

REIVINDICACIONES

1. Una cepa bacteriana gramnegativa con virulencia atenuada recombinante que comprende una molécula de nucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína heteróloga fusionada en marco al extremo 3' de una secuencia de nucleótidos que codifica una
5 señal de suministro de una proteína efectora bacteriana, en donde la secuencia de nucleótidos que codifica la señal de suministro de una proteína efectora bacteriana se une operativamente a un promotor, y en donde la proteína heteróloga es una proteína implicada en la inducción o regulación de una respuesta de interferón (IFN).
- 10 2. La cepa bacteriana gramnegativa con virulencia atenuada recombinante de conformidad con la reivindicación 1, en donde la proteína implicada en la inducción o regulación de una respuesta de IFN es una proteína implicada en la inducción o regulación de una respuesta de IFN del tipo I, en donde la proteína heteróloga implicada en la inducción o regulación de una respuesta de IFN del tipo I se selecciona del grupo que consiste en la familia del receptor similar a RIG-1 (RLR), otras
15 proteínas que contienen el dominio CARD implicadas en la señalización antiviral y la inducción de IFN del tipo I, y enzimas generadoras de dinucleótidos cíclicos tales como di-AMP cíclico, di-GMP cíclico y di-GAMP cíclico ciclasas seleccionadas del grupo que consiste en WspR, DncV, DisA y similar a DisA, CdaA, CdaS y cGAS, que conducen a la estimulación de STING.
- 20 3. La cepa bacteriana gramnegativa con virulencia atenuada recombinante de conformidad con la reivindicación 1, en donde la proteína implicada en la inducción o regulación de una respuesta de IFN es una proteína implicada en la inducción o regulación de una respuesta de IFN del tipo I en donde la proteína implicada en la inducción o regulación de una respuesta de IFN del tipo I se selecciona del grupo que consiste en RIG1, MDA5, MAVS/IPS-1, WspR, DncV, DisA y similar a
25 DisA, CdaA, y cGAS o un fragmento de esta.
4. La cepa bacteriana gramnegativa con virulencia atenuada recombinante de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde la cepa bacteriana gramnegativa con virulencia atenuada recombinante comprende además una delección de un gen cromosómico que codifica una
30 proteína endógena esencial para el crecimiento y un plásmido de virulencia endógeno que comprende una secuencia de nucleótidos que comprende un gen que codifica dicha proteína endógena esencial para el crecimiento unida operativamente a un promotor.

5. La cepa bacteriana gramnegativa con virulencia atenuada recombinante de conformidad con la reivindicación 4, en donde dicha cepa bacteriana gramnegativa recombinante con virulencia atenuada es deficiente en la producción de al menos una proteína efectora bacteriana.

5

6. La cepa bacteriana gramnegativa con virulencia atenuada recombinante de conformidad con la reivindicación 4 o 5, en donde el gen que codifica una proteína endógena esencial para el crecimiento se selecciona de un gen que codifica una enzima esencial para la producción de aminoácidos, un gen que codifica una enzima implicada en la biosíntesis de peptidoglicano, un gen que codifica una enzima implicada en biosíntesis de LPS, un gen que codifica una enzima implicada en la síntesis de nucleótidos y un gen que codifica un factor de iniciación de la traducción.

10

7. La cepa bacteriana gramnegativa con virulencia atenuada recombinante de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 4-6, en donde el gen que codifica una enzima endógena esencial para el crecimiento es un gen que codifica una enzima esencial para la producción de aminoácidos, en donde la enzima esencial para la producción de aminoácidos es la aspartato-beta-semialdehído deshidrogenasa (asd).

15

8. La cepa bacteriana gramnegativa con virulencia atenuada recombinante de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde la cepa bacteriana gramnegativa con virulencia atenuada recombinante es una cepa de *Yersinia*.

20

9. La cepa bacteriana gramnegativa con virulencia atenuada recombinante de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 4-8, en donde el gen que codifica una enzima endógena esencial para el crecimiento localizado en el plásmido de virulencia endógeno comprende su promotor endógeno y su terminador de la transcripción endógeno.

25

10. La cepa bacteriana gramnegativa con virulencia atenuada recombinante de conformidad con la reivindicación 9, en donde el gen que codifica la enzima endógena esencial para el crecimiento, su promotor endógeno y su terminador de la transcripción endógeno se localizan 122 pb corriente arriba del comienzo de orf155 (SycO) en el plásmido de virulencia endógeno.

30

11. La cepa bacteriana gramnegativa con virulencia atenuada recombinante de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en donde la cepa bacteriana gramnegativa con virulencia atenuada recombinante comprende además una modulación dentro de una región termosensora de ARN corriente arriba de un gen que codifica una proteína de unión al ADN del tipo AraC endógena.
12. La cepa bacteriana gramnegativa con virulencia atenuada recombinante de conformidad con la reivindicación 11, en donde la modulación dentro de una región termosensora de ARN corriente arriba de un gen que codifica una proteína de unión al ADN del tipo AraC endógena comprende una delección que elimina una estructura de horquilla de ARN o partes de esta corriente arriba del gen que codifica una proteína de unión al ADN del tipo AraC endógena.
13. La cepa bacteriana gramnegativa con virulencia atenuada recombinante de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 11-12, en donde la proteína de unión al ADN del tipo AraC es VirF.
14. La cepa bacteriana gramnegativa con virulencia atenuada recombinante de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-13, en donde la cepa bacteriana gramnegativa con virulencia atenuada recombinante es *Yersinia enterocolitica*.
15. Una cepa bacteriana gramnegativa con virulencia atenuada recombinante que comprende una molécula de nucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína heteróloga fusionada en marco al extremo 3' de una secuencia de nucleótidos que codifica una señal de suministro de una proteína efectora bacteriana, en donde la secuencia de nucleótidos que codifica la señal de suministro de una proteína efectora bacteriana se une operativamente a un promotor, y en donde la cepa bacteriana gramnegativa con virulencia atenuada recombinante comprende además una delección de un gen cromosómico que codifica una proteína endógena esencial para el crecimiento y un plásmido de virulencia endógeno que comprende una secuencia de nucleótidos que comprende un gen que codifica dicha proteína endógena esencial para el crecimiento unida operativamente a un promotor.

16. La cepa bacteriana gramnegativa con virulencia atenuada recombinante de conformidad con la reivindicación 15, en donde dicha cepa bacteriana gramnegativa recombinante con virulencia atenuada es deficiente en la producción de al menos una proteína efectora bacteriana.
- 5 17. La cepa bacteriana gramnegativa con virulencia atenuada recombinante de conformidad con la reivindicación 15 o 16, en donde el gen que codifica una proteína endógena esencial para el crecimiento se selecciona de un gen que codifica una enzima esencial para la producción de aminoácidos, un gen que codifica una enzima implicada en la biosíntesis de peptidoglicano, un gen que codifica una enzima implicada en biosíntesis de LPS, un gen que codifica una enzima
10 implicada en la síntesis de nucleótidos y un gen que codifica un factor de iniciación de la traducción.
18. La cepa bacteriana gramnegativa con virulencia atenuada recombinante de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 15-17, en donde el gen que codifica una enzima endógena
15 esencial para el crecimiento es un gen que codifica una enzima esencial para la producción de aminoácidos, en donde la enzima esencial para la producción de aminoácidos es la aspartato-beta-semialdehído deshidrogenasa (asd).
19. La cepa bacteriana gramnegativa con virulencia atenuada recombinante de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 15-18, en donde la cepa bacteriana gramnegativa con virulencia
20 atenuada recombinante es una cepa de *Yersinia*.
20. La cepa bacteriana gramnegativa con virulencia atenuada recombinante de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 15-19, en donde el gen que codifica una enzima endógena
25 esencial para el crecimiento localizado en el plásmido de virulencia endógeno comprende su promotor endógeno y su terminador de la transcripción endógeno.
21. La cepa bacteriana gramnegativa con virulencia atenuada recombinante de conformidad con la reivindicación 20, en donde el gen que codifica la enzima endógena esencial para el crecimiento,
30 su promotor endógeno y su terminador de la transcripción endógeno se localizan 122 pb corriente arriba del comienzo de orf155 (SycO) en el plásmido de virulencia endógeno.

22. La cepa bacteriana gramnegativa con virulencia atenuada recombinante de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 15-21, en donde la cepa bacteriana gramnegativa con virulencia atenuada recombinante comprende además una modulación dentro de una región termosensora de ARN corriente arriba de un gen que codifica una proteína de unión al ADN del tipo AraC endógena.
23. Una cepa bacteriana gramnegativa con virulencia atenuada recombinante que comprende una molécula de nucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína heteróloga fusionada en marco al extremo 3' de una secuencia de nucleótidos que codifica una señal de suministro de una proteína efectora bacteriana, en donde la secuencia de nucleótidos que codifica la señal de suministro de una proteína efectora bacteriana se une operativamente a un promotor, y en donde la cepa bacteriana gramnegativa con virulencia atenuada recombinante comprende además una modulación dentro de una región termosensora de ARN corriente arriba de un gen que codifica una proteína de unión al ADN del tipo AraC endógena.
24. La cepa bacteriana gramnegativa con virulencia atenuada recombinante de conformidad con la reivindicación 22 o 23, en donde la modulación dentro de una región termosensora de ARN corriente arriba de un gen que codifica una proteína de unión al ADN del tipo AraC endógena comprende una delección que elimina una estructura de horquilla de ARN o partes de esta corriente arriba del gen que codifica una proteína de unión al ADN del tipo AraC endógena.
25. La cepa bacteriana gramnegativa con virulencia atenuada recombinante de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 22-24, en donde la proteína de unión al ADN del tipo AraC es una proteína de regulación de la transcripción bacteriana que se une al ADN a través de un motivo de hélice-giro-hélice.
26. La cepa bacteriana gramnegativa con virulencia atenuada recombinante de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 22-24, en donde la proteína de unión al ADN del tipo AraC selecciona del grupo que consiste en VirF, LcrF, YbtA, Rns, MxiE, AraC, XylS, ExsA, PerA, MmsR, RhaS, TcpN, HrpX, HrpB, GadX, HilC, HilD, MarA, CafR, FapR y InvF.

27. La cepa bacteriana gramnegativa con virulencia atenuada recombinante de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 22-26, en donde la cepa bacteriana gramnegativa con virulencia atenuada recombinante es *Yersinia enterocolitica* y la proteína de unión al ADN del tipo AraC es VirF.

5

28. La cepa bacteriana gramnegativa con virulencia atenuada recombinante de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 15-27, en donde la proteína heteróloga se selecciona del grupo que consiste en las proteínas implicadas en la inducción o regulación de una respuesta de interferón (IFN), las proteínas implicadas en la apoptosis o la regulación de la apoptosis, reguladores del ciclo celular, proteínas de repetición de anquirina, proteínas de señalización celular, proteínas reporteras, factores de transcripción, proteasas, GTPasas pequeñas, proteínas relacionadas con GPCR, constructos de fusión de nanocuerpos y nanocuerpos, efectores de T3SS bacterianos, efectores de T4SS bacterianos y proteínas virales.

10

15

29. La cepa bacteriana gramnegativa con virulencia atenuada recombinante de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-28, para el uso en un método para tratar el cáncer en un sujeto, el método que comprende administrar al sujeto dicha cepa bacteriana gramnegativa con virulencia atenuada recombinante, en donde la cepa bacteriana gramnegativa con virulencia atenuada recombinante se administra en una cantidad que es suficiente para tratar al sujeto.