

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 745 649**

51 Int. Cl.:

C12N 1/20 (2006.01)

C12R 1/38 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.12.2012 PCT/EP2012/075167**

87 Fecha y número de publicación internacional: **20.06.2013 WO13087667**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.12.2012 E 12805669 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.06.2019 EP 2791318**

54 Título: **Cepa atenuada y adaptada de Pseudomonas para el suministro de antígenos**

30 Prioridad:

12.12.2011 EP 11306636

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
03.03.2020

73 Titular/es:

**UNIVERSITÉ GRENOBLE ALPES (50.0%)
621 Avenue Centrale
38400 Saint-Martin-d'Hères, FR y
CENTRE HOSPITALIER UNIVERSITAIRE
GRENOBLE (50.0%)**

72 Inventor/es:

**LE GOUELLEC, AUDREY;
TOUSSAINT, BERTRAND y
POLACK, BENOÎT**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 745 649 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

Cepa atenuada y adaptada de *Pseudomonas* para el suministro de antígenos

Dominio de la invención

5 La presente invención se refiere a un método para obtener una cepa atenuada y adaptada de *Pseudomonas* para su uso en vacunas humanas. La invención también se refiere a la cepa obtenida, y a los otros tratamientos útiles para mejorar la seguridad de la cepa de *Pseudomonas*, sin disminuir su inmunogenicidad.

Antecedentes

10 Se han desarrollado bacterias para su uso como vacunas que suministran antígenos heterólogos. Estas bacterias se han modificado para que contengan secuencias de ácido nucleico que codifiquen una proteína o antígeno de interés. Sin embargo, la inyección de bacterias infecciosas virulentas nativas es potencialmente perjudicial para el organismo receptor. Por lo tanto, la virulencia de las bacterias se debe atenuar antes de su uso en inmunoterapia.

15 Debido a la capacidad eficaz conferida para suministrar antígenos a las células presentadoras de antígenos in vivo, los vectores bacterianos atenuados basados en el sistema de secreción de tipo III (T3SS o TTSS) atrajeron cada vez más atención para su uso potencial, en particular para el desarrollo de vacunas contra el cáncer. En las últimas décadas, el uso de bacterias gram negativas, tales como *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia* y *Pseudomonas* que utilizan su poderosa maquinaria de secreción - el sistema de secreción tipo III, para suministrar efectores bacterianos a la membrana o al citoplasma de la célula anfitriona, ha atraído cada vez más atención por su uso potencial para el desarrollo de vacunas contra el cáncer (Epaulard et al., 2006). Hasta ahora, se ha demostrado que las bacterias basadas en T3SS son portadoras de vacunas contra el cáncer que proporcionan protección contra varios modelos tumorales como el glioma, el cáncer de próstata, el cáncer de mama y el fibrosarcoma en ratones.

20

Además de su alta eficacia, la seguridad de los vectores bacterianos es muy importante para la aplicación clínica. En el trabajo anterior de los autores de la presente invención descrito en el artículo de Epaulard et al., Publicado en 2008, se describieron dos cepas atenuadas de *Pseudomonas*:

- 25 • una cepa atenuada 'CHA-OST', en la que se han suprimido los genes *exoS* y *exoT* que codifican dos exoenzimas principales de la toxina T3S - ExoS y ExoT - demostrando una capacidad eficaz de suministro de antígenos y un rendimiento de protección tumoral;
- 30 • una cepa más atenuada 'CHA-OAL', en la que además de los genes *exoS* y *exoT*, también se han suprimido los genes *aroA* y *lasI*. El gen *aroA* codifica la 3-fosfoshikimato 1-carboxiviniltransferasa, que es una enzima clave en la síntesis de aminoácidos aromáticos y el gen *lasI* codifica la enzima que produce homoserina lactonas 3-oxo-C12-HSL para la percepción de cuorum ("*quorum sensing*") (QS).

Esta segunda cepa CHA-OAL tiene una toxicidad muy reducida al tiempo que mantiene una buena eficacia a altas dosis. Esta cepa máximamente atenuada puede representar el mejor compromiso entre la atenuación de virulencia y la eficacia, por lo que se le otorgó el potencial para aplicaciones clínicas.

35 La patente EP 1 692 162 describe un vector de expresión de proteínas quiméricas, que comprende la parte funcional de las proteínas ExoS o ExoT de *Pseudomonas aeruginosa*, y un antígeno de interés. La proteína quimérica puede ser expresada por una cepa transformada con dicho vector, y se puede "inyectar" en el citoplasma de una célula presentadora de antígeno a través del sistema TTSS. Preferentemente, la cepa transformada es una cepa CHA-OST en la que los genes *exoS* y *exoT* han sido eliminados

40 Recientemente, se ha descrito un nuevo concepto de vacunas que están "muertas pero son metabólicamente activas" (KBMA). Conservan las propiedades inmunológicas de los organismos vivos, pero tienen un perfil de seguridad más cercano al de los organismos muertos. Inicialmente, Brockstedt et al. demostraron la estrategia de vacuna KBMA con la bacteria *Listeria monocytogenes* (Brockstedt et al., 2005). La delección de dos genes *uvr* (A y B) que codifican la subunidad exonucleotidasa A y B hacen que las bacterias sean sensibles al entrecruzamiento inducido por psoraleno mediante exposición a luz UVA de longitud de onda larga (Wollowitz, 2001). Sin embargo, no está claro si este tratamiento fotoquímico se podría aplicar a bacterias *Pseudomonas* y si el sistema de secreción tipo III funcionaría después de este tratamiento.

45

Para fines clínicos, también es importante adherirse a las buenas prácticas de fabricación para la producción de vacunas. En particular, los vectores bacterianos se deben producir en un medio químicamente definido con un rendimiento de crecimiento constante para garantizar la calidad del producto.

50 De hecho, uno de los principales problemas técnicos encontrados con el cultivo de cepas atenuadas de *Pseudomonas* es su baja tasa de crecimiento en medios de crecimiento convencionales definidos químicamente.

En estudios recientes, se ha aplicado un medio químicamente definido - medio mínimo de glucosa (M9) en diferentes cultivos de especies bacterianas, tales como *E. Coli*, *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas putida*, para las investigaciones de la expresión de genes, la expresión de proteínas y las comunidades bacterianas. Este medio fue desarrollado previamente por DeBell RM y se demostró que era ideal para la producción de exotoxina A por *P. aeruginosa* (DeBell, 1979).

Existe la necesidad en la técnica de un medio químicamente definido optimizado, que permita una tasa de crecimiento elevada y constante para cepas atenuadas de *Pseudomonas*. Preferentemente, estas cepas se transforman con un vector de expresión tal como se describe en la patente EP 1 692 162.

Descripción de la invención

La presente invención se refiere a un procedimiento para la obtención de una cepa adaptada de *Pseudomonas*, que comprende las siguientes etapas:

- Deleción de los genes *ExoS*, *ExoT*, *aroA* y *lasI* en una cepa inicial de *Pseudomonas* cultivada en un medio LB,
- Cambio progresivo del medio de cultivo de medio LB a un medio químicamente definido que comprende magnesio y calcio, y
- Selección de la cepa adaptada que presenta un tiempo de duplicación inferior a 60 minutos cuando se cultiva en dicho medio químicamente definido.

En un aspecto preferido de la invención, la cepa de *Pseudomonas* se trata además con el proceso KBMA para convertirla en "muerta pero metabólicamente activa" como se define en la reivindicación 3.

La presente invención también está relacionada con una cepa de *Pseudomonas* adaptada obtenida por el procedimiento descrito anteriormente, con la misma toxicidad y capacidades de secreción que la cepa antes de la adaptación, y un tiempo de duplicación cuando se cultiva en dicho medio químicamente definido de menos de 60 minutos. Esta cepa de *Pseudomonas* adaptada se ha depositado en el CNCM (Institut Pasteur) con el número de registro 1-4564.

La invención también está relacionada con una composición inmunogénica y una vacuna que comprende la cepa adaptada descrita previamente y el uso de la cepa de *Pseudomonas* adaptada de la invención para preparar una composición de vacuna.

Finalmente, la invención también se refiere a la vacuna de la invención para su uso en una estrategia de vacunación para inducir una respuesta inmunitaria caracterizada por inyecciones en múltiples posiciones de la cepa atenuada y adaptada de *Pseudomonas*, al organismo, y a la cepa *Pseudomonas* adaptada de la invención para su uso en un método para inducir una respuesta inmunitaria.

Descripción detallada de la invención

Las publicaciones mencionadas en la presente memoria se citan con el fin de describir y revelar los protocolos, reactivos y vectores que se citan en las publicaciones y que se podrían utilizar en relación con la invención.

Además, la práctica de la presente invención emplea, a menos que se indique lo contrario, técnicas microbiológicas y biológicas moleculares convencionales dentro del conocimiento práctico de la técnica. Tales técnicas son bien conocidas por el trabajador cualificado y se explican con detalle en la bibliografía. Véase, por ejemplo, Sambrook et al., 2001. Las técnicas inmunológicas convencionales se explican en Current protocol in Immunology, Coligan, John Wiley & Sons (2005).

Se debe señalar que, como se emplea en la presente memoria y en las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular "un", "uno", "una" y "el" y "la" incluyen las referencia en plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Así, por ejemplo, una referencia a "una cepa" incluye una pluralidad de tales cepas, y así sucesivamente. A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente memoria tienen los mismos significados entendidos comúnmente por un experto en la técnica a la que pertenece esta invención. Aunque se puede utilizar cualquier material y método similar o equivalente a los descritos en la presente memoria para poner en práctica o someter a prueba la presente invención, a continuación se describen los materiales y métodos preferidos.

La presente invención está relacionada con un procedimiento para la obtención de una cepa adaptada de *Pseudomonas*, que comprende las siguientes etapas:

- Deleción de los genes *ExoS*, *ExoT*, *aroA* y *lasI* en una cepa inicial de *Pseudomonas* cultivada en un medio LB,

- Cambio progresivo del medio de cultivo de medio LB a un medio químicamente definido que comprende magnesio y calcio, y
- Selección de las cepas adaptadas que presentan un tiempo de duplicación inferior a 60 minutos cuando se cultivan en dicho medio químicamente definido.

5 Ventajosamente, la cepa adaptada presenta la misma toxicidad y capacidades de secreción que la cepa inicial.

Como se emplea en la presente memoria, los siguientes términos se pueden utilizar para la interpretación de las reivindicaciones y la memoria descriptiva.

10 En las reivindicaciones que siguen y en la descripción anterior de la invención, excepto cuando el contexto requiera lo contrario debido a un lenguaje expreso o implicación necesaria, la palabra "comprenden" o variaciones tales como "comprende" o "que comprende" se utilizan en un sentido inclusivo, es decir, para especificar la presencia de las características indicadas pero no para impedir la presencia o adición de características adicionales en diversas realizaciones de la invención.

15 El término 'Pseudomonas' designa un género de gammaproteobacterias, perteneciente a la familia Pseudomonadaceae que contiene 191 especies válidamente descritas. Todas las especies y cepas de Pseudomonas son bacilos gram negativos y se clasifican como aerobios estrictos. Entre ellos, *Pseudomonas aeruginosa* es un patógeno humano oportunista altamente relevante.

Las bacterias gram negativas utilizan diferentes tipos de sistemas de secreción para sus propios fines. En particular, el sistema de secreción tipo III (T3SS) está involucrado en la citotoxicidad de las cepas de Pseudomonas.

20 La primera etapa del procedimiento de acuerdo con la invención es la delección de los genes *ExoS*, *ExoT*, *aroA* y *lasI* en una cepa inicial de *Pseudomonas* cultivada en un medio LB. Los genes *exoS* y *exoT* codifican dos exoenzimas principales de la toxina T3S - ExoS y ExoT. El gen *aroA* codifica la 3-fosfoshikimato 1-carboxiviniltransferasa, que es una enzima clave en la síntesis de aminoácidos aromáticos y el gen *lasI* codifica la enzima que produce las homoserina lactonas 3-oxo-C12-HSL para la percepción de cuorum (QS). Como se describió previamente (Epaulard et al., 2008), la cepa obtenida presenta una atenuación de su virulencia mientras
25 mantiene una buena eficacia para inducir una respuesta inmunogénica, cuando se administra a un organismo.

Se utiliza principalmente Luria Bertani (LB), un medio nutricionalmente rico, para el crecimiento de bacterias. El medio LB se utiliza ampliamente como medio de crecimiento para todo tipo de bacterias, y su composición es bien conocida por los expertos en la técnica.

30 La segunda etapa del procedimiento según la invención es un cambio progresivo del medio de crecimiento, de medio LB a un medio químicamente definido basado en un medio mínimo de glucosa (M9) con un complemento de magnesio y calcio, denominado medio MM9. Ventajosamente, el reemplazo del caldo LB por el medio MM9 se realizó de acuerdo con las siguientes proporciones: LB al 100% -> LB al 50%-MM9 -> LB al 20%-MM9 -> LB al 5%-MM9 -> LB 2%-MM9 -> MM9 al 100%. Para cada etapa, se realizaron al menos dos días de adaptación, hasta que la cepa adaptada proliferó de manera estable en un medio MM9 al 100%.

35 La tercera etapa del procedimiento de acuerdo con la invención es la selección de cepas adaptadas, caracterizadas por una capacidad de crecimiento definida por un "tiempo de duplicación" que es inferior a 60 minutos. El "tiempo de duplicación" es el período necesario para que una colonia bacteriana duplique su población cuando se cultiva en condiciones óptimas (37°C en un crecimiento medio, en constante movimiento).

40 El producto final del procedimiento de acuerdo con la invención es una 'cepa adaptada' que presenta las siguientes características: la cepa adaptada presenta la misma toxicidad y capacidad de secreción que la cepa inicial, mientras que su tiempo de duplicación cuando se cultiva en dicho medio químicamente definido es menor de 60 minutos. Ventajosamente, su tiempo de duplicación en dicho medio químicamente definido es inferior a 50 minutos, y más preferentemente es inferior a 45 minutos.

45 En un aspecto específico de la invención, el medio MM9 es un medio M9 con un suplemento de Mg²⁺ 1 mM y Ca²⁺ 1 mM.

Ventajosamente, el medio químicamente definido MM9 tiene la siguiente composición:

Tabla 1: Composición del medio M9 modificado (MM9)

Extracto de levadura sintética	4 g/L	
Triptófano	1 mmol/L	(0,2 g/L)
Glucosa	14 mmoles/L	(2,5 g/L)
Glicerol	1%	

FeSO ₄	0,4 g/L	
Ácido cítrico	2 mmoles/L	(0,36 g/L)
Medio con Sales M9 5X (Sigma) composición aproximada por litro		
Na ₂ PO ₃ Anhidro	33,9 g	
KPO ₃	15,0 g	
NaCl	2,5 g	
NH ₄ Cl	5,0 g	
MgSO ₄	1 mmol/L	(50 mg/L)
CaSO ₄	1 mmol/L	(50 mg/L)
Agua	csp 1L	

En un aspecto específico de la invención, la cepa adaptada se trata además para convertirla en "muerta pero metabólicamente activa". El procedimiento para obtener bacterias muertas pero metabólicamente activas se puede resumir de la siguiente manera:

- 5
- Se elimina el gen *uvrAB* de una cepa de *Pseudomonas*; se puede utilizar cualquier mecanismo conocido por los expertos en la técnica para obtener esta delección;
 - Se realiza una inactivación fotoquímica con UVA en presencia de psoraleno S-59;
 - Se evalúan la toxicidad, la producción de antígeno y la secreción de antígeno a través del sistema TTSS por la cepa tratada.

10 Para más detalles sobre el proceso KBMA, véase Brockstedt et al., 2005 y Wollowitz, 2001.

En un aspecto preferido de la invención, la obtención de una cepa de *P. aeruginosa* KBMA se realiza en presencia de una concentración de 10 µM de S59-psoraleno con una irradiación UVA a una dosis de 7,2 J/cm².

15 La invención también se relaciona con un procedimiento tal como el descrito anteriormente, para obtener una cepa de *Pseudomonas* Muerta Pero Metabólicamente Activa, y con la cepa obtenida. En particular, el procedimiento KBMA se puede aplicar a una cepa 'CHA-OST' o 'CHA-OAL'.

La invención también está relacionada con una cepa de *Pseudomonas* KBMA, no toxigénica y menos virulenta que la cepa no tratada inicial, manteniendo las capacidades de secreción de T3SS.

En un aspecto específico de la invención, la cepa de *Pseudomonas* se ha atenuado antes del tratamiento KBMA, mediante la delección de los genes *exoS* y *exoT*.

20 En otro aspecto de la invención, la cepa de *Pseudomonas* se ha atenuado antes del tratamiento KBMA, mediante la delección de los genes *exoS*, *exoT*, *aroA* y *lasI*.

En otro aspecto de la invención, la cepa de *Pseudomonas* se ha adaptado en un medio MM9 antes del tratamiento KBMA.

25 En otro aspecto de la invención, la cepa de *Pseudomonas* ha sido atenuada por la delección de los genes *exoS*, *exoT*, *aroA* y *lasI* y adaptada en un medio MM9, antes del tratamiento KBMA.

En un aspecto preferido de la invención, la cepa pertenece a la especie *Pseudomonas aeruginosa*.

30 La invención también está relacionada con una cepa adaptada específica de *Pseudomonas* que ha sido depositada en el CNCM (Institut Pasteur) el 1 de diciembre, 2011 con el número de registro CNCM I-4564, que presenta la misma toxicidad y capacidades de secreción que la cepa inicial, y un tiempo de duplicación, cuando se cultiva en dicho medio químicamente definido, de menos de 60 minutos.

La invención también está relacionada con una composición inmunogénica que comprende una de las cepas adaptadas de *Pseudomonas* descritas anteriormente.

35 La invención también está relacionada con una vacuna que comprende la composición inmunogénica que comprende la cepa adaptada de *Pseudomonas* descrita anteriormente y un portador o coadyuvante farmacéuticamente aceptables. El experto en la técnica conoce el mejor coadyuvante para cada composición de vacuna.

La presente invención también está relacionada con la vacuna de la invención para su uso en un método para inducir una respuesta inmunitaria en un anfitrión, comprendiendo dicho método la administración al anfitrión por medio de inyecciones en múltiples posiciones de una cantidad eficaz de la vacuna descrita anteriormente.

5 En un aspecto particular de la invención, el método para inducir una respuesta inmunitaria se basa en un protocolo de vacunación que comprende cuatro inyecciones subcutáneas, en los flancos derecho e izquierdo, de una cantidad suficiente de la vacuna tal como se describe anteriormente (véanse los ejemplos para más detalles).

10 El uso terapéutico de la cepa adaptada y/o KBMA de la invención depende del antígeno que esté siendo expresado por la cepa. De hecho, la respuesta inmunitaria se inducirá contra un patógeno o tumor específicos. Dependiendo de la enfermedad a tratar, se elegirá un antígeno específico de interés para que sea expresado en forma de proteína de fusión por la cepa de *Pseudomonas* según la invención. En un aspecto específico de la invención, el antígeno de interés es un antígeno tumoral o viral. En particular, dicho antígeno se puede seleccionar de la lista: BAGE, CAMEL, CEA, DAM, GAGE, HER-2/neu, MAGE, MUM, MART, PSA, PSMA, RAGE, SAGE y WT1. Preferentemente, el antígeno se selecciona entre los antígenos tumorales enumerados en (Novellino et al., 2005) y (Buonaguro et al., 2011).

15 La invención también está relacionada con el uso de la cepa adaptada de *Pseudomonas* descrita anteriormente, para preparar una composición de vacuna.

Finalmente, la presente invención se refiere a la cepa adaptada de *Pseudomonas* como se describe anteriormente para su uso en un método para inducir una respuesta inmunitaria en un anfitrión.

Dibujos

20 **Figura 1.** Evaluación de la secreción de proteína de fusión mediada por T3SS por la cepa CHA-CLIN1 cultivada en MM9. Las posiciones de popB (flecha superior) y popD (flecha inferior) están marcadas con flechas; las posiciones de las proteínas de fusión S54-PADRE-antígeno están marcadas con estrellas.

25 **Figura 2.** El mutante Δ uvrAB de *P. aeruginosa* tratado fotoquímicamente está "muerto pero metabólicamente activo". A. Viabilidad de OST(wt) y OSTAB después del tratamiento con la concentración de S59 indicada basada en la unidad formadora de colonias en agar nutriente. La media de 5 experimentos realizados por duplicado se analiza con el soporte lógico Graphpad. B. Análisis de la viabilidad de *P. aeruginosa* después de un tratamiento diferente con el kit de tinción Live/Dead BacLight (Molecular Probe) y medición de fluorescencia en el lector de microplacas. C. Detección por transferencia Western de ExoS54-OVA en sobrenadante de *P. aeruginosa* tratado fotoquímicamente con diferentes niveles de amotosalen.

30 **Figura 3.** A. *P. aeruginosa* KBMA tratada fotoquímicamente con amotosalen 10 μ M produce, secreta e inyecta antígeno en las células dendríticas. A. *P. aeruginosa* KBMA secreta el antígeno ExoS54-Ovalbumina al sobrenadante. B. El sistema de secreción tipo III de *P. aeruginosa* KBMA es funcional. Inyección de S54-Bla en células HL60 humanas.

35 **Figura 4.** *Pseudomonas aeruginosa* KBMA es menos citotóxica. A) La pérdida de citotoxicidad se evaluó mediante la infección de células dendríticas de ratón (BMDC). La liberación de LDH de las células infectadas se midió a las 3 h de la infección. Los porcentajes de citotoxicidad se calcularon de acuerdo con la liberación de actividad de LDH. Los datos son las medias de los resultados de al menos tres experimentos. B) Citotoxicidad de *P. aeruginosa* KBMA (PCT 10 μ M) para moDC 3 h después de la infección. C) Efecto de MOI sobre la tinción 7AAD/AnexinaV de moDC 24h después de la infección. NT Control representa células solamente.

40 **Figura 5.** Protocolos de vacunación. Evaluación de la eficacia de la cepa CHA-CLIN1 por sensibilización tumoral sobre un protocolo de vacunación optimizado. (A) Ensayo profiláctico. (B) Ensayo terapéutico.

Ejemplos

45 Antes de describir la presente invención con detalle, se debe entender que esta invención no se limita a los métodos particularmente ilustrados y, por supuesto, puede variar.

Ejemplo 1. Adaptación de una cepa atenuada de *Pseudomonas* 'CHA-OAL' cultivada en medio LB, a un medio químicamente definido (MM9).

50 En primer lugar, los autores de la presente invención adaptaron la cepa CHA-OAL en medio M9 modificado por Debell MR, que era ideal para la producción de proteína ExoA por *Pseudomonas*, pero la tasa de crecimiento de la bacteria no fue lo suficientemente alta. Los autores de la presente invención modificaron aún más el medio M9 complementándolo con Mg²⁺ y Ca²⁺ y la composición del medio M9 modificado (MM9) se muestra en la tabla 1.

Para adaptar la cepa CHA-OAL a este medio, el reemplazo de LB por MM9 para el cultivo de la cepa CHA-OAL fue progresivo. Al final, la cepa CHA-OAL proliferó de manera estable en medio MM9 y el crecimiento fue mucho mejor que cuando se cultivó en caldo LB (tabla 2).

Tabla 2: Cinética de crecimiento (tiempo de duplicación) de mutantes CHA-OAL en caldos LB y MM9 después de la adaptación

Mutante	Tiempo medio de duplicación (min) durante el crecimiento exponencial	
	Caldo LB	Caldo MM9
CHA-OAL	88	43

Esta nueva cepa adaptada para crecer en medio MM9, con un tiempo de duplicación de 43 minutos, se denominó CHA-CLIN1 y se depositó en el CNCM con el número de registro 1-4564.

Ejemplo 2. Toxicidad y capacidades de secreción de la cepa adaptada CHA-CLIN1 obtenida en el Ejemplo 1. 2.1. Toxicidad: Con el fin de verificar si la adaptación y las nuevas condiciones de crecimiento habían modificado la toxicidad de la cepa CHA-CLIN1, los autores de la presente invención evaluaron la toxicidad *in vivo* de la cepa CHA-CLIN1 cultivada en medio LB o MM9 observando la mortalidad después de una inyección subcutánea de 10^7 , 10^8 o 10^9 bacterias a ratones hembra C57BL/6 de 6 semanas de edad. La toxicidad de la nueva cepa CHA-CLIN1 se comparó con la toxicidad de las cepas CHA-OST y CHA-OAL, descritas previamente (tabla 3).

Tabla 3: Prueba de toxicidad *in vivo* de mutantes CHA-OST y CHA-CLIN1

Mutante	Dosis	Mortalidad
CHA-OST (en LB)	10^5	0/6
	10^6	0/6
	10^7	4/6
CHA-OAL (en LB)	10^7	0/6
	10^8	0/6
	10^9	0/6
CHA-CLIN1 (en MM9)	10^7	0/6
	10^8	0/6
	10^9	0/6

Se puede observar que la toxicidad de la cepa CHA-CLIN1 en MM9 es muy baja en comparación con la toxicidad de la cepa CHA-OST, y es igual a la toxicidad de la cepa CHA-OAL, cultivada en medio LB.

2.2. Capacidad de secreción de proteínas por TTSS: Los autores de la presente invención sometieron a prueba si los caracteres TTSS de la cepa CHA-CLIN1 se habían modificado tanto para la adaptación como para el crecimiento en medio MM9, en comparación con una cepa no adaptada cultivada en LB. Transformaron las cepas CHA-OAL y CHA-CLIN1 con pEAI-S54-PADRE-OVACter (las cepas transformadas son OAL-P-OVA y CLIN1-P-OVA, respectivamente) y evaluaron la secreción de la proteína de fusión en medio LB y MM9.

Los cultivos bacterianos para las cepas OST-EI (cepa de control negativo), OAL-P-OVA y CLIN1-P-OVA se realizaron a 37°C con agitación a 250 rpm. Después de un pre-cultivo nocturno en LB que contenía 300 µg/mL de carbenicilina, las bacterias se resuspendieron a una DO_{600} de 0,2 en LB que contenía 300 µg/mL de carbenicilina, IPTG 0,5 mM, EGTA 5 mM y $MgCl_2$ 20 mM hasta que la DO_{600} alcanzó un valor entre 1,5 y 2. A continuación, los cultivos bacterianos se centrifugaron a 17000 g durante 15 minutos y se recuperó el sobrenadante. Para la precipitación de las proteínas, se añadió ácido perclórico al sobrenadante a una concentración final de 15% y se incubó a 4°C, durante la noche. Al día siguiente, las proteínas precipitadas se centrifugaron a 17000 g, 4°C durante 30 min; las proteínas se lavaron dos veces con acetona (17000 g, 15 min), se secaron a temperatura ambiente y se resuspendieron en 60 µL de tampón de desnaturalización (Tris HCl, ditioneitol, SDS, azul de bromofenol, glicerol).

A continuación, se analizaron las proteínas mediante SDS-PAGE, en un gel de poliacrilamida al 15% (Ready Gels Recast Gel (Biorad®)), a menos de 120 V, en tampón de migración Tris Glycine SDS (Biorad®), y se visualizaron mediante tinción con azul de Coomassie.

Los resultados de la secreción de las diferentes cepas se muestran en la figura 1. En esta figura, la primera calle presenta la cepa OST-EAI, que es la cepa de control que no contiene secuencia codificante de antígeno. Se visualizan tres proteínas:

- PopB y PopD (marcadas con flechas), dos proteínas estructurales de T3SS que forman el canal de translocación: su presencia es un control positivo de una correcta activación de T3SS;

- la proteína de fusión P-OVA (marcada con estrellas), observada para las cepas transformadas que expresan el antígeno cultivadas tanto en medio LB como adaptadas en medio M9M.

5 Por lo tanto, las capacidades de secreción de TTSS de la cepa CHA-CLIN1 en MM9 son las mismas que las capacidades de la cepa CHA-OAL cultivadas en medio LB, después de la transformación con un plásmido pEAI54-PADRE-OVACter.

Ejemplo 3. Atenuación de una cepa 'CHA-OST' por el procedimiento KBMA

10 Se generaron mutantes de reparación de la escisión de nucleótidos OST Δ uvrAB (OSTAB) a partir de la cepa CHA-OST de *P. aeruginosa* por mutagénesis basada en Cre/lox {Quenee, 2005 núm. 48} y sistema de selección negativa basado en sacB.

Inactivación de bacterias con psoraleno S59/UVA y ensayo de viabilidad

15 Los autores de la presente invención determinaron la sensibilidad relativa a la inactivación fotoquímica de la cepa OSTAB y su cepa parental OST en un intervalo de concentraciones de psoraleno S-59 y una dosis de UVA de 7,2 J/cm², utilizando las condiciones establecidas previamente para bacterias gram negativas {Lankowski, 2007 núm. 162}.

20 Para el tratamiento fotoquímico (PCT), se cultivó la cepa OST Δ uvrAB en medio LB a 37°C hasta una DO₆₀₀ de 0,5. Se añadieron diferentes concentraciones de psoraleno S-59 y los cultivos se hicieron crecer durante una hora adicional. A continuación se transfirió 1 ml de cultivo por pocillo (DO₆₀₀ de 1) a una placa de cultivo de 6 pocillos para la irradiación UVA a una dosis de 7,2 J/cm² en un dispositivo Stratalinker 1800 (Stratagen). La viabilidad de los cultivos fotoquímicamente inactivados se evaluó mediante dilución en serie y cultivo en placa sobre PIA para unidades formadoras de colonias. Los puntos representan los valores medios de las placas triplicadas contadas a la dilución más apropiada (Figura 2A).

25 Como se esperaba, la cepa OST Δ uvrAB fue mucho más sensible a PCT que OST. Con S-59 10 μ M hubo ~1 organismo replicante vivo/1,25 x 10⁸ bacterias expuestas para OSTAB, y 2,5 x 10⁶ bacterias vivas para OST.

Basándose en el kit Live/Dead BacLight Bacterial Viability (Molecular Probes), los autores de la presente invención buscaron a continuación la integridad de la membrana de la cepa de *P. aeruginosa* tratada fotoquímicamente (Figura 2B). Bajo el tratamiento fotoquímico, las bacterias no pueden reproducirse en medio nutriente, pero tienen membranas intactas, que todavía se pueden calificar como "vivas".

30 Por lo tanto, el presente ejemplo muestra que las cepas de *Pseudomonas* se pueden someter al tratamiento KBMA y convertirse en "Muertas pero Metabólicamente activas", con membranas intactas pero incapacidad para crecer.

Ejemplo 4. Capacidades de secreción de la cepa KBMA obtenida en el ejemplo 3: el mutante OST Δ uvrAB se inactiva por tratamiento fotoquímico, pero aún secreta proteínas

35 Como se muestra en la Figura 2C, la proteína de fusión ExoS54-OVA se detecta en el sobrenadante de *P. aeruginosa* tratada fotoquímicamente con diferentes niveles de amotosalen (0, 2, 5, 10, 15 y 20 μ M).

40 OST Δ uvrAB se transformó con el plásmido pEAI54 PADRE Ova. Las cepas resultantes se hicieron crecer en medio LB que contenía 300 mg/L de carbenicilina (Cb) durante el tratamiento fotoquímico. Las células se resuspendieron en LB 300 mg/L Cb con o sin EGTA 5 mM y se cultivaron 3 horas a 37°C. El agotamiento de calcio inducido por EGTA desencadena la activación de TTSS de *P. aeruginosa* y la secreción de efectores de TTSS en medio de cultivo {Epaulard, 2006 núm. 25}. Los sobrenadantes se hicieron precipitar y se analizaron mediante SDS PAGE (Mini protean Tris Glycine 12% Precast Gel (Biorad)) e inmunotransferencia con anticuerpo policlonal de conejo anti-ovalbúmina de pollo (AbDserotec) utilizado a 1/5000 en TBS BSA 0,5 mg/mL para someter a prueba la presencia de proteína de fusión secretada ExoS54-PADRE Ova.

45 La Figura 2C muestra que el antígeno 'PADRE Ova' se secreta tan pronto como se añade EGTA al medio de cultivo, a cualquier concentración de amotosalen.

Como se muestra en la figura 3A., *P. aeruginosa* KBMA tratada fotoquímicamente con amotosalen 10 μ M secreta el antígeno ExoS54-Ovalbúmina al sobrenadante.

50 Primero, los autores de la presente invención obtuvieron transformantes de OST Δ uvrAB con plásmidos pEAI SO-OVA (sometido a delección para la secreción de Tag) y pEAI S54-OVA. Prepararon la cepa tratada fotoquímicamente en presencia de psoraleno (0 y 10 μ M).

A continuación, los autores de la presente invención evaluaron la producción y secreción por TTSS de proteínas fusionadas con ExoS54 por las cepas PCT. Después de PCT, utilizaron cuatro condiciones de crecimiento en medio

LB: sin estimulación TTSS, con estimulación TTSS por agotamiento de calcio (EGTA 5 mM), producción intrabacteriana de OVA sin estimulación TTSS (IPTG 0,5 mM) y con suplemento de EGTA e IPTG para someter a prueba la producción y secreción de OVA.

5 Como se muestra en la figura 3B., el sistema de secreción tipo III de *P. aeruginosa* KBMA es funcional: el antígeno S54-Bla se inyecta en las células.

Para buscar más sobre la funcionalidad TTSS de la cepa KBMA de los autores de la presente invención, se utilizó un ensayo que medía la escisión de CCF2 en células eucarióticas a las que se había inyectado β -lactamasa fusionada a ExoS54.

10 Derouazi et al. describieron previamente esta prueba de la "inyección eficaz del antígeno en las células" {Derouazi, 2010 núm. 203}.

Brevemente, después de 3 h de infección de las células eucarióticas HL60 con varias cepas, las células se incubaron con solución 6xCCF2/AM recién preparada (concentración final 1 μ M; Invitrogen) durante 30 minutos en la oscuridad a temperatura ambiente. El porcentaje de células que recibieron fusiones de informador se cuantificó mediante citometría de flujo (FACS Moflo; Dako Cytomation).

15 Las cinco cepas diferentes sometidas a prueba son:

- OSTAB S54Bla: Cepa de *P. aeruginosa* conocida por inyectar S54-Bla a través de TTSS
- OSTAB PopBD S54Bla: Cepa de *P. aeruginosa* con delección para el translocon PopBD incapaz de inyectar Bla a través de TTSS a la célula
- KBMA S54Bla: KBMA que expresa el antígeno S54-bla
- 20 • KBMA PopBD S54Bla: cepa KBMA con delección para el translocon PopBD
- Destruída por calor: *P. aeruginosa* que expresa S54-Bla calentada a 70°C durante 1 hora
- Equivalente viable: Basada en el gráfico CFU, para KBMA a MOI 500 hay aproximadamente 1 bacteria viva. Esta es 1 bacteria OSTAB S54 Bla.

25 Los resultados se muestran en la figura 3B, y se expresan como el número de células que muestran una fluorescencia azul; las células no infectadas incubadas con CCF2 se usaron como control negativo.

30 El análisis FACS reveló células azules que indicaban la escisión CCF2-AM por Bla. No se observaron células azules en las células no teñidas, no infectadas o infectadas con bacterias viables equivalentes (es decir, 1 equivalente de bacteria para MOI 500) o cepas que albergan el plásmido vacío (pEAi) o el plásmido que expresa la proteína β -lactamasa de tipo salvaje fusionada a S54 pero no secretada a través de TTSS (OSTAB Δ popBD S54-Bla) (Figura 2b). Utilizando la cepa KBMA, se pudieron observar células azules en HL60 infectado a MOI 100 y 500 con un aumento del rendimiento, lo que indica que el TTSS está activo bajo PCT.

Juntos, estos datos demuestran que los autores de la presente invención obtienen *P. aeruginosa* KBMA a una concentración de S59-psoraleno 10 μ M, incapaz de replicarse en medio de agar nutriente pero aún capaz de secretar un antígeno por su sistema de secreción de tipo III activado.

35 **Ejemplo 5.** Citotoxicidad de la cepa atenuada obtenida en el ejemplo 3

40 La pérdida de citotoxicidad se evaluó mediante la infección de células dendríticas de ratón (BMDC). Las bacterias tratadas con PCT se prepararon como se mencionó anteriormente. La citotoxicidad se evaluó mediante la determinación de la liberación de lactato deshidrogenasa a los sobrenadantes de las células infectadas utilizando un kit de detección de citotoxicidad (LDH, Roche) como se describió anteriormente {Dacheux, 1999 núm. 81}. La liberación de LDH de las células infectadas se midió a las 3 h de la infección. El porcentaje de citotoxicidad para cada experimento se calculó con la siguiente ecuación: (valor de Exp. - control solo con células) / (control con Tritón X-100 al 1% - control solo con células) x 100. Los datos son las medias de los resultados de al menos tres experimentos.

45 Los datos se muestran en la figura 4A: las células foto-tratadas no son citotóxicas hacia las células dendríticas de ratón.

La Figura 4B muestra la citotoxicidad sobre células dendríticas humanas.

Las cepas sometidas a prueba son las siguientes: OSTAB y KBMA que expresan el antígeno MIFlu Puerto Rico (M1-K252) fusionado con ExoS54.

La Figura 4C muestra la viabilidad de los moDC humanas 24 h después de la infección con KBMA u OSTAB S54-

M1F1.

Ejemplo 6 Protocolo de vacunación con la cepa adaptada obtenida en el ejemplo 1

Experimentos con animales: Se adquirieron ratones hembra C57BL/6 de Janvier SA (Le Genest-Saint-Isle, Francia) y se sometieron al experimento a las 6-8 semanas de edad. Se mantuvieron en condiciones libres de patógenos en las instalaciones de animales de la Universidad Joseph Fourier (Grenoble, Francia). Todos los experimentos con animales fueron aprobados por el Comité de Experimentos con Animales de la Región y se realizaron de acuerdo con las directrices institucionales y nacionales.

Inmunización animal:

A) Ensayo profiláctico: A ratones C57BL/6 se les inyectó, en cuatro posiciones en los flancos derecho e izquierdo la cepa CHA-CLIN1-PADRE-OVA a $5 \cdot 10^7$ células/posición/vez, dos veces, 14 días y 7 días antes de la sensibilización de los tumores B16OVA. CHA-OST-EI es el control negativo. Las curvas de Kaplan-Meyer mostraron datos de supervivencia de los grupos de 6 ratones. Análisis estadístico: $p < 0,01$ para tres grupos inmunizados frente a EI, sin diferencia entre los grupos inmunizados.

B) Ensayo terapéutico: los ratones C57BL/6 recibieron una sensibilización tumoral por vía subcutánea con células tumorales GL261 el día 0 y a continuación se vacunaron en cuatro posiciones en los flancos derecho e izquierdo con la cepa CHA-CLIN1-PADRE-OVA a $5 \cdot 10^7$ células/posición/vez en el siguiente esquema terapéutico D1/D5/D9/D13/D17/D21. Las curvas de Kaplan-Meyer mostraron datos de supervivencia de los grupos de 6 ratones. Análisis estadístico: $p < 0,01$ para tres grupos inmunizados frente a EI; CHA-OST-PADRE-OVA frente a CHA-CLIN1-PADRE-OVA 4 posiciones, $p = 0,72$; CHA-OST-PADRE-OVA frente a CHA-CLIN1-PADRE-OVA 1 posición, $p = 0,038$.

Experimento de sensibilización tumoral: A ratones hembra C57BL/6 inmunizados (grupos profilácticos) o no inmunizados (grupos terapéuticos) se les inyectaron subcutáneamente en el flanco izquierdo el día 0 células B16-OVA a la dosis de $2 \cdot 10^5$ células (100 μ L)/ratón o células GL261 a la dosis de $1 \cdot 10^5$ células (100 μ L)/ratón.

La aparición y el crecimiento dinámico de la masa tumoral se midieron cada 48 horas. Cuando el diámetro del tumor excedió los 10 mm, los ratones fueron sacrificados y este día correspondió al período de supervivencia. El análisis de los datos se realizó con el soporte lógico GraphPad Prism 5.

Análisis estadístico: Los análisis de los diagramas de barras se evaluaron mediante la prueba t de Student. Las curvas de supervivencia de Kaplan-Meyer de animales tratados con diferentes protocolos se analizaron utilizando la prueba logrank. Se consideró que un valor p inferior a 0,05 entre los grupos indicaba una diferencia estadísticamente significativa.

Resultados: En primer lugar, los autores de la presente invención encontraron que 10^8 CHA-CLIN1-PADRE-OVA/vez cebaba la respuesta de las células T CD8+ más fuerte entre las tres dosis, y trataron de optimizar la eficacia de la cepa CHA-CLIN1 a través de la vacunación de ratones en múltiples posiciones (cuatro inyecciones subcutáneas en los flancos derecho e izquierdo, $5 \cdot 10^7$ bacteria/posición/vez, en D-14/D-7).

Las vacunaciones con CHA-CLIN1-PADRE-OVA basadas en diferentes protocolos demostraron la misma eficacia que la cepa CHA-OST-PADRE-OVA (Figura 5A).

Para el ensayo terapéutico, todos los grupos inmunizados presentaron rechazos tumorales con ligeras diferencias entre los tres grupos inmunizados, las vacunaciones con CHA-CLIN1-PADRE-OVA en cuatro posiciones fueron ligeramente más eficaces que las vacunas CHA-OST-PADRE-OVA que fueron aún mejores que las vacunaciones con CHA-CLIN1-PADRE-OVA en una posición. Se debe observar que no se encontraron diferencias significativas entre el grupo CHA-OST-PADRE-OVA y el grupo CHA-CLIN1-PADRE-OVA en 4 posiciones, mientras que la diferencia entre el grupo CHA-OST-PADRE-OVA y el grupo CHA-CLIN1-PADRE-OVA en 1 posición fue significativo ($p = 0,038$) (Figura 5B).

Documentos relacionados con patentes citados

- EP 1 692 162 B1 - Universidad Joseph Fourier

Documentos no relacionados con patentes citados

- 5
- Epaulard O, Toussaint B, Quenee L, Derouazi M, Bosco N, Villiers C, et al. *Anti-tumor immunotherapy via antigen delivery from a live attenuated genetically engineered Pseudomonas aeruginosa type III secretion system-based vector*. Mol Ther, noviembre 2006; 14(5):656-61.
 - Epaulard O, Derouazi M, Margerit C, Marlu R, Filopon D, Polack B, et al. *Optimization of a type III secretion system-based Pseudomonas aeruginosa live vector for antigen delivery*. Clin Vaccine Immunol febrero 2008;15(2):308-13.
- 10
- Brockstedt DG, Bahjat KS, Giedlin MA, Liu W, Leong M, Luckett W, Gao Y, Schnupf P, Kapadia D, Castro G, Lim JY, Sampson-Johannes A, Herskovits AA, Stassinopoulos A, Bouwer HG, Hearst JE, Portnoy DA, Cook DN, Dubensky TW Jr. *Killed but metabolically active microbes: a new vaccine paradigm for eliciting effector T-cell responses and protective immunity*. Nat Med. agosto 2005; 11(8):853-60.
- 15
- Wollowitz S. *Fundamentals of the psoralen-based Helinx technology for inactivation of infectious pathogens and leukocytes in platelets and plasma*. Semin Hematol. octubre 2001; 38(4 Supl 11):4-11.
 - DeBell RM. *Production of exotoxin A by Pseudomonas aeruginosa in a chemically defined medium*. Infect Immun abril 1979; 24(1):132-8.
 - Sambrook J, Russel DW. *Molecular Cloning, a laboratory manual, 3ª edición*. Cold Spring Harbor Laboratory Press (2001).
- 20
- Coligan, *Conventional immunological techniques are explained in Current protocol in Immunology*, John Wiley & Sons (2005).
 - Buonaguro L, Petrizzo A, Tornesello ML, Buonaguro FM. *Translating tumor antigens into cancer vaccines*. Clin Vaccine Immunol. Enero 2011; 18(1):23-34. Revisión.
- 25
- Novellino L, Castelli C, Parmiani G. *A listing of human tumor antigens recognized by T cells: actualización de marzo de 2004*. Cancer Immunol Immunother. Marzo 2005; 54(3):187-207. Revisión.
 - Derouazi M, Wang Y, Marlu R, Epaulard O, Mayol JF, Pasqual N, Le Gouellec A, Polack B, Toussaint B. *Optimal epitope composition after antigen screening using a live bacterial delivery vector: application to TRP-2*. Bioeng. Bugs. Enero-febrero 2010; 1(1):51-60.
- 30
- Dacheux D, Attree I, Schneider C, Toussaint B. *Cell death of human polymorphonuclear neutrophils induced by a Pseudomonas aeruginosa cystic fibrosis isolate requires a functional type III secretion system*. Infect Immun. Noviembre 1999; 67(11):6164-7.

WO 2013/087667

PCT/EP2012/075167

PCT

Impresión (original en formato electrónico)

(Esta hoja no es parte de la solicitud internacional, y no cuenta como página de la misma)

0-1	Formulario PCT/RO/134 (SAFE) Indicaciones relativas al(a los) microorganismo(s) u otro material biológico depositado (Regla 13bis del PCT)	
0-1-1	Preparado utilizando	Presentación online PCT Versión 3.5.000.232 MT/FOP 20020701/0.20.5.20
0-2	Solicitud internacional nº	
0-3	Referencia de archivo del solicitante o del agente	362022D30230

5

1	Las indicaciones hechas más abajo se refieren al (a los) microorganismo(s) u otro material biológico depositado al que se refiere la descripción en:	
1-1	página	7
1-2	línea	17-18
1-3	Identificación del depósito	
1-3-1	Nombre de la institución depositaria	CNCM Collection Nationale de Cultures de Micro-organismes
1-3-2	Dirección de la institución depositaria	Institut Pasteur, Rue Dr Roux, 28, 75724 Paris Cedex 15, Francia
1-3-3	Fecha del depósito	01 diciembre 2011 (01.12.2011)
1-3-4	Número de acceso	CNCM I-4564
1-4	Indicaciones adicionales	CLIN-01
1-5	Estados contratantes para los que se hacen las indicaciones	Todos los designados

SÓLO PARA USO DE LA OFICINA RECEPTORA

0-4	Este formulario fue recibido con la solicitud internacional: (sí o no)	Sí
0-4-1	Oficial autorizado	Hurenkamp, Jaap

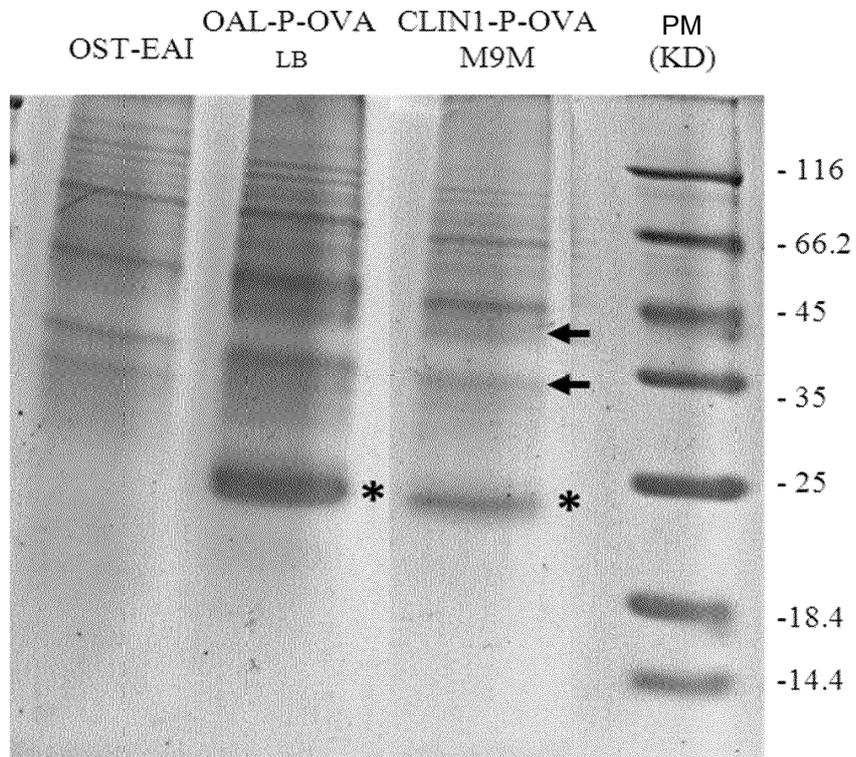
SÓLO PARA USO DE LA OFICINA INTERNACIONAL

0-5	Este formulario fue recibido por la oficina internacional:	
0-5-1	Oficial autorizado	

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para obtener una cepa adaptada de *Pseudomonas*, que comprende las siguientes etapas:
- Eliminar los genes *ExoS*, *ExoT*, *aroA* y *LasI* en una cepa inicial de *Pseudomonas* cultivada en un medio LB,
 - Cambiar progresivamente el medio de cultivo de medio LB a un medio químicamente definido que comprende magnesio y calcio, y
 - Seleccionar las cepas adaptadas que presentan un tiempo de duplicación inferior a 60 minutos cuando se cultivan en dicho medio químicamente definido.
2. El procedimiento según la reivindicación 1, en donde el medio químicamente definido tiene la siguiente composición: un medio mínimo de glucosa M9 con un suplemento de Mg^{2+} 1 mM y Ca^{2+} 1 mM.
3. El procedimiento según la reivindicación 1 o 2, en donde la cepa adaptada se trata adicionalmente para convertirla en "muerta pero metabólicamente activa", llevando a cabo:
- la delección del gen *uvrAB*;
 - la inactivación fotoquímica con UVA en presencia de psoraleno S-59.
4. Una cepa adaptada de *Pseudomonas* obtenida por el procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde la cepa adaptada presenta la misma toxicidad y capacidades de secreción que la cepa inicial, y su tiempo de duplicación cuando se cultiva en dicho medio químicamente definido es inferior a 60 minutos y en donde se ha depositado en el CNCM (Institut Pasteur) con el número de registro 1-4564.
5. Una composición inmunogénica que comprende la cepa adaptada de *Pseudomonas* según la reivindicación 4.
6. Una vacuna que comprende la composición inmunogénica según la reivindicación 5 y un portador o coadyuvante farmacéuticamente aceptables.
7. Una vacuna según la reivindicación 6, para su uso en un método para inducir una respuesta inmunitaria en un anfitrión, comprendiendo dicho método la administración al anfitrión mediante inyección en múltiples posiciones de una cantidad eficaz de dicha vacuna.
8. El uso de una cepa adaptada de *Pseudomonas* según la reivindicación 4, para la preparación de una composición de vacuna.
9. Una cepa adaptada de *Pseudomonas* como se define en la reivindicación 4, para su uso en un método para inducir una respuesta inmunitaria en un anfitrión.

Figura 1



- popB: 40KD
- popD: 31KD
- P-OVA: 21.7KD

Figura 2

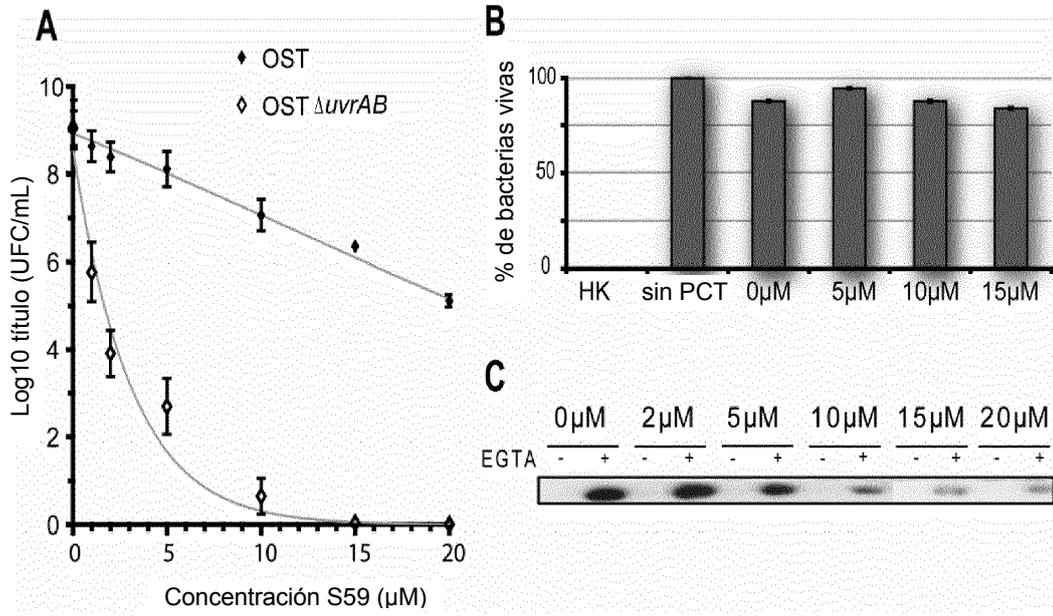


Figura 3

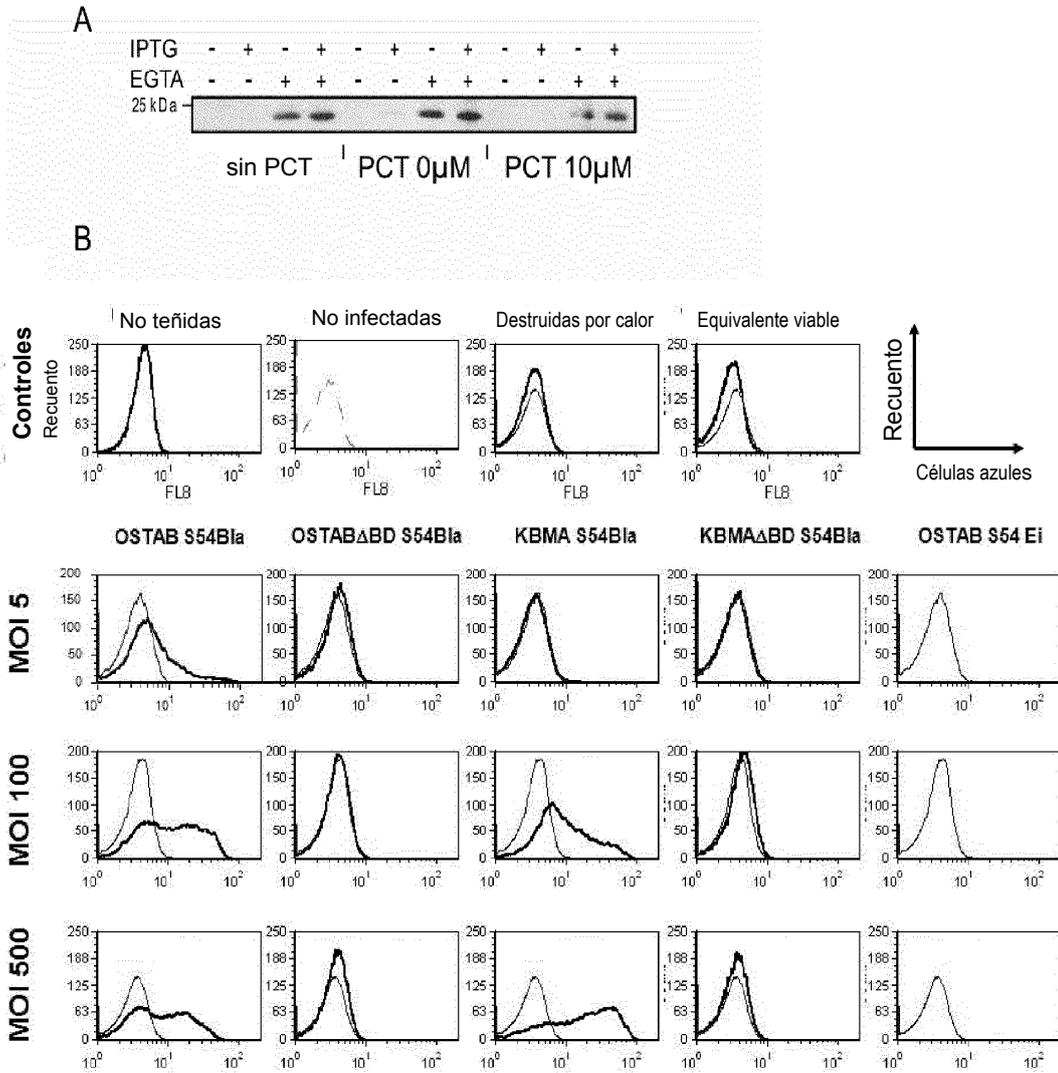


Figura 4

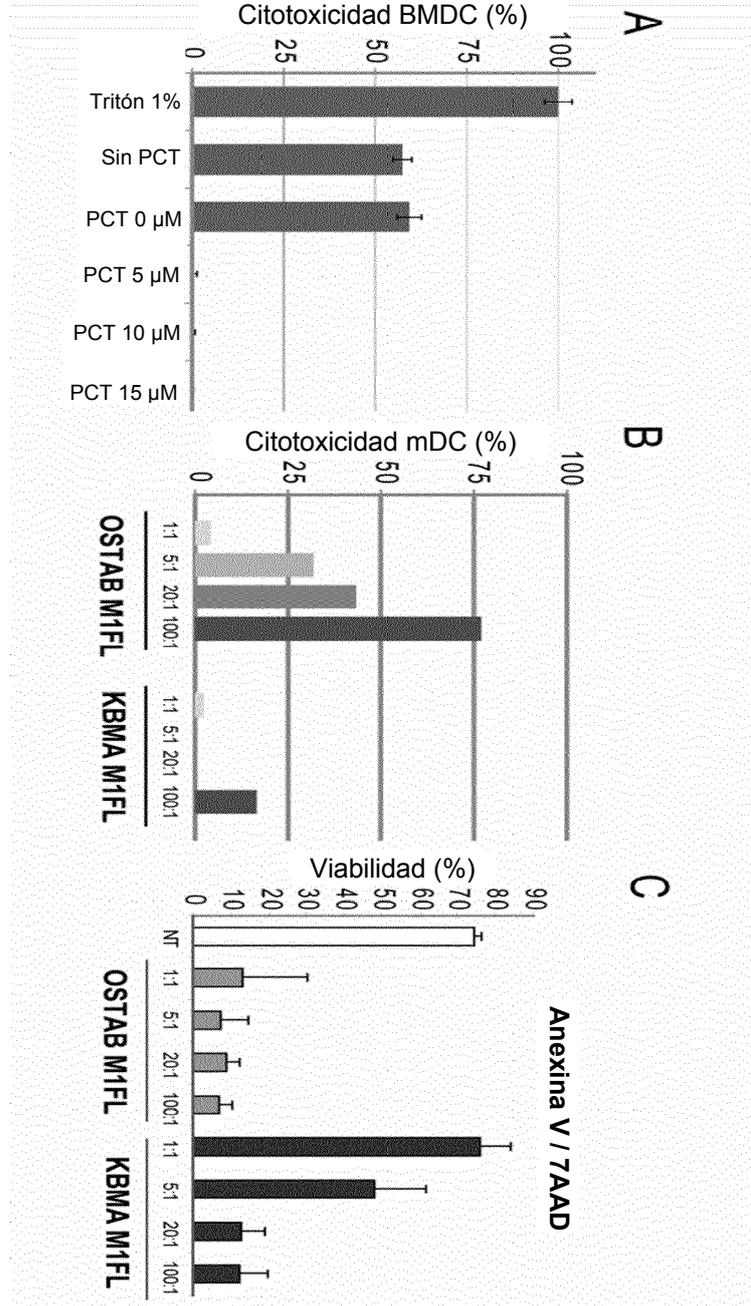
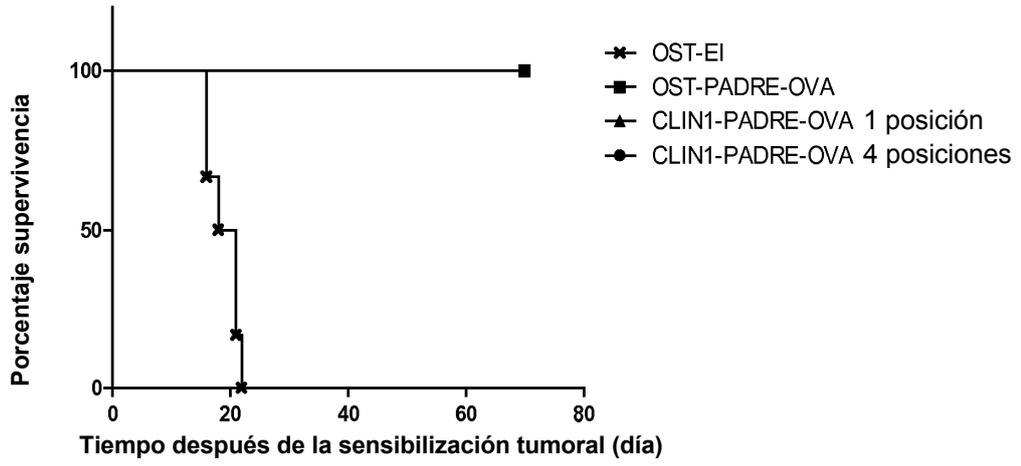


Figura 5

A



B

