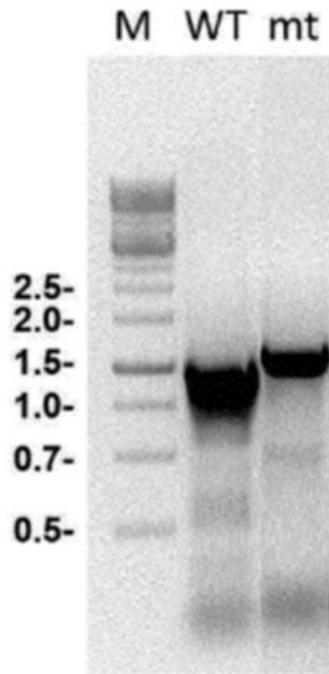


Fig. 9

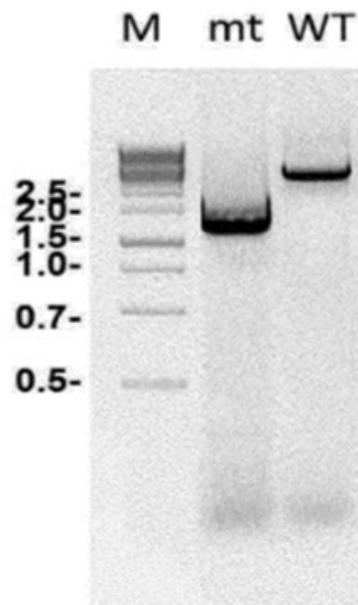


Fig. 10A

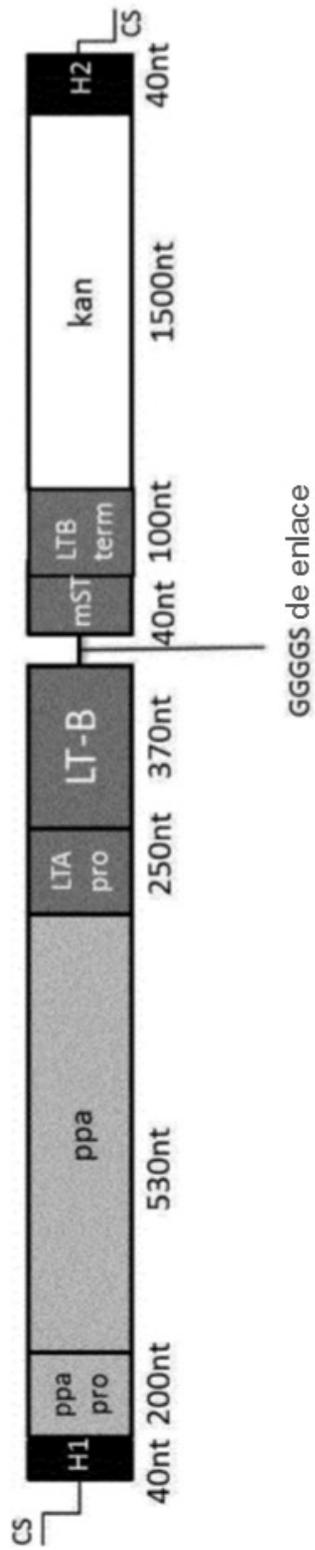


Fig. 10B

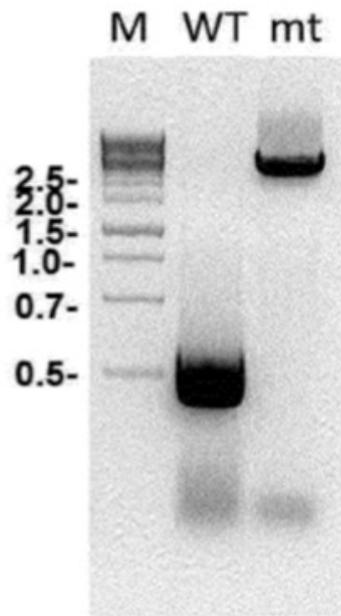


Fig. 10C

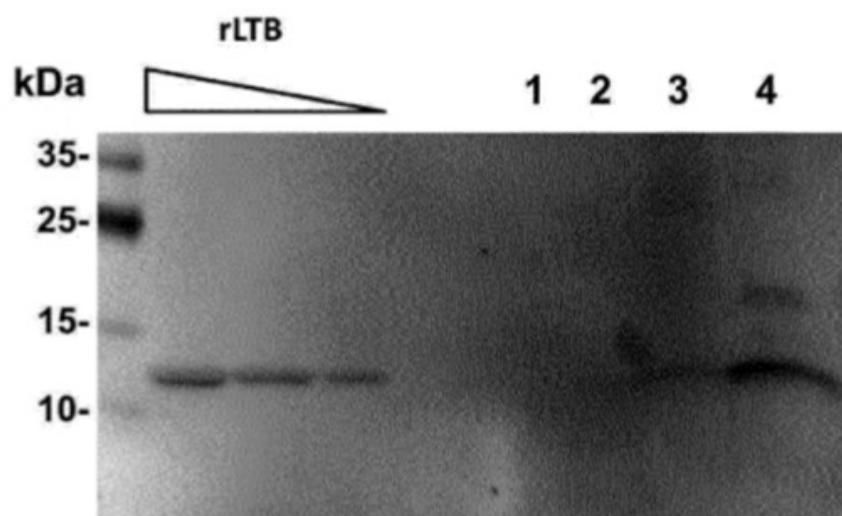


Fig. 11

