LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Universidad de Basel

<120> Suministro de proteínas basado en bacterias con virulencia atenuada

<130> P5239PC00

<160> 131

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1
<211> 219
<212> PRT
<213> Yersinia enterocolitica

<400> 1

```
Met Lys Ile Ser Ser Phe Ile Ser Thr Ser Leu Pro Leu Pro Ala Ser
1               5                  10                  15

Val Ser Gly Ser Ser Ser Val Gly Glu Met Ser Gly Arg Ser Val Ser
            20                  25                  30

Gln Gln Lys Ser Asp Gln Tyr Ala Asn Asn Leu Ala Gly Arg Thr Glu
        35                  40                  45

Ser Pro Gln Gly Ser Ser Leu Ala Ser Arg Ile Ile Glu Arg Leu Ser
```

50 55 60

Ser Met Ala His Ser Val Ile Gly Phe Ile Gln Arg Met Phe Ser Glu
65 70 75 80

Gly Ser His Lys Pro Val Val Thr Pro Ala Leu Thr Pro Ala Gln Met
85 90 95

Pro Ser Pro Thr Ser Phe Ser Asp Ser Ile Lys Gln Leu Ala Ala Glu
100 105 110

Thr Leu Pro Lys Tyr Met Gln Gln Leu Ser Ser Leu Asp Ala Glu Thr
115 120 125

Leu Gln Lys Asn His Asp Gln Phe Ala Thr Gly Ser Gly Pro Leu Arg
130 135 140

Gly Ser Ile Thr Gln Cys Gln Gly Leu Met Gln Phe Cys Gly Gly Glu
145 150 155 160

Leu Gln Ala Glu Ala Ser Ala Ile Leu Asn Thr Pro Val Cys Gly Ile
165 170 175

Pro Phe Ser Gln Trp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Ser Ala Tyr Val

180 185 190

Ala Ser Gly Val Asp Leu Thr Gln Ala Ala Asn Glu Ile Lys Gly Leu
195 200 205

Gly Gln Gln Met Gln Gln Leu Leu Ser Leu Met
210 215

<210> 2
<211> 138
<212> PRT
<213> Yersinia enterocolitica

<400> 2

Met Lys Ile Ser Ser Phe Ile Ser Thr Ser Leu Pro Leu Pro Ala Ser
1 5 10 15

Val Ser Gly Ser Ser Ser Val Gly Glu Met Ser Gly Arg Ser Val Ser
20 25 30

Gln Gln Lys Ser Asp Gln Tyr Ala Asn Asn Leu Ala Gly Arg Thr Glu
35 40 45

Ser Pro Gln Gly Ser Ser Leu Ala Ser Arg Ile Ile Glu Arg Leu Ser
50 55 60

Ser Met Ala His Ser Val Ile Gly Phe Ile Gln Arg Met Phe Ser Glu
65 70 75 80

Gly Ser His Lys Pro Val Val Thr Pro Ala Leu Thr Pro Ala Gln Met
85 90 95

Pro Ser Pro Thr Ser Phe Ser Asp Ser Ile Lys Gln Leu Ala Ala Glu
100 105 110

Thr Leu Pro Lys Tyr Met Gln Gln Leu Ser Ser Leu Asp Ala Glu Thr
115 120 125

Leu Gln Lys Asn His Asp Gln Phe Ala Thr
130 135

<210> 3
<211> 169
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> YopE1-138-MycHis

<400> 3

```
Met Lys Ile Ser Ser Phe Ile Ser Thr Ser Leu Pro Leu Pro Ala Ser
1               5                  10                  15

Val Ser Gly Ser Ser Ser Val Gly Glu Met Ser Gly Arg Ser Val Ser
            20                  25                  30

Gln Gln Lys Ser Asp Gln Tyr Ala Asn Asn Leu Ala Gly Arg Thr Glu
        35                  40                  45

Ser Pro Gln Gly Ser Ser Leu Ala Ser Arg Ile Ile Glu Arg Leu Ser
    50                  55                  60

Ser Met Ala His Ser Val Ile Gly Phe Ile Gln Arg Met Phe Ser Glu
65                  70                  75                  80

Gly Ser His Lys Pro Val Val Thr Pro Ala Leu Thr Pro Ala Gln Met
                85                  90                  95

Pro Ser Pro Thr Ser Phe Ser Asp Ser Ile Lys Gln Leu Ala Ala Glu
            100                 105                 110

Thr Leu Pro Lys Tyr Met Gln Gln Leu Ser Ser Leu Asp Ala Glu Thr
        115                 120                 125
```

Leu Gln Lys Asn His Asp Gln Phe Ala Thr Leu Glu Ser Arg Phe Glu
130 135 140

Lys Leu Gly Pro Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Ser
145 150 155 160

Ala Val Asp His His His His His His
165

<210> 4
<211> 20
<212> PRT
<213> Salmonella enterica

<400> 4

Met Pro Tyr Thr Ser Val Ser Thr Tyr Ala Arg Ala Leu Ser Gly Asn
1 5 10 15

Lys Leu Pro His
20

<210> 5
<211> 210
<212> PRT
<213> Salmonella enterica

<400> 5

```
Met Pro Tyr Thr Ser Val Ser Thr Tyr Ala Arg Ala Leu Ser Gly Asn
1               5                  10                  15

Lys Leu Pro His Val Ala Ala Gly Asp Tyr Glu Asn Lys Leu Ser Thr
            20                  25                  30

Lys Ile Met Lys Gly Ile Leu Tyr Val Leu Thr Ala Gly Leu Ala Tyr
        35                  40                  45

Gly Phe Thr Arg Val Ile Glu His Tyr Cys Asn Val Thr Pro Lys Val
    50                  55                  60

Ala Glu Phe Cys Ala Asn Ala Gly Asn Ile His Asn His Leu Ala Asp
65                  70                  75                  80

Ala Val Arg Asp Gly Leu Phe Thr Ile Asp Val Glu Leu Ser Asp Gly
                85                  90                  95

Arg Met Leu Thr Phe Glu Gln Leu Ser Leu Ile Ala Glu Gly Lys Pro
            100                 105                 110

Ile Val Arg Ile Ser Asp Gly Glu His Thr Val Glu Val Glu Gly Thr
        115                 120                 125
```

Phe Glu Glu Ile Cys Met Arg Leu Glu Glu Gly Phe Phe Glu Ala Pro
130 135 140

Ala Tyr Tyr Asp Tyr Asp Ile Asp Glu Lys Tyr Lys Thr Val Arg Glu
145 150 155 160

Arg Met Ala Ala Tyr Asn Ala Leu Pro Gln Ala Leu Gly Ala Ile Pro
165 170 175

Cys Leu Glu Tyr Tyr Ile Ala Arg Ala Ser Asn Met Gln Glu Ala Lys
180 185 190

Ala Gln Trp Ala Ala Asp Ile Lys Ala Arg Tyr His Asn Tyr Leu Asp
195 200 205

Asn Tyr
210

<210> 6
<211> 81
<212> PRT
<213> Salmonella enterica

<400> 6

Val Thr Lys Ile Thr Leu Ser Pro Gln Asn Phe Arg Ile Gln Lys Gln
1 5 10 15

Glu Thr Thr Leu Leu Lys Glu Lys Ser Thr Glu Lys Asn Ser Leu Ala
20 25 30

Lys Ser Ile Leu Ala Val Lys Asn His Phe Ile Glu Leu Arg Ser Lys
35 40 45

Leu Ser Glu Arg Phe Ile Ser His Lys Asn Thr Glu Ser Ser Ala Thr
50 55 60

His Phe His Arg Gly Ser Ala Ser Glu Gly Arg Ala Val Leu Thr Asn
65 70 75 80

Lys

<210> 7
<211> 105
<212> PRT
<213> Salmonella enterica

<400> 7

Val Thr Lys Ile Thr Leu Ser Pro Gln Asn Phe Arg Ile Gln Lys Gln
1 5 10 15

Glu Thr Thr Leu Leu Lys Glu Lys Ser Thr Glu Lys Asn Ser Leu Ala
20 25 30

Lys Ser Ile Leu Ala Val Lys Asn His Phe Ile Glu Leu Arg Ser Lys
35 40 45

Leu Ser Glu Arg Phe Ile Ser His Lys Asn Thr Glu Ser Ser Ala Thr
50 55 60

His Phe His Arg Gly Ser Ala Ser Glu Gly Arg Ala Val Leu Thr Asn
65 70 75 80

Lys Val Val Lys Asp Phe Met Leu Gln Thr Leu Asn Asp Ile Asp Ile
85 90 95

Arg Gly Ser Ala Ser Lys Asp Pro Ala
100 105

<210> 8
<211> 310
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> YopE1-138 - Ink4C

<400> 8

```
Met Lys Ile Ser Ser Phe Ile Ser Thr Ser Leu Pro Leu Pro Ala Ser
1               5                  10                  15

Val Ser Gly Ser Ser Ser Val Gly Glu Met Ser Gly Arg Ser Val Ser
            20                  25                  30

Gln Gln Lys Ser Asp Gln Tyr Ala Asn Asn Leu Ala Gly Arg Thr Glu
        35                  40                  45

Ser Pro Gln Gly Ser Ser Leu Ala Ser Arg Ile Ile Glu Arg Leu Ser
    50                  55                  60

Ser Met Ala His Ser Val Ile Gly Phe Ile Gln Arg Met Phe Ser Glu
65                  70                  75                  80

Gly Ser His Lys Pro Val Val Thr Pro Ala Leu Thr Pro Ala Gln Met
                85                  90                  95

Pro Ser Pro Thr Ser Phe Ser Asp Ser Ile Lys Gln Leu Ala Ala Glu
            100                 105                 110
```

Thr Leu Pro Lys Tyr Met Gln Gln Leu Ser Ser Leu Asp Ala Glu Thr
115 120 125

Leu Gln Lys Asn His Asp Gln Phe Ala Thr Leu Glu Ser Arg Met Ala
130 135 140

Glu Pro Trp Gly Asn Glu Leu Ala Ser Ala Ala Ala Arg Gly Asp Leu
145 150 155 160

Glu Gln Leu Thr Ser Leu Leu Gln Asn Asn Val Asn Val Asn Ala Gln
165 170 175

Asn Gly Phe Gly Arg Thr Ala Leu Gln Val Met Lys Leu Gly Asn Pro
180 185 190

Glu Ile Ala Arg Arg Leu Leu Leu Arg Gly Ala Asn Pro Asp Leu Lys
195 200 205

Asp Arg Thr Gly Phe Ala Val Ile His Asp Ala Ala Arg Ala Gly Phe
210 215 220

Leu Asp Thr Leu Gln Ala Leu Pro Glu Phe Gln Ala Asp Val Asn Ile
225 230 235 240

Glu Asp Asn Glu Gly Asn Leu Pro Leu His Leu Ala Ala Lys Glu Gly
245 250 255

His Leu Arg Val Val Glu Phe Leu Val Lys His Thr Ala Ser Asn Val
260 265 270

Gly His Arg Asn His Lys Gly Asp Thr Ala Cys Asp Leu Ala Arg Leu
275 280 285

Tyr Gly Arg Asn Glu Val Val Ser Leu Met Gln Ala Asn Gly Ala Gly
290 295 300

Gly Ala Thr Asn Leu Gln
305 310

<210> 9
<211> 465
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> YopE1-138 - ET1

<400> 9

```
Met Lys Ile Ser Ser Phe Ile Ser Thr Ser Leu Pro Leu Pro Ala Ser
1               5                  10                  15

Val Ser Gly Ser Ser Ser Val Gly Glu Met Ser Gly Arg Ser Val Ser
            20                  25                  30

Gln Gln Lys Ser Asp Gln Tyr Ala Asn Asn Leu Ala Gly Arg Thr Glu
        35                  40                  45

Ser Pro Gln Gly Ser Ser Leu Ala Ser Arg Ile Ile Glu Arg Leu Ser
    50                  55                  60

Ser Met Ala His Ser Val Ile Gly Phe Ile Gln Arg Met Phe Ser Glu
65                  70                  75                  80

Gly Ser His Lys Pro Val Val Thr Pro Ala Leu Thr Pro Ala Gln Met
                85                  90                  95

Pro Ser Pro Thr Ser Phe Ser Asp Ser Ile Lys Gln Leu Ala Ala Glu
            100                 105                 110

Thr Leu Pro Lys Tyr Met Gln Gln Leu Ser Ser Leu Asp Ala Glu Thr
        115                 120                 125
```

```
Leu Gln Lys Asn His Asp Gln Phe Ala Thr Leu Glu Ser Arg Met Pro
    130                 135                 140

Arg Pro Lys Leu Lys Ser Asp Asp Glu Val Leu Glu Ala Ala Thr Val
145                 150                 155                 160

Val Leu Lys Arg Cys Gly Pro Ile Glu Phe Thr Leu Ser Gly Val Ala
                165                 170                 175

Lys Glu Val Gly Leu Ser Arg Ala Ala Leu Ile Gln Arg Phe Thr Asn
            180                 185                 190

Arg Asp Thr Leu Leu Val Arg Met Met Glu Arg Gly Val Glu Gln Val
        195                 200                 205

Arg His Tyr Leu Asn Ala Ile Pro Ile Gly Ala Gly Pro Gln Gly Leu
    210                 215                 220

Trp Glu Phe Leu Gln Val Leu Val Arg Ser Met Asn Thr Arg Asn Asp
225                 230                 235                 240

Phe Ser Val Asn Tyr Leu Ile Ser Trp Tyr Glu Leu Gln Val Pro Glu
                245                 250                 255
```

Leu Arg Thr Leu Ala Ile Gln Arg Asn Arg Ala Val Val Glu Gly Ile
260 265 270

Arg Lys Arg Leu Pro Pro Gly Ala Pro Ala Ala Ala Glu Leu Leu Leu
275 280 285

His Ser Val Ile Ala Gly Ala Thr Met Gln Trp Ala Val Asp Pro Asp
290 295 300

Gly Glu Leu Ala Asp His Val Leu Ala Gln Ile Ala Ala Ile Leu Cys
305 310 315 320

Leu Met Phe Pro Glu His Asp Asp Phe Gln Leu Leu Gln Ala His Ala
325 330 335

Ser Ala Tyr Ser Arg Ala Arg Thr Lys Asn Asn Tyr Gly Ser Thr Ile
340 345 350

Glu Gly Leu Leu Asp Leu Pro Asp Asp Asp Ala Pro Glu Glu Ala Gly
355 360 365

Leu Ala Ala Pro Arg Leu Ser Phe Leu Pro Ala Gly His Thr Arg Arg
370 375 380

Leu Ser Thr Ala Pro Pro Thr Asp Val Ser Leu Gly Asp Glu Leu His
385 390 395 400

Leu Asp Gly Glu Asp Val Ala Met Ala His Ala Asp Ala Leu Asp Asp
405 410 415

Phe Asp Leu Asp Met Leu Gly Asp Gly Asp Ser Pro Gly Pro Gly Phe
420 425 430

Thr Pro His Asp Ser Ala Pro Tyr Gly Ala Leu Asp Met Ala Asp Phe
435 440 445

Glu Phe Glu Gln Met Phe Thr Asp Ala Leu Gly Ile Asp Glu Tyr Gly
450 455 460

Gly
465

<210> 10
<211> 324
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> YopE1-138 - 2x sitio de TEV - INK4C

<400> 10

```
Met Lys Ile Ser Ser Phe Ile Ser Thr Ser Leu Pro Leu Pro Ala Ser
1               5                  10                  15

Val Ser Gly Ser Ser Ser Val Gly Glu Met Ser Gly Arg Ser Val Ser
            20                  25                  30

Gln Gln Lys Ser Asp Gln Tyr Ala Asn Asn Leu Ala Gly Arg Thr Glu
        35                  40                  45

Ser Pro Gln Gly Ser Ser Leu Ala Ser Arg Ile Ile Glu Arg Leu Ser
    50                  55                  60

Ser Met Ala His Ser Val Ile Gly Phe Ile Gln Arg Met Phe Ser Glu
65                  70                  75                  80

Gly Ser His Lys Pro Val Val Thr Pro Ala Leu Thr Pro Ala Gln Met
                85                  90                  95

Pro Ser Pro Thr Ser Phe Ser Asp Ser Ile Lys Gln Leu Ala Ala Glu
            100                 105                 110

Thr Leu Pro Lys Tyr Met Gln Gln Leu Ser Ser Leu Asp Ala Glu Thr
        115                 120                 125
```

Leu Gln Lys Asn His Asp Gln Phe Ala Thr Leu Glu Ser Arg Glu Asn
130 135 140

Leu Tyr Phe Gln Ser Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Ser Met Ala Glu Pro
145 150 155 160

Trp Gly Asn Glu Leu Ala Ser Ala Ala Ala Arg Gly Asp Leu Glu Gln
165 170 175

Leu Thr Ser Leu Leu Gln Asn Asn Val Asn Val Asn Ala Gln Asn Gly
180 185 190

Phe Gly Arg Thr Ala Leu Gln Val Met Lys Leu Gly Asn Pro Glu Ile
195 200 205

Ala Arg Arg Leu Leu Leu Arg Gly Ala Asn Pro Asp Leu Lys Asp Arg
210 215 220

Thr Gly Phe Ala Val Ile His Asp Ala Ala Arg Ala Gly Phe Leu Asp
225 230 235 240

Thr Leu Gln Ala Leu Pro Glu Phe Gln Ala Asp Val Asn Ile Glu Asp
245 250 255

Asn Glu Gly Asn Leu Pro Leu His Leu Ala Ala Lys Glu Gly His Leu
260 265 270

Arg Val Val Glu Phe Leu Val Lys His Thr Ala Ser Asn Val Gly His
275 280 285

Arg Asn His Lys Gly Asp Thr Ala Cys Asp Leu Ala Arg Leu Tyr Gly
290 295 300

Arg Asn Glu Val Val Ser Leu Met Gln Ala Asn Gly Ala Gly Gly Ala
305 310 315 320

Thr Asn Leu Gln

<210> 11
<211> 479
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> YopE1-138 - 2x sitio de TEV - ET1

<400> 11

```
Met Lys Ile Ser Ser Phe Ile Ser Thr Ser Leu Pro Leu Pro Ala Ser
1               5                  10                  15

Val Ser Gly Ser Ser Ser Val Gly Glu Met Ser Gly Arg Ser Val Ser
            20                  25                  30

Gln Gln Lys Ser Asp Gln Tyr Ala Asn Asn Leu Ala Gly Arg Thr Glu
        35                  40                  45

Ser Pro Gln Gly Ser Ser Leu Ala Ser Arg Ile Ile Glu Arg Leu Ser
    50                  55                  60

Ser Met Ala His Ser Val Ile Gly Phe Ile Gln Arg Met Phe Ser Glu
65                  70                  75                  80

Gly Ser His Lys Pro Val Val Thr Pro Ala Leu Thr Pro Ala Gln Met
                85                  90                  95

Pro Ser Pro Thr Ser Phe Ser Asp Ser Ile Lys Gln Leu Ala Ala Glu
            100                 105                 110

Thr Leu Pro Lys Tyr Met Gln Gln Leu Ser Ser Leu Asp Ala Glu Thr
        115                 120                 125
```

Leu Gln Lys Asn His Asp Gln Phe Ala Thr Leu Glu Ser Arg Glu Asn
130 135 140

Leu Tyr Phe Gln Ser Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Ser Met Pro Arg Pro
145 150 155 160

Lys Leu Lys Ser Asp Asp Glu Val Leu Glu Ala Ala Thr Val Val Leu
165 170 175

Lys Arg Cys Gly Pro Ile Glu Phe Thr Leu Ser Gly Val Ala Lys Glu
180 185 190

Val Gly Leu Ser Arg Ala Ala Leu Ile Gln Arg Phe Thr Asn Arg Asp
195 200 205

Thr Leu Leu Val Arg Met Met Glu Arg Gly Val Glu Gln Val Arg His
210 215 220

Tyr Leu Asn Ala Ile Pro Ile Gly Ala Gly Pro Gln Gly Leu Trp Glu
225 230 235 240

Phe Leu Gln Val Leu Val Arg Ser Met Asn Thr Arg Asn Asp Phe Ser
245 250 255

Val Asn Tyr Leu Ile Ser Trp Tyr Glu Leu Gln Val Pro Glu Leu Arg
260 265 270

Thr Leu Ala Ile Gln Arg Asn Arg Ala Val Val Glu Gly Ile Arg Lys
275 280 285

Arg Leu Pro Pro Gly Ala Pro Ala Ala Ala Glu Leu Leu Leu His Ser
290 295 300

Val Ile Ala Gly Ala Thr Met Gln Trp Ala Val Asp Pro Asp Gly Glu
305 310 315 320

Leu Ala Asp His Val Leu Ala Gln Ile Ala Ala Ile Leu Cys Leu Met
325 330 335

Phe Pro Glu His Asp Asp Phe Gln Leu Leu Gln Ala His Ala Ser Ala
340 345 350

Tyr Ser Arg Ala Arg Thr Lys Asn Asn Tyr Gly Ser Thr Ile Glu Gly
355 360 365

Leu Leu Asp Leu Pro Asp Asp Asp Ala Pro Glu Glu Ala Gly Leu Ala
370 375 380

Ala Pro Arg Leu Ser Phe Leu Pro Ala Gly His Thr Arg Arg Leu Ser
385 390 395 400

Thr Ala Pro Pro Thr Asp Val Ser Leu Gly Asp Glu Leu His Leu Asp
405 410 415

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

Leu Asp Met Leu Gly Asp Gly Asp Ser Pro Gly Pro Gly Phe Thr Pro
435 440 445

His Asp Ser Ala Pro Tyr Gly Ala Leu Asp Met Ala Asp Phe Glu Phe
450 455 460

Glu Gln Met Phe Thr Asp Ala Leu Gly Ile Asp Glu Tyr Gly Gly
465 470 475

<210> 12
<211> 380
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> YopE1-138 - proteasa de TEV S219V

<400> 12

```
Met Lys Ile Ser Ser Phe Ile Ser Thr Ser Leu Pro Leu Pro Ala Ser
1               5                  10                  15

Val Ser Gly Ser Ser Ser Val Gly Glu Met Ser Gly Arg Ser Val Ser
            20                  25                  30

Gln Gln Lys Ser Asp Gln Tyr Ala Asn Asn Leu Ala Gly Arg Thr Glu
        35                  40                  45

Ser Pro Gln Gly Ser Ser Leu Ala Ser Arg Ile Ile Glu Arg Leu Ser
    50                  55                  60

Ser Met Ala His Ser Val Ile Gly Phe Ile Gln Arg Met Phe Ser Glu
65                  70                  75                  80

Gly Ser His Lys Pro Val Val Thr Pro Ala Leu Thr Pro Ala Gln Met
                85                  90                  95

Pro Ser Pro Thr Ser Phe Ser Asp Ser Ile Lys Gln Leu Ala Ala Glu
            100                 105                 110

Thr Leu Pro Lys Tyr Met Gln Gln Leu Ser Ser Leu Asp Ala Glu Thr
        115                 120                 125
```

Leu Gln Lys Asn His Asp Gln Phe Ala Thr Leu Glu Glu Ser Leu Phe
130 135 140

Lys Gly Pro Arg Asp Tyr Asn Pro Ile Ser Ser Thr Ile Cys His Leu
145 150 155 160

Thr Asn Glu Ser Asp Gly His Thr Thr Ser Leu Tyr Gly Ile Gly Phe
165 170 175

Gly Pro Phe Ile Ile Thr Asn Lys His Leu Phe Arg Arg Asn Asn Gly
180 185 190

Thr Leu Leu Val Gln Ser Leu His Gly Val Phe Lys Val Lys Asn Thr
195 200 205

Thr Thr Leu Gln Gln His Leu Ile Asp Gly Arg Asp Met Ile Ile Ile
210 215 220

Arg Met Pro Lys Asp Phe Pro Pro Phe Pro Gln Lys Leu Lys Phe Arg
225 230 235 240

Glu Pro Gln Arg Glu Glu Arg Ile Cys Leu Val Thr Thr Asn Phe Gln
245 250 255

Thr Lys Ser Met Ser Ser Met Val Ser Asp Thr Ser Cys Thr Phe Pro
260 265 270

Ser Ser Asp Gly Ile Phe Trp Lys His Trp Ile Gln Thr Lys Asp Gly
275 280 285

Gln Cys Gly Ser Pro Leu Val Ser Thr Arg Asp Gly Phe Ile Val Gly
290 295 300

Ile His Ser Ala Ser Asn Phe Thr Asn Thr Asn Asn Tyr Phe Thr Ser
305 310 315 320

Val Pro Lys Asn Phe Met Glu Leu Leu Thr Asn Gln Glu Ala Gln Gln
325 330 335

Trp Val Ser Gly Trp Arg Leu Asn Ala Asp Ser Val Leu Trp Gly Gly
340 345 350

His Lys Val Phe Met Val Lys Pro Glu Glu Pro Phe Gln Pro Val Lys
355 360 365

Glu Ala Thr Gln Leu Met Asn Arg Arg Arg Arg Arg Arg
370 375 380

<210> 13

<211> 332

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> YopE1-138 - 2x sitio de TEV - Flag - INK4C

<400> 13

```
Met Lys Ile Ser Ser Phe Ile Ser Thr Ser Leu Pro Leu Pro Ala Ser
1               5                  10                  15

Val Ser Gly Ser Ser Ser Val Gly Glu Met Ser Gly Arg Ser Val Ser
            20                  25                  30

Gln Gln Lys Ser Asp Gln Tyr Ala Asn Asn Leu Ala Gly Arg Thr Glu
        35                  40                  45

Ser Pro Gln Gly Ser Ser Leu Ala Ser Arg Ile Ile Glu Arg Leu Ser
    50                  55                  60

Ser Met Ala His Ser Val Ile Gly Phe Ile Gln Arg Met Phe Ser Glu
65                  70                  75                  80
```

```
Gly Ser His Lys Pro Val Val Thr Pro Ala Leu Thr Pro Ala Gln Met
                85                  90                  95

Pro Ser Pro Thr Ser Phe Ser Asp Ser Ile Lys Gln Leu Ala Ala Glu
            100                 105                 110

Thr Leu Pro Lys Tyr Met Gln Gln Leu Ser Ser Leu Asp Ala Glu Thr
        115                 120                 125

Leu Gln Lys Asn His Asp Gln Phe Ala Thr Leu Glu Ser Arg Glu Asn
    130                 135                 140

Leu Tyr Phe Gln Ser Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Ser Asp Tyr Lys Asp
145                 150                 155                 160

Asp Asp Asp Lys Met Ala Glu Pro Trp Gly Asn Glu Leu Ala Ser Ala
                165                 170                 175

Ala Ala Arg Gly Asp Leu Glu Gln Leu Thr Ser Leu Leu Gln Asn Asn
            180                 185                 190

Val Asn Val Asn Ala Gln Asn Gly Phe Gly Arg Thr Ala Leu Gln Val
        195                 200                 205
```

Met Lys Leu Gly Asn Pro Glu Ile Ala Arg Arg Leu Leu Leu Arg Gly
210 215 220

Ala Asn Pro Asp Leu Lys Asp Arg Thr Gly Phe Ala Val Ile His Asp
225 230 235 240

Ala Ala Arg Ala Gly Phe Leu Asp Thr Leu Gln Ala Leu Pro Glu Phe
245 250 255

Gln Ala Asp Val Asn Ile Glu Asp Asn Glu Gly Asn Leu Pro Leu His
260 265 270

Leu Ala Ala Lys Glu Gly His Leu Arg Val Val Glu Phe Leu Val Lys
275 280 285

His Thr Ala Ser Asn Val Gly His Arg Asn His Lys Gly Asp Thr Ala
290 295 300

Cys Asp Leu Ala Arg Leu Tyr Gly Arg Asn Glu Val Val Ser Leu Met
305 310 315 320

Gln Ala Asn Gly Ala Gly Gly Ala Thr Asn Leu Gln
325 330

<210> 14

<211> 245

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> YopE1-138-Ubiquitina

<400> 14

```
Met Lys Ile Ser Ser Phe Ile Ser Thr Ser Leu Pro Leu Pro Ala Ser
1               5                  10                  15

Val Ser Gly Ser Ser Ser Val Gly Glu Met Ser Gly Arg Ser Val Ser
            20                  25                  30

Gln Gln Lys Ser Asp Gln Tyr Ala Asn Asn Leu Ala Gly Arg Thr Glu
        35                  40                  45

Ser Pro Gln Gly Ser Ser Leu Ala Ser Arg Ile Ile Glu Arg Leu Ser
    50                  55                  60

Ser Met Ala His Ser Val Ile Gly Phe Ile Gln Arg Met Phe Ser Glu
65                  70                  75                  80

Gly Ser His Lys Pro Val Val Thr Pro Ala Leu Thr Pro Ala Gln Met
                85                  90                  95
```

```
Pro Ser Pro Thr Ser Phe Ser Asp Ser Ile Lys Gln Leu Ala Ala Glu
            100                 105                 110

Thr Leu Pro Lys Tyr Met Gln Gln Leu Ser Ser Leu Asp Ala Glu Thr
        115                 120                 125

Leu Gln Lys Asn His Asp Gln Phe Ala Thr Leu Glu Met Gln Ile Phe
    130                 135                 140

Val Lys Thr Leu Thr Gly Lys Thr Ile Thr Leu Glu Val Glu Pro Ser
145                 150                 155                 160

Asp Thr Ile Glu Asn Val Lys Ala Lys Ile Gln Asp Lys Glu Gly Ile
                165                 170                 175

Pro Pro Asp Gln Gln Arg Leu Ile Phe Ala Gly Lys Gln Leu Glu Asp
            180                 185                 190

Gly Arg Thr Leu Ser Asp Tyr Asn Ile Gln Lys Glu Ser Thr Leu His
        195                 200                 205

Leu Val Leu Arg Leu Arg Gly Gly Phe Glu Ala Ser Lys Leu Gly Pro
    210                 215                 220
```

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

His His His His His
245

<210> 15
<211> 419
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> YopE1-138-Ubiquitina-Flag-INK4C-MycHis

<400> 15

Met Lys Ile Ser Ser Phe Ile Ser Thr Ser Leu Pro Leu Pro Ala Ser
1 5 10 15

Val Ser Gly Ser Ser Ser Val Gly Glu Met Ser Gly Arg Ser Val Ser
20 25 30

Gln Gln Lys Ser Asp Gln Tyr Ala Asn Asn Leu Ala Gly Arg Thr Glu
35 40 45

```
Ser Pro Gln Gly Ser Ser Leu Ala Ser Arg Ile Ile Glu Arg Leu Ser
    50                  55                  60

Ser Met Ala His Ser Val Ile Gly Phe Ile Gln Arg Met Phe Ser Glu
65                  70                  75                  80

Gly Ser His Lys Pro Val Val Thr Pro Ala Leu Thr Pro Ala Gln Met
                85                  90                  95

Pro Ser Pro Thr Ser Phe Ser Asp Ser Ile Lys Gln Leu Ala Ala Glu
            100                 105                 110

Thr Leu Pro Lys Tyr Met Gln Gln Leu Ser Ser Leu Asp Ala Glu Thr
        115                 120                 125

Leu Gln Lys Asn His Asp Gln Phe Ala Thr Leu Glu Met Gln Ile Phe
    130                 135                 140

Val Lys Thr Leu Thr Gly Lys Thr Ile Thr Leu Glu Val Glu Pro Ser
145                 150                 155                 160

Asp Thr Ile Glu Asn Val Lys Ala Lys Ile Gln Asp Lys Glu Gly Ile
                165                 170                 175
```

Pro Pro Asp Gln Gln Arg Leu Ile Phe Ala Gly Lys Gln Leu Glu Asp
180 185 190

Gly Arg Thr Leu Ser Asp Tyr Asn Ile Gln Lys Glu Ser Thr Leu His
195 200 205

Leu Val Leu Arg Leu Arg Gly Gly Phe Glu Asp Tyr Lys Asp Asp Asp
210 215 220

Asp Lys Met Ala Glu Pro Trp Gly Asn Glu Leu Ala Ser Ala Ala Ala
225 230 235 240

Arg Gly Asp Leu Glu Gln Leu Thr Ser Leu Leu Gln Asn Asn Val Asn
245 250 255

Val Asn Ala Gln Asn Gly Phe Gly Arg Thr Ala Leu Gln Val Met Lys
260 265 270

Leu Gly Asn Pro Glu Ile Ala Arg Arg Leu Leu Leu Arg Gly Ala Asn
275 280 285

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

Arg Ala Gly Phe Leu Asp Thr Leu Gln Ala Leu Pro Glu Phe Gln Ala
305 310 315 320

Asp Val Asn Ile Glu Asp Asn Glu Gly Asn Leu Pro Leu His Leu Ala
325 330 335

Ala Lys Glu Gly His Leu Arg Val Val Glu Phe Leu Val Lys His Thr
340 345 350

Ala Ser Asn Val Gly His Arg Asn His Lys Gly Asp Thr Ala Cys Asp
355 360 365

Leu Ala Arg Leu Tyr Gly Arg Asn Glu Val Val Ser Leu Met Gln Ala
370 375 380

Asn Gly Ala Gly Gly Ala Thr Asn Leu Gln Lys Leu Gly Pro Glu Gln
385 390 395 400

Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Ser Ala Val Asp His His His
405 410 415

His His His

<210> 16

<211> 318

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> YopE1-138 - z-BIM

<400> 16

```
Met Lys Ile Ser Ser Phe Ile Ser Thr Ser Leu Pro Leu Pro Ala Ser
1               5                  10                  15

Val Ser Gly Ser Ser Ser Val Gly Glu Met Ser Gly Arg Ser Val Ser
            20                  25                  30

Gln Gln Lys Ser Asp Gln Tyr Ala Asn Asn Leu Ala Gly Arg Thr Glu
        35                  40                  45

Ser Pro Gln Gly Ser Ser Leu Ala Ser Arg Ile Ile Glu Arg Leu Ser
    50                  55                  60

Ser Met Ala His Ser Val Ile Gly Phe Ile Gln Arg Met Phe Ser Glu
65                  70                  75                  80

Gly Ser His Lys Pro Val Val Thr Pro Ala Leu Thr Pro Ala Gln Met
                85                  90                  95
```

```
Pro Ser Pro Thr Ser Phe Ser Asp Ser Ile Lys Gln Leu Ala Ala Glu
            100                 105                 110

Thr Leu Pro Lys Tyr Met Gln Gln Leu Ser Ser Leu Asp Ala Glu Thr
        115                 120                 125

Leu Gln Lys Asn His Asp Gln Phe Ala Thr Leu Glu Ser Arg Met Ser
    130                 135                 140

Asp Thr Ser Arg Glu Gln Thr Leu Ala Asn Gly Pro Ala Ser Gln Gly
145                 150                 155                 160

Ser Gly Glu Ser Thr Gly Gly Gly Val Val Leu Pro Ala Gly His Phe
                165                 170                 175

Asp Phe Pro Gln Pro Gly Glu Gly Asp Pro Leu Arg Gly Gly Ile Ser
            180                 185                 190

Met Ser Asn Asn Gln Ser Arg Ser Pro Met Asn Arg Thr Phe Ser Arg
        195                 200                 205

Ser Ser Ser Gly Tyr Phe Ser Val Asp Ser Asp Ser Val Pro Gly Ser
    210                 215                 220
```

Pro Leu Met Pro Asn Ile Ser Glu Ala Gln Asp Gly Gln Asn Asp Glu
225 230 235 240

Val Trp Leu Ser Glu His Ser His Gln His Leu Gln Met Ala Ala Pro
245 250 255

Val Ala Ala Leu Pro Pro Glu Met Val Val Ala Arg Glu Leu Arg Arg
260 265 270

Ile Gly Asp Glu Phe Asn Arg Leu Tyr Cys Glu Ala Gly Ala Gly Val
275 280 285

Asn Gln Leu Arg Ala Pro Asn Glu His Ala Ile Val Leu Trp Met Asn
290 295 300

Val Ile Ile Gly Arg Leu Val His Phe Phe Leu Arg Arg Arg
305 310 315

<210> 17
<211> 337
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> YopE1-138 - Bid humana

<400> 17

```
Met Lys Ile Ser Ser Phe Ile Ser Thr Ser Leu Pro Leu Pro Ala Ser
1               5                  10                  15

Val Ser Gly Ser Ser Ser Val Gly Glu Met Ser Gly Arg Ser Val Ser
            20                  25                  30

Gln Gln Lys Ser Asp Gln Tyr Ala Asn Asn Leu Ala Gly Arg Thr Glu
        35                  40                  45

Ser Pro Gln Gly Ser Ser Leu Ala Ser Arg Ile Ile Glu Arg Leu Ser
    50                  55                  60

Ser Met Ala His Ser Val Ile Gly Phe Ile Gln Arg Met Phe Ser Glu
65                  70                  75                  80

Gly Ser His Lys Pro Val Val Thr Pro Ala Leu Thr Pro Ala Gln Met
                85                  90                  95

Pro Ser Pro Thr Ser Phe Ser Asp Ser Ile Lys Gln Leu Ala Ala Glu
            100                 105                 110
```

Thr Leu Pro Lys Tyr Met Gln Gln Leu Ser Ser Leu Asp Ala Glu Thr
115 120 125

Leu Gln Lys Asn His Asp Gln Phe Ala Thr Leu Glu Ser Arg Met Asp
130 135 140

Cys Glu Val Asn Asn Gly Ser Ser Leu Arg Asp Glu Cys Ile Thr Asn
145 150 155 160

Leu Leu Val Phe Gly Phe Leu Gln Ser Cys Ser Asp Asn Ser Phe Arg
165 170 175

Arg Glu Leu Asp Ala Leu Gly His Glu Leu Pro Val Leu Ala Pro Gln
180 185 190

Trp Glu Gly Tyr Asp Glu Leu Gln Thr Asp Gly Asn Arg Ser Ser His
195 200 205

Ser Arg Leu Gly Arg Ile Glu Ala Asp Ser Glu Ser Gln Glu Asp Ile
210 215 220

Ile Arg Asn Ile Ala Arg His Leu Ala Gln Val Gly Asp Ser Met Asp
225 230 235 240

Arg Ser Ile Pro Pro Gly Leu Val Asn Gly Leu Ala Leu Gln Leu Arg
245 250 255

Asn Thr Ser Arg Ser Glu Glu Asp Arg Asn Arg Asp Leu Ala Thr Ala
260 265 270

Leu Glu Gln Leu Leu Gln Ala Tyr Pro Arg Asp Met Glu Lys Glu Lys
275 280 285

Thr Met Leu Val Leu Ala Leu Leu Leu Ala Lys Lys Val Ala Ser His
290 295 300

Thr Pro Ser Leu Leu Arg Asp Val Phe His Thr Thr Val Asn Phe Ile
305 310 315 320

Asn Gln Asn Leu Arg Thr Tyr Val Arg Ser Leu Ala Arg Asn Gly Met
325 330 335

Asp

<210> 18
<211> 277
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> YopE1-138 - t-Bid humana

<400> 18

```
Met Lys Ile Ser Ser Phe Ile Ser Thr Ser Leu Pro Leu Pro Ala Ser
1               5                  10                  15

Val Ser Gly Ser Ser Ser Val Gly Glu Met Ser Gly Arg Ser Val Ser
            20                  25                  30

Gln Gln Lys Ser Asp Gln Tyr Ala Asn Asn Leu Ala Gly Arg Thr Glu
        35                  40                  45

Ser Pro Gln Gly Ser Ser Leu Ala Ser Arg Ile Ile Glu Arg Leu Ser
    50                  55                  60

Ser Met Ala His Ser Val Ile Gly Phe Ile Gln Arg Met Phe Ser Glu
65                  70                  75                  80

Gly Ser His Lys Pro Val Val Thr Pro Ala Leu Thr Pro Ala Gln Met
                85                  90                  95

Pro Ser Pro Thr Ser Phe Ser Asp Ser Ile Lys Gln Leu Ala Ala Glu
            100                 105                 110
```

Thr Leu Pro Lys Tyr Met Gln Gln Leu Ser Ser Leu Asp Ala Glu Thr
115 120 125

Leu Gln Lys Asn His Asp Gln Phe Ala Thr Leu Glu Ser Arg Gly Asn
130 135 140

Arg Ser Ser His Ser Arg Leu Gly Arg Ile Glu Ala Asp Ser Glu Ser
145 150 155 160

Gln Glu Asp Ile Ile Arg Asn Ile Ala Arg His Leu Ala Gln Val Gly
165 170 175

Asp Ser Met Asp Arg Ser Ile Pro Pro Gly Leu Val Asn Gly Leu Ala
180 185 190

Leu Gln Leu Arg Asn Thr Ser Arg Ser Glu Glu Asp Arg Asn Arg Asp
195 200 205

Leu Ala Thr Ala Leu Glu Gln Leu Leu Gln Ala Tyr Pro Arg Asp Met
210 215 220

Glu Lys Glu Lys Thr Met Leu Val Leu Ala Leu Leu Leu Ala Lys Lys
225 230 235 240

Val Ala Ser His Thr Pro Ser Leu Leu Arg Asp Val Phe His Thr Thr
245 250 255

Val Asn Phe Ile Asn Gln Asn Leu Arg Thr Tyr Val Arg Ser Leu Ala
260 265 270

Arg Asn Gly Met Asp
275

<210> 19
<211> 163
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> YopE1-138 - parte BH3 de BID murina optimizada en codones de Y. enterocolitica

<400> 19

Met Lys Ile Ser Ser Phe Ile Ser Thr Ser Leu Pro Leu Pro Ala Ser
1 5 10 15

Val Ser Gly Ser Ser Ser Val Gly Glu Met Ser Gly Arg Ser Val Ser
20 25 30

```
Gln Gln Lys Ser Asp Gln Tyr Ala Asn Asn Leu Ala Gly Arg Thr Glu
        35                  40                  45

Ser Pro Gln Gly Ser Ser Leu Ala Ser Arg Ile Ile Glu Arg Leu Ser
    50                  55                  60

Ser Met Ala His Ser Val Ile Gly Phe Ile Gln Arg Met Phe Ser Glu
65                  70                  75                  80

Gly Ser His Lys Pro Val Val Thr Pro Ala Leu Thr Pro Ala Gln Met
                85                  90                  95

Pro Ser Pro Thr Ser Phe Ser Asp Ser Ile Lys Gln Leu Ala Ala Glu
            100                 105                 110

Thr Leu Pro Lys Tyr Met Gln Gln Leu Ser Ser Leu Asp Ala Glu Thr
        115                 120                 125

Leu Gln Lys Asn His Asp Gln Phe Ala Thr Leu Glu Ser Arg Phe Glu
    130                 135                 140

Glu Ile Ile His Asn Ile Ala Arg His Leu Ala Gln Ile Gly Asp Glu
145                 150                 155                 160
```

Met Asp His

<210> 20
<211> 156
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> YopE1-138 - parte BH3 de Bax murina optimizada en codones de Y. enterocolitica

<400> 20

Met Lys Ile Ser Ser Phe Ile Ser Thr Ser Leu Pro Leu Pro Ala Ser
1 5 10 15

Val Ser Gly Ser Ser Ser Val Gly Glu Met Ser Gly Arg Ser Val Ser
20 25 30

Gln Gln Lys Ser Asp Gln Tyr Ala Asn Asn Leu Ala Gly Arg Thr Glu
35 40 45

Ser Pro Gln Gly Ser Ser Leu Ala Ser Arg Ile Ile Glu Arg Leu Ser
50 55 60

Ser Met Ala His Ser Val Ile Gly Phe Ile Gln Arg Met Phe Ser Glu
65 70 75 80

Gly Ser His Lys Pro Val Val Thr Pro Ala Leu Thr Pro Ala Gln Met
85 90 95

Pro Ser Pro Thr Ser Phe Ser Asp Ser Ile Lys Gln Leu Ala Ala Glu
100 105 110

Thr Leu Pro Lys Tyr Met Gln Gln Leu Ser Ser Leu Asp Ala Glu Thr
115 120 125

Leu Gln Lys Asn His Asp Gln Phe Ala Thr Leu Glu Lys Lys Leu Ser
130 135 140

Glu Cys Leu Arg Arg Ile Gly Asp Glu Leu Asp Ser
145 150 155

<210> 21
<211> 276
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> YopE1-138-tBid murina optimizada en codones de Y. enterocolitica

<400> 21

```
Met Lys Ile Ser Ser Phe Ile Ser Thr Ser Leu Pro Leu Pro Ala Ser
1               5                  10                  15

Val Ser Gly Ser Ser Ser Val Gly Glu Met Ser Gly Arg Ser Val Ser
            20                  25                  30

Gln Gln Lys Ser Asp Gln Tyr Ala Asn Asn Leu Ala Gly Arg Thr Glu
        35                  40                  45

Ser Pro Gln Gly Ser Ser Leu Ala Ser Arg Ile Ile Glu Arg Leu Ser
    50                  55                  60

Ser Met Ala His Ser Val Ile Gly Phe Ile Gln Arg Met Phe Ser Glu
65                  70                  75                  80

Gly Ser His Lys Pro Val Val Thr Pro Ala Leu Thr Pro Ala Gln Met
                85                  90                  95

Pro Ser Pro Thr Ser Phe Ser Asp Ser Ile Lys Gln Leu Ala Ala Glu
            100                 105                 110

Thr Leu Pro Lys Tyr Met Gln Gln Leu Ser Ser Leu Asp Ala Glu Thr
        115                 120                 125
```

```
Leu Gln Lys Asn His Asp Gln Phe Ala Thr Leu Glu Gly Ser Gln Ala
    130                 135                 140

Ser Arg Ser Phe Asn Gln Gly Arg Ile Glu Pro Asp Ser Glu Ser Gln
145                 150                 155                 160

Glu Glu Ile Ile His Asn Ile Ala Arg His Leu Ala Gln Ile Gly Asp
                165                 170                 175

Glu Met Asp His Asn Ile Gln Pro Thr Leu Val Arg Gln Leu Ala Ala
            180                 185                 190

Gln Phe Met Asn Gly Ser Leu Ser Glu Glu Asp Lys Arg Asn Cys Leu
        195                 200                 205

Ala Lys Ala Leu Asp Glu Val Lys Thr Ala Phe Pro Arg Asp Met Glu
    210                 215                 220

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

Ala Ser His Ala Pro Ser Leu Leu Arg Asp Val Phe His Thr Thr Val
                245                 250                 255
```

Asn Phe Ile Asn Gln Asn Leu Phe Ser Tyr Val Arg Asn Leu Val Arg
260 265 270

Asn Glu Met Asp
275

<210> 22
<211> 167
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> YopE1-138- parte extendida BH3 de tBid murina optimizada en codones

<400> 22

Met Lys Ile Ser Ser Phe Ile Ser Thr Ser Leu Pro Leu Pro Ala Ser
1 5 10 15

Val Ser Gly Ser Ser Ser Val Gly Glu Met Ser Gly Arg Ser Val Ser
20 25 30

Gln Gln Lys Ser Asp Gln Tyr Ala Asn Asn Leu Ala Gly Arg Thr Glu
35 40 45

Ser Pro Gln Gly Ser Ser Leu Ala Ser Arg Ile Ile Glu Arg Leu Ser
50 55 60

Ser Met Ala His Ser Val Ile Gly Phe Ile Gln Arg Met Phe Ser Glu
65 70 75 80

Gly Ser His Lys Pro Val Val Thr Pro Ala Leu Thr Pro Ala Gln Met
85 90 95

Pro Ser Pro Thr Ser Phe Ser Asp Ser Ile Lys Gln Leu Ala Ala Glu
100 105 110

Thr Leu Pro Lys Tyr Met Gln Gln Leu Ser Ser Leu Asp Ala Glu Thr
115 120 125

Leu Gln Lys Asn His Asp Gln Phe Ala Thr Leu Glu Ser Arg Phe Glu
130 135 140

Glu Ile Ile His Asn Ile Ala Arg His Leu Ala Gln Ile Gly Asp Glu
145 150 155 160

Met Asp His Asn Ile Gln Pro
165

<210> 23
<211> 168

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> YopE1-138-enlazador de 10 Aa - parte BH3 de tBid murina optimizada en codones de Y. enterocolitica

<400> 23

```
Met Lys Ile Ser Ser Phe Ile Ser Thr Ser Leu Pro Leu Pro Ala Ser
1               5                  10                  15

Val Ser Gly Ser Ser Ser Val Gly Glu Met Ser Gly Arg Ser Val Ser
            20                  25                  30

Gln Gln Lys Ser Asp Gln Tyr Ala Asn Asn Leu Ala Gly Arg Thr Glu
        35                  40                  45

Ser Pro Gln Gly Ser Ser Leu Ala Ser Arg Ile Ile Glu Arg Leu Ser
    50                  55                  60

Ser Met Ala His Ser Val Ile Gly Phe Ile Gln Arg Met Phe Ser Glu
65                  70                  75                  80

Gly Ser His Lys Pro Val Val Thr Pro Ala Leu Thr Pro Ala Gln Met
                85                  90                  95
```

Pro Ser Pro Thr Ser Phe Ser Asp Ser Ile Lys Gln Leu Ala Ala Glu
100 105 110

Thr Leu Pro Lys Tyr Met Gln Gln Leu Ser Ser Leu Asp Ala Glu Thr
115 120 125

Leu Gln Lys Asn His Asp Gln Phe Ala Thr Leu Glu Ser Arg Phe Glu
130 135 140

Ala Gly Gly Ala Glu Glu Ile Ile His Asn Ile Ala Arg His Leu Ala
145 150 155 160

Gln Ile Gly Asp Glu Met Asp His
165

<210> 24
<211> 186
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> YopE1-138-parte BH3 de Bax murina optimizada en codones de Y. enterocolitica-parte BH3 de tBid murina optimizada en codones de Y. enterocolitica

<400> 24

Met Lys Ile Ser Ser Phe Ile Ser Thr Ser Leu Pro Leu Pro Ala Ser

1 5 10 15

Val Ser Gly Ser Ser Ser Val Gly Glu Met Ser Gly Arg Ser Val Ser
20 25 30

Gln Gln Lys Ser Asp Gln Tyr Ala Asn Asn Leu Ala Gly Arg Thr Glu
35 40 45

Ser Pro Gln Gly Ser Ser Leu Ala Ser Arg Ile Ile Glu Arg Leu Ser
50 55 60

Ser Met Ala His Ser Val Ile Gly Phe Ile Gln Arg Met Phe Ser Glu
65 70 75 80

Gly Ser His Lys Pro Val Val Thr Pro Ala Leu Thr Pro Ala Gln Met
85 90 95

Pro Ser Pro Thr Ser Phe Ser Asp Ser Ile Lys Gln Leu Ala Ala Glu
100 105 110

Thr Leu Pro Lys Tyr Met Gln Gln Leu Ser Ser Leu Asp Ala Glu Thr
115 120 125

Leu Gln Lys Asn His Asp Gln Phe Ala Thr Leu Glu Gly Ala Ile Asp

130 135 140

Ala Lys Lys Leu Ser Glu Cys Leu Arg Arg Ile Gly Asp Glu Leu Asp
145 150 155 160

Ser Gly Ala Phe Asp Ala Glu Glu Ile Ile His Asn Ile Ala Arg His
165 170 175

Leu Ala Gln Ile Gly Asp Glu Met Asp His
180 185

<210> 25
<211> 165
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> YopE1-138 - parte BH3 de BID murina optimizada en codones de Y. enterocolitica (lista para la inserción de dominios adicionales)

<400> 25

Met Lys Ile Ser Ser Phe Ile Ser Thr Ser Leu Pro Leu Pro Ala Ser
1 5 10 15

Val Ser Gly Ser Ser Ser Val Gly Glu Met Ser Gly Arg Ser Val Ser
20 25 30

Gln Gln Lys Ser Asp Gln Tyr Ala Asn Asn Leu Ala Gly Arg Thr Glu
35 40 45

Ser Pro Gln Gly Ser Ser Leu Ala Ser Arg Ile Ile Glu Arg Leu Ser
50 55 60

Ser Met Ala His Ser Val Ile Gly Phe Ile Gln Arg Met Phe Ser Glu
65 70 75 80

Gly Ser His Lys Pro Val Val Thr Pro Ala Leu Thr Pro Ala Gln Met
85 90 95

Pro Ser Pro Thr Ser Phe Ser Asp Ser Ile Lys Gln Leu Ala Ala Glu
100 105 110

Thr Leu Pro Lys Tyr Met Gln Gln Leu Ser Ser Leu Asp Ala Glu Thr
115 120 125

Leu Gln Lys Asn His Asp Gln Phe Ala Thr Leu Glu Gly Ala Ile Asp
130 135 140

Ala Glu Glu Ile Ile His Asn Ile Ala Arg His Leu Ala Gln Ile Gly
145 150 155 160

Asp Glu Met Asp His
165

<210> 26
<211> 161
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> parte BH3 de Bax murina optimizada en codones de Y. enterocolitica
(lista para la inserción de dominios adicionales)

<400> 26

Met Lys Ile Ser Ser Phe Ile Ser Thr Ser Leu Pro Leu Pro Ala Ser
1 5 10 15

Val Ser Gly Ser Ser Ser Val Gly Glu Met Ser Gly Arg Ser Val Ser
20 25 30

Gln Gln Lys Ser Asp Gln Tyr Ala Asn Asn Leu Ala Gly Arg Thr Glu
35 40 45

Ser Pro Gln Gly Ser Ser Leu Ala Ser Arg Ile Ile Glu Arg Leu Ser
50 55 60

Ser Met Ala His Ser Val Ile Gly Phe Ile Gln Arg Met Phe Ser Glu
65 70 75 80

Gly Ser His Lys Pro Val Val Thr Pro Ala Leu Thr Pro Ala Gln Met
85 90 95

Pro Ser Pro Thr Ser Phe Ser Asp Ser Ile Lys Gln Leu Ala Ala Glu
100 105 110

Thr Leu Pro Lys Tyr Met Gln Gln Leu Ser Ser Leu Asp Ala Glu Thr
115 120 125

Leu Gln Lys Asn His Asp Gln Phe Ala Thr Leu Glu Gly Ala Ile Asp
130 135 140

Ala Lys Lys Leu Ser Glu Cys Leu Arg Arg Ile Gly Asp Glu Leu Asp
145 150 155 160

Ser

<210> 27
<211> 190
<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> YopE1-138 - (parte BH3 de BID murina optimizada en codones de Y. enterocolitica)2

<400> 27

```
Met Lys Ile Ser Ser Phe Ile Ser Thr Ser Leu Pro Leu Pro Ala Ser
1               5                  10                  15

Val Ser Gly Ser Ser Ser Val Gly Glu Met Ser Gly Arg Ser Val Ser
            20                  25                  30

Gln Gln Lys Ser Asp Gln Tyr Ala Asn Asn Leu Ala Gly Arg Thr Glu
        35                  40                  45

Ser Pro Gln Gly Ser Ser Leu Ala Ser Arg Ile Ile Glu Arg Leu Ser
    50                  55                  60

Ser Met Ala His Ser Val Ile Gly Phe Ile Gln Arg Met Phe Ser Glu
65                  70                  75                  80

Gly Ser His Lys Pro Val Val Thr Pro Ala Leu Thr Pro Ala Gln Met
                85                  90                  95

Pro Ser Pro Thr Ser Phe Ser Asp Ser Ile Lys Gln Leu Ala Ala Glu
```

100 105 110

Thr Leu Pro Lys Tyr Met Gln Gln Leu Ser Ser Leu Asp Ala Glu Thr
115 120 125

Leu Gln Lys Asn His Asp Gln Phe Ala Thr Leu Glu Gly Ala Ile Asp
130 135 140

Ala Glu Glu Ile Ile His Asn Ile Ala Arg His Leu Ala Gln Ile Gly
145 150 155 160

Asp Glu Met Asp His Gly Ala Phe Asp Ala Glu Glu Ile Ile His Asn
165 170 175

Ile Ala Arg His Leu Ala Gln Ile Gly Asp Glu Met Asp His
180 185 190

<210> 28
<211> 186
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> YopE1-138 - (parte BH3 de BID murina optimizada en codones de Y. enterocolitica)(parte BH3 de Bax murina optimizada en codones de Y. enterocolitica)

<400> 28

```
Met Lys Ile Ser Ser Phe Ile Ser Thr Ser Leu Pro Leu Pro Ala Ser
1               5                  10                  15

Val Ser Gly Ser Ser Ser Val Gly Glu Met Ser Gly Arg Ser Val Ser
            20                  25                  30

Gln Gln Lys Ser Asp Gln Tyr Ala Asn Asn Leu Ala Gly Arg Thr Glu
        35                  40                  45

Ser Pro Gln Gly Ser Ser Leu Ala Ser Arg Ile Ile Glu Arg Leu Ser
    50                  55                  60

Ser Met Ala His Ser Val Ile Gly Phe Ile Gln Arg Met Phe Ser Glu
65                  70                  75                  80

Gly Ser His Lys Pro Val Val Thr Pro Ala Leu Thr Pro Ala Gln Met
                85                  90                  95

Pro Ser Pro Thr Ser Phe Ser Asp Ser Ile Lys Gln Leu Ala Ala Glu
            100                 105                 110

Thr Leu Pro Lys Tyr Met Gln Gln Leu Ser Ser Leu Asp Ala Glu Thr
        115                 120                 125
```

Leu Gln Lys Asn His Asp Gln Phe Ala Thr Leu Glu Gly Ala Ile Asp
130 135 140

Ala Glu Glu Ile Ile His Asn Ile Ala Arg His Leu Ala Gln Ile Gly
145 150 155 160

Asp Glu Met Asp His Gly Ala Phe Asp Ala Lys Lys Leu Ser Glu Cys
165 170 175

Leu Arg Arg Ile Gly Asp Glu Leu Asp Ser
180 185

<210> 29
<211> 20
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 29

Glu Glu Ile Ile His Asn Ile Ala Arg His Leu Ala Gln Ile Gly Asp
1 5 10 15

Glu Met Asp His
20

<210> 30
<211> 14
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 30

```
Ile Ala Arg His Leu Ala Gln Ile Gly Asp Glu Met Asp His
1               5                   10
```

<210> 31
<211> 20
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 31

```
Glu Asp Ile Ile Arg Asn Ile Ala Arg His Leu Ala Gln Val Gly Asp
1               5                   10                  15

Ser Met Asp Arg
            20
```

<210> 32
<211> 15
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 32

Ile Ala Arg His Leu Ala Gln Val Gly Asp Ser Met Asp Arg Ser
1 5 10 15

<210> 33
<211> 17
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 33

Lys Lys Leu Ser Glu Cys Leu Arg Arg Ile Gly Asp Glu Leu Asp Ser
1 5 10 15

Asn

<210> 34
<211> 14
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 34

Leu Ser Glu Cys Leu Arg Arg Ile Gly Asp Glu Leu Asp Ser
1 5 10

<210> 35

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 35

Lys Lys Leu Ser Glu Cys Leu Lys Arg Ile Gly Asp Glu Leu Asp Ser
1 5 10 15

Asn

<210> 36

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 36

Leu Ser Glu Cys Leu Lys Arg Ile Gly Asp Glu Leu Asp Ser
1 5 10

<210> 37

<211> 387

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> YopE1-138 - dos dominios CARD de RIG-1 humana optimizada en codones de Y. enterocolitica (Aa. 1-245)

<400> 37

```
Met Lys Ile Ser Ser Phe Ile Ser Thr Ser Leu Pro Leu Pro Ala Ser
1               5                  10                  15

Val Ser Gly Ser Ser Ser Val Gly Glu Met Ser Gly Arg Ser Val Ser
            20                  25                  30

Gln Gln Lys Ser Asp Gln Tyr Ala Asn Asn Leu Ala Gly Arg Thr Glu
        35                  40                  45

Ser Pro Gln Gly Ser Ser Leu Ala Ser Arg Ile Ile Glu Arg Leu Ser
    50                  55                  60

Ser Met Ala His Ser Val Ile Gly Phe Ile Gln Arg Met Phe Ser Glu
65                  70                  75                  80

Gly Ser His Lys Pro Val Val Thr Pro Ala Leu Thr Pro Ala Gln Met
                85                  90                  95

Pro Ser Pro Thr Ser Phe Ser Asp Ser Ile Lys Gln Leu Ala Ala Glu
            100                 105                 110
```

Thr Leu Pro Lys Tyr Met Gln Gln Leu Ser Ser Leu Asp Ala Glu Thr
115 120 125

Leu Gln Lys Asn His Asp Gln Phe Ala Thr Leu Glu Ser Arg Met Thr
130 135 140

Thr Glu Gln Arg Arg Ser Leu Gln Ala Phe Gln Asp Tyr Ile Arg Lys
145 150 155 160

Thr Leu Asp Pro Thr Tyr Ile Leu Ser Tyr Met Ala Pro Trp Phe Arg
165 170 175

Glu Glu Glu Val Gln Tyr Ile Gln Ala Glu Lys Asn Asn Lys Gly Pro
180 185 190

Met Glu Ala Ala Thr Leu Phe Leu Lys Phe Leu Leu Glu Leu Gln Glu
195 200 205

Glu Gly Trp Phe Arg Gly Phe Leu Asp Ala Leu Asp His Ala Gly Tyr
210 215 220

Ser Gly Leu Tyr Glu Ala Ile Glu Ser Trp Asp Phe Lys Lys Ile Glu
225 230 235 240

Lys Leu Glu Glu Tyr Arg Leu Leu Leu Lys Arg Leu Gln Pro Glu Phe
245 250 255

Lys Thr Arg Ile Ile Pro Thr Asp Ile Ile Ser Asp Leu Ser Glu Cys
260 265 270

Leu Ile Asn Gln Glu Cys Glu Glu Ile Leu Gln Ile Cys Ser Thr Lys
275 280 285

Gly Met Met Ala Gly Ala Glu Lys Leu Val Glu Cys Leu Leu Arg Ser
290 295 300

Asp Lys Glu Asn Trp Pro Lys Thr Leu Lys Leu Ala Leu Glu Lys Glu
305 310 315 320

Arg Asn Lys Phe Ser Glu Leu Trp Ile Val Glu Lys Gly Ile Lys Asp
325 330 335

Val Glu Thr Glu Asp Leu Glu Asp Lys Met Glu Thr Ser Asp Ile Gln
340 345 350

Ile Phe Tyr Gln Glu Asp Pro Glu Cys Gln Asn Leu Ser Glu Asn Ser
355 360 365

Cys Pro Pro Ser Glu Val Ser Asp Thr Asn Leu Tyr Ser Pro Phe Lys
370 375 380

Pro Arg Asn
385

<210> 38
<211> 388
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> YopE1-138 - dos dominios CARD de RIG-1 murina optimizada en codones de Y. enterocolitica (Aa. 1-246)

<400> 38

Met Lys Ile Ser Ser Phe Ile Ser Thr Ser Leu Pro Leu Pro Ala Ser
1 5 10 15

Val Ser Gly Ser Ser Ser Val Gly Glu Met Ser Gly Arg Ser Val Ser
20 25 30

Gln Gln Lys Ser Asp Gln Tyr Ala Asn Asn Leu Ala Gly Arg Thr Glu
35 40 45

Ser Pro Gln Gly Ser Ser Leu Ala Ser Arg Ile Ile Glu Arg Leu Ser
50 55 60

Ser Met Ala His Ser Val Ile Gly Phe Ile Gln Arg Met Phe Ser Glu
65 70 75 80

Gly Ser His Lys Pro Val Val Thr Pro Ala Leu Thr Pro Ala Gln Met
85 90 95

Pro Ser Pro Thr Ser Phe Ser Asp Ser Ile Lys Gln Leu Ala Ala Glu
100 105 110

Thr Leu Pro Lys Tyr Met Gln Gln Leu Ser Ser Leu Asp Ala Glu Thr
115 120 125

Leu Gln Lys Asn His Asp Gln Phe Ala Thr Leu Glu Ser Arg Met Thr
130 135 140

Ala Glu Gln Arg Gln Asn Leu Gln Ala Phe Arg Asp Tyr Ile Lys Lys
145 150 155 160

Ile Leu Asp Pro Thr Tyr Ile Leu Ser Tyr Met Ser Ser Trp Leu Glu
165 170 175

Asp Glu Glu Val Gln Tyr Ile Gln Ala Glu Lys Asn Asn Lys Gly Pro
180 185 190

Met Glu Ala Ala Ser Leu Phe Leu Gln Tyr Leu Leu Lys Leu Gln Ser
195 200 205

Glu Gly Trp Phe Gln Ala Phe Leu Asp Ala Leu Tyr His Ala Gly Tyr
210 215 220

Cys Gly Leu Cys Glu Ala Ile Glu Ser Trp Asp Phe Gln Lys Ile Glu
225 230 235 240

Lys Leu Glu Glu His Arg Leu Leu Leu Arg Arg Leu Glu Pro Glu Phe
245 250 255

Lys Ala Thr Val Asp Pro Asn Asp Ile Leu Ser Glu Leu Ser Glu Cys
260 265 270

Leu Ile Asn Gln Glu Cys Glu Glu Ile Arg Gln Ile Arg Asp Thr Lys
275 280 285

Gly Arg Met Ala Gly Ala Glu Lys Met Ala Glu Cys Leu Ile Arg Ser
290 295 300

Asp Lys Glu Asn Trp Pro Lys Val Leu Gln Leu Ala Leu Glu Lys Asp
305 310 315 320

Asn Ser Lys Phe Ser Glu Leu Trp Ile Val Asp Lys Gly Phe Lys Arg
325 330 335

Ala Glu Ser Lys Ala Asp Glu Asp Asp Gly Ala Glu Ala Ser Ser Ile
340 345 350

Gln Ile Phe Ile Gln Glu Glu Pro Glu Cys Gln Asn Leu Ser Gln Asn
355 360 365

Pro Gly Pro Pro Ser Glu Ala Ser Ser Asn Asn Leu His Ser Pro Leu
370 375 380

Lys Pro Arg Asn
385

<210> 39
<211> 348
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> YopE1-138 - GCN4 de S. cerevisiae optimizada en codones de Y. enterocolitica

(Aa. 249-278) - WspR de P. aeruginosa optimizada en codones de Y. enterocolitica (Aa. 172-347)

<400> 39

```
Met Lys Ile Ser Ser Phe Ile Ser Thr Ser Leu Pro Leu Pro Ala Ser
1               5                  10                  15

Val Ser Gly Ser Ser Ser Val Gly Glu Met Ser Gly Arg Ser Val Ser
            20                  25                  30

Gln Gln Lys Ser Asp Gln Tyr Ala Asn Asn Leu Ala Gly Arg Thr Glu
        35                  40                  45

Ser Pro Gln Gly Ser Ser Leu Ala Ser Arg Ile Ile Glu Arg Leu Ser
    50                  55                  60

Ser Met Ala His Ser Val Ile Gly Phe Ile Gln Arg Met Phe Ser Glu
65                  70                  75                  80

Gly Ser His Lys Pro Val Val Thr Pro Ala Leu Thr Pro Ala Gln Met
                85                  90                  95

Pro Ser Pro Thr Ser Phe Ser Asp Ser Ile Lys Gln Leu Ala Ala Glu
            100                 105                 110
```

Thr Leu Pro Lys Tyr Met Gln Gln Leu Ser Ser Leu Asp Ala Glu Thr
115 120 125

Leu Gln Lys Asn His Asp Gln Phe Ala Thr Leu Glu Ser Arg Arg Met
130 135 140

Lys Gln Leu Glu Asp Lys Val Glu Glu Leu Leu Ser Lys Asn Tyr His
145 150 155 160

Leu Glu Asn Glu Val Ala Arg Leu Lys Lys Leu Val Asn Ser Asp Gly
165 170 175

Leu Thr Gly Leu Ser Asn Arg Arg His Phe Asp Glu Tyr Leu Glu Met
180 185 190

Glu Trp Arg Arg Ser Leu Arg Glu Gln Ser Gln Leu Ser Leu Leu Met
195 200 205

Ile Asp Val Asp Tyr Phe Lys Ser Tyr Asn Asp Thr Phe Gly His Val
210 215 220

Ala Gly Asp Glu Ala Leu Arg Gln Val Ala Gly Ala Ile Arg Glu Gly
225 230 235 240

Cys Ser Arg Ser Ser Asp Leu Ala Ala Arg Tyr Gly Gly Glu Glu Phe
245 250 255

Ala Met Val Leu Pro Gly Thr Ser Pro Gly Gly Ala Arg Leu Leu Ala
260 265 270

Glu Lys Val Arg Arg Thr Val Glu Ser Leu Gln Ile Ser His Asp Gln
275 280 285

Pro Arg Pro Gly Ser His Leu Thr Val Ser Ile Gly Val Ser Thr Leu
290 295 300

Val Pro Gly Gly Gly Gly Gln Thr Phe Arg Val Leu Ile Glu Met Ala
305 310 315 320

Asp Gln Ala Leu Tyr Gln Ala Lys Asn Asn Gly Arg Asn Gln Val Gly
325 330 335

Leu Met Glu Gln Pro Val Pro Pro Ala Pro Ala Gly
340 345

<210> 40
<211> 561
<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> YopE1-138 - IRF3 S397D murina optimizada en codones de Y. enterocolitica

<400> 40

```
Met Lys Ile Ser Ser Phe Ile Ser Thr Ser Leu Pro Leu Pro Ala Ser
1               5                  10                  15

Val Ser Gly Ser Ser Ser Val Gly Glu Met Ser Gly Arg Ser Val Ser
            20                  25                  30

Gln Gln Lys Ser Asp Gln Tyr Ala Asn Asn Leu Ala Gly Arg Thr Glu
        35                  40                  45

Ser Pro Gln Gly Ser Ser Leu Ala Ser Arg Ile Ile Glu Arg Leu Ser
    50                  55                  60

Ser Met Ala His Ser Val Ile Gly Phe Ile Gln Arg Met Phe Ser Glu
65                  70                  75                  80

Gly Ser His Lys Pro Val Val Thr Pro Ala Leu Thr Pro Ala Gln Met
                85                  90                  95

Pro Ser Pro Thr Ser Phe Ser Asp Ser Ile Lys Gln Leu Ala Ala Glu
```

100 105 110

Thr Leu Pro Lys Tyr Met Gln Gln Leu Ser Ser Leu Asp Ala Glu Thr
115 120 125

Leu Gln Lys Asn His Asp Gln Phe Ala Thr Leu Glu Ser Arg Met Glu
130 135 140

Thr Pro Lys Pro Arg Ile Leu Pro Trp Leu Val Ser Gln Leu Asp Leu
145 150 155 160

Gly Gln Leu Glu Gly Val Ala Trp Leu Asp Glu Ser Arg Thr Arg Phe
165 170 175

Arg Ile Pro Trp Lys His Gly Leu Arg Gln Asp Ala Gln Met Ala Asp
180 185 190

Phe Gly Ile Phe Gln Ala Trp Ala Glu Ala Ser Gly Ala Tyr Thr Pro
195 200 205

Gly Lys Asp Lys Pro Asp Val Ser Thr Trp Lys Arg Asn Phe Arg Ser
210 215 220

Ala Leu Asn Arg Lys Glu Val Leu Arg Leu Ala Ala Asp Asn Ser Lys

225 230 235 240

Asp Pro Tyr Asp Pro His Lys Val Tyr Glu Phe Val Thr Pro Gly Ala
245 250 255

Arg Asp Phe Val His Leu Gly Ala Ser Pro Asp Thr Asn Gly Lys Ser
260 265 270

Ser Leu Pro His Ser Gln Glu Asn Leu Pro Lys Leu Phe Asp Gly Leu
275 280 285

Ile Leu Gly Pro Leu Lys Asp Glu Gly Ser Ser Asp Leu Ala Ile Val
290 295 300

Ser Asp Pro Ser Gln Gln Leu Pro Ser Pro Asn Val Asn Asn Phe Leu
305 310 315 320

Asn Pro Ala Pro Gln Glu Asn Pro Leu Lys Gln Leu Leu Ala Glu Glu
325 330 335

Gln Trp Glu Phe Glu Val Thr Ala Phe Tyr Arg Gly Arg Gln Val Phe
340 345 350

Gln Gln Thr Leu Phe Cys Pro Gly Gly Leu Arg Leu Val Gly Ser Thr

355 360 365

Ala Asp Met Thr Leu Pro Trp Gln Pro Val Thr Leu Pro Asp Pro Glu
370 375 380

Gly Phe Leu Thr Asp Lys Leu Val Lys Glu Tyr Val Gly Gln Val Leu
385 390 395 400

Lys Gly Leu Gly Asn Gly Leu Ala Leu Trp Gln Ala Gly Gln Cys Leu
405 410 415

Trp Ala Gln Arg Leu Gly His Ser His Ala Phe Trp Ala Leu Gly Glu
420 425 430

Glu Leu Leu Pro Asp Ser Gly Arg Gly Pro Asp Gly Glu Val His Lys
435 440 445

Asp Lys Asp Gly Ala Val Phe Asp Leu Arg Pro Phe Val Ala Asp Leu
450 455 460

Ile Ala Phe Met Glu Gly Ser Gly His Ser Pro Arg Tyr Thr Leu Trp
465 470 475 480

Phe Cys Met Gly Glu Met Trp Pro Gln Asp Gln Pro Trp Val Lys Arg

485 490 495

Leu Val Met Val Lys Val Val Pro Thr Cys Leu Lys Glu Leu Leu Glu
500 505 510

Met Ala Arg Glu Gly Gly Ala Ser Ser Leu Lys Thr Val Asp Leu His
515 520 525

Ile Asp Asn Ser Gln Pro Ile Ser Leu Thr Ser Asp Gln Tyr Lys Ala
530 535 540

Tyr Leu Gln Asp Leu Val Glu Asp Met Asp Phe Gln Ala Thr Gly Asn
545 550 555 560

Ile

<210> 41
<211> 553
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> YopE1-138 - DncV de V. Cholerae optimizada en codones de Y. enterocolitica (M3aL413)

<400> 41

```
Met Lys Ile Ser Ser Phe Ile Ser Thr Ser Leu Pro Leu Pro Ala Ser
1               5                  10                  15

Val Ser Gly Ser Ser Ser Val Gly Glu Met Ser Gly Arg Ser Val Ser
            20                  25                  30

Gln Gln Lys Ser Asp Gln Tyr Ala Asn Asn Leu Ala Gly Arg Thr Glu
        35                  40                  45

Ser Pro Gln Gly Ser Ser Leu Ala Ser Arg Ile Ile Glu Arg Leu Ser
    50                  55                  60

Ser Met Ala His Ser Val Ile Gly Phe Ile Gln Arg Met Phe Ser Glu
65                  70                  75                  80

Gly Ser His Lys Pro Val Val Thr Pro Ala Leu Thr Pro Ala Gln Met
                85                  90                  95

Pro Ser Pro Thr Ser Phe Ser Asp Ser Ile Lys Gln Leu Ala Ala Glu
            100                 105                 110

Thr Leu Pro Lys Tyr Met Gln Gln Leu Ser Ser Leu Asp Ala Glu Thr
        115                 120                 125
```

Leu Gln Lys Asn His Asp Gln Phe Ala Thr Leu Glu Ser Arg Met Thr
130 135 140

Trp Asn Phe His Gln Tyr Tyr Thr Asn Arg Asn Asp Gly Leu Met Gly
145 150 155 160

Lys Leu Val Leu Thr Asp Glu Glu Lys Asn Asn Leu Lys Ala Leu Arg
165 170 175

Lys Ile Ile Arg Leu Arg Thr Arg Asp Val Phe Glu Glu Ala Lys Gly
180 185 190

Ile Ala Lys Ala Val Lys Lys Ser Ala Leu Thr Phe Glu Ile Ile Gln
195 200 205

Glu Lys Val Ser Thr Thr Gln Ile Lys His Leu Ser Asp Ser Glu Gln
210 215 220

Arg Glu Val Ala Lys Leu Ile Tyr Glu Met Asp Asp Asp Ala Arg Asp
225 230 235 240

Glu Phe Leu Gly Leu Thr Pro Arg Phe Trp Thr Gln Gly Ser Phe Gln
245 250 255

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

Asp Asp Gly Thr Tyr Met Pro Met Pro Ile Phe Glu Ser Glu Pro Lys
275 280 285

Ile Gly His Ser Leu Leu Ile Leu Leu Val Asp Ala Ser Leu Lys Ser
290 295 300

Leu Val Ala Glu Asn His Gly Trp Lys Phe Glu Ala Lys Gln Thr Cys
305 310 315 320

Gly Arg Ile Lys Ile Glu Ala Glu Lys Thr His Ile Asp Val Pro Met
325 330 335

Tyr Ala Ile Pro Lys Asp Glu Phe Gln Lys Lys Gln Ile Ala Leu Glu
340 345 350

Ala Asn Arg Ser Phe Val Lys Gly Ala Ile Phe Glu Ser Tyr Val Ala
355 360 365

Asp Ser Ile Thr Asp Asp Ser Glu Thr Tyr Glu Leu Asp Ser Glu Asn
370 375 380

Val Asn Leu Ala Leu Arg Glu Gly Asp Arg Lys Trp Ile Asn Ser Asp
385 390 395 400

Pro Lys Ile Val Glu Asp Trp Phe Asn Asp Ser Cys Ile Arg Ile Gly
405 410 415

Lys His Leu Arg Lys Val Cys Arg Phe Met Lys Ala Trp Arg Asp Ala
420 425 430

Gln Trp Asp Val Gly Gly Pro Ser Ser Ile Ser Leu Met Ala Ala Thr
435 440 445

Val Asn Ile Leu Asp Ser Val Ala His Asp Ala Ser Asp Leu Gly Glu
450 455 460

Thr Met Lys Ile Ile Ala Lys His Leu Pro Ser Glu Phe Ala Arg Gly
465 470 475 480

Val Glu Ser Pro Asp Ser Thr Asp Glu Lys Pro Leu Phe Pro Pro Ser
485 490 495

Tyr Lys His Gly Pro Arg Glu Met Asp Ile Met Ser Lys Leu Glu Arg
500 505 510

Leu Pro Glu Ile Leu Ser Ser Ala Glu Ser Ala Asp Ser Lys Ser Glu
515 520 525

Ala Leu Lys Lys Ile Asn Met Ala Phe Gly Asn Arg Val Thr Asn Ser
530 535 540

Glu Leu Ile Val Leu Ala Lys Ala Leu
545 550

<210> 42
<211> 272
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> YopE1-138 - proteína similar a DisA de B. cereus optimizada en codones de Y. enterocolitica
(PDB: 2FB5; Aa. 76-205)

<400> 42

Met Lys Ile Ser Ser Phe Ile Ser Thr Ser Leu Pro Leu Pro Ala Ser
1 5 10 15

Val Ser Gly Ser Ser Ser Val Gly Glu Met Ser Gly Arg Ser Val Ser
20 25 30

```
Gln Gln Lys Ser Asp Gln Tyr Ala Asn Asn Leu Ala Gly Arg Thr Glu
        35                  40                  45

Ser Pro Gln Gly Ser Ser Leu Ala Ser Arg Ile Ile Glu Arg Leu Ser
    50                  55                  60

Ser Met Ala His Ser Val Ile Gly Phe Ile Gln Arg Met Phe Ser Glu
65                  70                  75                  80

Gly Ser His Lys Pro Val Val Thr Pro Ala Leu Thr Pro Ala Gln Met
                85                  90                  95

Pro Ser Pro Thr Ser Phe Ser Asp Ser Ile Lys Gln Leu Ala Ala Glu
            100                 105                 110

Thr Leu Pro Lys Tyr Met Gln Gln Leu Ser Ser Leu Asp Ala Glu Thr
        115                 120                 125

Leu Gln Lys Asn His Asp Gln Phe Ala Thr Leu Glu Ser Arg Ser Ser
    130                 135                 140

Ser Phe Ile Thr Thr Ala Ile Gln His Leu Ser Ala Arg Lys His Gly
145                 150                 155                 160
```

Ala Leu Ile Val Val Glu Arg Asn Glu Thr Leu Glu Ala Leu Ile Gln
165 170 175

Thr Gly Thr Thr Leu Asn Ala His Leu Thr Ala Pro Leu Leu Glu Ser
180 185 190

Ile Phe Tyr Pro Gly Asn Pro Leu His Asp Gly Ala Val Leu Val Lys
195 200 205

Asn Asn His Ile Val Ser Ala Ala Asn Ile Leu Pro Leu Thr Lys Ser
210 215 220

Thr Glu Val Asp Pro Glu Leu Gly Thr Arg His Arg Ala Ala Ile Gly
225 230 235 240

Leu Ser Glu Lys Ser Asp Ala Leu Ile Leu Val Val Ser Glu Glu Thr
245 250 255

Gly Arg Thr Ser Phe Ala Leu Asn Gly Ile Leu Tyr Thr Ile Ser Leu
260 265 270

<210> 43
<211> 564

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> YopE1-138 - cGAS de anémona (N. vectensis) optimizada en codones de Y. enterocolitica (Ensembl: A7SFB5.1)

<400> 43

Met Lys Ile Ser Ser Phe Ile Ser Thr Ser Leu Pro Leu Pro Ala Ser
1 5 10 15

Val Ser Gly Ser Ser Ser Val Gly Glu Met Ser Gly Arg Ser Val Ser
20 25 30

Gln Gln Lys Ser Asp Gln Tyr Ala Asn Asn Leu Ala Gly Arg Thr Glu
35 40 45

Ser Pro Gln Gly Ser Ser Leu Ala Ser Arg Ile Ile Glu Arg Leu Ser
50 55 60

Ser Met Ala His Ser Val Ile Gly Phe Ile Gln Arg Met Phe Ser Glu
65 70 75 80

Gly Ser His Lys Pro Val Val Thr Pro Ala Leu Thr Pro Ala Gln Met
85 90 95

```
Pro Ser Pro Thr Ser Phe Ser Asp Ser Ile Lys Gln Leu Ala Ala Glu
            100                 105                 110

Thr Leu Pro Lys Tyr Met Gln Gln Leu Ser Ser Leu Asp Ala Glu Thr
        115                 120                 125

Leu Gln Lys Asn His Asp Gln Phe Ala Thr Leu Glu Ser Arg Met Ala
    130                 135                 140

Thr Leu Glu Arg Leu Leu Asp Leu Leu Arg Glu Tyr His Leu Asp Asp
145                 150                 155                 160

Val Leu Phe His Asn Ser Thr Pro Glu Leu Gly Ile Gln His Arg Ser
                165                 170                 175

Arg Pro Lys Gln Lys Arg Ile Ile Arg Gly Lys Lys Gln Gln Lys Ser
            180                 185                 190

Lys Lys Leu Lys Arg Asn Glu Gln Gln Gln Pro Phe Pro Lys Gly Asp
        195                 200                 205

Leu Glu Thr Leu Arg Arg Phe Ser Val Thr Asp Val Lys Ile Ser Lys
    210                 215                 220
```

```
Gln Ser Thr Lys Trp Ala Lys Lys Met Ala Asp Lys His Leu Glu Ile
225                 230                 235                 240

Ile Arg Lys His Cys Lys Thr Asn Ser Ile Lys Leu Phe Asn His Phe
                245                 250                 255

Glu Tyr Thr Gly Ser Phe Tyr Glu His Leu Lys Thr Ile Asp Ala Asp
            260                 265                 270

Glu Leu Asp Ile Met Val Ala Leu Ser Ile Lys Met Asp Glu Leu Glu
        275                 280                 285

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

Pro Ser Asn Arg Asn Lys Tyr Asn Asp Leu Thr Ile Ala Asp Asn Tyr
305                 310                 315                 320

Gly Arg Tyr Leu Ser Pro Glu Lys Val Ser Arg Trp Phe Phe Ser Leu
                325                 330                 335

Val Gln Lys Ala Val Asn Thr Tyr Lys Asp Glu Ile Pro Gln Thr Glu
            340                 345                 350
```

Val Lys Leu Thr Asp Asn Gly Pro Ala Thr Thr Leu Val Ile Thr Tyr
355 360 365

Arg Glu Gly Asp Lys Pro Gln Glu Lys Asn Arg Arg Leu Ser Ile Asp
370 375 380

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

Asp Leu Arg Ala Trp His Tyr Val Ala Lys Thr Ile Pro Lys Gly Ala
405 410 415

Arg Leu Lys Glu Pro Leu Pro Phe Arg Ser Glu Leu Leu Trp Arg Gln
420 425 430

Ser Phe Ser Leu Lys Glu Lys His Leu Met Asp Lys Leu Asp Lys Asp
435 440 445

Asp Asn Gly Cys Arg Arg Glu Met Val Arg Ile Val Lys Thr Ile Val
450 455 460

Lys Lys Asp Pro Thr Leu Ala Gln Leu Ser Ser Tyr His Ile Lys Thr
465 470 475 480

Ala Phe Leu Gln Tyr Asn Phe Ser Asp Val Lys Leu Asp Trp Glu Gly
485 490 495

Lys Lys Leu Ala Glu Arg Phe Leu His Phe Leu Glu Phe Leu Arg Asp
500 505 510

Arg Val Lys Asp Lys Thr Leu Asn Asn Tyr Phe Ile Thr Asp Leu Asn
515 520 525

Leu Leu Asp Asp Leu Asn Asp Ser Asn Ile Asp Asn Ile Ala Asn Arg
530 535 540

Leu Asp Lys Ile Ile Gln Asn Glu Thr Glu Arg Ala Lys Ile Phe Thr
545 550 555 560

Thr Gln Arg Gln

<210> 44
<211> 332
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> YopE1-138 - dos dominios CARD de MAD5 murina optimizada en codones de Y. enterocolitica (mínimo: Aa 1-190)

<400> 44

```
Met Lys Ile Ser Ser Phe Ile Ser Thr Ser Leu Pro Leu Pro Ala Ser
1               5                  10                  15

Val Ser Gly Ser Ser Ser Val Gly Glu Met Ser Gly Arg Ser Val Ser
            20                  25                  30

Gln Gln Lys Ser Asp Gln Tyr Ala Asn Asn Leu Ala Gly Arg Thr Glu
        35                  40                  45

Ser Pro Gln Gly Ser Ser Leu Ala Ser Arg Ile Ile Glu Arg Leu Ser
    50                  55                  60

Ser Met Ala His Ser Val Ile Gly Phe Ile Gln Arg Met Phe Ser Glu
65                  70                  75                  80

Gly Ser His Lys Pro Val Val Thr Pro Ala Leu Thr Pro Ala Gln Met
                85                  90                  95

Pro Ser Pro Thr Ser Phe Ser Asp Ser Ile Lys Gln Leu Ala Ala Glu
            100                 105                 110
```

Thr Leu Pro Lys Tyr Met Gln Gln Leu Ser Ser Leu Asp Ala Glu Thr
115 120 125

Leu Gln Lys Asn His Asp Gln Phe Ala Thr Leu Glu Ser Arg Met Ser
130 135 140

Ile Val Cys Ser Ala Glu Asp Ser Phe Arg Asn Leu Ile Leu Phe Phe
145 150 155 160

Arg Pro Arg Leu Lys Met Tyr Ile Gln Val Glu Pro Val Leu Asp His
165 170 175

Leu Ile Phe Leu Ser Ala Glu Thr Lys Glu Gln Ile Leu Lys Lys Ile
180 185 190

Asn Thr Cys Gly Asn Thr Ser Ala Ala Glu Leu Leu Leu Ser Thr Leu
195 200 205

Glu Gln Gly Gln Trp Pro Leu Gly Trp Thr Gln Met Phe Val Glu Ala
210 215 220

Leu Glu His Ser Gly Asn Pro Leu Ala Ala Arg Tyr Val Lys Pro Thr
225 230 235 240

Leu Thr Asp Leu Pro Ser Pro Ser Ser Glu Thr Ala His Asp Glu Cys
245 250 255

Leu His Leu Leu Thr Leu Leu Gln Pro Thr Leu Val Asp Lys Leu Leu
260 265 270

Ile Asn Asp Val Leu Asp Thr Cys Phe Glu Lys Gly Leu Leu Thr Val
275 280 285

Glu Asp Arg Asn Arg Ile Ser Ala Ala Gly Asn Ser Gly Asn Glu Ser
290 295 300

Gly Val Arg Glu Leu Leu Arg Arg Ile Val Gln Lys Glu Asn Trp Phe
305 310 315 320

Ser Thr Phe Leu Asp Val Leu Arg Gln Thr Gly Asn
325 330

<210> 45
<211> 457
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> YopE1-138 - dos dominios CARD de MAD5 murina optimizada en codones de Y. enterocolitica (extendida: Aa 1-315)

<400> 45

```
Met Lys Ile Ser Ser Phe Ile Ser Thr Ser Leu Pro Leu Pro Ala Ser
1               5                  10                  15

Val Ser Gly Ser Ser Ser Val Gly Glu Met Ser Gly Arg Ser Val Ser
            20                  25                  30

Gln Gln Lys Ser Asp Gln Tyr Ala Asn Asn Leu Ala Gly Arg Thr Glu
        35                  40                  45

Ser Pro Gln Gly Ser Ser Leu Ala Ser Arg Ile Ile Glu Arg Leu Ser
    50                  55                  60

Ser Met Ala His Ser Val Ile Gly Phe Ile Gln Arg Met Phe Ser Glu
65                  70                  75                  80

Gly Ser His Lys Pro Val Val Thr Pro Ala Leu Thr Pro Ala Gln Met
                85                  90                  95

Pro Ser Pro Thr Ser Phe Ser Asp Ser Ile Lys Gln Leu Ala Ala Glu
            100                 105                 110
```

Thr Leu Pro Lys Tyr Met Gln Gln Leu Ser Ser Leu Asp Ala Glu Thr
115 120 125

Leu Gln Lys Asn His Asp Gln Phe Ala Thr Leu Glu Ser Arg Met Ser
130 135 140

Ile Val Cys Ser Ala Glu Asp Ser Phe Arg Asn Leu Ile Leu Phe Phe
145 150 155 160

Arg Pro Arg Leu Lys Met Tyr Ile Gln Val Glu Pro Val Leu Asp His
165 170 175

Leu Ile Phe Leu Ser Ala Glu Thr Lys Glu Gln Ile Leu Lys Lys Ile
180 185 190

Asn Thr Cys Gly Asn Thr Ser Ala Ala Glu Leu Leu Leu Ser Thr Leu
195 200 205

Glu Gln Gly Gln Trp Pro Leu Gly Trp Thr Gln Met Phe Val Glu Ala
210 215 220

Leu Glu His Ser Gly Asn Pro Leu Ala Ala Arg Tyr Val Lys Pro Thr
225 230 235 240

Leu Thr Asp Leu Pro Ser Pro Ser Ser Glu Thr Ala His Asp Glu Cys
245 250 255

Leu His Leu Leu Thr Leu Leu Gln Pro Thr Leu Val Asp Lys Leu Leu
260 265 270

Ile Asn Asp Val Leu Asp Thr Cys Phe Glu Lys Gly Leu Leu Thr Val
275 280 285

Glu Asp Arg Asn Arg Ile Ser Ala Ala Gly Asn Ser Gly Asn Glu Ser
290 295 300

Gly Val Arg Glu Leu Leu Arg Arg Ile Val Gln Lys Glu Asn Trp Phe
305 310 315 320

Ser Thr Phe Leu Asp Val Leu Arg Gln Thr Gly Asn Asp Ala Leu Phe
325 330 335

Gln Glu Leu Thr Gly Gly Gly Cys Pro Glu Asp Asn Thr Asp Leu Ala
340 345 350

Asn Ser Ser His Arg Asp Gly Pro Ala Ala Asn Glu Cys Leu Leu Pro
355 360 365

Ala Val Asp Glu Ser Ser Leu Glu Thr Glu Ala Trp Asn Val Asp Asp
370 375 380

Ile Leu Pro Glu Ala Ser Cys Thr Asp Ser Ser Val Thr Thr Glu Ser
385 390 395 400

Asp Thr Ser Leu Ala Glu Gly Ser Val Ser Cys Phe Asp Glu Ser Leu
405 410 415

Gly His Asn Ser Asn Met Gly Arg Asp Ser Gly Thr Met Gly Ser Asp
420 425 430

Ser Asp Glu Ser Val Ile Gln Thr Lys Arg Val Ser Pro Glu Pro Glu
435 440 445

Leu Gln Leu Arg Pro Tyr Gln Met Glu
450 455

<210> 46
<211> 332
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> YopE1-138 - dos dominios CARD de MAD5 murina optimizada en codones de Y. enterocolitica (mínimo: Aa 1-190)

<400> 46

```
Met Lys Ile Ser Ser Phe Ile Ser Thr Ser Leu Pro Leu Pro Ala Ser
1               5                  10                  15

Val Ser Gly Ser Ser Ser Val Gly Glu Met Ser Gly Arg Ser Val Ser
            20                  25                  30

Gln Gln Lys Ser Asp Gln Tyr Ala Asn Asn Leu Ala Gly Arg Thr Glu
        35                  40                  45

Ser Pro Gln Gly Ser Ser Leu Ala Ser Arg Ile Ile Glu Arg Leu Ser
    50                  55                  60

Ser Met Ala His Ser Val Ile Gly Phe Ile Gln Arg Met Phe Ser Glu
65                  70                  75                  80

Gly Ser His Lys Pro Val Val Thr Pro Ala Leu Thr Pro Ala Gln Met
                85                  90                  95

Pro Ser Pro Thr Ser Phe Ser Asp Ser Ile Lys Gln Leu Ala Ala Glu
            100                 105                 110
```

Thr Leu Pro Lys Tyr Met Gln Gln Leu Ser Ser Leu Asp Ala Glu Thr
115 120 125

Leu Gln Lys Asn His Asp Gln Phe Ala Thr Leu Glu Ser Arg Met Ser
130 135 140

Asn Gly Tyr Ser Thr Asp Glu Asn Phe Arg Tyr Leu Ile Ser Cys Phe
145 150 155 160

Arg Ala Arg Val Lys Met Tyr Ile Gln Val Glu Pro Val Leu Asp Tyr
165 170 175

Leu Thr Phe Leu Pro Ala Glu Val Lys Glu Gln Ile Gln Arg Thr Val
180 185 190

Ala Thr Ser Gly Asn Met Gln Ala Val Glu Leu Leu Leu Ser Thr Leu
195 200 205

Glu Lys Gly Val Trp His Leu Gly Trp Thr Arg Glu Phe Val Glu Ala
210 215 220

Leu Arg Arg Thr Gly Ser Pro Leu Ala Ala Arg Tyr Met Asn Pro Glu
225 230 235 240

Leu Thr Asp Leu Pro Ser Pro Ser Phe Glu Asn Ala His Asp Glu Tyr
245 250 255

Leu Gln Leu Leu Asn Leu Leu Gln Pro Thr Leu Val Asp Lys Leu Leu
260 265 270

Val Arg Asp Val Leu Asp Lys Cys Met Glu Glu Glu Leu Leu Thr Ile
275 280 285

Glu Asp Arg Asn Arg Ile Ala Ala Ala Glu Asn Asn Gly Asn Glu Ser
290 295 300

Gly Val Arg Glu Leu Leu Lys Arg Ile Val Gln Lys Glu Asn Trp Phe
305 310 315 320

Ser Ala Phe Leu Asn Val Leu Arg Gln Thr Gly Asn
325 330

<210> 47
<211> 456
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> YopE1-138 - dos dominios CARD de MAD5 murina optimizada en codones de Y. enterocolitica (extendido: Aa 1-314)

<400> 47

```
Met Lys Ile Ser Ser Phe Ile Ser Thr Ser Leu Pro Leu Pro Ala Ser
1               5                  10                  15

Val Ser Gly Ser Ser Ser Val Gly Glu Met Ser Gly Arg Ser Val Ser
            20                  25                  30

Gln Gln Lys Ser Asp Gln Tyr Ala Asn Asn Leu Ala Gly Arg Thr Glu
        35                  40                  45

Ser Pro Gln Gly Ser Ser Leu Ala Ser Arg Ile Ile Glu Arg Leu Ser
    50                  55                  60

Ser Met Ala His Ser Val Ile Gly Phe Ile Gln Arg Met Phe Ser Glu
65                  70                  75                  80

Gly Ser His Lys Pro Val Val Thr Pro Ala Leu Thr Pro Ala Gln Met
                85                  90                  95

Pro Ser Pro Thr Ser Phe Ser Asp Ser Ile Lys Gln Leu Ala Ala Glu
            100                 105                 110
```

Thr Leu Pro Lys Tyr Met Gln Gln Leu Ser Ser Leu Asp Ala Glu Thr
115 120 125

Leu Gln Lys Asn His Asp Gln Phe Ala Thr Leu Glu Ser Arg Met Ser
130 135 140

Asn Gly Tyr Ser Thr Asp Glu Asn Phe Arg Tyr Leu Ile Ser Cys Phe
145 150 155 160

Arg Ala Arg Val Lys Met Tyr Ile Gln Val Glu Pro Val Leu Asp Tyr
165 170 175

Leu Thr Phe Leu Pro Ala Glu Val Lys Glu Gln Ile Gln Arg Thr Val
180 185 190

Ala Thr Ser Gly Asn Met Gln Ala Val Glu Leu Leu Leu Ser Thr Leu
195 200 205

Glu Lys Gly Val Trp His Leu Gly Trp Thr Arg Glu Phe Val Glu Ala
210 215 220

Leu Arg Arg Thr Gly Ser Pro Leu Ala Ala Arg Tyr Met Asn Pro Glu
225 230 235 240

Leu Thr Asp Leu Pro Ser Pro Ser Phe Glu Asn Ala His Asp Glu Tyr
245 250 255

Leu Gln Leu Leu Asn Leu Leu Gln Pro Thr Leu Val Asp Lys Leu Leu
260 265 270

Val Arg Asp Val Leu Asp Lys Cys Met Glu Glu Glu Leu Leu Thr Ile
275 280 285

Glu Asp Arg Asn Arg Ile Ala Ala Ala Glu Asn Asn Gly Asn Glu Ser
290 295 300

Gly Val Arg Glu Leu Leu Lys Arg Ile Val Gln Lys Glu Asn Trp Phe
305 310 315 320

Ser Ala Phe Leu Asn Val Leu Arg Gln Thr Gly Asn Asn Glu Leu Val
325 330 335

Gln Glu Leu Thr Gly Ser Asp Cys Ser Glu Ser Asn Ala Glu Ile Glu
340 345 350

Asn Leu Ser Gln Val Asp Gly Pro Gln Val Glu Glu Gln Leu Leu Ser
355 360 365

Thr Thr Val Gln Pro Asn Leu Glu Lys Glu Val Trp Gly Met Glu Asn
370 375 380

Asn Ser Ser Glu Ser Ser Phe Ala Asp Ser Ser Val Val Ser Glu Ser
385 390 395 400

Asp Thr Ser Leu Ala Glu Gly Ser Val Ser Cys Leu Asp Glu Ser Leu
405 410 415

Gly His Asn Ser Asn Met Gly Ser Asp Ser Gly Thr Met Gly Ser Asp
420 425 430

Ser Asp Glu Glu Asn Val Ala Ala Arg Ala Ser Pro Glu Pro Glu Leu
435 440 445

Gln Leu Arg Pro Tyr Gln Met Glu
450 455

<210> 48
<211> 219
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> YopE1-138 - dos dominios CARD de MAVS murina optimizada en codones de Y. enterocolitica (mínimo: Aa 1-77)

<400> 48

```
Met Lys Ile Ser Ser Phe Ile Ser Thr Ser Leu Pro Leu Pro Ala Ser
1               5                  10                  15

Val Ser Gly Ser Ser Ser Val Gly Glu Met Ser Gly Arg Ser Val Ser
            20                  25                  30

Gln Gln Lys Ser Asp Gln Tyr Ala Asn Asn Leu Ala Gly Arg Thr Glu
        35                  40                  45

Ser Pro Gln Gly Ser Ser Leu Ala Ser Arg Ile Ile Glu Arg Leu Ser
    50                  55                  60

Ser Met Ala His Ser Val Ile Gly Phe Ile Gln Arg Met Phe Ser Glu
65                  70                  75                  80

Gly Ser His Lys Pro Val Val Thr Pro Ala Leu Thr Pro Ala Gln Met
                85                  90                  95

Pro Ser Pro Thr Ser Phe Ser Asp Ser Ile Lys Gln Leu Ala Ala Glu
            100                 105                 110
```

Thr Leu Pro Lys Tyr Met Gln Gln Leu Ser Ser Leu Asp Ala Glu Thr
115 120 125

Leu Gln Lys Asn His Asp Gln Phe Ala Thr Leu Glu Ser Arg Met Pro
130 135 140

Phe Ala Glu Asp Lys Thr Tyr Lys Tyr Ile Cys Arg Asn Phe Ser Asn
145 150 155 160

Phe Cys Asn Val Asp Val Val Glu Ile Leu Pro Tyr Leu Pro Cys Leu
165 170 175

Thr Ala Arg Asp Gln Asp Arg Leu Arg Ala Thr Cys Thr Leu Ser Gly
180 185 190

Asn Arg Asp Thr Leu Trp His Leu Phe Asn Thr Leu Gln Arg Arg Pro
195 200 205

Gly Trp Val Glu Tyr Phe Ile Ala Ala Leu Arg
210 215

<210> 49
<211> 142
<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> YopE1-138 - dos dominios CARD de MAVS murina optimizada en codones de Y. enterocolitica (mínimo: Aa 1-77)

<400> 49

```
Met Lys Ile Ser Ser Phe Ile Ser Thr Ser Leu Pro Leu Pro Ala Ser
1               5                  10                  15

Val Ser Gly Ser Ser Ser Val Gly Glu Met Ser Gly Arg Ser Val Ser
            20                  25                  30

Gln Gln Lys Ser Asp Gln Tyr Ala Asn Asn Leu Ala Gly Arg Thr Glu
        35                  40                  45

Ser Pro Gln Gly Ser Ser Leu Ala Ser Arg Ile Ile Glu Arg Leu Ser
    50                  55                  60

Ser Met Ala His Ser Val Ile Gly Phe Ile Gln Arg Met Phe Ser Glu
65                  70                  75                  80

Gly Ser His Lys Pro Val Val Thr Pro Ala Leu Thr Pro Ala Gln Met
                85                  90                  95
```

Pro Ser Pro Thr Ser Phe Ser Asp Ser Ile Lys Gln Leu Ala Ala Glu
100 105 110

Thr Leu Pro Lys Tyr Met Gln Gln Leu Ser Ser Leu Asp Ala Glu Thr
115 120 125

Leu Gln Lys Asn His Asp Gln Phe Ala Thr Leu Glu Ser Arg
130 135 140

<210> 50
<211> 1675
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencia de mutador para la generación de YopE1-138 - dos dominios CARD de RIG-1 murina optimizada en codones de Y. enterocolitica (Aa. 1-246)
integrada en el plásmido pYV

<400> 50
gaatagacag cgaaagttgt tgaaataatt gagtgatagc ttgttcaaat gaatacattt 60

gatctcctaa tagttagata aaatatcaac ttaaccaaag cactctcggc agaccatcaa 120

ttttagccta taatttttag tttttatttt gtctaatata acaacaaaaa cagcagcggt 180

tttttatata accaccggct attttcccac taagataacc ttgttttaat agccaaggga 240

ataaatagtc atgaaaatat catcatttat ttctacatca ctgcccctgc cggcatcagt 300

gtcaggatct agcagcgtag gagaaatgtc tgggcgctca gtctcacagc aaaaaagtga 360

tcaatatgca aacaatctgg ccgggcgcac tgaaagccct cagggttcca gcttagccag 420

ccgtatcatt gagaggttat catcaatggc ccactctgtg attggattta tccaacgcat 480

gttctcggag gggagccata aaccggtggt gacaccagca ctcacgcctg cacaaatgcc 540

aagccctacg tctttcagtg atagtatcaa gcaacttgct gctgagacgc tgccaaaata 600

catgcagcag ttgagtagct tggatgcaga gacgctgcag aaaaatcatg accagttcgc 660

cacgctcgag tctagaatga ccgccgaaca acgccaaaat ctgcaagcct ttcgcgatta 720

tattaaaaaa attctggatc cgacctatat tctgagctat atgagcagct ggctggaaga 780

tgaagaagtg caatatattc aagccgaaaa aaataataaa ggtccgatgg aagccgccag 840

cctgtttctg caatatctgc tgaaactgca aagcgaaggt tggtttcaag cctttctgga 900

tgccctgtat catgccggtt attgtggtct gtgtgaagcc attgaaagct gggattttca 960

aaaaattgaa aaactggaag aacatcgcct gctgctgcgc cgcctggaac cggaatttaa 1020

agccaccgtg gatccgaatg atattctgag cgaactgagc gaatgtctga ttaatcaaga 1080

atgtgaagaa attcgccaaa ttcgcgatac caaaggtcgc atggccggtg ccgaaaaaat 1140

ggccgaatgt ctgattcgca gcgataaaga aaattggccg aaagtgctgc aactggccct 1200

ggaaaaagat aatagcaaat ttagcgaact gtggattgtg gataaaggtt ttaaacgcgc 1260

cgaaagcaaa gccgatgaag atgatggtgc cgaagccagc agcattcaaa tttttattca 1320

agaagaaccg gaatgtcaaa atctgagcca aaatccgggt ccgccgagcg aagccagcag 1380

caataatctg catagcccgc tgaaaccgcg caattaatat ggataaaaac aaggggggtag 1440

tgtttccccc ttttttctatc aatattgcga atatcttcgt ccctgatctt tcaggggcga 1500

atcgtttttt agcatgctca ttgttagaat ttctgactta tctctcttct gtattactac 1560

tcatactctg gaaaatcctg agcatttata tctatggatt gatgcagcac tcgagaaatc 1620

aaaatatcat tgctaagcgt tatatagtat ataccgtgct ttttatactg aaaac 1675

<210> 51
<211> 27
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Núm. de cebador : Si_285

<400> 51
cataccatgg gagtgagcaa gggcgag 27

<210> 52
<211> 30
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Núm. de cebador : Si_286

<400> 52

ggaagatctt tacttgtaca gctcgtccat 30

<210> 53

<211> 29

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Núm. de cebador : Si_287

<400> 53

cggggtacct caactaaatg accgtggtg 29

<210> 54

<211> 43

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Núm. de cebador : Si_288

<400> 54

gttaaagctt ttcgaatcta gactcgagcg tggcgaactg gtc 43

<210> 55

<211> 30

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Núm. de cebador : Si_387

<400> 55

cgtatctaga atggactgtg aggtcaacaa 30

<210> 56

<211> 23

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Núm. de cebador : Si_391

<400> 56

cgtatctaga ggcaaccgca gca 23

<210> 57

<211> 29

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Núm. de cebador : Si_389

<400> 57
gttaaagctt tcagtccatc ccatttctg 29

<210> 58
<211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Núm. de cebador : Si_436

<400> 58
cgtatctaga atgccccgcc cc 22

<210> 59
<211> 31
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Núm. de cebador : Si_437

<400> 59
gttaaagctt ctacccaccg tactcgtcaa t 31

<210> 60
<211> 31
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Núm. de cebador : Si_438

<400> 60

cgtatctaga atgtctgaca cgtccagaga g 31

<210> 61

<211> 32

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Núm. de cebador : Si_439

<400> 61

gttaaagctt tcatcttctt cgcaggaaaa ag 32

<210> 62

<211> 29

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Núm. de cebador : Si_463

<400> 62

cagtctcgag gaaagcttgt ttaaggggc 29

<210> 63

<211> 25

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Núm. de cebador : Si_464

<400> 63

cagtttcgaa ttagcgacgg cgacg 25

<210> 64

<211> 31

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Núm. de cebador : Si_476

<400> 64

gttaaagctt ttacttgtac agctcgtcca t 31

<210> 65

<211> 24

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Núm. de cebador : Si_494

<400> 65
cgtatctaga atggccgagc cttg 24

<210> 66
<211> 31
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Núm. de cebador : Si_495

<400> 66
gttaaagctt ttattgaaga tttgtggctc c 31

<210> 67
<211> 64
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Núm. de cebador : Si_504

<400> 67
cgtatctaga gaaaatctgt attttcaaag tgaaaatctg tattttcaaa gtatgccccg 60

cccc 64

<210> 68
<211> 30

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Núm. de cebador : Si_505

<400> 68

gttaaagctt cccaccgtac tcgtcaattc 30

<210> 69

<211> 66

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Núm. de cebador : Si_508

<400> 69

cgtatctaga gaaaatctgt attttcaaag tgaaaatctg tattttcaaa gtatggccga 60

gccttg 66

<210> 70

<211> 29

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Núm. de cebador : Si_509

<400> 70
gttaaagctt ttgaagattt gtggctccc 29

<210> 71
<211> 67
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Núm. de cebador : Si_511

<400> 71
cgtatctaga gaaaatctgt attttcaaag tgaaaatctg tattttcaaa gtgtgagcaa 60

gggcgag 67

<210> 72
<211> 91
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Núm. de cebador : Si_512

<400> 72
cgtatctaga gaaaatctgt attttcaaag tgaaaatctg tattttcaaa gtccgccgaa 60

aaaaaaacgt aaagttgtga gcaagggcga g 91

<210> 73

<211> 55

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Núm. de cebador : Si_513

<400> 73

gttaaagctt ttaaacttta cgtttttttt tcggcggctt gtacagctcg tccat 55

<210> 74

<211> 90

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Núm. de cebador : Si_515

<400> 74

cgtatctaga gaaaatctgt attttcaaag tgaaaatctg tattttcaaa gtgattataa 60

agatgatgat gataaaatgg ccgagccttg 90

<210> 75

<211> 82

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Núm. de cebador : Si_677

<400> 75
ttactattcg aagaaattat tcataatatt gcccgccatc tggcccaaat tggtgatgaa 60

atggatcatt aagcttggag ta 82

<210> 76
<211> 82
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Núm. de cebador : Si_678

<400> 76
tactccaagc ttaatgatcc atttcatcac caatttgggc cagatggcgg gcaatattat 60

gaataatttc ttcgaatagt aa 82

<210> 77
<211> 73
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Núm. de cebador : Si_682

<400> 77
ttactactcg agaaaaaact gagcgaatgt ctgcgccgca ttggtgatga actggatagc 60

taagcttgga gta 73

<210> 78
<211> 73
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Núm. de cebador : Si_683

<400> 78
tactccaagc ttagctatcc agttcatcac caatgcggcg cagacattcg ctcagttttt 60

tctcgagtag taa 73

<210> 79
<211> 34
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Núm. de cebador : Si_580

<400> 79
catgccatgg atttatggtc atagatatga cctc 34

<210> 80
<211> 35

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Núm. de cebador : Si_612

<400> 80

cggggtacca tgaggtagct tatttcctga taaag 35

<210> 81

<211> 35

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Núm. de cebador : Si_613

<400> 81

cggggtacca taattgtcca aatagttatg gtagc 35

<210> 82

<211> 24

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Núm. de cebador : Si_614

<400> 82

catgccatgg cggcaaggct cctc 24

<210> 83

<211> 29

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Núm. de cebador : Si_615

<400> 83

cggggtacct ttatttgtca acactgccc 29

<210> 84

<211> 26

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Núm. de cebador : Si_616

<400> 84

cggggtacct gcggggtctt tactcg 26

<210> 85

<211> 30

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Núm. de cebador : Si_585

<400> 85
cagtctcgag atgcagatct tcgtcaagac 30

<210> 86
<211> 43
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Núm. de cebador : Si_586

<400> 86
gttaaagctt gctagcttcg aaaccaccac gtagacgtaa gac 43

<210> 87
<211> 48
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Núm. de cebador : Si_588

<400> 87
cagtttcgaa gattataaag atgatgatga taaaatggcc gagccttg 48

<210> 88
<211> 53

<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> núm. de cebador 733

<400> 88
ttactactcg agggtgccat cgatgccgaa gaaattattc ataatattgc ccg 53

<210> 89
<211> 39
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> núm. de cebador 735

<400> 89
tactccttcg aattaatgat ccatttcatc accaatttg 39

<210> 90
<211> 50
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> núm. de cebador 736

<400> 90
ttactactcg agggtgccat cgatgccaaa aaactgagcg aatgtctgcg 50

<210> 91

<211> 37

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> núm. de cebador 738

<400> 91

tactccttcg aattagctat ccagttcatc accaatg 37

<210> 92

<211> 43

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> núm. de cebador 734

<400> 92

tactccttcg aaggcaccat gatccatttc atcaccaatt tgg 43

<210> 93

<211> 33

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> núm. de cebador 725

<400> 93
ttactattcg aagaaattat tcataatatt gcc 33

<210> 94
<211> 50
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> núm. de cebador 726

<400> 94
tactccaagc ttacggttga atattatgat ccatttcatc accaatttgg 50

<210> 95
<211> 49
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> núm. de cebador 727

<400> 95
ttactattcg aagccggtgg tgccgaagaa attattcata atattgccc 49

<210> 96
<211> 29

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> núm. de cebador 728

<400> 96

tactccaagc ttaatgatcc atttcatca 29

<210> 97

<211> 40

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> núm. de cebador 737

<400> 97

tactccttcg aaggcaccgc tatccagttc atcaccaatg 40

<210> 98

<211> 394

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> YopE1-138 2xsitio de TEV - EGFP

<400> 98

```
Met Lys Ile Ser Ser Phe Ile Ser Thr Ser Leu Pro Leu Pro Ala Ser
1               5                  10                  15

Val Ser Gly Ser Ser Ser Val Gly Glu Met Ser Gly Arg Ser Val Ser
            20                  25                  30

Gln Gln Lys Ser Asp Gln Tyr Ala Asn Asn Leu Ala Gly Arg Thr Glu
        35                  40                  45

Ser Pro Gln Gly Ser Ser Leu Ala Ser Arg Ile Ile Glu Arg Leu Ser
    50                  55                  60

Ser Met Ala His Ser Val Ile Gly Phe Ile Gln Arg Met Phe Ser Glu
65                  70                  75                  80

Gly Ser His Lys Pro Val Val Thr Pro Ala Leu Thr Pro Ala Gln Met
                85                  90                  95

Pro Ser Pro Thr Ser Phe Ser Asp Ser Ile Lys Gln Leu Ala Ala Glu
            100                 105                 110

Thr Leu Pro Lys Tyr Met Gln Gln Leu Ser Ser Leu Asp Ala Glu Thr
        115                 120                 125
```

Leu Gln Lys Asn His Asp Gln Phe Ala Thr Leu Glu Ser Arg Glu Asn
130 135 140

Leu Tyr Phe Gln Ser Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Ser Val Ser Lys Gly
145 150 155 160

Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu Val Glu Leu Asp Gly
165 170 175

Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly Glu Gly Glu Gly Asp
180 185 190

Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile Cys Thr Thr Gly Lys
195 200 205

Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr Leu Thr Tyr Gly Val
210 215 220

Gln Cys Phe Ser Arg Tyr Pro Asp His Met Lys Gln His Asp Phe Phe
225 230 235 240

Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu Arg Thr Ile Phe Phe
245 250 255

Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu Val Lys Phe Glu Gly
260 265 270

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

Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr Asn Tyr Asn Ser His
290 295 300

Asn Val Tyr Ile Met Ala Asp Lys Gln Lys Asn Gly Ile Lys Val Asn
305 310 315 320

Phe Lys Ile Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Ser Val Gln Leu Ala Asp
325 330 335

His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly Pro Val Leu Leu Pro
340 345 350

Asp Asn His Tyr Leu Ser Thr Gln Ser Ala Leu Ser Lys Asp Pro Asn
355 360 365

Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe Val Thr Ala Ala Gly
370 375 380

Ile Thr Leu Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys
385 390

<210> 99
<211> 401
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> YopE1-138 - 2xsitio de TEV - NLS - EGFP

<400> 99

Met Lys Ile Ser Ser Phe Ile Ser Thr Ser Leu Pro Leu Pro Ala Ser
1 5 10 15

Val Ser Gly Ser Ser Ser Val Gly Glu Met Ser Gly Arg Ser Val Ser
20 25 30

Gln Gln Lys Ser Asp Gln Tyr Ala Asn Asn Leu Ala Gly Arg Thr Glu
35 40 45

Ser Pro Gln Gly Ser Ser Leu Ala Ser Arg Ile Ile Glu Arg Leu Ser
50 55 60

Ser Met Ala His Ser Val Ile Gly Phe Ile Gln Arg Met Phe Ser Glu
65 70 75 80

Gly Ser His Lys Pro Val Val Thr Pro Ala Leu Thr Pro Ala Gln Met
85 90 95

Pro Ser Pro Thr Ser Phe Ser Asp Ser Ile Lys Gln Leu Ala Ala Glu
100 105 110

Thr Leu Pro Lys Tyr Met Gln Gln Leu Ser Ser Leu Asp Ala Glu Thr
115 120 125

Leu Gln Lys Asn His Asp Gln Phe Ala Thr Leu Glu Ser Arg Glu Asn
130 135 140

Leu Tyr Phe Gln Ser Val Ser Lys Gly Gln Ser Pro Pro Lys Lys Lys
145 150 155 160

Arg Lys Val Val Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro
165 170 175

Ile Leu Val Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val
180 185 190

Ser Gly Glu Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys
195 200 205

```
Phe Ile Cys Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val
    210                 215                 220

Thr Thr Leu Thr Tyr Gly Val Gln Cys Phe Ser Arg Tyr Pro Asp His
225                 230                 235                 240

Met Lys Gln His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val
                245                 250                 255

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

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

Lys Gly Ile Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu
    290                 295                 300

Glu Tyr Asn Tyr Asn Ser His Asn Val Tyr Ile Met Ala Asp Lys Gln
305                 310                 315                 320

Lys Asn Gly Ile Lys Val Asn Phe Lys Ile Arg His Asn Ile Glu Asp
                325                 330                 335
```

Gly Ser Val Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly
340 345 350

Asp Gly Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Thr Gln Ser
355 360 365

Ala Leu Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu
370 375 380

Glu Phe Val Thr Ala Ala Gly Ile Thr Leu Gly Met Asp Glu Leu Tyr
385 390 395 400

Lys

<210> 100
<211> 402
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> YopE1-138 - 2xsitio de TEV - EGFP - NLS

<400> 100

```
Met Lys Ile Ser Ser Phe Ile Ser Thr Ser Leu Pro Leu Pro Ala Ser
1               5                  10                  15

Val Ser Gly Ser Ser Ser Val Gly Glu Met Ser Gly Arg Ser Val Ser
            20                  25                  30

Gln Gln Lys Ser Asp Gln Tyr Ala Asn Asn Leu Ala Gly Arg Thr Glu
        35                  40                  45

Ser Pro Gln Gly Ser Ser Leu Ala Ser Arg Ile Ile Glu Arg Leu Ser
    50                  55                  60

Ser Met Ala His Ser Val Ile Gly Phe Ile Gln Arg Met Phe Ser Glu
65                  70                  75                  80

Gly Ser His Lys Pro Val Val Thr Pro Ala Leu Thr Pro Ala Gln Met
                85                  90                  95

Pro Ser Pro Thr Ser Phe Ser Asp Ser Ile Lys Gln Leu Ala Ala Glu
            100                 105                 110

Thr Leu Pro Lys Tyr Met Gln Gln Leu Ser Ser Leu Asp Ala Glu Thr
        115                 120                 125
```

Leu Gln Lys Asn His Asp Gln Phe Ala Thr Leu Glu Ser Arg Glu Asn
130 135 140

Leu Tyr Phe Gln Ser Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Ser Val Ser Lys Gly
145 150 155 160

Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu Val Glu Leu Asp Gly
165 170 175

Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly Glu Gly Glu Gly Asp
180 185 190

Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile Cys Thr Thr Gly Lys
195 200 205

Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr Leu Thr Tyr Gly Val
210 215 220

Gln Cys Phe Ser Arg Tyr Pro Asp His Met Lys Gln His Asp Phe Phe
225 230 235 240

Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu Arg Thr Ile Phe Phe
245 250 255

Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu Val Lys Phe Glu Gly
260 265 270

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

Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr Asn Tyr Asn Ser His
290 295 300

Asn Val Tyr Ile Met Ala Asp Lys Gln Lys Asn Gly Ile Lys Val Asn
305 310 315 320

Phe Lys Ile Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Ser Val Gln Leu Ala Asp
325 330 335

His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly Pro Val Leu Leu Pro
340 345 350

Asp Asn His Tyr Leu Ser Thr Gln Ser Ala Leu Ser Lys Asp Pro Asn
355 360 365

Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe Val Thr Ala Ala Gly
370 375 380

Ile Thr Leu Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys Pro Pro Lys Lys Lys Arg
385 390 395 400

Lys Val

<210> 101
<211> 36
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> núm. de cebador 869

<400> 101
gatcgtcgac ttaagttcaa tggagcgttt aatatc 36

<210> 102
<211> 41
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> núm. de cebador 870

<400> 102
ctttgactgg cgagaaacgc tcttaacatg aggctgagct c 41

<210> 103

<211> 41

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> núm. de cebador 871

<400> 103

gagctcagcc tcatgttaag agcgtttctc gccagtcaaa g 41

<210> 104

<211> 40

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> núm. de cebador 872

<400> 104

gatagccccc gagcctgtgc actttgtcat taacctcagc 40

<210> 105

<211> 40

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> núm. de cebador 873

<400> 105
gctgaggtta atgacaaagt gcacaggctc gggggctatc 40

<210> 106
<211> 31
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> núm. de cebador 874

<400> 106
catgtctaga ccctcagcat aataacgact c 31

<210> 107
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> núm. de cebador 600

<400> 107
catgacatgt tggcgtttct cgcc 24

<210> 108
<211> 34
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> núm. de cebador 601

<400> 108

catgacatgt attaacctca gccctgacta taag 34

<210> 109

<211> 138

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Sitio de clonación múltiple de pBad_Si_1 y pBad_Si_2

<400> 109

gttcgccacg ctcgagtcta gattcgaaaa gcttgggccc gaacaaaaac tcatctcaga 60

agaggatctg aatagcgccg tcgaccatca tcatcatcat cattgagttt aaacggtctc 120

cagcttggct gttttggc 138

<210> 110

<211> 371

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> YopE1-138 - dominios CARD de RIG1 murina optimizada en codones de Y. enterocolitica (Aa. 1-229)

<400> 110

```
Met Lys Ile Ser Ser Phe Ile Ser Thr Ser Leu Pro Leu Pro Ala Ser
1               5                  10                  15

Val Ser Gly Ser Ser Ser Val Gly Glu Met Ser Gly Arg Ser Val Ser
            20                  25                  30

Gln Gln Lys Ser Asp Gln Tyr Ala Asn Asn Leu Ala Gly Arg Thr Glu
        35                  40                  45

Ser Pro Gln Gly Ser Ser Leu Ala Ser Arg Ile Ile Glu Arg Leu Ser
    50                  55                  60

Ser Met Ala His Ser Val Ile Gly Phe Ile Gln Arg Met Phe Ser Glu
65                  70                  75                  80

Gly Ser His Lys Pro Val Val Thr Pro Ala Leu Thr Pro Ala Gln Met
                85                  90                  95

Pro Ser Pro Thr Ser Phe Ser Asp Ser Ile Lys Gln Leu Ala Ala Glu
            100                 105                 110

Thr Leu Pro Lys Tyr Met Gln Gln Leu Ser Ser Leu Asp Ala Glu Thr
```

115 120 125

Leu Gln Lys Asn His Asp Gln Phe Ala Thr Leu Glu Ser Arg Met Thr
130 135 140

Ala Glu Gln Arg Gln Asn Leu Gln Ala Phe Arg Asp Tyr Ile Lys Lys
145 150 155 160

Ile Leu Asp Pro Thr Tyr Ile Leu Ser Tyr Met Ser Ser Trp Leu Glu
165 170 175

Asp Glu Glu Val Gln Tyr Ile Gln Ala Glu Lys Asn Asn Lys Gly Pro
180 185 190

Met Glu Ala Ala Ser Leu Phe Leu Gln Tyr Leu Leu Lys Leu Gln Ser
195 200 205

Glu Gly Trp Phe Gln Ala Phe Leu Asp Ala Leu Tyr His Ala Gly Tyr
210 215 220

Cys Gly Leu Cys Glu Ala Ile Glu Ser Trp Asp Phe Gln Lys Ile Glu
225 230 235 240

Lys Leu Glu Glu His Arg Leu Leu Leu Arg Arg Leu Glu Pro Glu Phe

245 250 255

Lys Ala Thr Val Asp Pro Asn Asp Ile Leu Ser Glu Leu Ser Glu Cys
260 265 270

Leu Ile Asn Gln Glu Cys Glu Glu Ile Arg Gln Ile Arg Asp Thr Lys
275 280 285

Gly Arg Met Ala Gly Ala Glu Lys Met Ala Glu Cys Leu Ile Arg Ser
290 295 300

Asp Lys Glu Asn Trp Pro Lys Val Leu Gln Leu Ala Leu Glu Lys Asp
305 310 315 320

Asn Ser Lys Phe Ser Glu Leu Trp Ile Val Asp Lys Gly Phe Lys Arg
325 330 335

Ala Glu Ser Lys Ala Asp Glu Asp Asp Gly Ala Glu Ala Ser Ser Ile
340 345 350

Gln Ile Phe Ile Gln Glu Glu Pro Glu Cys Gln Asn Leu Ser Gln Asn
355 360 365

Pro Gly Pro

370

<210> 111
<211> 360
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> YopE1-138 - dominios CARD de RIG1 murina optimizada en codones de Y. enterocolitica (Aa. 1-218)

<400> 111

Met Lys Ile Ser Ser Phe Ile Ser Thr Ser Leu Pro Leu Pro Ala Ser
1 5 10 15

Val Ser Gly Ser Ser Ser Val Gly Glu Met Ser Gly Arg Ser Val Ser
20 25 30

Gln Gln Lys Ser Asp Gln Tyr Ala Asn Asn Leu Ala Gly Arg Thr Glu
35 40 45

Ser Pro Gln Gly Ser Ser Leu Ala Ser Arg Ile Ile Glu Arg Leu Ser
50 55 60

Ser Met Ala His Ser Val Ile Gly Phe Ile Gln Arg Met Phe Ser Glu
65 70 75 80

```
Gly Ser His Lys Pro Val Val Thr Pro Ala Leu Thr Pro Ala Gln Met
                85                  90                  95

Pro Ser Pro Thr Ser Phe Ser Asp Ser Ile Lys Gln Leu Ala Ala Glu
            100                 105                 110

Thr Leu Pro Lys Tyr Met Gln Gln Leu Ser Ser Leu Asp Ala Glu Thr
        115                 120                 125

Leu Gln Lys Asn His Asp Gln Phe Ala Thr Leu Glu Ser Arg Met Thr
    130                 135                 140

Ala Glu Gln Arg Gln Asn Leu Gln Ala Phe Arg Asp Tyr Ile Lys Lys
145                 150                 155                 160

Ile Leu Asp Pro Thr Tyr Ile Leu Ser Tyr Met Ser Ser Trp Leu Glu
                165                 170                 175

Asp Glu Glu Val Gln Tyr Ile Gln Ala Glu Lys Asn Asn Lys Gly Pro
            180                 185                 190

Met Glu Ala Ala Ser Leu Phe Leu Gln Tyr Leu Leu Lys Leu Gln Ser
        195                 200                 205
```

Glu Gly Trp Phe Gln Ala Phe Leu Asp Ala Leu Tyr His Ala Gly Tyr
210 215 220

Cys Gly Leu Cys Glu Ala Ile Glu Ser Trp Asp Phe Gln Lys Ile Glu
225 230 235 240

Lys Leu Glu Glu His Arg Leu Leu Leu Arg Arg Leu Glu Pro Glu Phe
245 250 255

Lys Ala Thr Val Asp Pro Asn Asp Ile Leu Ser Glu Leu Ser Glu Cys
260 265 270

Leu Ile Asn Gln Glu Cys Glu Glu Ile Arg Gln Ile Arg Asp Thr Lys
275 280 285

Gly Arg Met Ala Gly Ala Glu Lys Met Ala Glu Cys Leu Ile Arg Ser
290 295 300

Asp Lys Glu Asn Trp Pro Lys Val Leu Gln Leu Ala Leu Glu Lys Asp
305 310 315 320

Asn Ser Lys Phe Ser Glu Leu Trp Ile Val Asp Lys Gly Phe Lys Arg
325 330 335

Ala Glu Ser Lys Ala Asp Glu Asp Asp Gly Ala Glu Ala Ser Ser Ile
340 345 350

Gln Ile Phe Ile Gln Glu Glu Pro
355 360

<210> 112
<211> 436
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> YopE1-138 - MAD5 murina optimizada en codones de Y. enterocolitica (Aa. 1-294)

<400> 112

Met Lys Ile Ser Ser Phe Ile Ser Thr Ser Leu Pro Leu Pro Ala Ser
1 5 10 15

Val Ser Gly Ser Ser Ser Val Gly Glu Met Ser Gly Arg Ser Val Ser
20 25 30

Gln Gln Lys Ser Asp Gln Tyr Ala Asn Asn Leu Ala Gly Arg Thr Glu
35 40 45

Ser Pro Gln Gly Ser Ser Leu Ala Ser Arg Ile Ile Glu Arg Leu Ser
50 55 60

Ser Met Ala His Ser Val Ile Gly Phe Ile Gln Arg Met Phe Ser Glu
65 70 75 80

Gly Ser His Lys Pro Val Val Thr Pro Ala Leu Thr Pro Ala Gln Met
85 90 95

Pro Ser Pro Thr Ser Phe Ser Asp Ser Ile Lys Gln Leu Ala Ala Glu
100 105 110

Thr Leu Pro Lys Tyr Met Gln Gln Leu Ser Ser Leu Asp Ala Glu Thr
115 120 125

Leu Gln Lys Asn His Asp Gln Phe Ala Thr Leu Glu Ser Arg Met Ser
130 135 140

Ile Val Cys Ser Ala Glu Asp Ser Phe Arg Asn Leu Ile Leu Phe Phe
145 150 155 160

Arg Pro Arg Leu Lys Met Tyr Ile Gln Val Glu Pro Val Leu Asp His
165 170 175

Leu Ile Phe Leu Ser Ala Glu Thr Lys Glu Gln Ile Leu Lys Lys Ile
180 185 190

Asn Thr Cys Gly Asn Thr Ser Ala Ala Glu Leu Leu Leu Ser Thr Leu
195 200 205

Glu Gln Gly Gln Trp Pro Leu Gly Trp Thr Gln Met Phe Val Glu Ala
210 215 220

Leu Glu His Ser Gly Asn Pro Leu Ala Ala Arg Tyr Val Lys Pro Thr
225 230 235 240

Leu Thr Asp Leu Pro Ser Pro Ser Ser Glu Thr Ala His Asp Glu Cys
245 250 255

Leu His Leu Leu Thr Leu Leu Gln Pro Thr Leu Val Asp Lys Leu Leu
260 265 270

Ile Asn Asp Val Leu Asp Thr Cys Phe Glu Lys Gly Leu Leu Thr Val
275 280 285

Glu Asp Arg Asn Arg Ile Ser Ala Ala Gly Asn Ser Gly Asn Glu Ser
290 295 300

Gly Val Arg Glu Leu Leu Arg Arg Ile Val Gln Lys Glu Asn Trp Phe
305 310 315 320

Ser Thr Phe Leu Asp Val Leu Arg Gln Thr Gly Asn Asp Ala Leu Phe
325 330 335

Gln Glu Leu Thr Gly Gly Gly Cys Pro Glu Asp Asn Thr Asp Leu Ala
340 345 350

Asn Ser Ser His Arg Asp Gly Pro Ala Ala Asn Glu Cys Leu Leu Pro
355 360 365

Ala Val Asp Glu Ser Ser Leu Glu Thr Glu Ala Trp Asn Val Asp Asp
370 375 380

Ile Leu Pro Glu Ala Ser Cys Thr Asp Ser Ser Val Thr Thr Glu Ser
385 390 395 400

Asp Thr Ser Leu Ala Glu Gly Ser Val Ser Cys Phe Asp Glu Ser Leu
405 410 415

Gly His Asn Ser Asn Met Gly Arg Asp Ser Gly Thr Met Gly Ser Asp
420 425 430

Ser Asp Glu Ser
435

<210> 113
<211> 373
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> YopE1-138 - MAD5 murina optimizada en codones de Y. enterocolitica (Aa. 1-231)

<400> 113

Met Lys Ile Ser Ser Phe Ile Ser Thr Ser Leu Pro Leu Pro Ala Ser
1 5 10 15

Val Ser Gly Ser Ser Ser Val Gly Glu Met Ser Gly Arg Ser Val Ser
20 25 30

Gln Gln Lys Ser Asp Gln Tyr Ala Asn Asn Leu Ala Gly Arg Thr Glu
35 40 45

Ser Pro Gln Gly Ser Ser Leu Ala Ser Arg Ile Ile Glu Arg Leu Ser
50 55 60

Ser Met Ala His Ser Val Ile Gly Phe Ile Gln Arg Met Phe Ser Glu
65 70 75 80

Gly Ser His Lys Pro Val Val Thr Pro Ala Leu Thr Pro Ala Gln Met
85 90 95

Pro Ser Pro Thr Ser Phe Ser Asp Ser Ile Lys Gln Leu Ala Ala Glu
100 105 110

Thr Leu Pro Lys Tyr Met Gln Gln Leu Ser Ser Leu Asp Ala Glu Thr
115 120 125

Leu Gln Lys Asn His Asp Gln Phe Ala Thr Leu Glu Ser Arg Met Ser
130 135 140

Ile Val Cys Ser Ala Glu Asp Ser Phe Arg Asn Leu Ile Leu Phe Phe
145 150 155 160

Arg Pro Arg Leu Lys Met Tyr Ile Gln Val Glu Pro Val Leu Asp His
165 170 175

Leu Ile Phe Leu Ser Ala Glu Thr Lys Glu Gln Ile Leu Lys Lys Ile
180 185 190

Asn Thr Cys Gly Asn Thr Ser Ala Ala Glu Leu Leu Leu Ser Thr Leu
195 200 205

Glu Gln Gly Gln Trp Pro Leu Gly Trp Thr Gln Met Phe Val Glu Ala
210 215 220

Leu Glu His Ser Gly Asn Pro Leu Ala Ala Arg Tyr Val Lys Pro Thr
225 230 235 240

Leu Thr Asp Leu Pro Ser Pro Ser Ser Glu Thr Ala His Asp Glu Cys
245 250 255

Leu His Leu Leu Thr Leu Leu Gln Pro Thr Leu Val Asp Lys Leu Leu
260 265 270

Ile Asn Asp Val Leu Asp Thr Cys Phe Glu Lys Gly Leu Leu Thr Val
275 280 285

Glu Asp Arg Asn Arg Ile Ser Ala Ala Gly Asn Ser Gly Asn Glu Ser
290 295 300

Gly Val Arg Glu Leu Leu Arg Arg Ile Val Gln Lys Glu Asn Trp Phe
305 310 315 320

Ser Thr Phe Leu Asp Val Leu Arg Gln Thr Gly Asn Asp Ala Leu Phe
325 330 335

Gln Glu Leu Thr Gly Gly Gly Cys Pro Glu Asp Asn Thr Asp Leu Ala
340 345 350

Asn Ser Ser His Arg Asp Gly Pro Ala Ala Asn Glu Cys Leu Leu Pro
355 360 365

Ala Val Asp Glu Ser
370

<210> 114
<211> 349
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> YopE1-138- versión activa constitutiva de CdaS L44F de B. subtilis optimizada en codones de Y. enterocolitica

<400> 114

Met Lys Ile Ser Ser Phe Ile Ser Thr Ser Leu Pro Leu Pro Ala Ser
1 5 10 15

Val Ser Gly Ser Ser Ser Val Gly Glu Met Ser Gly Arg Ser Val Ser

20 25 30

Gln Gln Lys Ser Asp Gln Tyr Ala Asn Asn Leu Ala Gly Arg Thr Glu
35 40 45

Ser Pro Gln Gly Ser Ser Leu Ala Ser Arg Ile Ile Glu Arg Leu Ser
50 55 60

Ser Met Ala His Ser Val Ile Gly Phe Ile Gln Arg Met Phe Ser Glu
65 70 75 80

Gly Ser His Lys Pro Val Val Thr Pro Ala Leu Thr Pro Ala Gln Met
85 90 95

Pro Ser Pro Thr Ser Phe Ser Asp Ser Ile Lys Gln Leu Ala Ala Glu
100 105 110

Thr Leu Pro Lys Tyr Met Gln Gln Leu Ser Ser Leu Asp Ala Glu Thr
115 120 125

Leu Gln Lys Asn His Asp Gln Phe Ala Thr Leu Glu Ser Arg Met Lys
130 135 140

Ala Met Arg Tyr Glu Gln Ile Ser Glu Asn Ala Phe Lys Gly Lys Ile

145 150 155 160

Gln Val Tyr Leu Glu Gln Ile Leu Gly Asp Ala Ser Leu Ile Leu Lys
165 170 175

Thr Leu His Glu Lys Asp Gln Cys Leu Phe Cys Glu Leu Asp Asp Leu
180 185 190

Gly His Val Phe Gln Asp Met Gln Gly Ile Ala Ser Ser Phe Tyr Leu
195 200 205

Gln Ser Tyr Ile Glu Glu Phe Thr Pro Ala Phe Ile Glu Leu Ala Lys
210 215 220

Ala Ile Lys Ala Leu Ser Glu His Lys His Gly Ala Leu Ile Val Ile
225 230 235 240

Glu Arg Ala Asp Pro Val Glu Arg Phe Ile Gln Lys Gly Thr Ser Leu
245 250 255

His Ala Glu Ile Ser Ser Ser Leu Ile Glu Ser Ile Phe Phe Pro Gly
260 265 270

Asn Pro Leu His Asp Gly Ala Leu Leu Val Arg Glu Asn Lys Leu Val

275 280 285

Ser Ala Ala Asn Val Leu Pro Leu Thr Thr Lys Glu Val Asp Ile His
290 295 300

Leu Gly Thr Arg His Arg Ala Ala Leu Gly Met Ser Gly Tyr Thr Asp
305 310 315 320

Ala Leu Val Leu Val Val Ser Glu Glu Thr Gly Lys Met Ser Phe Ala
325 330 335

Lys Asp Gly Val Leu Tyr Pro Leu Ile Ser Pro Arg Thr
340 345

<210> 115
<211> 504
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> YopE1-138- cGAS humana optimizada en codones de Y. enterocolitica (Aa. 161-522)

<400> 115

Met Lys Ile Ser Ser Phe Ile Ser Thr Ser Leu Pro Leu Pro Ala Ser
1 5 10 15

Val Ser Gly Ser Ser Ser Val Gly Glu Met Ser Gly Arg Ser Val Ser
20 25 30

Gln Gln Lys Ser Asp Gln Tyr Ala Asn Asn Leu Ala Gly Arg Thr Glu
35 40 45

Ser Pro Gln Gly Ser Ser Leu Ala Ser Arg Ile Ile Glu Arg Leu Ser
50 55 60

Ser Met Ala His Ser Val Ile Gly Phe Ile Gln Arg Met Phe Ser Glu
65 70 75 80

Gly Ser His Lys Pro Val Val Thr Pro Ala Leu Thr Pro Ala Gln Met
85 90 95

Pro Ser Pro Thr Ser Phe Ser Asp Ser Ile Lys Gln Leu Ala Ala Glu
100 105 110

Thr Leu Pro Lys Tyr Met Gln Gln Leu Ser Ser Leu Asp Ala Glu Thr
115 120 125

Leu Gln Lys Asn His Asp Gln Phe Ala Thr Leu Glu Ser Arg Gly Ala
130 135 140

```
Ser Lys Leu Arg Ala Val Leu Glu Lys Leu Lys Leu Ser Arg Asp Asp
145                 150                 155                 160

Ile Ser Thr Ala Ala Gly Met Val Lys Gly Val Val Asp His Leu Leu
                165                 170                 175

Leu Arg Leu Lys Cys Asp Ser Ala Phe Arg Gly Val Gly Leu Leu Asn
            180                 185                 190

Thr Gly Ser Tyr Tyr Glu His Val Lys Ile Ser Ala Pro Asn Glu Phe
        195                 200                 205

Asp Val Met Phe Lys Leu Glu Val Pro Arg Ile Gln Leu Glu Glu Tyr
    210                 215                 220

Ser Asn Thr Arg Ala Tyr Tyr Phe Val Lys Phe Lys Arg Asn Pro Lys
225                 230                 235                 240

Glu Asn Pro Leu Ser Gln Phe Leu Glu Gly Glu Ile Leu Ser Ala Ser
                245                 250                 255

Lys Met Leu Ser Lys Phe Arg Lys Ile Ile Lys Glu Glu Ile Asn Asp
            260                 265                 270
```

Ile Lys Asp Thr Asp Val Ile Met Lys Arg Lys Arg Gly Gly Ser Pro
275 280 285

Ala Val Thr Leu Leu Ile Ser Glu Lys Ile Ser Val Asp Ile Thr Leu
290 295 300

Ala Leu Glu Ser Lys Ser Ser Trp Pro Ala Ser Thr Gln Glu Gly Leu
305 310 315 320

Arg Ile Gln Asn Trp Leu Ser Ala Lys Val Arg Lys Gln Leu Arg Leu
325 330 335

Lys Pro Phe Tyr Leu Val Pro Lys His Ala Lys Glu Gly Asn Gly Phe
340 345 350

Gln Glu Glu Thr Trp Arg Leu Ser Phe Ser His Ile Glu Lys Glu Ile
355 360 365

Leu Asn Asn His Gly Lys Ser Lys Thr Cys Cys Glu Asn Lys Glu Glu
370 375 380

Lys Cys Cys Arg Lys Asp Cys Leu Lys Leu Met Lys Tyr Leu Leu Glu
385 390 395 400

Gln Leu Lys Glu Arg Phe Lys Asp Lys Lys His Leu Asp Lys Phe Ser
405 410 415

Ser Tyr His Val Lys Thr Ala Phe Phe His Val Cys Thr Gln Asn Pro
420 425 430

Gln Asp Ser Gln Trp Asp Arg Lys Asp Leu Gly Leu Cys Phe Asp Asn
435 440 445

Cys Val Thr Tyr Phe Leu Gln Cys Leu Arg Thr Glu Lys Leu Glu Asn
450 455 460

Tyr Phe Ile Pro Glu Phe Asn Leu Phe Ser Ser Asn Leu Ile Asp Lys
465 470 475 480

Arg Ser Lys Glu Phe Leu Thr Lys Gln Ile Glu Tyr Glu Arg Asn Asn
485 490 495

Glu Phe Pro Val Phe Asp Glu Phe
500

<210> 116
<211> 242

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> YopE1-138- CARD de MAVS humana optimizada en codones de Y. enterocolitica (Aa. 1-100)

<400> 116

```
Met Lys Ile Ser Ser Phe Ile Ser Thr Ser Leu Pro Leu Pro Ala Ser
1               5                  10                  15

Val Ser Gly Ser Ser Ser Val Gly Glu Met Ser Gly Arg Ser Val Ser
            20                  25                  30

Gln Gln Lys Ser Asp Gln Tyr Ala Asn Asn Leu Ala Gly Arg Thr Glu
        35                  40                  45

Ser Pro Gln Gly Ser Ser Leu Ala Ser Arg Ile Ile Glu Arg Leu Ser
    50                  55                  60

Ser Met Ala His Ser Val Ile Gly Phe Ile Gln Arg Met Phe Ser Glu
65                  70                  75                  80

Gly Ser His Lys Pro Val Val Thr Pro Ala Leu Thr Pro Ala Gln Met
                85                  90                  95
```

Pro Ser Pro Thr Ser Phe Ser Asp Ser Ile Lys Gln Leu Ala Ala Glu
100 105 110

Thr Leu Pro Lys Tyr Met Gln Gln Leu Ser Ser Leu Asp Ala Glu Thr
115 120 125

Leu Gln Lys Asn His Asp Gln Phe Ala Thr Leu Glu Ser Arg Met Pro
130 135 140

Phe Ala Glu Asp Lys Thr Tyr Lys Tyr Ile Cys Arg Asn Phe Ser Asn
145 150 155 160

Phe Cys Asn Val Asp Val Val Glu Ile Leu Pro Tyr Leu Pro Cys Leu
165 170 175

Thr Ala Arg Asp Gln Asp Arg Leu Arg Ala Thr Cys Thr Leu Ser Gly
180 185 190

Asn Arg Asp Thr Leu Trp His Leu Phe Asn Thr Leu Gln Arg Arg Pro
195 200 205

Gly Trp Val Glu Tyr Phe Ile Ala Ala Leu Arg Gly Cys Glu Leu Val
210 215 220

Asp Leu Ala Asp Glu Val Ala Ser Val Tyr Glu Ser Tyr Gln Pro Arg
225 230 235 240

Thr Ser

<210> 117
<211> 505
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> YopE1-138- cGAS de anémona (N. vectensis) optimizada en codones de Y. enterolitica (Aa. 60-422) (Ensembl: A7SFB5.1)

<400> 117

Met Lys Ile Ser Ser Phe Ile Ser Thr Ser Leu Pro Leu Pro Ala Ser
1 5 10 15

Val Ser Gly Ser Ser Ser Val Gly Glu Met Ser Gly Arg Ser Val Ser
20 25 30

Gln Gln Lys Ser Asp Gln Tyr Ala Asn Asn Leu Ala Gly Arg Thr Glu
35 40 45

Ser Pro Gln Gly Ser Ser Leu Ala Ser Arg Ile Ile Glu Arg Leu Ser
50 55 60

Ser Met Ala His Ser Val Ile Gly Phe Ile Gln Arg Met Phe Ser Glu
65 70 75 80

Gly Ser His Lys Pro Val Val Thr Pro Ala Leu Thr Pro Ala Gln Met
85 90 95

Pro Ser Pro Thr Ser Phe Ser Asp Ser Ile Lys Gln Leu Ala Ala Glu
100 105 110

Thr Leu Pro Lys Tyr Met Gln Gln Leu Ser Ser Leu Asp Ala Glu Thr
115 120 125

Leu Gln Lys Asn His Asp Gln Phe Ala Thr Leu Glu Ser Arg Gln Pro
130 135 140

Phe Pro Lys Gly Asp Leu Glu Thr Leu Arg Arg Phe Ser Val Thr Asp
145 150 155 160

Val Lys Ile Ser Lys Gln Ser Thr Lys Trp Ala Lys Lys Met Ala Asp
165 170 175

Lys His Leu Glu Ile Ile Arg Lys His Cys Lys Thr Asn Ser Ile Lys
180 185 190

Leu Phe Asn His Phe Glu Tyr Thr Gly Ser Phe Tyr Glu His Leu Lys
195 200 205

Thr Ile Asp Ala Asp Glu Leu Asp Ile Met Val Ala Leu Ser Ile Lys
210 215 220

Met Asp Glu Leu Glu Val Glu Gln Val Thr Pro Gly Tyr Ala Gly Leu
225 230 235 240

Lys Leu Arg Asp Thr Pro Ser Asn Arg Asn Lys Tyr Asn Asp Leu Thr
245 250 255

Ile Ala Asp Asn Tyr Gly Arg Tyr Leu Ser Pro Glu Lys Val Ser Arg
260 265 270

Trp Phe Phe Ser Leu Val Gln Lys Ala Val Asn Thr Tyr Lys Asp Glu
275 280 285

Ile Pro Gln Thr Glu Val Lys Leu Thr Asp Asn Gly Pro Ala Thr Thr
290 295 300

```
Leu Val Ile Thr Tyr Arg Glu Gly Asp Lys Pro Gln Glu Lys Asn Arg
305                 310                 315                 320

Arg Leu Ser Ile Asp Leu Val Pro Ala Leu Leu Phe Lys Asp Lys Thr
                325                 330                 335

Lys Pro Ala Gly Asp Asp Leu Arg Ala Trp His Tyr Val Ala Lys Thr
            340                 345                 350

Ile Pro Lys Gly Ala Arg Leu Lys Glu Pro Leu Pro Phe Arg Ser Glu
        355                 360                 365

Leu Leu Trp Arg Gln Ser Phe Ser Leu Lys Glu Lys His Leu Met Asp
    370                 375                 380

Lys Leu Asp Lys Asp Asp Asn Gly Cys Arg Arg Glu Met Val Arg Ile
385                 390                 395                 400

Val Lys Thr Ile Val Lys Lys Asp Pro Thr Leu Ala Gln Leu Ser Ser
                405                 410                 415

Tyr His Ile Lys Thr Ala Phe Leu Gln Tyr Asn Phe Ser Asp Val Lys
            420                 425                 430
```

Leu Asp Trp Glu Gly Lys Lys Leu Ala Glu Arg Phe Leu His Phe Leu
435 440 445

Glu Phe Leu Arg Asp Arg Val Lys Asp Lys Thr Leu Asn Asn Tyr Phe
450 455 460

Ile Thr Asp Leu Asn Leu Leu Asp Asp Leu Asn Asp Ser Asn Ile Asp
465 470 475 480

Asn Ile Ala Asn Arg Leu Asp Lys Ile Ile Gln Asn Glu Thr Glu Arg
485 490 495

Ala Lys Ile Phe Thr Thr Gln Arg Gln
500 505

<210> 118
<211> 315
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> YopE1-138- CdaA de Listeria optimizada en codones de Y. enterocolitica(Aa. 101-273)

<400> 118

Met Lys Ile Ser Ser Phe Ile Ser Thr Ser Leu Pro Leu Pro Ala Ser

1 5 10 15

Val Ser Gly Ser Ser Ser Val Gly Glu Met Ser Gly Arg Ser Val Ser
20 25 30

Gln Gln Lys Ser Asp Gln Tyr Ala Asn Asn Leu Ala Gly Arg Thr Glu
35 40 45

Ser Pro Gln Gly Ser Ser Leu Ala Ser Arg Ile Ile Glu Arg Leu Ser
50 55 60

Ser Met Ala His Ser Val Ile Gly Phe Ile Gln Arg Met Phe Ser Glu
65 70 75 80

Gly Ser His Lys Pro Val Val Thr Pro Ala Leu Thr Pro Ala Gln Met
85 90 95

Pro Ser Pro Thr Ser Phe Ser Asp Ser Ile Lys Gln Leu Ala Ala Glu
100 105 110

Thr Leu Pro Lys Tyr Met Gln Gln Leu Ser Ser Leu Asp Ala Glu Thr
115 120 125

Leu Gln Lys Asn His Asp Gln Phe Ala Thr Leu Glu Ser Arg Tyr Gly

130 135 140

Ser Arg Ile Glu Arg Glu Gln His His Leu Ile Glu Ser Ile Glu Lys
145 150 155 160

Ser Thr Gln Tyr Met Ala Lys Arg Arg Ile Gly Ala Leu Ile Ser Val
165 170 175

Ala Arg Asp Thr Gly Met Asp Asp Tyr Ile Glu Thr Gly Ile Pro Leu
180 185 190

Asn Ala Lys Ile Ser Ser Gln Leu Leu Ile Asn Ile Phe Ile Pro Asn
195 200 205

Thr Pro Leu His Asp Gly Ala Val Ile Ile Lys Gly Asn Glu Ile Ala
210 215 220

Ser Ala Ala Ser Tyr Leu Pro Leu Ser Asp Ser Pro Phe Leu Ser Lys
225 230 235 240

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

Asp Ser Ile Thr Ile Val Val Ser Glu Glu Thr Gly Gly Ile Ser Leu

260 265 270

Thr Lys Gly Gly Glu Leu Phe Arg Asp Val Ser Glu Glu Glu Leu His
275 280 285

Lys Ile Leu Leu Lys Glu Leu Val Thr Val Thr Ala Lys Lys Pro Ser
290 295 300

Ile Phe Ser Lys Trp Lys Gly Gly Lys Ser Glu
305 310 315

<210> 119
<211> 36
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> núm. de cebador 1010

<400> 119
cacatgtcta gacaaccgtt tccgaaaggt gatctg 36

<210> 120
<211> 37
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> núm. de cebador 1012

<400> 120

atcccaagct tattggcgtt gggtggtaaa aattttg 37

<210> 121

<211> 30

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> núm. de cebador 1021

<400> 121

cacatgtcta gaatgaccgc cgaacaacgc 30

<210> 122

<211> 30

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> núm. de cebador 1022

<400> 122

catgaagctt acggacccgg attttggctc 30

<210> 123

<211> 39
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> núm. de cebador 1023

<400> 123
catgaagctt acggttcttc ttgaataaaa atttgaatg 39

<210> 124
<211> 33
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> núm. de cebador 1024

<400> 124
catgaagctt attgcagcac tttcggccaa ttt 33

<210> 125
<211> 32
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> núm. de cebador 1025

<400> 125

cacatgtcta gaatgagcat tgtgtgtagc gc 32

<210> 126
<211> 29
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> núm. de cebador 1026

<400> 126
catgaagctt agctttcatc cacggccgg 29

<210> 127
<211> 30
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> núm. de cebador 1027

<400> 127
catgaagctt aattaccggt ttggcgcagc 30

<210> 128
<211> 370
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> YopE1-138 - dominios CARD de RIG1 humana optimizada en codones de Y. enterocolitica (Aa. 1-228)

<400> 128

```
Met Lys Ile Ser Ser Phe Ile Ser Thr Ser Leu Pro Leu Pro Ala Ser
1               5                  10                  15

Val Ser Gly Ser Ser Ser Val Gly Glu Met Ser Gly Arg Ser Val Ser
            20                  25                  30

Gln Gln Lys Ser Asp Gln Tyr Ala Asn Asn Leu Ala Gly Arg Thr Glu
        35                  40                  45

Ser Pro Gln Gly Ser Ser Leu Ala Ser Arg Ile Ile Glu Arg Leu Ser
    50                  55                  60

Ser Met Ala His Ser Val Ile Gly Phe Ile Gln Arg Met Phe Ser Glu
65                  70                  75                  80

Gly Ser His Lys Pro Val Val Thr Pro Ala Leu Thr Pro Ala Gln Met
                85                  90                  95

Pro Ser Pro Thr Ser Phe Ser Asp Ser Ile Lys Gln Leu Ala Ala Glu
            100                 105                 110
```

Thr Leu Pro Lys Tyr Met Gln Gln Leu Ser Ser Leu Asp Ala Glu Thr
115 120 125

Leu Gln Lys Asn His Asp Gln Phe Ala Thr Leu Glu Ser Arg Met Thr
130 135 140

Thr Glu Gln Arg Arg Ser Leu Gln Ala Phe Gln Asp Tyr Ile Arg Lys
145 150 155 160

Thr Leu Asp Pro Thr Tyr Ile Leu Ser Tyr Met Ala Pro Trp Phe Arg
165 170 175

Glu Glu Glu Val Gln Tyr Ile Gln Ala Glu Lys Asn Asn Lys Gly Pro
180 185 190

Met Glu Ala Ala Thr Leu Phe Leu Lys Phe Leu Leu Glu Leu Gln Glu
195 200 205

Glu Gly Trp Phe Arg Gly Phe Leu Asp Ala Leu Asp His Ala Gly Tyr
210 215 220

Ser Gly Leu Tyr Glu Ala Ile Glu Ser Trp Asp Phe Lys Lys Ile Glu
225 230 235 240

Lys Leu Glu Glu Tyr Arg Leu Leu Leu Lys Arg Leu Gln Pro Glu Phe
245 250 255

Lys Thr Arg Ile Ile Pro Thr Asp Ile Ile Ser Asp Leu Ser Glu Cys
260 265 270

Leu Ile Asn Gln Glu Cys Glu Glu Ile Leu Gln Ile Cys Ser Thr Lys
275 280 285

Gly Met Met Ala Gly Ala Glu Lys Leu Val Glu Cys Leu Leu Arg Ser
290 295 300

Asp Lys Glu Asn Trp Pro Lys Thr Leu Lys Leu Ala Leu Glu Lys Glu
305 310 315 320

Arg Asn Lys Phe Ser Glu Leu Trp Ile Val Glu Lys Gly Ile Lys Asp
325 330 335

Val Glu Thr Glu Asp Leu Glu Asp Lys Met Glu Thr Ser Asp Ile Gln
340 345 350

Ile Phe Tyr Gln Glu Asp Pro Glu Cys Gln Asn Leu Ser Glu Asn Ser
355 360 365

Cys Pro
370

<210> 129
<211> 358
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> YopE1-138 - dominios CARD de RIG1 humana optimizada en codones de Y. enterocolitica (Aa. 1-217)

<400> 129

Lys Ile Ser Ser Phe Ile Ser Thr Ser Leu Pro Leu Pro Ala Ser Val
1 5 10 15

Ser Gly Ser Ser Ser Val Gly Glu Met Ser Gly Arg Ser Val Ser Gln
20 25 30

Gln Lys Ser Asp Gln Tyr Ala Asn Asn Leu Ala Gly Arg Thr Glu Ser
35 40 45

Pro Gln Gly Ser Ser Leu Ala Ser Arg Ile Ile Glu Arg Leu Ser Ser
50 55 60

Met Ala His Ser Val Ile Gly Phe Ile Gln Arg Met Phe Ser Glu Gly
65 70 75 80

Ser His Lys Pro Val Val Thr Pro Ala Leu Thr Pro Ala Gln Met Pro
85 90 95

Ser Pro Thr Ser Phe Ser Asp Ser Ile Lys Gln Leu Ala Ala Glu Thr
100 105 110

Leu Pro Lys Tyr Met Gln Gln Leu Ser Ser Leu Asp Ala Glu Thr Leu
115 120 125

Gln Lys Asn His Asp Gln Phe Ala Thr Leu Glu Ser Arg Met Thr Thr
130 135 140

Glu Gln Arg Arg Ser Leu Gln Ala Phe Gln Asp Tyr Ile Arg Lys Thr
145 150 155 160

Leu Asp Pro Thr Tyr Ile Leu Ser Tyr Met Ala Pro Trp Phe Arg Glu
165 170 175

Glu Glu Val Gln Tyr Ile Gln Ala Glu Lys Asn Asn Lys Gly Pro Met
180 185 190

Glu Ala Ala Thr Leu Phe Leu Lys Phe Leu Leu Glu Leu Gln Glu Glu
195 200 205

Gly Trp Phe Arg Gly Phe Leu Asp Ala Leu Asp His Ala Gly Tyr Ser
210 215 220

Gly Leu Tyr Glu Ala Ile Glu Ser Trp Asp Phe Lys Lys Ile Glu Lys
225 230 235 240

Leu Glu Glu Tyr Arg Leu Leu Leu Lys Arg Leu Gln Pro Glu Phe Lys
245 250 255

Thr Arg Ile Ile Pro Thr Asp Ile Ile Ser Asp Leu Ser Glu Cys Leu
260 265 270

Ile Asn Gln Glu Cys Glu Glu Ile Leu Gln Ile Cys Ser Thr Lys Gly
275 280 285

Met Met Ala Gly Ala Glu Lys Leu Val Glu Cys Leu Leu Arg Ser Asp
290 295 300

Lys Glu Asn Trp Pro Lys Thr Leu Lys Leu Ala Leu Glu Lys Glu Arg
305 310 315 320

Asn Lys Phe Ser Glu Leu Trp Ile Val Glu Lys Gly Ile Lys Asp Val
325 330 335

Glu Thr Glu Asp Leu Glu Asp Lys Met Glu Thr Ser Asp Ile Gln Ile
340 345 350

Phe Tyr Gln Glu Asp Pro
355

<210> 130
<211> 243
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> YopE1-138 - dominio CARD de MAVS murina optimizada en codones de Y. enterocolitica (Aa. 1-101)

<400> 130

Met Lys Ile Ser Ser Phe Ile Ser Thr Ser Leu Pro Leu Pro Ala Ser
1 5 10 15

Val Ser Gly Ser Ser Ser Val Gly Glu Met Ser Gly Arg Ser Val Ser
20 25 30

```
Gln Gln Lys Ser Asp Gln Tyr Ala Asn Asn Leu Ala Gly Arg Thr Glu
        35                  40                  45

Ser Pro Gln Gly Ser Ser Leu Ala Ser Arg Ile Ile Glu Arg Leu Ser
    50                  55                  60

Ser Met Ala His Ser Val Ile Gly Phe Ile Gln Arg Met Phe Ser Glu
65                  70                  75                  80

Gly Ser His Lys Pro Val Val Thr Pro Ala Leu Thr Pro Ala Gln Met
                85                  90                  95

Pro Ser Pro Thr Ser Phe Ser Asp Ser Ile Lys Gln Leu Ala Ala Glu
            100                 105                 110

Thr Leu Pro Lys Tyr Met Gln Gln Leu Ser Ser Leu Asp Ala Glu Thr
        115                 120                 125

Leu Gln Lys Asn His Asp Gln Phe Ala Thr Leu Glu Ser Arg Met Thr
    130                 135                 140

Phe Ala Glu Asp Lys Thr Tyr Lys Tyr Ile Arg Asp Asn His Ser Lys
145                 150                 155                 160
```

Phe Cys Cys Val Asp Val Leu Glu Ile Leu Pro Tyr Leu Ser Cys Leu
165 170 175

Thr Ala Ser Asp Gln Asp Arg Leu Arg Ala Ser Tyr Arg Gln Ile Gly
180 185 190

Asn Arg Asp Thr Leu Trp Gly Leu Phe Asn Asn Leu Gln Arg Arg Pro
195 200 205

Gly Trp Val Glu Val Phe Ile Arg Ala Leu Gln Ile Cys Glu Leu Pro
210 215 220

Gly Leu Ala Asp Gln Val Thr Arg Val Tyr Gln Ser Tyr Leu Pro Pro
225 230 235 240

Gly Thr Ser

<210> 131
<211> 504
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> YopE1-138- cGAS murina optimizada en codones de Y. enterocolitica (Aa. 146-507)

<400> 131

```
Met Lys Ile Ser Ser Phe Ile Ser Thr Ser Leu Pro Leu Pro Ala Ser
1               5                  10                  15

Val Ser Gly Ser Ser Ser Val Gly Glu Met Ser Gly Arg Ser Val Ser
            20                  25                  30

Gln Gln Lys Ser Asp Gln Tyr Ala Asn Asn Leu Ala Gly Arg Thr Glu
        35                  40                  45

Ser Pro Gln Gly Ser Ser Leu Ala Ser Arg Ile Ile Glu Arg Leu Ser
    50                  55                  60

Ser Met Ala His Ser Val Ile Gly Phe Ile Gln Arg Met Phe Ser Glu
65                  70                  75                  80

Gly Ser His Lys Pro Val Val Thr Pro Ala Leu Thr Pro Ala Gln Met
                85                  90                  95

Pro Ser Pro Thr Ser Phe Ser Asp Ser Ile Lys Gln Leu Ala Ala Glu
            100                 105                 110

Thr Leu Pro Lys Tyr Met Gln Gln Leu Ser Ser Leu Asp Ala Glu Thr
```

115 120 125

Leu Gln Lys Asn His Asp Gln Phe Ala Thr Leu Glu Ser Arg Glu Pro
130 135 140

Asp Lys Leu Lys Lys Val Leu Asp Lys Leu Arg Leu Lys Arg Lys Asp
145 150 155 160

Ile Ser Glu Ala Ala Glu Thr Val Asn Lys Val Val Glu Arg Leu Leu
165 170 175

Arg Arg Met Gln Lys Arg Glu Ser Glu Phe Lys Gly Val Glu Gln Leu
180 185 190

Asn Thr Gly Ser Tyr Tyr Glu His Val Lys Ile Ser Ala Pro Asn Glu
195 200 205

Phe Asp Val Met Phe Lys Leu Glu Val Pro Arg Ile Glu Leu Gln Glu
210 215 220

Tyr Tyr Glu Thr Gly Ala Phe Tyr Leu Val Lys Phe Lys Arg Ile Pro
225 230 235 240

Arg Gly Asn Pro Leu Ser His Phe Leu Glu Gly Glu Val Leu Ser Ala

245 250 255

Thr Lys Met Leu Ser Lys Phe Arg Lys Ile Ile Lys Glu Glu Val Lys
260 265 270

Glu Ile Lys Asp Ile Asp Val Ser Val Glu Lys Glu Lys Pro Gly Ser
275 280 285

Pro Ala Val Thr Leu Leu Ile Arg Asn Pro Glu Glu Ile Ser Val Asp
290 295 300

Ile Ile Leu Ala Leu Glu Ser Lys Gly Ser Trp Pro Ile Ser Thr Lys
305 310 315 320

Glu Gly Leu Pro Ile Gln Gly Trp Leu Gly Thr Lys Val Arg Thr Asn
325 330 335

Leu Arg Arg Glu Pro Phe Tyr Leu Val Pro Lys Asn Ala Lys Asp Gly
340 345 350

Asn Ser Phe Gln Gly Glu Thr Trp Arg Leu Ser Phe Ser His Thr Glu
355 360 365

Lys Tyr Ile Leu Asn Asn His Gly Ile Glu Lys Thr Cys Cys Glu Ser

370 375 380

Ser Gly Ala Lys Cys Cys Arg Lys Glu Cys Leu Lys Leu Met Lys Tyr
385 390 395 400

Leu Leu Glu Gln Leu Lys Lys Glu Phe Gln Glu Leu Asp Ala Phe Cys
405 410 415

Ser Tyr His Val Lys Thr Ala Ile Phe His Met Trp Thr Gln Asp Pro
420 425 430

Gln Asp Ser Gln Trp Asp Pro Arg Asn Leu Ser Ser Cys Phe Asp Lys
435 440 445

Leu Leu Ala Phe Phe Leu Glu Cys Leu Arg Thr Glu Lys Leu Asp His
450 455 460

Tyr Phe Ile Pro Lys Phe Asn Leu Phe Ser Gln Glu Leu Ile Asp Arg
465 470 475 480

Lys Ser Lys Glu Phe Leu Ser Lys Lys Ile Glu Tyr Glu Arg Asn Asn
485 490 495

Gly Phe Pro Ile Phe Asp Lys Leu

500

PCT

Print Out (Original in Electronic Form)

VIII-2-1	**Declaration: Entitlement to apply for and be granted a patent** Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to apply for and be granted a patent (Rules 4.17(ii) and 51bis.1(a)(ii)), in a case where the declaration under Rule 4.17(iv) is not appropriate: Name (LAST, First)	In relation to this international application UNIVERSITÄT BASEL is entitled to apply for and be granted a patent by virtue of the following:
VIII-2-1(ii)		Universität Basel is entitled as employer of the inventor, AMSTUTZ,Marlise

PCT

Print Out (Original in Electronic Form)

VIII-2-2	**Declaration: Entitlement to apply for and be granted a patent** Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to apply for and be granted a patent (Rules 4.17(ii) and 51bis.1(a)(ii)), in a case where the declaration under Rule 4.17(iv) is not appropriate: Name (LAST, First)	In relation to this international application UNIVERSITÄT BASEL is entitled to apply for and be granted a patent by virtue of the following:
VIII-2-2(ii)		Universität Basel is entitled as employer of the inventor, ITTIG,Simon

PCT

Print Out (Original in Electronic Form)

VIII-2-3	**Declaration: Entitlement to apply for and be granted a patent** Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to apply for and be granted a patent (Rules 4.17(ii) and 51bis.1(a)(ii)), in a case where the declaration under Rule 4.17(iv) is not appropriate: Name (LAST, First)	In relation to this international application UNIVERSITÄT BASEL is entitled to apply for and be granted a patent by virtue of the following:
VIII-2-3(ii)		Universität Basel is entitled as employer of the inventor, KASPER,Christoph

SUMINISTRO DE PROTEÍNAS BASADO EN BACTERIAS CON VIRULENCIA ATENUADA

CAMPO DE LA INVENCIÓN

La presente invención se refiere a cepas bacterianas gramnegativas con virulencia atenuada recombinantes y su uso en un método para tratar el cáncer en un sujeto.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

Las bacterias han desarrollado diferentes mecanismos para inyectar proteínas directamente en células diana [1]. El sistema de secreción tipo III (T3SS) usado por bacterias como *Yersinia*, *Shigella* y *Salmonella* [2] funciona como una nanojeringa que inyecta las llamadas proteínas efectoras bacterianas en las células huésped.

El T3S se ha explotado para suministrar péptidos y proteínas híbridos a células diana. Se han suministrado efectores heterólogos del T3SS bacteriano en caso en que la bacteria en estudio es de difícil acceso por métodos genéticos (como *Chlamydia trachomatis*). Frecuentemente se fusionaron proteínas reporteras a posibles señales de secreción de T3SS para estudiar los requerimientos del suministro de proteínas dependiente de T3SS, tales como la adenilato ciclasa de *Bordetella pertussis*, la DHFR murina o una etiqueta fosforilable. El suministro de péptidos se realizó principalmente con el objetivo de la vacunación. Esto incluye epítopos virales, epítopos bacterianos (listeriolisina O) así como péptidos que representan epítopos de células cancerosas humanas. En algunos casos se han suministrado proteínas eucariotas funcionales para modular la célula huésped, como se hizo con nanocuerpos [3], proteínas nucleares (recombinasa Cre, MyoD) [4,5] o Il10 e IL1ra [6]. Ninguno de los sistemas mencionados anteriormente permite el suministro de proteínas individuales dado que en cada caso aún se codifican una o múltiples proteínas efectoras endógenas. Además, los vectores usados no se han diseñado de manera que permita la clonación simple de otros fragmentos de ADN que codifican proteínas de elección, lo que impide la aplicación amplia del sistema.

Los enfoques que permiten el suministro dirigido de fármacos son de gran interés. Por ejemplo, se usan anticuerpos que reconocen estructuras de la superficie de células tumorales y, en un caso óptimo, que se unen selectivamente a células tumorales. Para mejorar el mecanismo de tales anticuerpos estos pueden conjugarse a agentes terapéuticos o a vesículas lipídicas empacadas con fármacos. Una de las dificultades con tales vesículas es la liberación correcta del reactante activo.

Aun más complejo es el suministro de proteínas o péptidos terapéuticos, especialmente cuando se dirige a mecanismos intracelulares. Se han intentado muchas maneras alternativas para solucionar el problema del suministro de proteínas terapéuticas a células eucariotas, entre las cuales están los "péptidos de penetración celular" (CPP) o tecnologías similares así como varias metodologías basadas en nanopartículas. Todas estas tecnologías tienen el inconveniente de su baja eficacia y que la carga captada por la célula por medio de la endocitosis probablemente termine degradándose en los lisosomas. Además, el conflicto entre la necesidad de estabilidad del portador de la carga en el cuerpo humano y el requerimiento de desestabilización y liberación dentro de la célula diana constituye un problema intrínseco de tales tecnologías.

Varias bacterias han demostrado su replicación dentro de tumores sólidos malignos cuando se administran desde un sitio distal, que incluyen *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae*, *Salmonella enterica*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Bifidobacteria*. Actualmente, solo se usa el bacilo Calmette-Guérin (BCG, derivado de *Mycobacterium bovis*) en la práctica clínica. El BCG se administra para tratar el cáncer de vejiga superficial, aunque el mecanismo molecular subyacente aún se desconoce en gran medida. El desarrollo de cepas bacterianas que son capaces por ejemplo de suministrar la carga producida dentro de las bacterias a su sitio de acción dentro de células como las células cancerosas, es decir fuera de las bacterias, sigue siendo una dificultad importante.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

La presente invención se refiere a cepas bacterianas gramnegativas con virulencia atenuada recombinantes y su uso en un método para tratar el cáncer en un sujeto. En algunas modalidades la presente invención proporciona cepas bacterianas gramnegativas con virulencia atenuada recombinantes y el uso de estas para tratar el cáncer en un sujeto en donde las cepas bacterianas gramnegativas con virulencia atenuada recombinantes permiten la translocación de varios efectores tipo III, pero también de efectores tipo IV, de proteínas virales y lo que es más importante de proteínas eucariotas funcionales a células cancerosas por ejemplo a células de un tumor sólido maligno.

La presente invención proporciona una cepa bacteriana gramnegativa con virulencia atenuada recombinante con aumento de la expresión de proteína heteróloga y propiedades de secreción y que sorprendentemente es capaz de codificar la proteína heteróloga de manera estable durante varios días, o incluso semanas, *in vivo*.

En un primer aspecto la presente invención se refiere a una cepa bacteriana gramnegativa con virulencia atenuada recombinante que comprende una molécula de nucleótidos 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 deleción 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.

En un aspecto adicional la presente invención se refiere a una cepa bacteriana gramnegativa con virulencia atenuada recombinante que comprende una molécula de nucleótidos 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.

En un aspecto adicional la presente invención se refiere a una cepa bacteriana gramnegativa con virulencia atenuada recombinante que comprende una molécula de nucleótidos 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 proteína heteróloga es una proteína involucrada en la inducción o regulación de una respuesta de interferón (IFN).

En un aspecto adicional la presente invención se refiere a una cepa bacteriana gramnegativa con virulencia atenuada recombinante que comprende una molécula de nucleótidos 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 deleción 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 para el uso en un método para tratar el cáncer en un sujeto, el método 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.

Del mismo modo la presente invención se refiere a un método para tratar el cáncer en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una cepa bacteriana gramnegativa con virulencia atenuada recombinante que comprende una molécula de nucleótidos 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 deleción 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, en donde la cepa bacteriana gramnegativa con virulencia atenuada recombinante se administra en una cantidad que es suficiente para tratar al sujeto.

Del mismo modo la presente invención se refiere al uso de una cepa bacteriana gramnegativa con virulencia atenuada recombinante que comprende una molécula de nucleótidos 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 deleción 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 para la fabricación de un medicamento para tratar el cáncer en un sujeto

En un aspecto adicional la presente invención se refiere a una cepa bacteriana gramnegativa con virulencia atenuada recombinante que comprende una molécula de nucleótidos 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 para el uso en un método para tratar el cáncer en un sujeto, el método 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.

Del mismo modo la presente invención se refiere a un método para tratar el cáncer en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una cepa bacteriana gramnegativa con virulencia atenuada recombinante que comprende una molécula de nucleótidos 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, en donde la cepa bacteriana gramnegativa con virulencia atenuada recombinante se administra en una cantidad que es suficiente para tratar al sujeto.

Del mismo modo la presente invención se refiere al uso de una cepa bacteriana gramnegativa con virulencia atenuada recombinante que comprende una molécula de nucleótidos 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 para la fabricación de un medicamento para tratar el cáncer en un sujeto.

En un aspecto adicional la presente invención se refiere a una cepa bacteriana gramnegativa con virulencia atenuada recombinante que comprende una molécula de nucleótidos 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 proteína heteróloga es una proteína involucrada en la inducción o regulación de una respuesta de interferón (IFN) para el uso en un método para tratar el cáncer en un sujeto, el método 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.

Del mismo modo la presente invención se refiere a un método para tratar el cáncer en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una cepa bacteriana gramnegativa con virulencia atenuada recombinante que comprende una molécula de nucleótidos 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 proteína heteróloga es una proteína involucrada en la inducción o regulación de una respuesta de interferón (IFN), en donde la cepa bacteriana gramnegativa con virulencia atenuada recombinante se administra en una cantidad que es suficiente para tratar al sujeto.

Del mismo modo la presente invención se refiere al uso de una cepa bacteriana gramnegativa con virulencia atenuada recombinante que comprende una molécula de nucleótidos 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 proteína heteróloga es una proteína involucrada en la inducción o regulación de una respuesta de interferón (IFN) para la fabricación de un medicamento para tratar el cáncer en un sujeto.

En un aspecto adicional la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende una cepa bacteriana gramnegativa con virulencia atenuada recombinante y un portador farmacéuticamente aceptable, en donde la cepa bacteriana gramnegativa con virulencia atenuada recombinante comprende una molécula de nucleótidos 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 deleción 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.

En un aspecto adicional la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende una cepa bacteriana gramnegativa con virulencia atenuada recombinante y un portador farmacéuticamente aceptable, en donde la cepa bacteriana gramnegativa con virulencia atenuada recombinante comprende una molécula de nucleótidos 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.

En un aspecto adicional la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende una cepa bacteriana gramnegativa con virulencia atenuada recombinante y un portador farmacéuticamente aceptable, en donde la cepa bacteriana gramnegativa con virulencia atenuada recombinante comprende una molécula de nucleótidos 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 proteína heteróloga es una proteína involucrada en la inducción o regulación de una respuesta de interferón (IFN).

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1: Caracterización del suministro de proteínas por T3SS. Representación esquemática de la secreción de proteínas dependiente de T3SS al medio circundante (secreción *in vitro*)(lado izquierdo) o a células eucariotas (lado derecho). I: muestra el sistema de secreción tipo 3. II indica las proteínas secretadas al medio circundante, III proteínas translocadas a través de la membrana al citosol de células eucariotas (VII). VI muestra un segmento de las dos membranas bacterianas en las que se inserta el T3SS y el citosol bacteriano debajo. IV es una proteína de fusión unida al fragmento N-terminal $YopE_{1-138}$ (V)

Figura 2: Descripción de las herramientas del suministro basado en la secreción tipo III. (A) Mapas de vectores de los plásmidos de clonación pBad_Si1 y pBad_Si2 usados para generar los constructos de fusión con $YopE_{1-138}$. La chaperona SycE y la fusión con $YopE_{1-138}$ se encuentran bajo el promotor nativo de *Y. enterocolitica*. Los dos plásmidos solo difieren en la presencia de una EGFP inducible por arabinosa presente en pBad_Si1 (B) Sitio de clonación múltiple directamente a continuación del fragmento $yopE_{1-138}$ en los plásmidos pBad_Si1 y pBad_Si2.

Las Figuras 3A a Q: Cepas de *Y. enterocolitica* usadas en este estudio. Lista de cepas de *Y. enterocolitica* usadas en este estudio que proporciona información sobre las cepas de fondo, los plásmidos y las proteínas para el suministro dependiente de T3SS codificadas en los plásmidos correspondientes. Además, se proporciona información sobre los oligonucleótidos usados para la construcción del plásmido correspondiente, la cadena principal del plásmido y las resistencias a antibióticos.

Figura 4: El plásmido de virulencia de *Yersinia enterocolitica* W227, pYV. El plásmido de 69,673 pb de virulencia de *Yersinia* (pYV) de la cepa W227 dibujado a escala. Se indican las proteínas efectoras del T3SS, el origen de replicación y la resistencia a arsénico (codificada por los genes arsC, B, R y H):

I: origen de replicación, II: yopO, III: yopP, IV: yopQ, V: yopT, VI: sycT,

VII: yopM, VIII: yopD, IX: yopB, X: sycD, XII: yopH, XIII: sycH, XIV: sycE,

XV: yopE, XVI: yadA, XVII-XVXX: arsC, B, R y H.

Figura 5: Suministro de proteínas proapoptóticas sintéticas aumentadas. El suministro de proteínas sintéticas individuales que consisten en repeticiones únicas o en tándem de dominios BH3 que se originan de proteínas proapoptóticas t-BID o BAX conduce al aumento de la inducción de la apoptosis en células cancerosas 4T1 y B16F10. Las células 4T1 (I) o B16F10 (II) se infectaron con

Y. enterocolitica ΔyopHOPEMT que codifica en pBad-MycHisA IV: $YopE_{1-138}$-dominio BH3 de tBID extendido, V: $YopE_{1-138}$-enlazador-BH3 de tBID, VI: $YopE_{1-138}$-BH3 de tBID, VII: $YopE_{1-138}$-$(BH3\ de\ tBID)_2$, VIII: $YopE_{1-138}$-BH3 de tBID - BH3 de BAX o IX: $YopE_{1-138}$-BH3 de BAX - BH3 de tBID. Se realizó una titulación de las bacterias añadidas a las células (MOI) para cada cepa, se determinaron los recuentos de células y se calculó la IC50 con el uso de regresión no-lineal. Se indica MOI de IC50 (III).

Figura 6: Inducción de la apoptosis por proteínas proapoptóticas sintéticas codificadas por pYV. El suministro de una repetición única o en tándem del dominio BH3 de BID codificado en el pYV conduce a la inducción de la apoptosis en células cancerosas 4T1 y B16F10. Las células 4T1 (I) o B16F10 (II) se infectaron con *Y. enterocolitica* ΔHOPEMT + IV: pYV-$YopE_{1-138}$-BH3-Bid, o V: + pYV-$YopE_{1-138}$-$(BH3\text{-}Bid)_2$ o VI: con *Y. enterocolitica* ΔHOPEMT pBad-MycHisA-$YopE_{1-138}$-$(BH3\text{-}Bid)_2$ durante 3 horas. Se realizó una titulación de las bacterias añadidas a las células (MOI) para cada cepa, se determinaron los recuentos de células y se calculó la IC50 (III) con el uso de regresión no- lineal.

Figura 7: Colonización del tumor de *Y. enterocolitica* ΔyopH,O,P,E,M,T inyectada por vía i.v. en el modelo de aloinjerto de cáncer de mama 4T1. Los recuentos bacterianos en los tumores se indican como unidades formadoras de colonias (UFC) por gramo de tejido (III). Los recuentos se evaluaron en los tumores en el día 8 (I) y 14 (II) después de la infección. Cada punto representa un ratón individual. La línea discontinua horizontal indica el límite de detección.

Figura 8: Biodistribución de *Y. enterocolitica* ΔyopH,O,P,E,M,T inyectada por vía i.v. en el modelo de aloinjerto de cáncer de mama 4T1. Los recuentos bacterianos en sangre (I), bazo (II), hígado (III), pulmón (IV) y tumor (V) se indican como unidades formadoras de colonias (UFC) por gramo de tejido o por ml de sangre (VI). Los recuentos se evaluaron en el día 14 después de la infección. Cada punto representa un ratón individual. La línea discontinua horizontal indica el límite de detección. * indica un ratón con metástasis grandes encontradas en pulmón.

Figura 9: Retardo de la progresión del tumor en ratones Balb/C de tipo silvestre con aloinjerto s.c. de células de cáncer de mama 4T1. Los ratones Balb/C de tipo silvestre con aloinjerto s.c. de células de cáncer de mama 4T1 se inyectaron por vía i.v. con I: PBS o II: $1*10^7$ Y. enterocolitica dHOPEMT ΔHairpinI-VirF + pYV-$YopE_{1-138}(BH3\text{-}Bid)_2$, una vez que el tumor había alcanzado un tamaño de 150-250 mm3. El día de la inyección i.v. de bacterias se definió como el día 0. El volumen tumoral se midió en los siguientes días (III; día 0 a día 9 después de la inyección i.v. de bacterias) con calibres. El volumen tumoral relativo, normalizado respecto al volumen tumoral en

el día 0, se indica (IV) como mm^3. La media se indica con símbolos, las barras de error representadas muestran el error estándar de la media. La significación estadística se mide con un ANOVA de 2 vías, * indica un valor $p < 0.05$, ** un valor $p < 0.005$.

Figura 10: Progresión del tumor en ratones Balb/C de tipo silvestre con aloinjerto s.c. de células de cáncer de mama 4T1. Los ratones Balb/C de tipo silvestre con aloinjerto s.c. de células de cáncer de mama 4T1 se inyectaron por vía i.v. con I: PBS o II: $1*10^7$ Y. enterocolitica dHOPEMT, una vez que el tumor había alcanzado un tamaño de 150-250 mm3. El día de la inyección i.v. de bacterias se definió como el día 0. El volumen tumoral se midió en los siguientes días (III; día 0 a día 9 después de la inyección i.v. de bacterias) con calibres. El volumen tumoral relativo, normalizado respecto al volumen tumoral en el día 0, se indica (IV) como mm^3. La media se indica con símbolos, las barras de error representadas muestran el error estándar de la media

Figura 11: Regulación de la secreción basada en T3SS mediante el control de la expresión del regulador maestro VirF. A: Ensayo de secreción *in vitro* (realizado a 37 °C) con cepas de Y. enterocolitica ΔHOPEMT que suministran $YopE_{1-138}$-(BH3 de tBID)$_2$. La expresión de VirF se encuentra bajo el control de su promotor natural (I + II), un promotor inducible por arabinosa (III + IV) o su promotor natural con una deleción de su región de horquilla I que controla la expresión dependiente de la temperatura (V). El ensayo de secreción se realizó ya sea en ausencia de arabinosa (I, III y V) o en presencia de arabinosa al 0.2 % (II y IV). La $YopE_{1-138}$-(BH3 de tBID)$_2$ secretada se detectó con el uso de transferencia Western con un anticuerpo que reconoce la región $YopE_{1-138}$. B: Ensayo de secreción *in vitro* (realizado a 37 °C) con cepas de Y. enterocolitica ΔHOPEMT que suministran $YopE_{1-138}$- dominios Card de RIG1 murina. La expresión de VirF se encuentra bajo el control de su promotor natural (I + II), o su promotor natural con una deleción de su región de horquilla I que controla la expresión dependiente de la temperatura (III). El ensayo de secreción se realizó ya sea en ausencia de arabinosa (I, y III) o en presencia de arabinosa al 0.2 % (II). La secreción de $YopE_{1-138}$-dominios Card de RIG1 murina se detectó con el uso de transferencia Western con un anticuerpo que reconoce la región $YopE_{1-138}$.

Figura 12: Comparación del crecimiento *in vitro*: Comparación del crecimiento *in vitro* para II: *Y. enterocolitica* ΔHOPEMT, III: *Y. enterocolitica* ΔHOPEMT Δasd, IV: *Y. enterocolitica* ΔHOPEMT Δasd + pBAD-MycHisA-asd, V: *Y. enterocolitica* ΔHOPEMT Δasd + pBAD-MycHisA-asd (orientación inversa), VI: *Y. enterocolitica* ΔHOPEMT que codifica $YopE_{1-138}$-(BH3 de tBID)$_2$ en el pYV y VII: *Y. enterocolitica* ΔHOPEMT Δasd + pYV-asd-$YopE_{1-138}$-(BH3 de

tBID)$_2$. Las bacterias se inocularon en cultivo líquido y se cultivaron durante 3 horas. Posteriormente, se determinó la OD600 (I) para todas las cepas.

Figura 13: Colonización del tumor con Y. enterocolitica ΔHOPEMT Δasd + pBad-MycHisA-asd y estabilidad de pBad-MycHisA-asd: Ratones C57BL/6 de tipo silvestre con aloinjerto s.c. de células de melanoma B16F10 se inyectaron por vía i.v. con 1*10^6 *Y. enterocolitica* ΔHOPEMT Δasd + pBad-MycHisA-asd. En el día 1 (I) o el día 4 (II) después de la inyección i.v. de bacterias, sangre (V), bazo (VI), hígado (VII), pulmón (VIII) y tumor (IX) se aislaron, se homogeneizaron, se diluyeron en serie y se sembraron en placas de LB-agar que contienen ácido nalidíxico (y sin ampicilina, -IV) o en placas de LB-agar con ampicilina (+IV), con selección para pBad-MycHisA-asd. Los recuentos bacterianos en las muestras respectivas se indican como unidades formadoras de colonias (UFC) por gramo de tejido o ml de sangre (III). Cada punto representa un ratón individual. La línea discontinua horizontal indica el límite de detección.

Figura 14: Colonización del tumor con Y. enterocolitica ΔHOPEMT Δasd + pBad-MycHisA-asd: Ratones Balb/C de tipo silvestre con aloinjerto s.c. de células de cáncer de mama 4T1 se inyectaron por vía i.v. con 1*10^6 *Y. enterocolitica* ΔHOPEMT Δasd + pBad-MycHisA-asd. En los días indicados después de la inyección i.v. de bacterias (I), los tumores se aislaron, se homogeneizaron, se diluyeron en serie y se sembraron en placas de LB-agar que contienen ácido nalidíxico. Los recuentos bacterianos en los tumores se indican como unidades formadoras de colonias (UFC) por gramo de tejido (II). Cada punto representa un ratón individual. La línea discontinua horizontal indica el límite de detección.

Figura 15: Estabilidad genética del pYV: Estabilidad de pYV nativo o pYV-asd en tumores sólidos *in vivo*. Ratones Balb/C de tipo silvestre con aloinjerto s.c. de células de cáncer de mama 4T1 se inyectaron por vía i.v. con 1*10^7 II: *Y. enterocolitica* ΔHOPEMT + pYV-YopE$_{1\text{-}138}$-(BH3 de tBID)$_2$, III:*Y. enterocolitica* ΔHOPEMT ΔhairpinI-virF + pYV-YopE$_{1\text{-}138}$-(BH3 de tBID)$_2$ o IV: *Y. enterocolitica* ΔHOPEMT Δasd + pYV-asd-YopE$_{1\text{-}138}$-(BH3 de tBID)$_2$. En el día 9 después de la inyección i.v. de bacterias, los tumores se aislaron, se homogeneizaron, se diluyeron en serie y se sembraron en placas de LB-agar que contienen ácido nalidíxico. Después del crecimiento en estas placas, se volvieron a escoger colonias individuales de ratones individuales en las placas de LB-agar con y sin arsenito de sodio, con selección para el pYV. Para cada ratón, se indica el porcentaje de colonias que crecen en las placas de agar que contienen arsenito con relación al número de colonias que crecen en las placas que no contienen arsenito (I: como %). 100 % indica, que todas las colonias aisladas de un tumor sólido aún contienen el plásmido pYV.

Figura 16: Colonización del tumor: Ratones Balb/C de tipo silvestre con aloinjerto s.c. de células de cáncer de mama 4T1 se inyectaron por vía i.v. con $1*10^7$ II: *Y. enterocolitica* ΔHOPEMT + pYV-$YopE_{1-138}$-$(BH3\ de\ tBID)_2$, III:*Y. enterocolitica* ΔHOPEMT ΔhairpinI-virF + pYV-$YopE_{1-138}$-$(BH3\ de\ tBID)_2$ o IV: *Y. enterocolitica* ΔHOPEMT Δasd + pYV-asd-$YopE_{1-138}$-$(BH3\ de\ tBID)_2$. En el día 9 después de la inyección i.v. de bacterias, los tumores se aislaron, se homogeneizaron, se diluyeron en serie y se sembraron en placas de LB-agar que contienen ácido nalidíxico. Los recuentos bacterianos en los tumores se indican como unidades formadoras de colonias (UFC) por gramo de tejido (I). Cada punto representa un ratón individual. La línea discontinua horizontal indica el límite de detección.

Figura 17: Suministro de proteínas que inducen respuesta de interferón tipo I por medio del T3SS bacteriano – ruta de Rig1. El suministro de dominios Card de Rig1 humana y murina conduce a la inducción de IFN tipo I en una línea celular reportera de IFN B16F10. Las células reporteras B16F10 se infectaron con I: *Y. enterocolitica* ΔHOPEMT, o *Y. enterocolitica* ΔHOPEMT que codifica en un plásmido derivado de pBadMycHisA II: $YopE_{1-138}$-dominios Card de Rig1 humana, III: $YopE_{1-138}$- dominios Card de Rig1 murina. Se realizó una titulación de las bacterias añadidas a las células (IV: indicada como MOI) para cada cepa, y la estimulación de IFN se evaluó en base a la actividad de la fosfatasa alcalina secretada (V: OD650) que se encuentra bajo el control del promotor I-ISG54 que comprende el promotor ISG54 inducible por IFN potenciado por un ISRE multimérico.

Figura 18: Suministro de proteínas que inducen respuesta de interferón tipo I por medio del T3SS bacteriano – ruta de Rig1. El suministro de dominios Card de Rig1 humana conduce a la inducción de IFN tipo I en una línea celular reportera de IFN B16F10. Las células reporteras B16F10 se infectaron con I: *Y. enterocolitica* ΔHOPEMT, o *Y. enterocolitica* ΔHOPEMT que codifica en un plásmido derivado de pBadMycHisA II: $YopE_{1-138}$-MycHis, III: $YopE_{1-138}$- dominios Card de Rig1 humana. Se realizó una titulación de las bacterias añadidas a las células (IV: indicada como MOI) para cada cepa, y la estimulación de IFN se evaluó en base a la actividad de la fosfatasa alcalina secretada (V: OD650) que se encuentra bajo el control del promotor I-ISG54 que comprende el promotor ISG54 inducible por IFN potenciado por un ISRE multimérico.

Figura 19: Suministro de proteínas que inducen respuesta de interferón tipo I por medio del T3SS bacteriano – ruta de Rig1: control positivo. El control positivo en el mismo experimento de la Figura 18 que usa IFN gamma para estimular la línea celular reportera de IFN B16F10. Las células reporteras B16F10 se estimularon con IFN gamma murino. Se añadió una titulación de IFN gamma

a las células (I: indicada como U/ml), y la estimulación de IFN se evaluó en base a la actividad de la fosfatasa alcalina secretada (II: OD650) que se encuentra bajo el control del promotor I-ISG54 que comprende el promotor ISG54 inducible por IFN potenciado por un ISRE multimérico.

Figura 20: Suministro de proteínas que inducen respuesta de interferón tipo I por medio del T3SS bacteriano – ruta de Rig1. El suministro de dominios Card de Rig1 murina codificados por pYV conduce a la inducción de IFN tipo I en la línea de células cancerosas B16F10. Las células B16F10 se infectaron con I: *Y. enterocolitica* ΔHOPEMT, o *Y. enterocolitica* ΔHOPEMT que codifica en el pYV II: $YopE_{1-138}$-dominios Card de Rig1 murina. Se realizó una titulación de las bacterias añadidas a las células (III: indicada como MOI) para cada cepa, y la estimulación de IFN se evaluó mediante la adición de sobrenadante celular a una línea celular reportera de IFN en base a la actividad de la fosfatasa alcalina secretada (IV: OD650) que se encuentra bajo el control del promotor I-ISG54 que comprende el promotor ISG54 inducible por IFN potenciado por un ISRE multimérico.

Figura 21: Suministro de proteínas que inducen respuesta de interferón tipo I por medio del T3SS bacteriano – ruta de Rig1. El suministro de dominios Card de Rig1 murina codificados por pYV conduce a la inducción de IFN tipo I en la línea de células cancerosas 4T1. Las células 4T1 se infectaron con I: *Y. enterocolitica* ΔHOPEMT, o *Y. enterocolitica* ΔHOPEMT que codifica en el pYV II: $YopE_{1-138}$-dominios Card de Rig1 murina. Se realizó una titulación de las bacterias añadidas a las células (III: indicada como MOI) para cada cepa, y la estimulación de IFN se evaluó mediante la adición de sobrenadante celular a una línea celular reportera de IFN en base a la actividad de la fosfatasa alcalina secretada (IV: OD650) que se encuentra bajo el control del promotor I-ISG54 que comprende el promotor ISG54 inducible por IFN potenciado por un ISRE multimérico.

Figura 22: Suministro de proteínas que inducen respuesta de interferón tipo I por medio del T3SS bacteriano – ruta de STING. El suministro de enzimas que generan dinucleótidos cíclicos conduce a la inducción de IFN tipo I en una línea celular reportera de IFN B16F10. Las células reporteras B16F10 se infectaron con I: *Y. enterocolitica* ΔHOPEMT, o *Y. enterocolitica* ΔHOPEMT que codifica en un plásmido derivado de pBadMycHisA II: $YopE_{1-138}$- WspR de P. aeruginosa (con dominio de apilamiento adaptado). Se realizó una titulación de las bacterias añadidas a las células (III: indicada como MOI) para cada cepa, y la estimulación de IFN se evaluó en base a la actividad de la fosfatasa alcalina secretada (IV: OD650) que se encuentra bajo el control del promotor I-ISG54 que comprende el promotor ISG54 inducible por IFN potenciado por un ISRE multimérico.

Figura 23: Suministro de proteínas que inducen respuesta de interferón tipo I por medio del T3SS bacteriano – ruta de STING. El suministro de enzimas que generan dinucleótidos cíclicos conduce a la inducción de IFN tipo I en una línea celular reportera de IFN B16F10. Las células reporteras B16F10 no se trataron (I), o se infectaron con II: *Y. enterocolitica* ΔHOPEMT, o *Y. enterocolitica* ΔHOPEMT que codifica en un plásmido derivado de pBadMycHisA III: $YopE_{1-138}$- DncV de V. cholerae, IV: $YopE_{1-138}$- proteína similar a DisA de B. cereus, V: $YopE_{1-138}$- cGAS de anémona o VI: $YopE_{1-138}$- MycHis. Se realizó una titulación de las bacterias añadidas a las células (VII: indicada como MOI) para cada cepa, y la estimulación de IFN se evaluó en base a la actividad de la fosfatasa alcalina secretada (VIII: OD650) que se encuentra bajo el control del promotor I-ISG54 que comprende el promotor ISG54 inducible por IFN potenciado por un ISRE multimérico.

Figura 24: Secreción de IRF3 dependiente de T3SS al sobrenadante de cultivo. Experimento de secreción *in vitro* de I: *Y. enterocolitica* ΔHOPEMT + $YopE_{1-138}$- BH3 de tBID murina y II: *Y. enterocolitica* ΔHOPEMT + $YopE_{1-138}$- IRF3 Ser397Asp murina. El contenido de proteínas de los lisados bacterianos totales ("A") y los sobrenadantes de cultivo precipitados ("B") se analizó por transferencia Western con el uso de un anticuerpo anti-YopE. Los números escritos indican el peso molecular en kDa a la altura correspondiente.

Figura 25: Suministro de proteínas que inducen respuesta de interferón tipo I por medio del T3SS bacteriano a células inmunitarias – ruta de Rig1 y STING. El suministro de dominios Card de Rig1 murina y enzimas que generan dinucleótidos cíclicos conduce a la inducción de IFN tipo I en una línea celular reportera de IFN RAW264.7. Las células reporteras RAW264.7 se infectaron con I: *Y. enterocolitica* ΔHOPEMT, o *Y. enterocolitica* ΔHOPEMT que codifica en un plásmido derivado de pBadMycHisA II: $YopE_{1-138}$- DncV de V. cholerae, III: $YopE_{1-138}$- proteína similar a DisA de B. cereus, IV: $YopE_{1-138}$- cGAS de anémona o V: $YopE_{1-138}$- dominios Card de Rig1 murina. Se realizó una titulación de las bacterias añadidas a las células (VI: indicada como MOI) para cada cepa, y la estimulación de IFN se evaluó en base a la actividad de la fosfatasa alcalina secretada (VII: OD650) que se encuentra bajo el control del promotor I-ISG54 que comprende el promotor ISG54 inducible por IFN potenciado por un ISRE multimérico.

Figura 26: Colonización del tumor de cepas de Y. enterocolitica inyectadas por vía i.v. en el modelo de aloinjerto de cáncer de mama B16F10. Ratones C57BL/6 de tipo silvestre con aloinjerto s.c. de células cancerosas de melanoma B16F10 se inyectaron por vía i.v. con I: PBS, II: $1*10^7$ Y. enterocolitica dHOPEMT, III: Y. enterocolitica dHOPEMT + pYV-$YopE_{1-138}$ – CARD de RIG1 murina $_{1-246}$ o IV: Y. enterocolitica dHOPEMT ΔHairpinI-VirF + pYV-$YopE_{1-138}$ - CARD de RIG1

murina$_{1-246}$ una vez que el tumor había alcanzado un tamaño de 100-315 mm^3. Los recuentos bacterianos en los tumores se indican como unidades formadoras de colonias (UFC) por gramo de tejido (V). Los recuentos se evaluaron en los tumores en el día 5 u 8 después de la infección. Cada punto representa un ratón individual. La línea discontinua horizontal indica el límite de detección.

Figura 27: Suministro de proteínas que inducen respuesta de interferón tipo I por medio del T3SS bacteriano – RIG1. El suministro de dominios CARD de RIG1 humana y murina conduce a la inducción de IFN tipo I en una línea celular reportera de IFN B16F10. Las células B16F10 se infectaron con I: *Y. enterocolitica* ΔHOPEMT, o *Y. enterocolitica* ΔHOPEMT que codifica en un plásmido derivado de pBadMycHisA II: YopE$_{1-138}$-dominios CARD de RIG1 humana$_{1-245}$, III: YopE$_{1-138}$-dominios CARD de RIG1 murina$_{1-246}$, IV: YopE$_{1-138}$-dominios CARD de RIG1 murina$_{1-229}$, V: YopE$_{1-138}$-dominios CARD de RIG1 murina$_{1-218}$. Se realizó una titulación de las bacterias añadidas a las células (VI: indicada como MOI) para cada cepa, y la estimulación de IFN se evaluó en base a la actividad de la fosfatasa alcalina secretada (VII: OD650) que se encuentra bajo el control del promotor I-ISG54 que comprende el promotor ISG54 inducible por IFN potenciado por un ISRE multimérico.

Figura 28: Suministro de proteínas que inducen respuesta de interferón tipo I por medio del T3SS bacteriano – RIG1. El suministro de dominios CARD de RIG1 humana y murina conduce a la inducción de IFN tipo I en una línea celular reportera de IFN RAW. Las células reporteras RAW se infectaron con I: *Y. enterocolitica* ΔHOPEMT, o *Y. enterocolitica* ΔHOPEMT que codifica en un plásmido derivado de pBadMycHisA II: YopE$_{1-138}$-dominios CARD de RIG1 humana$_{1-245}$, III: YopE$_{1-138}$-dominios CARD de RIG1 murina$_{1-246}$, IV: YopE$_{1-138}$-dominios CARD de RIG1 murina$_{1-229}$, V: YopE$_{1-138}$-dominios CARD de RIG1 murina$_{1-218}$. Se realizó una titulación de las bacterias añadidas a las células (VI: indicada como MOI) para cada cepa, y la estimulación de IFN se evaluó en base a la actividad de la fosfatasa alcalina secretada (VII: OD650) que se encuentra bajo el control del promotor I-ISG54 que comprende el promotor ISG54 inducible por IFN potenciado por un ISRE multimérico.

Figura 29: Suministro de proteínas que inducen respuesta de interferón tipo I por medio del T3SS bacteriano –ruta de MDA5. El suministro de MDA5 murina conduce a la inducción de IFN tipo I en una línea celular reportera de IFN B16F10. Las células reporteras B16F10 se infectaron con I: *Y. enterocolitica* ΔHOPEMT, o *Y. enterocolitica* ΔHOPEMT que codifica en un plásmido derivado de pBadMycHisA II: YopE$_{1-138}$-MDA5 murina$_{1-294}$, III: YopE$_{1-138}$-MDA5 murina$_{1-231}$. Se realizó una titulación de las bacterias añadidas a las células (IV: indicada como MOI) para cada cepa, y la

estimulación de IFN se evaluó en base a la actividad de la fosfatasa alcalina secretada (V: OD650) que se encuentra bajo el control del promotor I-ISG54 que comprende el promotor ISG54 inducible por IFN potenciado por un ISRE multimérico.

Figura 30: Suministro de proteínas que inducen respuesta de interferón tipo I por medio del T3SS bacteriano – MAVS. El suministro de CARD de MAVS conduce a la inducción de IFN tipo I en una línea celular reportera de IFN B16F10. Las células reporteras B16F10 se infectaron con I: *Y. enterocolitica* ΔHOPEMT, o *Y. enterocolitica* ΔHOPEMT que codifica en un plásmido derivado de pBadMycHisA II: $YopE_{1-138}$-dominios CARD de RIG1 $murina_{1-246}$, III: $YopE_{1-138}$-cGAS $humana_{161-522}$, IV: $YopE_{1-138}$-CARD de MAVS $humana_{1-100}$. Se realizó una titulación de las bacterias añadidas a las células (V: indicada como MOI) para cada cepa, y la estimulación de IFN se evaluó en base a la actividad de la fosfatasa alcalina secretada (VI: OD650) que se encuentra bajo el control del promotor I-ISG54 que comprende el promotor ISG54 inducible por IFN potenciado por un ISRE multimérico.

Figura 31: Suministro de proteínas que inducen respuesta de interferón tipo I por medio del T3SS bacteriano – MAVS. El suministro de CARD de MAVS conduce a la inducción de IFN tipo I en una línea celular reportera de IFN de macrófagos RAW. Las células reporteras macrófagas RAW se infectaron con I: *Y. enterocolitica* ΔHOPEMT, o *Y. enterocolitica* ΔHOPEMT que codifica en un plásmido derivado de pBadMycHisA II: $YopE_{1-138}$-dominios CARD de RIG1 $murina_{1-246}$, III: $YopE_{1-138}$-cGAS $humana_{161-522}$, IV: $YopE_{1-138}$-CARD de MAVS $humana_{1-100}$. Se realizó una titulación de las bacterias añadidas a las células (V: indicada como MOI) para cada cepa, y la estimulación de IFN se evaluó en base a la actividad de la fosfatasa alcalina secretada (VI: OD650) que se encuentra bajo el control del promotor I-ISG54 que comprende el promotor ISG54 inducible por IFN potenciado por un ISRE multimérico.

Figura 32: Suministro de proteínas que inducen respuesta de interferón tipo I por medio del T3SS bacteriano – ruta de STING. El suministro de enzimas que generan dinucleótidos cíclicos conduce a la inducción de IFN tipo I en una línea celular reportera de IFN B16F10. Las células reporteras B16F10 se infectaron con I: *Y. enterocolitica* ΔHOPEMT, o *Y. enterocolitica* ΔHOPEMT que codifica en un plásmido derivado de pBadMycHisA II: $YopE_{1-138}$-cGAS de anémona, III: $YopE_{1-138}$-cGAS de $anémona_{60-422}$, IV: $YopE_{1-138}$-cGAS $humana_{161-522}$, V: $YopE_{1-138}$- CdaA de $Listeria_{101-273}$, VI: $YopE_{1-138}$- DncV de V. cholerae, VII: $YopE_{1-138}$- proteína similar a DisA de B. cereus. Se realizó una titulación de las bacterias añadidas a las células (VIII: indicada como MOI) para cada cepa, y la estimulación de IFN se evaluó en base a la actividad de la fosfatasa alcalina secretada

(IX: OD650) que se encuentra bajo el control del promotor I-ISG54 que comprende el promotor ISG54 inducible por IFN potenciado por un ISRE multimérico.

Figura 33: Suministro de proteínas que inducen respuesta de interferón tipo I por medio del T3SS bacteriano – ruta de STING. El suministro de enzimas que generan dinucleótidos cíclicos conduce a la inducción de IFN tipo I en una línea celular reportera de IFN de macrófagos RAW. Las células reporteras macrófagas RAW se infectaron con I: *Y. enterocolitica* ΔHOPEMT, o *Y. enterocolitica* ΔHOPEMT que codifica en un plásmido derivado de pBadMycHisA II: $YopE_{1-138}$-cGAS de anémona, III: $YopE_{1-138}$-cGAS de $anémona_{60-422}$, IV: $YopE_{1-138}$-cGAS $humana_{161-522}$, V: $YopE_{1-138}$-CdaA de $Listeria_{101-273}$, VI: $YopE_{1-138}$- DncV de V. cholerae, VII: $YopE_{1-138}$- proteína similar a DisA de B. cereus. Se realizó una titulación de las bacterias añadidas a las células (VIII: indicada como MOI) para cada cepa, y la estimulación de IFN se evaluó en base a la actividad de la fosfatasa alcalina secretada (IX: OD650) que se encuentra bajo el control del promotor I-ISG54 que comprende el promotor ISG54 inducible por IFN potenciado por un ISRE multimérico.

Figura 34: Suministro de proteínas que inducen respuesta de interferón tipo I por medio del T3SS bacteriano y comparación con agonistas moleculares pequeños de STING. El suministro de enzimas que generan dinucleótidos cíclicos conduce a la inducción de IFN tipo I en una línea celular reportera de IFN B16F10. Las células reporteras B16F10 se infectaron con I: *Y. enterocolitica* ΔHOPEMT, o *Y. enterocolitica* ΔHOPEMT que codifica en un plásmido derivado de pBadMycHisA II: $YopE_{1-138}$-cGAS de anémona, III: $YopE_{1-138}$-cGAS $humana_{161-522}$, IV: $YopE_{1-138}$-dominios CARD de RIG1 $murina_{1-218}$. Se realizó una titulación de las bacterias añadidas a las células (V: indicada como MOI), y la estimulación de IFN se evaluó en base a la actividad de la fosfatasa alcalina secretada (VI: OD650) que se encuentra bajo el control del promotor I-ISG54 que comprende el promotor ISG54 inducible por IFN potenciado por un ISRE multimérico.

Figura 35: Suministro de proteínas que inducen respuesta de interferón tipo I por medio del T3SS bacteriano y comparación con agonistas moleculares pequeños de STING. El suministro de un dinucleótido cíclico conduce a la inducción de IFN tipo I en una línea celular reportera de IFN B16F10. Las células reporteras B16F10 se trataron con el agonista molecular pequeño de STING 2’3’-c-di-AM(PS)2 (Rp,Rp). Se realizó una titulación del compuesto (I: indicada como micromolar), y la estimulación de IFN se evaluó en base a la actividad de la fosfatasa alcalina secretada (II: OD650) que se encuentra bajo el control del promotor I-ISG54 que comprende el promotor ISG54 inducible por IFN potenciado por un ISRE multimérico.

Figura 36: Suministro de proteínas que inducen respuesta de interferón tipo I por medio del T3SS bacteriano y comparación con agonistas moleculares pequeños de STING. El suministro de enzimas que generan dinucleótidos cíclicos conduce a la inducción de IFN tipo I en una línea celular reportera de IFN RAW. Las células reporteras RAW se infectaron con I: *Y. enterocolitica* ΔHOPEMT, o *Y. enterocolitica* ΔHOPEMT que codifica en un plásmido derivado de pBadMycHisA II: $YopE_{1-138}$-cGAS de anémona, III: $YopE_{1-138}$-cGAS $humana_{161-522}$, IV: $YopE_{1-138}$-dominios CARD de RIG1 $murina_{1-218}$). Se realizó una titulación de las bacterias añadidas a las células (V: indicada como MOI), y la estimulación de IFN se evaluó en base a la actividad de la fosfatasa alcalina secretada (VI: OD650) que se encuentra bajo el control del promotor I-ISG54 que comprende el promotor ISG54 inducible por IFN potenciado por un ISRE multimérico.

Figura 37: Suministro de proteínas que inducen respuesta de interferón tipo I por medio del T3SS bacteriano y comparación con agonistas moleculares pequeños de STING. El suministro de un dinucleótido cíclico conduce a la inducción de IFN tipo I en una línea celular reportera de IFN RAW. Las células reporteras RAW se trataron con el agonista molecular pequeño de STING 2'3'-c-di-AM(PS)2 (Rp,Rp). Se realizó una titulación del compuesto (I: indicada como micromolar), y la estimulación de IFN se evaluó en base a la actividad de la fosfatasa alcalina secretada (II: OD650) que se encuentra bajo el control del promotor I-ISG54 que comprende el promotor ISG54 inducible por IFN potenciado por un ISRE multimérico.

Figura 38: Suministro de proteínas que inducen respuesta de interferón tipo I por medio del T3SS bacteriano y prueba de dependencia de T3SS – RIG1 y MAVS. El suministro de dominios CARD de RIG1 o CARD de MAVS fusionados a $YopE_{1-138}$ conduce a la inducción de IFN tipo I en una línea celular reportera de IFN RAW, que es estrictamente dependiente de T3SS. Las células reporteras RAW se infectaron con I: *Y. enterocolitica* ΔHOPEMT, o II: *Y. enterocolitica* ΔHOPEMT-yopB, o *Y. enterocolitica* ΔHOPEMT que codifica en un plásmido derivado de pBadMycHisA III: $YopE_{1-138}$-dominios CARD de RIG1 $murina_{1-246}$, V: $YopE_{1-138}$-CARD de MAVS $humana_{1-100}$ o *Y. enterocolitica* ΔHOPEMT-yopB que codifica en un plásmido derivado de pBadMycHisA IV: $YopE_{1-138}$-dominios CARD de RIG1 $murina_{1-246}$, VI: $YopE_{1-138}$-CARD de MAVS $humana_{1-100}$. Se realizó una titulación de las bacterias añadidas a las células (VII: indicada como MOI) para cada cepa, y la estimulación de IFN se evaluó en base a la actividad de la luciferasa lucia secretada (VIII: OD650) que se encuentra bajo el control del promotor I-ISG54 que comprende el promotor ISG54 inducible por IFN potenciado por un ISRE multimérico.

Figura 39: Suministro de proteínas que inducen respuesta de interferón tipo I por medio del T3SS bacteriano en mezcla celular cruda de aislado de tumor – RIG1. El suministro de dominios CARD de RIG1 fusionados a $YopE_{1-138}$ conduce a la inducción de IFN tipo I en aislado de tumor crudo. Los ratones Balb/C de tipo silvestre con aloinjerto s.c. de células de cáncer de mama EMT6 se sacrificaron cuando el tumor había alcanzado un volumen de >200 mm^3. Los tumores se maceraron, se digirieron y se sembraron como suspensiones de células individuales en placas de 24 pocillos. Tales células de dos tumores diferentes se infectaron con I y III: *Y. enterocolitica* ΔHOPEMT, o II y IV: *Y. enterocolitica* ΔHOPEMT que codifica en un plásmido derivado de pBadMycHisA $YopE_{1-138}$-dominios CARD de RIG1 $murina_{1-246}$. Se realizó una titulación de las bacterias añadidas a las células (V: indicada como MOI) para cada cepa, y la estimulación de IFN se evaluó con el uso de un ELISA de interferón beta (VI: picogramo/mililitro). Las líneas discontinuas indicaban los tumores correspondientes no tratados, I/II y III/IV son cada uno células derivadas del mismo tumor.

Figura 40: Progresión del tumor en ratones Balb/C de tipo silvestre con aloinjerto s.c. de células de cáncer de mama EMT6. Ratones Balb/C de tipo silvestre con aloinjerto s.c. de células de cáncer de mama EMT6 se inyectaron por vía intratumoral con PBS una vez que el tumor había alcanzado un tamaño de 60-130 mm3. El día de la primera inyección intratumoral de PBS se definió como el día 0, los tratamientos se realizaron en d0, d1, d5, d6, d10 y d11. El volumen tumoral se midió en los siguientes días (I: día -11 al día 80 después de la primera inyección de bacterias) con calibres. El volumen tumoral relativo (volumen tumoral en el día correspondiente dividido por el volumen tumoral en el d0) como mm^3, se indica transformado a log-2 (II) para cada ratón.

Figura 41: Progresión del tumor en ratones Balb/C de tipo silvestre con aloinjerto s.c. de células de cáncer de mama EMT6. Ratones Balb/C de tipo silvestre con aloinjerto s.c. de células de cáncer de mama EMT6 se inyectaron por vía intratumoral con $7.5*10^7$ Y. enterocolitica dHOPEMT una vez que el tumor había alcanzado un tamaño de 60-130 mm3. El día de la primera inyección intratumoral de bacterias se definió como el día 0, los tratamientos se realizaron en d0, d1, d5, d6, d10 y d11. El volumen tumoral se midió en los siguientes días (I: día -11 al día 80 después de la primera inyección de bacterias) con calibres. El volumen tumoral relativo (volumen tumoral en el día correspondiente dividido por el volumen tumoral en el d0) como mm^3, se indica transformado a log-2 (II) para cada ratón.

Figura 42: Progresión del tumor en ratones Balb/C de tipo silvestre con aloinjerto s.c. de células de cáncer de mama EMT6. Ratones Balb/C de tipo silvestre con aloinjerto s.c. de células de cáncer de

mama EMT6 se inyectaron por vía intratumoral con $7.5*10^7$ Y. enterocolitica dHOPEMT que codifica en un plásmido derivado de pBadMycHisA $YopE_{1-138}$-dominios CARD de RIG1 $murina_{1-246}$ una vez que el tumor había alcanzado un tamaño de 60-130 mm3. El día de la primera inyección intratumoral de bacterias se definió como el día 0, los tratamientos se realizaron en d0, d1, d5, d6, d10 y d11. El volumen tumoral se midió en los siguientes días (I: día -11 al día 80 después de la primera inyección de bacterias) con calibres. El volumen tumoral relativo (volumen tumoral en el día correspondiente dividido por el volumen tumoral en d0) como mm^3, se indica transformado a log-2 (II) para cada ratón.

Figura 43: Progresión del tumor en ratones Balb/C de tipo silvestre con aloinjerto s.c. de células de cáncer de mama EMT6. Ratones Balb/C de tipo silvestre con aloinjerto s.c. de células de cáncer de mama EMT6 se inyectaron por vía intratumoral con $7.5*10^7$ Y. enterocolitica dHOPEMT que codifica en un plásmido derivado de pBadMycHisA $YopE_{1-138}$-cGAS $humana_{161-522}$ una vez que el tumor había alcanzado un tamaño de 60-130 mm3. El día de la primera inyección intratumoral de bacterias se definió como el día 0, los tratamientos se realizaron en d0, d1, d5, d6, d10 y d11. El volumen tumoral se midió en los siguientes días (I: día -11 al día 80 después de la primera inyección de bacterias) con calibres. El volumen tumoral relativo (volumen tumoral en el día correspondiente dividido por el volumen tumoral en d0) como mm^3, se indica transformado a log-2 (II) para cada ratón.

Figura 44: Progresión del tumor en ratones Balb/C de tipo silvestre reestimulados por vía s.c. en el costado contralateral con células de cáncer de mama EMT6 después de una primera remisión completa. Ratones Balb/C de tipo silvestre con aloinjerto s.c. de células de cáncer de mama EMT6 se trataron como se describió anteriormente (Figura 40-43) por vía intratumoral con $7.5*10^7$ II: Y. enterocolitica dHOPEMT que codifica en un plásmido derivado de pBadMycHisA $YopE_{1-138}$-dominios CARD de RIG1 $murina_{1-246}$, III: Y. enterocolitica dHOPEMT que codifica en un plásmido derivado de pBadMycHisA $YopE_{1-138}$-cGAS $humana_{161-522}$, una vez que el tumor había alcanzado un tamaño de 60-130 mm3. El día de la inyección intratumoral de bacterias se definió como el día 0. Los ratones con una regresión tumoral completa (o I: ratones vírgenes como control) recibieron un aloinjerto s.c. de células de cáncer de mama EMT6 en el costado contralateral. El volumen tumoral se midió en los siguientes días (IV: hasta el día 80 después de la primera inyección de bacterias) con calibres. El volumen tumoral absoluto se indica (V) como mm^3 para cada ratón.

Figura 45: Progresión del tumor en ratones Balb/C de tipo silvestre con aloinjerto s.c. de células de cáncer de mama EMT6. Ratones Balb/C de tipo silvestre con aloinjerto s.c. de células de cáncer de mama EMT6 se inyectaron por vía i.v. con I: PBS, o $5*10^6$ II: Y. enterocolitica dHOPEMT, III: Y. enterocolitica dHOPEMT pYV-$YopE_{1-138}$-$(BH3\ de\ tBID)_2$, IV: Y. enterocolitica dHOPEMT ΔHairpinI-VirF pYV-$YopE_{1-138}$-$(BH3\ de\ tBID)_2$, V: Y. enterocolitica dHOPEMT ΔHairpinI-VirF Δasd pYV-asd-$YopE_{1-138}$-$(BH3\ de\ tBID)_2$ una vez que el tumor había alcanzado un tamaño de 80-250 mm3. El día de la inyección i.v. de bacterias se definió como el día 0, todos los ratones se trataron por vía i.p con Desferal en d-1. El volumen tumoral se midió en los siguientes días (VI: día 0 a día 15 después de la primera inyección de bacterias) con calibres. El volumen tumoral medio se indica (VII) como mm^3.

Figura 46: Progresión del tumor en ratones C57BL/6 de tipo silvestre con aloinjerto s.c. de células de melanoma B16F10. Ratones C57BL/6 de tipo silvestre con aloinjerto s.c. de células de melanoma B16F10 se inyectaron por vía intratumoral con I: PBS, o $7.5*10^7$ II: Y. enterocolitica dHOPEMT, III: que codifica en un plásmido derivado de pBadMycHisA $YopE_{1-138}$-dominios CARD de RIG1 $murina_{1-246}$, IV: Y. enterocolitica dHOPEMT que codifica en un plásmido derivado de pBadMycHisA $YopE_{1-138}$-cGAS $humana_{161-522}$ una vez que el tumor había alcanzado un tamaño de 60-130 mm3. El día de la primera inyección intratumoral de bacterias se definió como el día 0, los tratamientos se realizaron en d0, d1, d2, d3, d6 y d9. El volumen tumoral se midió en los siguientes días (V: días) con calibres. El volumen tumoral medio se indica (VI) como mm^3.

Figura 47: Biodistribución de Y. enterocolitica subsp. palearctica en el modelo de aloinjerto de ratón de melanoma B16F10: puntuación de la apariencia física. I: Días, II: fracción de ratones con una puntuación, III: Y. enterocolitica MRS40 de tipo silvestre, IV: Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T. La flecha indica el día de inyección i.v. de $2x10^5$ bacterias.

Figura 48: Biodistribución de Y. enterocolitica subsp. palearctica en el modelo de aloinjerto de ratón de melanoma B16F10: puntuación de conducta. I: Días, II: fracción de ratones con una puntuación, III: Y. enterocolitica MRS40 de tipo silvestre, IV: Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T. La flecha indica el día de infección i.v. con $2x10^5$ bacterias.

Figura 49: Biodistribución de Y. enterocolitica subsp. palearctica en el modelo de aloinjerto de ratón de melanoma B16F10: pesos de los ratones. El peso de los ratones se evaluó diariamente después de la infección i.v. con bacterias. I: Días, II: peso corporal en gramos, III: Y. enterocolitica

MRS40 de tipo silvestre, IV: Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T. La flecha indica el día de infección i.v. con $2x10^5$ bacterias.

Figura 50: Biodistribución de Y. enterocolitica subsp. palearctica en el modelo de aloinjerto de ratón de melanoma B16F10: biodistribución de Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T. Los recuentos en los órganos en el tiempo indicado se evaluaron mediante la homogeneización de los órganos, la dilución en serie y el recuento de las unidades formadoras de colonias (UFC) resultantes. El día de la inyección i.v. de bacterias se definió como el día 0, todos los ratones se trataron i.p con Desferal en d-1. I: Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T, II:

UFC por gramo de tejido o ml de sangre, III: día 1, IV: día 4, V: sangre, VI: bazo, VII: hígado, VIII: pulmón, IX: tumor. * indica un ratón sin tumor visible.

Figura 51: Biodistribución de Y. enterocolitica subsp. palearctica en el modelo de aloinjerto de ratón de melanoma B16F10: biodistribución de Y. enterocolitica MRS40 de tipo silvestre. Los recuentos en los órganos en el tiempo indicado se evaluaron mediante la homogeneización de los órganos, la dilución en serie y el recuento de las unidades formadoras de colonias (UFC) resultantes. El día de la inyección i.v. de bacterias se definió como el día 0, todos los ratones se trataron i.p con Desferal en d-1. I: Y. enterocolitica MRS40 de tipo silvestre, II: UFC por gramo de tejido o ml de sangre, III: día 1, IV: día 4, V: sangre, VI: bazo, VII: hígado, VIII: pulmón, IX: tumor.

Figura 52: Suministro de proteínas que inducen respuesta de interferón tipo I por medio del T3SS bacteriano – la MAVS suministrada por T3SS bacteriano funciona independiente de la MAVS endógena. El suministro de CARD de MAVS por medio de T3SS conduce a la inducción de IFN tipo I en una línea celular reportera (luciferasa) de IFN de macrófagos RAW $MAVS^{KO}$. Las células reporteras macrófagas RAW $MAVS^{KO}$ se infectaron con I: *Y. enterocolitica* ΔHOPEMT, o II: *Y. enterocolitica* ΔHOPEMT-yopB, III: *Y. enterocolitica* ΔHOPEMT que codifica en un plásmido derivado de pBadMycHisA $YopE_{1-138}$-CARD de MAVS $humana_{1-100}$ o IV: *Y. enterocolitica* ΔHOPEMT-yopB que codifica en un plásmido derivado de pBadMycHisA $YopE_{1-138}$-CARD de MAVS $humana_{1-100}$. Se realizó una titulación de las bacterias añadidas a las células (V: indicada como MOI) para cada cepa, y la estimulación de IFN se evaluó en base a la actividad de luciferasa (VI: RLU – unidades de luminiscencia relativa) que se encuentra bajo el control del promotor I-ISG54 que comprende el promotor ISG54 inducible por IFN potenciado por un ISRE multimérico.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

La presente invención se refiere a cepas bacterianas gramnegativas con virulencia atenuada recombinantes y su uso en un método para tratar el cáncer por ejemplo un tumor sólido maligno en un sujeto.

Con el propósito de interpretar esta descripción, se aplicarán las siguientes definiciones y, cuando sea apropiado, los términos usados en el singular incluirán, además, el plural y viceversa. Debe entenderse que la terminología que se usa en la presente descripción es con el sólo propósito de describir las modalidades particulares y no pretende ser limitante.

El término “cepa bacteriana gramnegativa“ como se usa en la presente descripción incluye las siguientes bacterias: *Aeromonas salmonicida*, *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas veronii*, *Anaeromyxobacter dehalogenans*, *Bordetella bronchiseptica*, *Bordetella parapertussis*, *Bordetella pertussis*, *Bradyrhizobium japonicum*, *Burkholderia cenocepacia*, *Burkholderia cepacia*, *Burkholderia mallei*, *Burkholderia pseudomallei*, *Chlamydia muridarum*, *Chlamydia trachmoatis*, *Chlamydophila abortus*, *Chlamydophila pneumoniae*, *Chromobacterium violaceum*, *Citrobacter rodentium*, *Desulfovibrio vulgaris*, *Edwardsiella tarda*, *Endozoicomonas elysicola*, *Erwinia amylovora*, *Escherichia albertii*, *Escherichia coli*, *Lawsonia intracellularis*, *Mesorhizobium loti*, *Myxococcus xanthus*, *Pantoea agglomerans*, *Photobacterium damselae*, *Photorhabdus luminescens*, *Photorabdus temperate*, *Pseudoalteromonas spongiae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas plecoglossicida*, *Pseudomonas syringae*, *Ralstonia solanacearum*, *Rhizobium sp*, *Salmonella enterica* y otras *Salmonella sp*, *Shigella flexneri* y otras *Shigella sp*, *Sodalis glossinidius*, *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio azureus*, *Vibrio campellii*, *Vibrio caribbenthicus*, *Vibrio harvey*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio tasmaniensis*, *Vibrio tubiashii*, *Xanthomonas axonopodis*, *Xanthomonas campestris*, *Xanthomonas oryzae*, *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia pestis*, *Yersinia pseudotuberculosis*. Las cepas bacterianas gramnegativas preferidas de la invención son cepas bacterianas gramnegativas comprendidas en la familia de *Enterobacteriaceae* y *Pseudomonadaceae*. La cepa bacteriana gramnegativa de la presente invención se usa normalmente para el suministro de proteínas heterólogas por el T3SS bacteriano a células eucariotas *in vitro* y/o *in vivo*, preferentemente *in vivo*.

El término "cepa bacteriana gramnegativa con virulencia atenuada recombinante" como se usa en la presente descripción se refiere a una cepa bacteriana gramnegativa con virulencia atenuada recombinante transformada genéticamente con una molécula de nucleótidos como un vector. La virulencia de una cepa bacteriana gramnegativa recombinante de este tipo usualmente se atenúa mediante la deleción de proteínas efectoras bacterianas que tienen actividad de virulencia que se

transportan por una o más proteínas bacterianas, las que son parte de una maquinaria del sistema de secreción. Tales proteínas efectoras se suministran mediante una maquinaria del sistema de secreción a unas células huésped donde ejercen su actividad de virulencia hacia varias proteínas del huésped y maquinarias celulares. Se conocen muchas proteínas efectoras diferentes, transportadas por varios tipos de sistemas de secreción y que muestran un gran repertorio de actividades bioquímicas que modulan las funciones de moléculas reguladoras del huésped. La virulencia de la cepa bacteriana gramnegativa recombinante usada en la presente descripción puede atenuarse además por la carencia de un sideróforo producido normalmente u ocasionalmente por la cepa bacteriana gramnegativa de manera que la cepa no produce el sideróforo por ejemplo es deficiente en la producción del sideróforo. Por lo tanto en una modalidad preferida se usa una cepa bacteriana gramnegativa con virulencia atenuada recombinante que carece de un sideróforo producido normalmente u ocasionalmente por la cepa bacteriana gramnegativa de manera que la cepa no produce el sideróforo por ejemplo es deficiente en la producción de un sideróforo, con mayor preferencia se usa una cepa de *Yersinia*, en particular *Y. enterocolitica* MRS40 ΔyopH,O,P,E,M,T, *Y. enterocolitica* MRS40 ΔyopH,O,P,E,M,T ΔHairpinI-virF o *Y. enterocolitica* MRS40 ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd pYV-asd que carece de un sideróforo producido normalmente u ocasionalmente por la cepa bacteriana gramnegativa de manera que la cepa no produce el sideróforo por ejemplo es deficiente en la producción de un sideróforo, en particular es deficiente en la producción de Yersiniabactina. La *Y. enterocolitica* MRS40 ΔyopH,O,P,E,M,T que es deficiente en la producción de Yersiniabactina se ha descrito en el documento WO02077249 y se depositó el 24 de septiembre de 2001, de acuerdo con el Tratado de Budapest sobre el Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos a los Propósitos del Procedimiento en materia de Patentes con las Colecciones Coordinadas de Microorganismos de Bélgica (BCCM) y se le proporcionó el número de acceso LMG P-21013. La cepa bacteriana gramnegativa con virulencia atenuada recombinante preferentemente no produce al menos uno, preferentemente al menos dos sideróforos por ejemplo es deficiente en la producción de al menos uno, preferentemente al menos dos sideróforos, con mayor preferencia la cepa bacteriana gramnegativa con virulencia atenuada recombinante no produce ningún sideróforo.

Los términos “sideróforo”, “sideróforo de hierro” o “quelante de hierro” que se usan indistintamente en la presente descripción se refieren a compuestos con alta afinidad por el hierro por ejemplo compuestos pequeños con alta afinidad por el hierro.

Los sideróforos de bacterias gramnegativas son por ejemplo Enterobactina y dihidroxibenzoilserina sintetizadas por *Salmonella*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Shigella*, *Serratia* (pero usadas por todas las enterobacterias), Pioverdinas sintetizadas por *Pseudomonas*, Vibriobactina sintetizada por *Vibrio*, Acinetobactina y Acinetoferrina por *Acinetobacter*, Yersiniabactina y Aerobactina sintetizadas por *Yersinia*, Ornibactina sintetizada por *Burkholderia*, Salmoquelina sintetizada por *Salmonella*, Aerobactina sintetizada por *Escherichia*, *Shigella*, *Salmonella*, y *Yersinia*, Alcaligina sintetizada por *Bordetella*, Bisucaberina sintetizada por *Vibrio*.

Los sideróforos incluyen hidroxamato, catecolato y sideróforos con ligandos mixtos. Varios sideróforos se han aprobado hasta la fecha para el uso en seres humanos, principalmente con el objetivo de tratar la sobrecarga de hierro. Los sideróforos preferidos son Deferoxamina (también conocida como desferrioxamina B, desferoxamina B, DFO-B, DFOA, DFB o desferal), Desferrioxamina E, Deferasirox (Exjade, Desirox, Defrijet, Desifer) y Deferiprona (Ferriprox).

El término "una proteína endógena esencial para el crecimiento" usado en la presente descripción se refiere a proteínas de la cepa bacteriana gramnegativa con virulencia atenuada recombinante sin las que la cepa bacteriana gramnegativa no puede crecer. Las proteínas endógenas esenciales para el crecimiento son por ejemplo una enzima esencial para la producción de aminoácidos, una enzima involucrada en la biosíntesis de péptidoglicanos, una enzima involucrada en la biosíntesis de LPS, una enzima involucrada en la síntesis de nucleótidos o un factor de iniciación de la traducción.

El término "una enzima esencial para la producción de aminoácidos" usado en la presente descripción se refiere a enzimas que se relacionan con la producción de aminoácidos de la cepa bacteriana gramnegativa con virulencia atenuada recombinante y sin las que la cepa bacteriana gramnegativa no puede crecer. Las enzimas esenciales para la producción de aminoácidos, son por ejemplo aspartato-beta-semialdehído deshidrogenasa (asd), glutamina sintetasa (glnA), triptofanil ARNt sintetasa (trpS) o serina hidroximetil transferasa (glyA), o Transcetolasa 1 (tktA), Transcetolasa 2 (tktB), Ribulosa-fosfato 3-epimerasa (rpe), Ribosa-5-fosfato isomerasa A (rpiA), Transaldolasa A (talA), Transaldolasa B (talB), fosforribosilpirofosfato sintasa (prs), ATP fosforribosiltransferasa (hisG), Proteína bifuncional HisIE de la biosíntesis de histidina (hisI), 1-(5-fosforribosil)-5-[(5-fosforribosilamino)metilidenamino] imidazol-4-carboxamida isomerasa (hisA), Subunidad HisH de imidazol glicerol fosfato sintasa (hisH), Subunidad HisF de imidazol glicerol fosfato sintasa (hisF), Proteína bifuncional HisB de la biosíntesis de histidina (hisB), Histidinol-fosfato aminotransferasa (hisC), Histidinol deshidrogenasa (hisD), 3-deshidroquinato sintasa

(aroB), 3-deshidroquinato deshidratasa (aroD), Shikimato deshidrogenasa (NADP(+)) (aroE), Shikimato quinasa 2 (aroL), Shikimato quinasa 1 (aroK), 3-fosfoshikimato 1-carboxiviniltransferasa (aroA), Corismato sintasa (aroC), Proteína P (pheA), Proteína T (tyrA), Aminotransferasa de aminoácidos aromáticos (tyrB), Fosfo-2-deshidro-3-desoxiheptonato aldolasa (aroG), Fosfo-2-deshidro-3-desoxiheptonato aldolasa (aroH), Fosfo-2-deshidro-3-desoxiheptonato aldolasa (aroF), Quinato/shikimato deshidrogenasa (ydiB), 6-fosfofructoquinasa dependiente de ATP isozima 1 (pfkA), 6-fosfofructoquinasa dependiente de ATP isozima 2 (pfkB), Fructosa-bisfosfato aldolasa clase 2 (fbaA), Fructosa-bisfosfato aldolasa clase 1 (fbaB), Triosafosfato isomerasa (tpiA), Piruvato quinasa I (pykF), Piruvato quinasa II (pykA), Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa A (gapA), Fosfoglicerato quinasa (pgk), Fosfoglicerato mutasa dependiente de 2,3-bisfosfoglicerato (gpmA), Fosfoglicerato mutasa independiente de 2,3-bisfosfoglicerato (gpmM/yibO), Fosfoglicerato mutasa probable (ytjC/gpmB), Enolasa (eno), D-3-fosfoglicerato deshidrogenasa (serA), Fosfoserina aminotransferasa (serC), Fosfoserina fosfatasa (serB), L-serina deshidratasa 1 (sdaA), L-serina deshidratasa 2 (sdaB), L-treonina deshidratasa catabólica (tdcB), L-treonina deshidratasa biosintética (ilvA), L-serina deshidratasa (tdcG), Serina acetiltransferasa (cysE), Cisteína sintasa A (cysK), Cisteína sintasa B (cysM), beta-cistationasa (malY), Cistationina beta-liasa (metC), 5-metiltetrahidropteroiltriglutamato-homocisteína metiltransferasa (metE), Metionina sintasa (metH), S-adenosilmetionina sintasa (metK), Cistationina gamma-sintasa (metB), Homoserina O-succiniltransferasa (metA), 5'-metiltioadenosina/S-adenosilhomocisteína nucleosidasa (mtnN), S-ribosilhomocisteína liasa (luxS), Cistatión beta liasa, Cistatión gamma liasa, Serina hidroximetiltransferasa (glyA), Glicina hidroximetiltransferasa (itaE), Subunidad pequeña de 3-isopropilmalato deshidratasa (leuD), Subunidad grande de 3-isopropilmalato deshidratasa (leuC), 3-isopropilmalato deshidrogenasa (leuB), L-treonina deshidratasa biosintética (ilvA), Subunidad grande de acetolactato sintasa isozima 3 (ilvI), Subunidad pequeña de acetolactato sintasa isozima 3 (ilvH), Subunidad pequeña de acetolactato sintasa isozima 1 (ilvN), Subunidad pequeña de acetolactato sintasa isozima 2 (ilvM), Cetoácido reductoisomerasa (NADP(+)) (ilvC), Dihidroxiácido deshidratasa (ilvD), Aminotransferasa de aminoácidos de cadena ramificada (ilvE), Aspartoquinasa/homoserina deshidrogenasa 1 bifuncional (thrA), Aspartoquinasa/homoserina deshidrogenasa 2 bifuncional (metL), 2-isopropilmalato sintasa (leuA), Glutamato-piruvato aminotransferasa (alaA), Aspartato aminotransferasa (aspC), Aspartoquinasa/homoserina deshidrogenasa 1 bifuncional (thrA), Aspartoquinasa/homoserina deshidrogenasa 2 bifuncional (metL), Aspartoquinasa 3 sensible a lisina (lysC), aspartato-

semialdehído deshidrogenasa (asd), 2-ceto-3-desoxi-galactonato aldolasa (yagE), 4-hidroxi-tetrahidrodipicolinato sintasa (dapA), 4-hidroxi-tetrahidrodipicolinato reductasa (dapB), 2,3,4,5-tetrahidropiridina-2,6-dicarboxilato N-succiniltransferasa (dapD), Succinil-diaminopimelato desuccinilasa (dapE), Diaminopimelato epimerasa (dapF), Liasa putativa (yjhH), Acetilornitina/succinildiaminopimelato aminotransferasa (argD), Citrato sintasa (gltA), Aconitato hidratasa B (acnB), Aconitato hidratasa A (acnA), Aconitato hidratasa putativa no caracterizada (ybhJ), Isocitrato deshidrogenasa (icd), Aspartato aminotransferasa (aspC), Glutamato-piruvato aminotransferasa (alaA), Glutamato sintasa [NADPH] cadena grande (gltB), Glutamato sintasa [NADPH] cadena pequeña (gltD), Glutamina sintetasa (glnA), Acetiltransferasa de aminoácidos (argA), Acetilglutamato quinasa (argB), N-acetil-gamma-glutamil-fosfato reductasa (argC), Acetilornitina/succinildiaminopimelato aminotransferasa (argD), Acetilornitina desacetilasa (argE), Ornitina carbamoiltransferasa cadena F (argF), Ornitina carbamoiltransferasa cadena I (argI), Argininosuccinato sintasa (argG), Argininosuccinato liasa (argH), Glutamato 5-quinasa (proB), Gamma-glutamil fosfato reductasa (proA), Pirrolino-5-carboxilato reductasa (proC), Ornitina ciclodesaminasa, Leucina-ARNt ligasa (leuS), Glutamina-ARNt ligasa (glnS), Serina-ARNt ligasa (serS), Subunidad beta de glicina-ARNt ligasa (glyS), Subunidad alfa de glicina-ARNt ligasa (glyQ), Tirosina-ARNt ligasa (tyrS), Treonina-ARNt ligasa (thrS), Subunidad alfa de fenilalanina-ARNt ligasa (pheS), Subunidad beta de fenilalanina-ARNt ligasa (pheT), Arginina-ARNt ligasa (argS), Histidina-ARNt ligasa (hisS), Valina-ARNt ligasa (valS), Alanina-ARNt ligasa (alaS), Isoleucina-ARNt ligasa (ileS), Prolina-ARNt ligasa (proS), Cisteína-ARNt ligasa (cysS), Asparagina-ARNt ligasa (asnS), Aspartato-ARNt ligasa (aspS), Glutamato-ARNt ligasa (gltX), Triptófano-ARNt ligasa (trpS), Subunidad beta de glicina-ARNt ligasa (glyS), Metionina-ARNt ligasa (metG), Lisina-ARNt ligasa (lysS). Las enzimas esenciales preferidas para la producción de aminoácidos son tktA, rpe, prs, aroK, tyrB, aroH, fbaA, gapA, pgk, eno, tdcG, cysE, metK, glyA, asd, dapA/B/D/E/F, argC, proC, leuS, glnS, serS, glyS/Q, tyrS, thrS, pheS/T, argS, hisS, valS, alaS, ileS, proS, cysS, asnS, aspS, gltX, trpS, glyS, metG, lysS, las de mayor preferencia son asd, glyA, leuS, glnS, serS, glyS/Q, tyrS, thrS, pheS/T, argS, hisS, valS, alaS, ileS, proS, cysS, asnS, aspS, gltX, trpS, glyS, metG, lysS, la de máxima preferencia es asd.

Los términos “cepa bacteriana gramnegativa deficiente en la producción de un aminoácido esencial para el crecimiento” y “mutante auxotrófico” se usan indistintamente en la presente descripción y se refieren a cepas bacterianas gramnegativas que no pueden crecer en ausencia de al menos un aminoácido esencial proporcionado de manera exógena o un precursor de este. El aminoácido que

la cepa es deficiente en producir es por ejemplo aspartato, ácido meso-2,6-diaminopimélico, aminoácidos aromáticos o leucina-arginina. Una cepa de este tipo puede generarse por ejemplo mediante la deleción del gen de la aspartato-beta-semialdehído deshidrogenasa (Δasd). Un mutante auxotrófico de este tipo no puede crecer en ausencia de ácido meso-2,6-diaminopimélico exógeno. La mutación, por ejemplo la deleción del gen de la aspartato-beta-semialdehído deshidrogenasa se prefiere en la presente descripción para una cepa bacteriana gramnegativa deficiente en la producción de un aminoácido esencial para el crecimiento de la presente invención.

El término "cepa bacteriana gramnegativa deficiente en la producción de proteínas de adhesión que se unen a la superficie celular o a la matriz extracelular eucariota" se refiere a cepas bacterianas gramnegativas mutantes que no expresan al menos una proteína de adhesión en comparación con las proteínas de adhesión expresadas por la cepa de tipo silvestre correspondiente. Las proteínas de adhesión pueden incluir por ejemplo moléculas de adhesión poliméricas extendidas como pili/fimbrias o adhesinas no fimbriales. Las adhesinas fimbriales incluyen pili tipo-1 (tal como Fim-pili de *E. coli* con la adhesina FimH), P-pili (tal como Pap-pili con la adhesina PapG de *E. coli*), pili tipo 4 (como la proteína pilina de por ejemplo *P. aeruginosa*) o curli (proteínas Csg con la adhesina CsgA de *S. enterica*). Las adhesiones no fimbriales incluyen adhesinas autotransportadoras triméricas tales como YadA de *Y. enterocolitica*, BpaA (*B. pseudomallei*), Hia (*H. influenzae*), BadA (*B. henselae*), NadA *(N. meningitidis*) o UspA1 (*M. catarrhalis*) así como otras adhesinas autotransportadoras tales como AIDA-1 (*E. coli*) así como otras adhesinas/invasinas tales como InvA de *Y. enterocolitica* o Intimina (*E. coli*) o miembros de la familia Dr o la familia Afa (*E. coli*). Los términos YadA e InvA como se usa en la presente descripción se refieren a proteínas de *Y. enterocolitica*. El autotransportador YadA [7] se une a diferentes formas de colágeno así como a fibronectina, mientras que la invasina InvA [8] se une a β-integrinas en la membrana celular eucariota. Si la cepa bacteriana gramnegativa es una cepa de *Y. enterocolitica* la cepa es preferentemente deficiente en InvA y/o YadA.

Como se usa en la presente descripción, el término "familia de *Enterobacteriaceae*" comprende una familia de bacterias gramnegativas, en forma de bastoncillo, anaerobias facultativas que se encuentran en suelo, agua, plantas, y animales, que frecuentemente aparecen como patógenos en vertebrados. Las bacterias de esta familia comparten una fisiología similar y demuestran una conservación dentro de elementos funcionales y genes de los genomas respectivos. Así como son oxidasa negativos, todos los miembros de esta familia son fermentadores de glucosa y la mayoría reducen nitratos.

Las bacterias *Enterobacteriaceae* de la invención pueden ser cualquiera de las bacterias de esa familia, e incluye específicamente, pero no se limita a, bacterias de los siguientes géneros: *Escherichia, Shigella, Edwardsiella, Salmonella, Citrobacter, Klebsiella, Enterobacter, Serratia, Proteus, Erwinia, Morganella, Providencia,* o *Yersinia*. En modalidades más específicas, la bacteria es de la especie *Escherichia coli, Escherichia blattae, Escherichia fergusonii, Escherichia hermanii, Escherichia vuneris, Salmonella enterica, Salmonella bongori, Shigella dysenteriae, Shigella flexneri, Shigella boydii, Shigella sonnei, Enterobacter aerogenes, Enterobacter gergoviae, Enterobacter sakazakii, Enterobacter cloacae, Enterobacter agglomerans, Klebsiella pneumoniae, Klebsiella oxytoca, Serratia marcescens, Yersinia pseudotuberculosis, Yersinia pestis, Yersinia enterocolitica, Erwinia amylovora, Proteus mirabilis, Proteus vulgaris, Proteus penneri, Proteus hauseri, Providencia alcalifaciens,* o *Morganella morganii.*

Preferentemente la cepa bacteriana gramnegativa se selecciona del grupo que consiste en los géneros *Yersinia, Escherichia, Salmonella, Shigella, Pseudomonas, Chlamydia, Erwinia, Pantoea, Vibrio, Burkholderia, Ralstonia, Xanthomonas, Chromobacterium, Sodalis, Citrobacter, Edwardsiella, Rhizobiae, Aeromonas, Photorhabdus, Bordetella* y *Desulfovibrio,* con mayor preferencia del grupo que consiste en los géneros *Yersinia, Escherichia, Salmonella,* y *Pseudomonas,* con la máxima preferencia del grupo que consiste en los géneros *Yersinia* y *Salmonella*, en particular *Yersinia*.

El término "*Yersinia*" como se usa en la presente descripción incluye todas las especies de *Yersinia,* que incluyen *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia pseudotuberculosis* y *Yersinia pestis.* Se prefiere la *Yersinia enterocolitica*.

El término "*Salmonella*" como se usa en la presente descripción incluye todas las especies de *Salmonella*, que incluyen *Salmonella enterica* y *S. bongori*. Se prefiere la *Salmonella enterica*.

”Promotor” como se usa en la presente descripción se refiere a una secuencia de ácido nucleico que regula la expresión de una unidad transcripcional. Una “región promotora” es una región reguladora capaz de unirse a la ARN polimerasa en una célula e iniciar la transcripción de una secuencia codificante corriente abajo (dirección 3'). Dentro de la región promotora se encontrará un sitio de iniciación de la transcripción (definido convenientemente mediante el mapeo con nucleasa S1), así como dominios de unión a proteínas (secuencias consenso) responsables de la unión de la ARN polimerasa tal como la región -35 putativa y la caja Pribnow. El término “unido operativamente" cuando describe la relación entre dos regiones de nucleótidos por ejemplo ADN significa simplemente que están relacionadas funcionalmente entre sí y que se ubican en el mismo

fragmento de ácido nucleico. Un promotor está unido operativamente a un gen estructural si controla la transcripción del gen y se ubica en el mismo fragmento de ácido nucleico que el gen. Usualmente el promotor es funcional en dicha cepa bacteriana gramnegativa, es decir el promotor es capaz de expresar la proteína de fusión de la presente invención, es decir el promotor es capaz de expresar la proteína de fusión de la presente invención sin modificación genética adicional o expresión de proteínas adicionales. Además, un promotor funcional no debe regularse naturalmente de manera opuesta al T3SS bacteriano.

El término “elemento genético extracromosómico” usado en la presente descripción se refiere a un elemento genético distinto a un cromosoma que se alberga de manera endógena en la cepa bacteriana gramnegativa de la presente invención tal como un plásmido de virulencia o que es un elemento genético exógeno con el que se transforma la cepa bacteriana gramnegativa y que se integra de manera transitoria o de manera estable en el cromosoma o en un elemento genético distinto a un cromosoma que se alberga de manera endógena tal como un plásmido de virulencia. Un elemento genético extracromosómico de este tipo puede ser un vector como un vector de expresión, un vector para la recombinación homóloga u otra integración en el cromosoma o en un elemento genético distinto a un cromosoma que se alberga de manera endógena tal como un plásmido de virulencia, fragmentos de ADN para la recombinación homóloga u otra integración en el cromosoma o en un elemento genético distinto a un cromosoma que se alberga de manera endógena tal como un plásmido de virulencia o un elemento de ARN que guía la inserción específica en el cromosoma o en un elemento genético distinto a un cromosoma que se alberga de manera endógena tal como un plásmido de virulencia, tal como CRISPR/Cas9 y ARN guías relacionados.

El término "región termosensora de ARN" usado en la presente descripción se refiere a una secuencia de ARN no codificante sensible a la temperatura, que regula la expresión génica de genes relacionados. Usualmente las regiones termosensoras de ARN funcionan mediante la formación de una estructura secundaria como una horquilla y lazo de ARN, que se forma de manera estable a una temperatura de represión e inestable a una temperatura permisiva, y que enmascara una secuencia de ARN esencial para la traducción tal como un sitio de unión al ribosoma, lo que regula de este modo la expresión de un gen relacionado con dicha secuencia de ARN esencial para la traducción.

El término "estructura en horquilla de ARN o partes de esta" usado en la presente descripción se refiere a una estructura secundaria del ARN formada por apareamiento intramolecular de bases que

conduce a una estructura de tallo y lazo. El apareamiento intramolecular de bases, generalmente dentro de la misma cadena de ARN, se forma debido a secuencias de nucleótidos complementarias o partes de estas.

El término "proteína de unión al ADN del tipo AraC", también referida como familia AraC/XylS, usado en la presente descripción se refiere a proteínas de regulación de la transcripción bacteriana que se unen al ADN a través de un motivo hélice-giro-hélice. La mayoría de los miembros de las proteínas de unión al ADN del tipo AraC son reguladores transcripcionales positivos, y pueden caracterizarse por un dominio mínimo de unión al ADN que se extiende en un segmento de 100 residuos que contiene dos subdominios hélice-giro-hélice. Las proteínas de unión al ADN del tipo AraC incluyen específicamente, pero no se limitan a: VirF, LcrF, YbtA, Rns, MxiE, AraC, XylS, ExsA, PerA, MmsR, RhaS, TcpN, HrpX, HrpB, GadX, HilC, HilD, MarA, CafR, FapR e InvF. Se prefieren las proteínas de unión al ADN del tipo AraC involucradas en la regulación de mecanismos relevantes de virulencia, tales como VirF, LcrF, YbtA, Rns, MxiE, ExsA, PerA, HrpX, HrpB, GadX, HilC, HilD, TcpN, CafR, FapR e InvF. Las de mayor preferencia son las proteínas de unión al ADN del tipo AraC involucradas en la regulación de la actividad del sistema de secreción tipo tres como VirF, LcrF, MxiE, ExsA, PerA, HrpX, HrpB, GadX, HilC, HilD e InvF, las de máxima preferencia son VirF y/o LcrF.

El término "suministro" usado en la presente descripción se refiere a la transportación de una proteína de una cepa bacteriana gramnegativa con virulencia atenuada recombinante a una célula eucariota, que incluye las etapas de expresar la proteína heteróloga en la cepa bacteriana gramnegativa con virulencia atenuada recombinante, secretar la(s) proteína(s) expresada(s) desde tal cepa bacteriana gramnegativa con virulencia atenuada recombinante y translocar la(s) proteína(s) secretada(s) por dicha cepa bacteriana gramnegativa con virulencia atenuada recombinante al citosol de la célula eucariota. En consecuencia, los términos "señal de suministro" o “señal de secreción” que se usan indistintamente en la presente descripción se refieren a una secuencia polipeptídica que puede ser reconocida por el sistema de secreción y translocación de la cepa bacteriana gramnegativa y dirige el suministro de una proteína de la cepa bacteriana gramnegativa a células eucariotas.

El término "señal de suministro de una proteína efectora bacteriana” usado en la presente descripción se refiere a una señal de suministro de una proteína efectora bacteriana funcional en la cepa bacteriana gramnegativa recombinante, es decir que permite la secreción de una proteína heteróloga expresada en la cepa bacteriana gramnegativa recombinante desde dicha cepa

bacteriana gramnegativa recombinante mediante un sistema de secreción tal como el sistema de secreción tipo III, tipo IV o tipo VI o la translocación por dicha cepa bacteriana gramnegativa recombinante al citosol de una célula eucariota mediante un sistema de secreción tal como el sistema de secreción tipo III, tipo IV o tipo VI. El término "señal de suministro de una proteína efectora bacteriana" usado en la presente descripción comprende además un fragmento de una señal de suministro de una proteína efectora bacteriana es decir versiones más cortas de una señal de suministro por ejemplo una señal de suministro que comprende hasta 10, preferentemente hasta 20, con mayor preferencia hasta 50, aun con mayor preferencia hasta 100, en particular hasta 140 aminoácidos de una señal de suministro por ejemplo de una señal de suministro de origen natural. Por lo tanto una secuencia de nucleótidos tal como por ejemplo una secuencia de ADN que codifica una señal de suministro de una proteína efectora bacteriana puede codificar una señal de suministro de longitud completa o un fragmento de esta en donde el fragmento usualmente comprende usualmente hasta 30, preferentemente hasta 60, con mayor preferencia hasta 150, aun con mayor preferencia hasta 300, en particular hasta 420 ácidos nucleicos.

Como se usa en la presente descripción, la "secreción" de una proteína se refiere a la transportación de una proteína heteróloga al exterior a través de la membrana celular de una cepa bacteriana gramnegativa con virulencia atenuada recombinante. La "translocación" de una proteína se refiere a la transportación de una proteína heteróloga desde una cepa bacteriana gramnegativa con virulencia atenuada recombinante a través de la membrana plasmática de una célula eucariota al citosol de dicha célula eucariota.

El término "proteína bacteriana, que es parte de una maquinaria del sistema de secreción" como se usa en la presente descripción se refiere a proteínas bacterianas que constituyen componentes esenciales del sistema de secreción tipo 3 (T3SS), el sistema de secreción tipo 4 (T4SS) y el sistema de secreción tipo 6 (T6SS) bacterianos, preferentemente T3SS. Sin tales proteínas, el sistema de secreción respectivo no es funcional en la translocación de proteínas a células huésped, incluso si el resto de los componentes del sistema de secreción y la proteína efectora bacteriana a translocar se codifican y producen.

El término "proteína efectora bacteriana" como se usa en la presente descripción se refiere a proteínas bacterianas transportadas por sistemas de secreción por ejemplo por proteínas bacterianas, las que son parte de una maquinaria del sistema de secreción a células huésped. Tales proteínas efectoras se suministran mediante un sistema de secreción a una célula huésped donde ejercen por ejemplo actividad de virulencia hacia varias proteínas y maquinarias celulares del

huésped. Se conocen muchas proteínas efectoras diferentes, transportadas por varios tipos de sistemas de secreción y que muestran un gran repertorio de actividades bioquímicas que modulan las funciones de moléculas reguladoras del huésped. Los sistemas de secreción incluyen el sistema de secreción tipo 3 (T3SS), el sistema de secreción tipo 4 (T4SS) y el sistema de secreción tipo 6 (T6SS). Algunas proteínas efectoras (como IpaC de *Shigella flexneri*) también pertenecen a la clase de proteína bacteriana, las que son parte de una maquinaria del sistema de secreción y permiten la translocación de proteínas. La cepa bacteriana gramnegativa con virulencia atenuada recombinante usada en la presente descripción usualmente comprende proteínas bacterianas que constituyen componentes esenciales del sistema de secreción tipo 3 (T3SS), el sistema de secreción tipo 4 (T4SS) y/o el sistema de secreción tipo 6 (T6SS) bacterianos, preferentemente del sistema de secreción tipo 3 (T3SS). El término "proteínas bacterianas que constituyen componentes esenciales del T3SS bacteriano" como se usa en la presente descripción se refiere a proteínas, que forman naturalmente el inyectisoma por ejemplo la aguja de inyección o de cualquier otra manera son esenciales para su función en la translocación de proteínas a células eucariotas. Las proteínas que forman el inyectisoma o de cualquier otra manera son esenciales para su función en la translocación de proteínas a células eucariotas incluyen, pero no se limitan a:

SctC, YscC, MxiD, InvG, SsaC, EscC, HrcC, HrcC (Secretina), SctD, YscD, MxiG, Prg, SsaD, EscD, HrpQ, HrpW, FliG (Proteína del anillo de MS exterior), SctJ, YscJ, MxiJ, PrgK, SsaJ, EscJ, HrcJ, HrcJ, FliF (Proteína del anillo de MS interior), SctR, YscR, Spa24, SpaP, SpaP, SsaR, EscR, HrcR, HrcR, FliP (Proteína del aparato de exportación menor), SctS, YscS, Spa9 (SpaQ), SpaQ, SsaS, EscS, HrcS, HrcS, FliQ (Proteína del aparato de exportación menor), SctT, YscT, Spa29 (SpaR), SpaR, SsaT, EscT, HrcT, HrcT, FliR (Proteína del aparato de exportación menor), SctU, YscU, Spa40, SpaS, SpaS, SsaU, EscU, HrcU, HrcU, FlhB (Proteína de intercambio del aparato de exportación), SctV, YscV, MxiA, InvA, SsaV, EscV, HrcV, HrcV, FlhA (Proteína del aparato de exportación mayor), SctK, YscK, MxiK, OrgA, HrpD (Proteína citosólica auxiliar), SctQ, YscQ, Spa33, SpaO, SpaO, SsaQ, EscQ, HrcQA+B, HrcQ, FliM + FliN (Proteína del anillo C), SctL, YscL, MxiN, OrgB, SsaK, EscL, Orf5, HrpE, HrpF, FliH (Stator), SctN, YscN, Spa47, SpaL, InvC, SsaN, EscN, HrcN, HrcN, FliI (ATPasa), SctO, YscO, Spa13, SpaM, InvI, SsaO, Orf15, HrpO, HrpD, FliJ (Apilamiento), SctF, YscF, MxiH, PrgI, SsaG, EscF, HrpA, HrpY (Proteína de filamento de la aguja), SctI, YscI, MxiI, PrgJ, SsaI, EscI, rOrf8, HrpB, HrpJ, (Proteína de tallo interno), SctP, YscP, Spa32, SpaN, InvJ, SsaP, EscP, Orf16, HrpP, HpaP, FliK (Regulador de la longitud de la aguja), LcrV, IpaD, SipD (Translocador hidrofílico, proteína de la punta de la

aguja), YopB, IpaB, SipB, SseC, EspD, HrpK, PopF1, PopF2 (Translocador hidrofóbico, proteína del poro), YopD, IpaC, SipC, SseD, EspB (Translocador hidrofóbico, proteína del poro), YscW, MxiM, InvH (Pilotina), SctW, YopN, MxiC, InvE, SsaL, SepL, HrpJ, HpaA (Guardiana).

El término "proteína efectora del T6SS" o "proteína efectora del T6SS bacteriano" como se usa en la presente descripción se refiere a proteínas que se inyectan naturalmente mediante sistemas T6S al citosol de células eucariotas o bacterias y a proteínas secretadas naturalmente por sistemas T6S que podrían por ejemplo formar poros de translocación a la membrana eucariota. El término "proteína efectora del T4SS" o "proteína efectora del T4SS bacteriano" como se usa en la presente descripción se refiere a proteínas que se inyectan naturalmente mediante sistemas T4S al citosol de células eucariotas y a proteínas secretadas naturalmente por sistemas T4S que podrían por ejemplo formar el poro de translocación a la membrana eucariota.

El término "proteína efectora del T3SS" o "proteína efectora del T3SS bacteriano" como se usa en la presente descripción se refiere a proteínas que se inyectan naturalmente mediante sistemas T3S al citosol de células eucariotas y a proteínas secretadas naturalmente por sistemas T3S que podrían por ejemplo formar el poro de translocación a la membrana eucariota (que incluyen translocadores formadores de poros (como YopB y YopD de *Yersinia*) y proteínas de la punta como LcrV de *Yersinia*). Preferentemente se usan proteínas que se inyectan naturalmente mediante sistemas T3S al citosol de células eucariotas. Estos factores de virulencia paralizarán o reprogramarán la célula eucariota para el beneficio del patógeno. Los efectores del T3S muestran un gran repertorio de actividades bioquímicas y modulan la función de moléculas reguladoras del huésped cruciales e incluyen AvrA, AvrB, AvrBs2, AvrBS3, AvrBsT, AvrD, AvrD1, AvrPphB, AvrPphC, AvrPphEPto, AvrPpiBPto, AvrPto, AvrPtoB, AvrRpm1, AvrRpt2, AvrXv3, CigR, EspF, EspG, EspH, EspZ, ExoS, ExoT, GogB, GtgA, GtgE, la familia de proteínas GALA, HopAB2, HopAO1, HopI1, HopM1, HopN1, HopPtoD2, HopPtoE, HopPtoF, HopPtoN, HopU1, HsvB, IcsB, IpaA, IpaB, IpaC, IpaH, IpaH7.8, IpaH9.8, IpgB1, IpgB2, IpgD, LcrV, Map, OspC1, OspE2, OspF, OspG, OspI, PipB, PipB2, PopB, PopP2, PthXo1, PthXo6, PthXo7, SifA, SifB, SipA/SspA, SipB, SipC/SspC, SipD/SspD, SlrP, SopA, SopB/SigD, SopD, SopE, SopE2, SpiC/SsaB, SptP, SpvB, SpvC, SrfH, SrfJ, Sse, SseB, SseC, SseD, SseF, SseG, SseI/SrfH, SseJ, SseK1, SseK2, SseK3, SseL, SspH1, SspH2, SteA, SteB, SteC, SteD, SteE, TccP2, Tir, VirA, VirPphA, VopF, XopD, YopB, YopD YopE, YopH, YopJ, YopM, YopO, YopP, YopT, YpkA.

El término "cepa bacteriana gramnegativa con virulencia atenuada recombinante que se acumula en un tumor sólido maligno" o “la cepa bacteriana gramnegativa con virulencia atenuada

recombinante se acumula en un tumor sólido maligno" como se usa en la presente descripción se refiere a una cepa bacteriana gramnegativa con virulencia atenuada recombinante que se replica dentro de un tumor sólido maligno lo que aumenta de este modo el recuento bacteriano de esta cepa bacteriana gramnegativa con virulencia atenuada recombinante dentro del tumor sólido maligno. Sorprendentemente se ha descubierto que la cepa bacteriana gramnegativa con virulencia atenuada recombinante después de la administración al sujeto se acumula específicamente en el tumor sólido maligno es decir se acumula específicamente en el órgano donde está presente el tumor maligno, en donde los recuentos bacterianos de la cepa bacteriana gramnegativa con virulencia atenuada recombinante en los órganos donde no está presente el tumor sólido maligno son bajos o no detectables.

En el caso de bacterias que residen de manera extracelular como *Yersinia*, la bacteria se acumula principalmente dentro del espacio intercelular formado entre las células tumorales. Las bacterias de crecimiento intracelular como *Salmonella* invadirán principalmente las células tumorales y residirán dentro de tales células, si bien aún podrían aparecer acumulaciones extracelulares. Los recuentos bacterianos de la cepa bacteriana gramnegativa con virulencia atenuada recombinante acumulada dentro del tumor sólido maligno pueden estar por ejemplo en el intervalo de 10^4 a 10^9 bacterias por gramo de tejido tumoral.

El término "cáncer" usado en la presente descripción se refiere a una enfermedad en la que células anormales se dividen sin control y pueden invadir los tejidos vecinos. Las células cancerosas pueden propagarse además a otras partes del cuerpo a través de los sistemas vascular y linfático. Existen varios tipos principales de cáncer. El carcinoma es un cáncer que comienza en la piel o en tejidos que revisten o cubren a los órganos internos. El sarcoma es un cáncer que comienza en el hueso, cartílago, grasa, músculo, vasos sanguíneos, u otro tejido conectivo o de soporte. La leucemia es un cáncer que comienza en tejido formador de sangre, tal como la médula ósea, y causa la producción de grandes cantidades de células sanguíneas anormales y su entrada a la sangre. El linfoma y el mieloma múltiple son cánceres que comienzan en las células del sistema inmunitario. Los cánceres del sistema nervioso central son cánceres que comienzan en los tejidos del cerebro y la médula espinal. El término "cáncer" usado en la presente descripción comprende tumores sólidos es decir tumores sólidos malignos tales como por ejemplo sarcomas, carcinomas, y linfomas y tumores no sólidos tales como por ejemplo leucemias (cánceres de la sangre). Se prefieren los tumores sólidos malignos.

El término "tumor sólido maligno" o “indicio de tumor sólido maligno” usado en la presente descripción se refiere a una masa anormal de tejido que usualmente no contiene quistes o áreas líquidas. Los tumores sólidos pueden ser benignos (no cancerosos), o malignos (cáncer). Los tumores sólidos malignos se tratan con los métodos de la presente invención. Los diferentes tipos de tumores sólidos malignos se nombran por el tipo de células que los forman. Los ejemplos de tumores sólidos malignos son sarcomas, carcinomas, y linfomas. Las leucemias (cánceres de la sangre) generalmente no forman tumores sólidos malignos (definición de acuerdo con el Instituto nacional del cáncer del NIH). Los tumores sólidos malignos incluyen, pero no se limitan a, masa anormal de células que pueden originarse a partir de diferentes tipos de tejido tales como hígado, colon, colorrectal, piel, mama, páncreas, cuello uterino, cuerpo del útero, vejiga, vesícula, riñón, laringe, labio, cavidad oral, esófago, ovario, próstata, estómago, testículo, glándula tiroides o pulmón y por lo tanto incluyen tumores sólidos malignos de hígado, colon, colorrectal, piel, mama, páncreas, cuello uterino, cuerpo del útero, vejiga, vesícula, riñón, laringe, labio, cavidad oral, esófago, ovario, próstata, estómago, testículo, glándula tiroides o pulmón. Los tumores sólidos malignos preferidos que pueden tratarse con los métodos de la presente invención son tumores sólidos malignos que se originan a partir de piel, mama, hígado, páncreas, vejiga, próstata y colon y por lo tanto incluyen tumores sólidos malignos de piel, mama, hígado, páncreas, vejiga, próstata y colon. Los tumores sólidos malignos igualmente preferidos que pueden tratarse con los métodos de la presente invención son tumores sólidos malignos asociados con cáncer de hígado, tal como carcinoma hepatocelular.

El término "proteína efectora bacteriana que es virulenta hacia células eucariotas" como se usa en la presente descripción se refiere a proteínas efectoras bacterianas, que se transportan mediante sistemas de secreción a células huésped donde ejercen su actividad de virulencia hacia varias proteínas y maquinarias celulares del huésped. Se conocen muchas proteínas efectoras diferentes, transportadas por varios tipos de sistemas de secreción y que muestran un gran repertorio de actividades bioquímicas que modulan las funciones de moléculas reguladoras del huésped. Los sistemas de secreción incluyen el sistema de secreción tipo 3 (T3SS), el sistema de secreción tipo 4 (T4SS) y el sistema de secreción tipo 6 (T6SS). Lo que es más importante, algunas proteínas efectoras que son virulentas hacia células eucariotas (como IpaC de *Shigella flexneri*) también pertenecen a la clase de proteínas bacterianas, las que son parte de una maquinaria del sistema de secreción. En caso que la proteína efectora bacteriana que es virulenta hacia células eucariotas también sea esencial para la función de la maquinaria de secreción, dicha proteína se excluye de

esta definición. Las proteínas efectoras del T3SS que son virulentas hacia células eucariotas se refieren a proteínas como YopE, YopH, YopJ, YopM, YopO, YopP, YopT de *Y. enterocolitica* u OspF, IpgD, IpgB1 de *Shigella flexneri* o SopE, SopB, SptP de *Salmonella enterica* o ExoS, ExoT, ExoU, ExoY de *P. aeruginosa* o Tir, Map, EspF, EspG, EspH, EspZ de *E. coli*. Las proteínas efectoras del T4SS que son virulentas hacia células eucariotas se refieren a proteínas como LidA, SidC, SidG, SidH, SdhA, SidJ, SdjA, SdeA, SdeA, SdeC, LepA, LepB, WipA, WipB, YlfA, YlfB, VipA, VipF, VipD, VpdA, VpdB, DrrA, LegL3, LegL5, LegL7, LegLC4, LegLC8, LegC5, LegG2, Ceg10, Ceg23, Ceg29 de *Legionella pneumophila* o BepA, BepB, BepC, BepD, BepE, BepF BepG de *Bartonella henselae* o VirD2, VirE2, VirE3, VirF de *Agrobacterium tumefaciens* o CagA de *H. pylori* o la toxina pertussis de *Bordetella pertussis*. Las proteínas efectoras del T6SS que son virulentas hacia células eucariotas se refieren a proteínas como las proteínas VgrG de *Vibrio cholerae* (como VgrG1).

El término "proteína efectora del T3SS que es virulenta hacia células eucariotas" o "proteína efectora del T3SS bacteriano que es virulenta hacia células eucariotas" como se usa en la presente descripción se refiere a proteínas que se inyectan naturalmente mediante sistemas T3S al citosol de células eucariotas y a proteínas secretadas naturalmente por sistemas T3S que podrían por ejemplo formar el poro de translocación a la membrana eucariota, que son factores de virulencia hacia células eucariotas es decir a proteínas que paralizan o reprograman la célula eucariota para el beneficio del patógeno. Los efectores muestran un gran repertorio de actividades bioquímicas y modulan la función de mecanismos de regulación del huésped cruciales tales como por ejemplo fagocitosis y el citoesqueleto de actina, la señalización de rutas inflamatorias, la apoptosis, la endocitosis o rutas de secreción[2,9] e incluyen AvrA, AvrB, AvrBs2, AvrBS3, AvrBsT, AvrD, AvrD1, AvrPphB, AvrPphC, AvrPphEPto, AvrPpiBPto, AvrPto, AvrPtoB, AvrRpm1, AvrRpt2, AvrXv3, CigR, EspF, EspG, EspH, EspZ, ExoS, ExoT, GogB, GtgA, GtgE, familia de proteínas GALA, HopAB2, HopAO1, HopI1, HopM1, HopN1, HopPtoD2, HopPtoE, HopPtoF, HopPtoN, HopU1, HsvB, IcsB, IpaA, IpaH, IpaH7.8, IpaH9.8, IpgB1, IpgB2, IpgD, LcrV, Map, OspC1, OspE2, OspF, OspG, OspI, PipB, PipB2, PopB, PopP2, PthXo1, PthXo6, PthXo7, SifA, SifB, SipA/SspA,, SlrP, SopA, SopB/SigD, SopD, SopE, SopE2, SpiC/SsaB, SptP, SpvB, SpvC, SrfH, SrfJ, Sse, SseB, SseC, SseD, SseF, SseG, SseI/SrfH, SseJ, SseK1, SseK2, SseK3, SseL, SspH1, SspH2, SteA, SteB, SteC, SteD, SteE, TccP2, Tir, VirA, VirPphA, VopF, XopD, YopE, YopH, YopJ, YopM, YopO, YopP, YopT, YpkA.

Los genes de efectores del T3SS de *Yersinia* que son virulentos para una célula eucariota y pueden eliminarse/mutarse de por ejemplo *Y. enterocolitica* son YopE, YopH, YopM, YopO, YopP (también llamado YopJ), y YopT [10]. Los genes de efectores respectivos que son virulentos para una célula eucariota pueden eliminarse/mutarse de *Shigella flexneri* (por ejemplo OspF, IpgD, IpgB1), *Salmonella enterica* (por ejemplo SopE, SopB, SptP), *P. aeruginosa* (por ejemplo ExoS, ExoT, ExoU, ExoY) o *E. coli* (por ejemplo Tir, Map, EspF, EspG, EspH, EspZ). Las secuencias de ácidos nucleicos de estos genes están a disposición de los expertos en la técnica, por ejemplo, en la base de datos Genebank (yopH, yopO, yopE, yopP, yopM, yopT de NC_002120 GI:10955536; proteínas efectoras de *S. flexneri* de AF386526.1 GI:18462515; efectores de *S. enterica* de NC_016810.1 GI:378697983 o FQ312003.1 GI:301156631; efectores de *P. aeruginosa* de AE004091.2 GI:110227054 o CP000438.1 GI:115583796 y proteínas efectoras de *E. coli* de NC_011601.1 GI:215485161).

Para el propósito de la presente invención, los genes se denotan con letras en minúsculas y cursiva para distinguirlos de las proteínas. En caso que los genes (denotados con letras en minúsculas y cursiva) aparezcan a continuación del nombre de una especie bacteriana (como *E. coli*), estos se refieren a una mutación del gen correspondiente en la especie bacteriana correspondiente. Por ejemplo, YopE se refiere a la proteína efectora codificada por el gen yopE. *Y. enterocolitica* yopE representa una *Y. enterocolitica* que tiene una mutación en el gen yopE.

Como se usa en la presente descripción, los términos “polipéptido”, “péptido”, “proteína”, “polipeptídico” y “peptídico” se usan indistintamente para designar una serie de residuos de aminoácidos conectados entre sí por enlaces peptídicos entre los grupos alfa-amino y carboxilo de residuos adyacentes. Se prefieren las proteínas que tienen una secuencia de aminoácidos que comprende al menos 10 aminoácidos, con mayor preferencia al menos 20 aminoácidos.

De acuerdo con la presente invención, "una proteína heteróloga" incluye proteínas de origen natural o una parte estas y también incluye proteínas producidas de manera artificial o una parte de estas. Como se usa en la presente descripción, el término “proteína heteróloga” se refiere a una proteína o una parte de esta distinta a la proteína efectora del T3SS o fragmento N-terminal de esta al que puede fusionarse. En particular la proteína heteróloga como se usa en la presente descripción se refiere a una proteína o una parte de esta, que no pertenece al proteoma, es decir el complemento completo de proteínas naturales de la cepa bacteriana gramnegativa con virulencia atenuada recombinante específica proporcionada y usada por la invención, por ejemplo que no pertenece al proteoma, es decir el complemento completo de proteínas naturales de una cepa

bacteriana específica de los géneros *Yersinia*, *Escherichia*, *Salmonella* o *Pseudomonas*. Usualmente la proteína heteróloga es de origen animal que incluye de origen humano. Preferentemente la proteína heteróloga es una proteína humana o una parte de esta. Con mayor preferencia la proteína heteróloga se selecciona del grupo que consiste en proteínas involucradas en la inducción o regulación de una respuesta de interferón (IFN), proteínas involucradas en la apoptosis o la regulación de la apoptosis, reguladores del ciclo celular, proteínas con repeticiones de anquirina, proteínas de señalización celular, proteínas reporteras, factores de transcripción, proteasas, GTPasas pequeñas, proteínas asociadas a GPCR, constructos de fusión de nanocuerpos y nanocuerpos, efectores del T3SS bacteriano, efectores del T4SS bacteriano y proteínas virales. Preferentemente en particular la proteína heteróloga se selecciona del grupo que consiste en proteínas involucradas en la inducción o regulación de una respuesta de interferón (IFN), proteínas involucradas en la apoptosis o la regulación de la apoptosis, reguladores del ciclo celular, proteínas con repeticiones de anquirina, proteínas reporteras, GTPasas pequeñas, proteínas asociadas a GPCR, constructos de fusión de nanocuerpos, efectores del T3SS bacteriano, efectores del T4SS bacteriano y proteínas virales. Aún más particularmente se prefieren las proteínas heterólogas seleccionadas del grupo que consiste en proteínas involucradas en la inducción o regulación de una respuesta de interferón (IFN), proteínas involucradas en la apoptosis o la regulación de la apoptosis, reguladores del ciclo celular, y proteínas con repeticiones de anquirina. Las de máxima preferencia son las proteínas involucradas en la apoptosis o la regulación de la apoptosis o las proteínas involucradas en la inducción o regulación de una respuesta de interferón (IFN), en particular las proteínas involucradas en la inducción o regulación de una respuesta de interferón (IFN), como proteínas heterólogas de origen animal, preferentemente humanas involucradas en la apoptosis o la regulación de la apoptosis o proteínas humanas involucradas en la inducción o regulación de una respuesta de interferón (IFN). Las proteínas involucradas en la inducción o regulación de una respuesta de interferón (IFN) son preferentemente proteínas, involucradas en la inducción o regulación de una respuesta de interferón (IFN) tipo I, con mayor preferencia proteínas humanas involucradas en la inducción o regulación de una respuesta de interferón (IFN) tipo I.

En algunas modalidades la cepa bacteriana gramnegativa de la presente invención comprende dos secuencias de nucleótidos que codifican las proteínas heterólogas idénticas o dos diferentes fusionadas independientemente entre sí en marco al extremo 3’ de una secuencia de nucleótidos que codifica una señal de suministro de una proteína efectora bacteriana.

En algunas modalidades la cepa bacteriana gramnegativa de la presente invención comprende tres secuencias de nucleótidos que codifican las proteínas heterólogas idénticas o tres diferentes fusionadas independientemente entre sí en marco al extremo 3’ de una secuencia de nucleótidos que codifica una señal de suministro de una proteína efectora bacteriana.

La proteína heteróloga expresada por la cepa bacteriana gramnegativa con virulencia atenuada recombinante tiene usualmente un peso molecular de entre 1 y 150 kD, preferentemente entre 1 y 120 kD, con mayor preferencia entre 1 y 100 kDa, con la máxima preferencia entre 10 y 80 kDa.

En algunas modalidades una parte de una proteína heteróloga comprende un dominio de una proteína heteróloga. Por lo tanto en algunas modalidades la cepa bacteriana gramnegativa de la presente invención comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio de una proteína heteróloga. Preferentemente la cepa bacteriana gramnegativa de la presente invención comprende una secuencia de nucleótidos que codifica uno o dos dominios de una proteína heteróloga, con mayor preferencia dos dominios de una proteína heteróloga.

En algunas modalidades la cepa bacteriana gramnegativa de la presente invención comprende una secuencia de nucleótidos que codifica dominios repetidos de una proteína heteróloga o dos o más dominios de proteínas heterólogas diferentes fusionados en marco al extremo 3’ de una secuencia de nucleótidos que codifica una señal de suministro de una proteína efectora bacteriana.

El término “proteínas heterólogas que pertenecen a la misma clase funcional de proteínas” como se usa en la presente descripción se refiere a proteínas heterólogas que tienen la misma función por ejemplo proteínas heterólogas que tienen actividad enzimática, proteínas heterólogas que actúan en la misma ruta tal como por ejemplo la regulación del ciclo celular, o comparten una característica específica común por ejemplo pertenecen a la misma clase de proteínas efectoras bacterianas. Las clases funcionales de proteínas son por ejemplo proteínas involucradas en la apoptosis o la regulación de la apoptosis, proteínas que actúan como reguladores del ciclo celular, proteínas con repeticiones de anquirina, proteínas de señalización celular, proteínas involucradas en la inducción o regulación de una respuesta de interferón (IFN), proteínas reporteras, factores de transcripción, proteasas, GTPasas pequeñas, proteínas asociadas a GPCR, constructos de fusión de nanocuerpos y nanocuerpos, efectores del T3SS bacteriano, efectores del T4SS bacteriano o proteínas virales que actúan en conjunto en el proceso biológico de establecimiento de la virulencia a células eucariotas.

De acuerdo con la presente invención, "un dominio de una proteína heteróloga" incluye dominios de proteínas de origen natural e incluye además dominios de proteínas producidas de manera artificial. Como se usa en la presente descripción, el término “dominio de una proteína heteróloga”

se refiere a un dominio de una proteína heteróloga distinto a un dominio de una proteína efectora del T3SS o un dominio distinto a un dominio que comprende el fragmento N-terminal de esta al que puede fusionarse para lograr una proteína de fusión. En particular el dominio de una proteína heteróloga como se usa en la presente descripción se refiere a un dominio de una proteína heteróloga, que no pertenece al proteoma, es decir el complemento completo de proteínas naturales de la cepa bacteriana gramnegativa recombinante específica proporcionada y usada por la invención, por ejemplo que no pertenece al proteoma, es decir el complemento completo de proteínas naturales de una cepa bacteriana específica de los géneros *Yersinia*, *Escherichia*, *Salmonella* o *Pseudomonas*. Usualmente el dominio de la proteína heteróloga es de origen animal que incluye de origen humano. Preferentemente el dominio de la proteína heteróloga es un dominio de una proteína humana. Con mayor preferencia el dominio de la proteína heteróloga es un dominio de una proteína seleccionada del grupo que consiste en proteínas involucradas en la apoptosis o la regulación de la apoptosis, proteínas involucradas en la inducción o regulación de una respuesta de interferón (IFN), reguladores del ciclo celular, proteínas con repeticiones de anquirina, proteínas de señalización celular, proteínas reporteras, factores de transcripción, proteasas, GTPasas pequeñas, proteínas asociadas a GPCR, constructos de fusión de nanocuerpos y nanocuerpos, efectores del T3SS bacteriano, efectores del T4SS bacteriano y proteínas virales. Preferentemente en particular el dominio de la proteína heteróloga es un dominio de una proteína seleccionada del grupo que consiste en proteínas involucradas en la apoptosis o la regulación de la apoptosis, proteínas involucradas en la inducción o regulación de una respuesta de interferón (IFN), reguladores del ciclo celular, proteínas con repeticiones de anquirina, proteínas reporteras, GTPasas pequeñas, proteínas asociadas a GPCR, constructos de fusión de nanocuerpos, efectores del T3SS bacteriano, efectores del T4SS bacteriano y proteínas virales. Aún más particularmente se prefieren los dominios de proteínas heterólogas seleccionadas del grupo que consiste en proteínas involucradas en la apoptosis o la regulación de la apoptosis, proteínas involucradas en la inducción o regulación de una respuesta de interferón (IFN), reguladores del ciclo celular, y proteínas con repeticiones de anquirina. Los de máxima preferencia son los dominios de proteínas involucradas en la inducción o regulación de una respuesta de interferón (IFN), como proteínas de origen animal involucradas en la inducción o regulación de una respuesta de interferón (IFN), preferentemente dominios de proteínas heterólogas humanas involucradas en la inducción o regulación de una respuesta de interferón (IFN).

El término "dominios repetidos de una proteína heteróloga" como se usa en la presente descripción se refiere a una proteína de fusión que consiste en varias repeticiones de un dominio de una proteína heteróloga, donde estos dominios podrían fusionarse directamente entre sí o donde podría introducirse un enlazador variable por ejemplo un enlazador entre 1 y 30, preferentemente entre 2 y 15, con mayor preferencia entre 3 y 10 aminoácidos entre los dominios. Preferentemente se usan dominios idénticos repetidos o dominios repetidos que tienen una identidad de secuencia de aminoácidos de más de 80 %, usualmente más de 85 %, preferentemente más de 90 %, aun con mayor preferencia más de 95 %, en particular más de 96 %, más particularmente más de 97 %, aún más particularmente más de 98 %, lo más particular más de 99 %. Se prefieren además dominios idénticos que tienen una identidad de aminoácidos de 100 %. Preferentemente dos dominios repetidos, con mayor preferencia dos dominios idénticos repetidos o dos dominios repetidos que tienen una identidad de secuencia de aminoácidos de más de 90 %, preferentemente más de 95 %, con la máxima preferencia 100 % se encuentran comprendidos en la proteína de fusión como se refiere en la presente descripción. En la presente invención se contemplan además más de dos, por ejemplo tres, cuatro, cinco o seis dominios repetidos.

El término "dos o más dominios de proteínas heterólogas diferentes" como se usa en la presente descripción se refiere a una proteína de fusión que consiste en una o varias repeticiones de al menos dos dominios de proteínas heterólogas diferentes por ejemplo al menos dos dominios de proteínas heterólogas que tienen una identidad de secuencia de aminoácidos de 80 % o menos, preferentemente 60 % o menos, con mayor preferencia 40 % o menos, donde estos dominios diferentes podrían fusionarse directamente entre sí o donde podría introducirse un enlazador variable por ejemplo un enlazador entre 1 y 30, preferentemente entre 2 y 15, con mayor preferencia entre 3 y 10 aminoácidos entre los dominios. Preferentemente dos dominios de proteínas heterólogas diferentes se encuentran comprendidos en la proteína de fusión como se refiere en la presente descripción. En la presente invención se contemplan además más de dos, por ejemplo tres, cuatro, cinco o seis dominios de proteínas heterólogas diferentes.

El dominio de una proteína heteróloga expresada por la cepa bacteriana gramnegativa recombinante tiene usualmente un peso molecular de entre 1-50 kDa, preferentemente entre 1-30 kDa, con mayor preferencia entre 1-20 kDa, con la máxima preferencia entre 1-10 kDa.

De acuerdo con la presente invención las "proteínas involucradas en la inducción o regulación de una respuesta de IFN" incluyen, pero no se limitan a, cGAS, STING, TRIF, TBK1, IKKépsilon, IRF3, TREX1, VPS34, ATG9a, DDX3, LC3, DDX41, IFI16, MRE11, DNA-PK, RIG1, MDA5,

LGP2, IPS-1/MAVS/Cardif/VISA, Trim25, Trim32, Trim56, Riplet, TRAF2, TRAF3, TRAF5, TANK, IRF3, IRF7, IRF9, STAT1, STAT2, PKR, TLR3, TLR7, TLR9, DAI, IFI16, IFIX, MRE11, DDX41, LSm14A, LRRFIP1, DHX9, DHX36, DHX29, DHX15, Ku70, IFNAR1, IFNAR2, TYK2, JAK1, ISGF3, IL10R2, IFNLR1, IFNGR1, IFNGR2, JAK2, STAT4, enzimas que generan dinucleótidos cíclicos (ciclasas de di-AMP cíclico, di-GMP cíclico y di-GAMP cíclico) como WspR, DncV, DisA y similar a DisA, CdaA, CdaS y cGAS o un fragmento de estas.

De acuerdo con la presente invención las "proteínas involucradas en la inducción o regulación de una respuesta de IFN tipo I" incluyen, pero no se limitan a, cGAS, STING, TRIF, TBK1, IKKépsilon, IRF3, TREX1, VPS34, ATG9a, DDX3, LC3, DDX41, IFI16, MRE11, DNA-PK, RIG1, MDA5, LGP2, IPS-1/MAVS/Cardif/VISA, Trim25, Trim32, Trim56, Riplet, TRAF2, TRAF3, TRAF5, TANK, IRF3, IRF7, IRF9, STAT1, STAT2, PKR, TLR3, TLR7, TLR9, DAI, IFI16, IFIX, MRE11, DDX41, LSm14A, LRRFIP1, DHX9, DHX36, DHX29, DHX15, Ku70, enzimas que generan dinucleótidos cíclicos (ciclasas de di-AMP cíclico, di-GMP cíclico y di-GAMP cíclico) como WspR, DncV, DisA y similar a DisA, CdaA, CdaS y cGAS o un fragmento de estas.

Las proteínas involucradas en la inducción o regulación de una respuesta de IFN tipo I preferidas se seleccionan del grupo que consiste en cGAS, STING, TRIF, TBK1, IKKépsilon, IRF3, TREX1, VPS34, ATG9a, DDX3, LC3, DDX41, IFI16, MRE11, DNA-PK, RIG1, MDA5, LGP2, IPS-1/MAVS/Cardif/VISA, Trim25, Trim32, Trim56, Riplet, TRAF2, TRAF3, TRAF5, TANK, IRF3, IRF7, IRF9, STAT1, STAT2, PKR, LSm14A, LRRFIP1, DHX29, DHX15, y enzimas que generan dinucleótidos cíclicos tales como ciclasas de di-AMP cíclico, di-GMP cíclico y di-GAMP cíclico seleccionadas del grupo que consiste en WspR, DncV, DisA y similar a DisA, CdaA, CdaS y cGAS o un fragmento de estas.

Las proteínas involucradas en la inducción o regulación de una respuesta de IFN tipo I más preferidas se seleccionan del grupo que consiste en cGAS (como Uniprot. Q8N884 para la proteína humana), RIG1 (como Uniprot. O95786 para la proteína humana), MDA5 (como Uniprot. Q9BYX4 para la proteína humana), IPS-1/MAVS (como Uniprot. Q7Z434 para la proteína humana), IRF3 (como Uniprot. Q14653 para la proteína humana), IRF7 (como Uniprot. Q92985 para la proteína humana), IRF9 (como Uniprot. Q00978 para la proteína humana) y enzimas que generan dinucleótidos cíclicos tales como ciclasas de di-AMP cíclico, di-GMP cíclico y di-GAMP cíclico seleccionadas del grupo que consiste en WspR (como Uniprot. Q9HXT9 para la proteína de P. aeruginosa), DncV (como Uniprot. Q9KVG7 para la proteína de V. cholerae), DisA y similar a

DisA (como Uniprot. Q812L9 para la proteína de B. cereus), CdaA (como Uniprot. Q8Y5E4 para la proteína de L. monocytogenes), CdaS (como Uniprot. O31854 o mutación L44F activa constitutiva como en la SEQ ID NO.114 para la proteína de B. subtilis) y cGAS (como Uniprot. Q8N884 para la proteína humana) o un fragmento de estas proteínas.

IPS-1/MAVS/Cardif/VISA se refieren a la proteína de señalización antiviral mitocondrial eucariota que contiene un dominio CARD N-terminal y con el identificador de Uniprot (www.uniprot.org) para la secuencia humana "Q7Z434" y "Q8VCF0" para la secuencia murina. Los términos "IPS-1/MAVS", "MAVS/IPS-1" y "MAVS" se usan indistintamente en la presente descripción y se refieren a la proteína de señalización antiviral mitocondrial eucariota que contiene un dominio CARD N-terminal y con el identificador de Uniprot (www.uniprot.org) para la secuencia humana "Q7Z434" y "Q8VCF0" para la secuencia murina.

En algunas modalidades las proteínas heterólogas involucradas en la inducción o regulación de una respuesta de IFN tipo I se seleccionan del grupo que consiste en unas proteínas que contienen un dominio CARD o un fragmento de estas y enzimas que generan dinucleótidos cíclicos tales como ciclasas de di-AMP cíclico, di-GMP cíclico y di-GAMP cíclico o un fragmento de estas.

Un fragmento de una proteína heteróloga involucrada en la inducción o regulación de una respuesta de IFN o una respuesta de IFN tipo I contiene usualmente entre 25 y 1,000 aminoácidos, preferentemente entre 50 y 600 aminoácidos, con mayor preferencia entre 100 y 400 aminoácidos, aun con mayor preferencia entre 100 y 362 aminoácidos. En algunas modalidades un fragmento de una proteína heteróloga involucrada en la inducción o regulación de una respuesta de IFN o una respuesta de IFN tipo I comprende un fragmento N-terminal de la proteína heteróloga involucrada en la inducción o regulación de una respuesta de IFN o una respuesta de IFN tipo I que contiene usualmente entre 25 y 1,000 aminoácidos, preferentemente entre 50 y 600 aminoácidos, con mayor preferencia entre 100 y 400 aminoácidos, aun con mayor preferencia entre 100 y 362 aminoácidos, en particular entre 100 y 246 aminoácidos o, comprende un fragmento N-terminal de la proteína heteróloga involucrada en la inducción o regulación de una respuesta de IFN o una respuesta de IFN tipo I que tiene una deleción de una secuencia de aminoácidos que contiene entre el aminoácido 1 y el aminoácido 160 de los aminoácidos N-terminales, preferentemente una deleción de una secuencia de aminoácidos que contiene los aminoácidos N-terminales 1-59 o los aminoácidos N-terminales 1-160, y en donde el fragmento N-terminal de la proteína heteróloga involucrada en la inducción o regulación de una respuesta de IFN o una respuesta de IFN tipo I contiene usualmente entre 25 y 1,000 aminoácidos, preferentemente entre 50 y 600 aminoácidos,

con mayor preferencia entre 100 y 400 aminoácidos, aun con mayor preferencia entre 100 y 362 aminoácidos.

Un fragmento de una proteína heteróloga que contiene dominio CARD involucrada en la inducción o regulación de una respuesta de IFN o una respuesta de IFN tipo I contiene usualmente una secuencia de aminoácidos del aminoácido N-terminal 1 a cualquiera del aminoácido N-terminal 100-500, preferentemente una secuencia de aminoácidos del aminoácido N-terminal 1 a cualquiera del aminoácido N-terminal 100-400, con mayor preferencia una secuencia de aminoácidos del aminoácido N-terminal 1 a cualquiera del aminoácido N-terminal 100300, con mayor preferencia una secuencia de aminoácidos del aminoácido N-terminal 1 a cualquiera del aminoácido N-terminal 100-294, con mayor preferencia una secuencia de aminoácidos del aminoácido N-terminal 1 a cualquiera del aminoácido N-terminal 100-246.

En algunas modalidades un fragmento de una proteína heteróloga que contiene dominio CARD involucrada en la inducción o regulación de una respuesta de IFN o una respuesta de IFN tipo I contiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en una secuencia de aminoácidos que comprende al menos el aminoácido N-terminal 1 y no más del aminoácido N-terminal 294, una secuencia de aminoácidos que comprende al menos el aminoácido N-terminal 1 y no más del aminoácido N-terminal 246, una secuencia de aminoácidos que comprende al menos el aminoácido N-terminal 1 y no más del aminoácido N-terminal 245, una secuencia de aminoácidos que comprende al menos el aminoácido N-terminal 1 y no más del aminoácido N-terminal 229, una secuencia de aminoácidos que comprende al menos el aminoácido N-terminal 1 y no más del aminoácido N-terminal 228, una secuencia de aminoácidos que comprende al menos el aminoácido N-terminal 1 y no más del aminoácido N-terminal 218, una secuencia de aminoácidos que comprende al menos el aminoácido N-terminal 1 y no más del aminoácido N-terminal 217, una secuencia de aminoácidos que comprende al menos el aminoácido N-terminal 1 y no más del aminoácido N-terminal 100 y una secuencia de aminoácidos que comprende al menos el aminoácido N-terminal 1 y no más del aminoácido N-terminal 101, más particularmente una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en una secuencia de aminoácidos que comprende al menos el aminoácido N-terminal 1 y no más del aminoácido N-terminal 245, una secuencia de aminoácidos que comprende al menos el aminoácido N-terminal 1 y no más del aminoácido N-terminal 228, una secuencia de aminoácidos que comprende al menos el aminoácido N-terminal 1 y no más del aminoácido N-terminal 217 y una secuencia de aminoácidos que

comprende al menos el aminoácido N-terminal 1 y no más del aminoácido N-terminal 100 de un dominio CARD humano.

En algunas modalidades preferidas un fragmento de una proteína heteróloga que contiene dominio CARD involucrada en la inducción o regulación de una respuesta de IFN o una respuesta de IFN tipo I contiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en una secuencia de aminoácidos del aminoácido N-terminal 1 al aminoácido N-terminal 294, una secuencia de aminoácidos del aminoácido N-terminal 1 al aminoácido N-terminal 246, una secuencia de aminoácidos del aminoácido N-terminal 1 al aminoácido N-terminal 245, una secuencia de aminoácidos del aminoácido N-terminal 1 al aminoácido N-terminal 229, una secuencia de aminoácidos del aminoácido N-terminal 1 al aminoácido N-terminal 228, una secuencia de aminoácidos del aminoácido N-terminal 1 al aminoácido N-terminal 218, una secuencia de aminoácidos del aminoácido N-terminal 1 al aminoácido N-terminal 217, una secuencia de aminoácidos del aminoácido N-terminal 1 al aminoácido N-terminal 100, una secuencia de aminoácidos del aminoácido N-terminal 1 al aminoácido N-terminal 101, más particularmente una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en una secuencia de aminoácidos del aminoácido N-terminal 1 al aminoácido N-terminal 245, una secuencia de aminoácidos del aminoácido N-terminal 1 al aminoácido N-terminal 228, una secuencia de aminoácidos del aminoácido N-terminal 1 al aminoácido N-terminal 217 y una secuencia de aminoácidos del aminoácido N-terminal 1 al aminoácido N-terminal 100 de un dominio CARD humano.

Un fragmento de enzimas que generan dinucleótidos cíclicos tales como ciclasas de di-AMP cíclico, di-GMP cíclico y di-GAMP cíclico contiene usualmente una secuencia de aminoácidos del aminoácido N-terminal 1 a cualquiera del aminoácido N-terminal 100-600, preferentemente una secuencia de aminoácidos del aminoácido N-terminal 50 a cualquiera del aminoácido N-terminal 100-550, con mayor preferencia una secuencia de aminoácidos del aminoácido N-terminal 60 a cualquiera del aminoácido N-terminal 100-530, en particular una secuencia de aminoácidos del aminoácido N-terminal 60 al aminoácido N-terminal 530, una secuencia de aminoácidos del aminoácido N-terminal 146 al aminoácido N-terminal 507 o una secuencia de aminoácidos del aminoácido N-terminal 161 al aminoácido N-terminal 530, más particularmente una secuencia de aminoácidos del aminoácido N-terminal 161 al aminoácido N-terminal 530 de la cGAS humana.

En algunas modalidades un fragmento de cGAS contiene en particular una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en una secuencia de aminoácidos que comprende al menos el aminoácido N-terminal 60 y no más del aminoácido N-terminal aminoácido N-terminal

422, una secuencia de aminoácidos que comprende al menos el aminoácido N-terminal 146 y no más del aminoácido N-terminal aminoácido N-terminal 507, y una secuencia de aminoácidos que comprende al menos el aminoácido N-terminal 161 y no más del aminoácido N-terminal aminoácido N-terminal 522. En algunas modalidades un fragmento de cGAS contiene más particularmente una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en una secuencia de aminoácidos del aminoácido N-terminal 60 al aminoácido N-terminal 422, una secuencia de aminoácidos del aminoácido N-terminal 146 al aminoácido N-terminal 507, y una secuencia de aminoácidos del aminoácido N-terminal 161 al aminoácido N-terminal 522.

En una modalidad más preferida la proteína heteróloga involucrada en la inducción o regulación de una respuesta de IFN tipo I se selecciona del grupo que consiste en RIG1, MDA5, y MAVS/IPS-1 que comprende el dominio CARD o un fragmento de estas y cGAS y un fragmento de esta, en particular se selecciona del grupo que consiste en RIG1 que comprende el dominio CARD y un fragmento de esta, MAVS/IPS-1 que comprende el dominio CARD y un fragmento de esta, y cGAS y un fragmento de esta. Los fragmentos de estas proteínas se prefieren particularmente. En esta modalidad más preferida, la RIG1, MDA5, MAVS/IPS-1 que comprende el dominio CARD comprende el(los) dominio(s) CARD de origen natural y además los aminoácidos C-terminales a continuación del(de los) dominio(s) CARD de origen natural que comprenden el dominio helicasa de origen natural en el caso de RIG-1 o un fragmento de este, preferentemente un fragmento que contienen 1-500, con mayor preferencia 1-250, aun con mayor preferencia 1-150 aminoácidos en donde el dominio helicasa de origen natural o fragmento de este no es funcional, es decir no se une a un dominio CARD o, comprende la secuencia C-terminal corriente abajo en el caso de MAVS/IPS-1 o un fragmento de esta, preferentemente un fragmento que contiene 1-500, con mayor preferencia 1-250, aun con mayor preferencia 1-150 aminoácidos. En estas modalidades cGAS y un fragmento de esta comprende usualmente el dominio sintasa de origen natural (núcleo NTasa y dominio C-terminal; aminoácidos 160-522 de la cGAS humana como se describe en [65] y como Uniprot. Q8N884 para la proteína humana), preferentemente cGAS y un fragmento de esta comprende el dominio sintasa de origen natural, pero tiene una deleción de una parte o el dominio N-terminal completo, preferentemente una deleción de la extensión de hélice N-terminal completa (extensión de hélice N-terminal; aminoácidos 1-160 de la cGAS humana como se describe en [65] y como Uniprot. Q8N884 para la proteína humana). La deleción de una parte o el dominio N-terminal completo es preferentemente una deleción de los aminoácidos 1-59.

En algunas modalidades las proteínas heterólogas involucradas en la inducción o regulación de una respuesta de IFN tipo I se seleccionan del grupo que consiste en la familia de receptores similares a RIG-I (RLR) (como RIG1 y MDA5) y un fragmento de estos, otras proteínas que contienen dominio CARD involucradas en la señalización antiviral y la inducción de IFN tipo I (como MAVS/IPS-1) y un fragmento de estas y enzimas que generan dinucleótidos cíclicos tales como ciclasas de di-AMP cíclico, di-GMP cíclico y di-GAMP cíclico seleccionadas del grupo que consiste en WspR, DncV, DisA y similar a DisA, CdaA, CdaS y cGAS, y un fragmento de estas, que conducen a la estimulación de STING.

En algunas modalidades las proteínas heterólogas involucradas en la inducción o regulación de una respuesta de IFN tipo I se seleccionan del grupo que consiste en RIG1, MDA5, LGP2, MAVS/IPS-1, WspR, DncV, DisA y similar a DisA, CdaA, CdaS y cGAS o un fragmento de estas, con mayor preferencia se seleccionan del grupo que consiste en RIG1, WspR, DncV, similar a DisA, y cGAS o un fragmento de estas.

En una modalidad más preferida la proteína involucrada en la inducción o regulación de una respuesta de IFN tipo I se selecciona del grupo que consiste en RIG1, MDA5, MAVS/IPS-1, WspR, DncV, DisA y similar a DisA, CdaA, y cGAS o un fragmento de estas, aun con mayor preferencia se selecciona del grupo que consiste en RIG1, MDA5, MAVS/IPS-1, WspR, DncV, similar a DisA, CdaA, y cGAS o un fragmento de estas, en particular se selecciona del grupo que consiste en RIG1, MAVS/IPS-1 y cGAS o un fragmento de estas. Los fragmentos de estas proteínas se prefieren particularmente.

En esta modalidad más preferida un fragmento de RIG1, MDA5, MAVS/IPS-1 usualmente contiene una secuencia de aminoácidos del aminoácido N-terminal 1 a cualquiera del aminoácido N-terminal 100-500, preferentemente una secuencia de aminoácidos del aminoácido N-terminal 1 a cualquiera del aminoácido N-terminal 100-400, con mayor preferencia una secuencia de aminoácidos del aminoácido N-terminal 1 a cualquiera del aminoácido N-terminal 100-300.

En esta modalidad más preferida un fragmento de RIG1 contiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en una secuencia de aminoácidos que comprende al menos el aminoácido N-terminal 1 y no más del aminoácido N-terminal 246, una secuencia de aminoácidos que comprende al menos el aminoácido N-terminal 1 y no más del aminoácido N-terminal 245, una secuencia de aminoácidos que comprende al menos el aminoácido N-terminal 1 y no más del aminoácido N-terminal 229, una secuencia de aminoácidos que comprende al menos el aminoácido N-terminal 1 y no más del aminoácido N-terminal 228, una secuencia de aminoácidos que

comprende al menos el aminoácido N-terminal 1 y no más del aminoácido N-terminal 218, y una secuencia de aminoácidos que comprende al menos el aminoácido N-terminal 1 y no más del aminoácido N-terminal 217; y un fragmento de MAVS/IPS-1 contiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en una secuencia de aminoácidos que comprende al menos el aminoácido N-terminal 1 y no más del aminoácido N-terminal 100 y una secuencia de aminoácidos que comprende al menos el aminoácido N-terminal 1 y no más del aminoácido N-terminal 101.

En esta modalidad más preferida un fragmento de RIG1 contiene más particularmente una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en una secuencia de aminoácidos del aminoácido N-terminal 1 al aminoácido N-terminal 246, una secuencia de aminoácidos del aminoácido N-terminal 1 al aminoácido N-terminal 245, una secuencia de aminoácidos del aminoácido N-terminal 1 al aminoácido N-terminal 229, una secuencia de aminoácidos del aminoácido N-terminal 1 al aminoácido N-terminal 228, una secuencia de aminoácidos del aminoácido N-terminal 1 al aminoácido N-terminal 218, y una secuencia de aminoácidos del aminoácido N-terminal 1 al aminoácido N-terminal 217; y un fragmento de MAVS/IPS-1 contiene más particularmente una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en una secuencia de aminoácidos del aminoácido N-terminal 1 al aminoácido N-terminal 100 y una secuencia de aminoácidos del aminoácido N-terminal 1 al aminoácido N-terminal 101.

En esta modalidad más preferida un fragmento de cGAS contiene usualmente una secuencia de aminoácidos del aminoácido N-terminal 1 a cualquiera del aminoácido N-terminal 100-600, preferentemente una secuencia de aminoácidos del aminoácido N-terminal 50 a cualquiera del aminoácido N-terminal 100-550, con mayor preferencia una secuencia de aminoácidos del aminoácido N-terminal 60 a cualquiera del aminoácido N-terminal 100-530, en particular una secuencia de aminoácidos del aminoácido N-terminal 60 al aminoácido N-terminal 530, una secuencia de aminoácidos del aminoácido N-terminal 146 al aminoácido N-terminal 507 o una secuencia de aminoácidos del aminoácido N-terminal 161 al aminoácido N-terminal 530, más particularmente una secuencia de aminoácidos del aminoácido N-terminal 60 al aminoácido N-terminal 530, o una secuencia de aminoácidos del aminoácido N-terminal 161 al aminoácido N-terminal 530 de la cGAS humana.

En esta modalidad más preferida un fragmento de cGAS contiene en particular una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en una secuencia de aminoácidos que comprende al menos el aminoácido N-terminal 60 y no más del aminoácido N-terminal aminoácido N-terminal

422, una secuencia de aminoácidos que comprende al menos el aminoácido N-terminal 146 y no más del aminoácido N-terminal aminoácido N-terminal 507, y una secuencia de aminoácidos que comprende al menos el aminoácido N-terminal 161 y no más del aminoácido N-terminal aminoácido N-terminal 522.

En esta modalidad más preferida un fragmento de cGAS contiene más particularmente una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en una secuencia de aminoácidos del aminoácido N-terminal 60 al aminoácido N-terminal 422, una secuencia de aminoácidos del aminoácido N-terminal 146 al aminoácido N-terminal 507, una secuencia de aminoácidos del aminoácido N-terminal 161 al aminoácido N-terminal 522.

En una modalidad aún más preferida la proteína involucrada en la inducción o regulación de una respuesta de IFN tipo I se selecciona del grupo que consiste en dominios CARD de RIG1 humana$_{1-245}$ (SEQ ID NO: 37), dominios CARD de RIG1 humana$_{1-228}$ (SEQ ID NO: 128), dominios CARD de RIG1 humana$_{1-217}$ (SEQ ID NO: 129), dominios CARD de RIG1 murina$_{1-246}$ (SEQ ID NO: 38), dominios CARD de RIG1 murina$_{1-229}$ (SEQ ID NO: 110), dominios CARD de RIG1 murina$_{1-218}$ (SEQ ID NO: 111), dominio CARD de MAVS humana$_{1-100}$ (SEQ ID NO: 116), dominio CARD de MAVS murina$_{1-101}$ (SEQ ID NO: 130), cGAS de N. vectensis (SEQ ID NO: 43), cGAS humana$_{161-522}$ (SEQ ID NO: 115), cGAS murina$_{146-507}$ (SEQ ID NO: 131) y cGAS de N. vectensis$_{60-422}$ (SEQ ID NO: 117).

En una modalidad preferida particular la proteína involucrada en la inducción o regulación de una respuesta de IFN tipo I en donde la proteína involucrada en la inducción o regulación de una respuesta de IFN tipo I se selecciona del grupo que consiste en dominios CARD de RIG1 humana$_{1-245}$, (SEQ ID NO: 37), dominios CARD de RIG1 humana$_{1-228}$ (SEQ ID NO: 128), dominios CARD de RIG1 humana$_{1-217}$ (SEQ ID NO: 129), dominio CARD de MAVS humana$_{1-100}$ (SEQ ID NO: 116), y cGAS humana$_{161-522}$ (SEQ ID NO: 115).

En una modalidad preferida más particular la proteína involucrada en la inducción o regulación de una respuesta de IFN tipo I se selecciona del grupo que consiste en dominios CARD de RIG1 humana$_{1-245}$, dominios CARD de RIG1 murina$_{1-246}$, dominios CARD de RIG1 murina$_{1-229}$, dominios CARD de RIG1 murina$_{1-218}$, MAVS humana$_{1-100}$, cGAS de N. vectensis, cGAS humana$_{161-522}$ y cGAS de N. vectensis$_{60-422}$.

La familia de receptores similares a RIG-I (RLR) comprende proteínas seleccionadas del grupo que consiste en RIG1, MDA5 y LGP2. Las proteínas heterólogas involucradas en la inducción o regulación de una respuesta de IFN tipo I preferidas son las proteínas que contienen dominio

CARD RIG1 y MDA5, en particular la proteína que contiene dominio CARD RIG1. Otras proteínas que contienen dominio CARD involucradas en la inducción de IFN tipo I comprenden proteínas seleccionadas del grupo que consiste en MAVS/IPS-1.

En algunas modalidades preferidas las proteínas heterólogas involucradas en la inducción o regulación de una respuesta de IFN tipo I se seleccionan del grupo de proteínas que comprenden un dominio CARD de RIG1, un dominio CARD de MDA5, y/o un dominio CARD de MAVS/IPS-1, y WspR, DncV, DisA y similar a DisA, CdaA, CdaS y cGAS y un fragmento de estas, preferentemente se seleccionan del grupo de proteínas que comprenden un dominio CARD de RIG1 y/o un dominio CARD de MAVS/IPS-1, y WspR, DncV, DisA y similar a DisA, CdaA, y cGAS o un fragmento de estas.

En algunas modalidades preferidas las proteínas heterólogas involucradas en la inducción o regulación de una respuesta de IFN tipo I se seleccionan del grupo que consiste en un dominio CARD de RIG1, un dominio CARD de MDA5, un dominio CARD de MAVS/IPS-1, WspR, DncV, DisA y similar a DisA, CdaA, CdaS y cGAS, con mayor preferencia se seleccionan del grupo que consiste en un dominio CARD de RIG1, WspR, DncV, similar a DisA, y cGAS.

En algunas modalidades preferidas las proteínas heterólogas involucradas en la inducción o regulación de una respuesta de IFN tipo I comprenden uno o más (por ejemplo dos, tres o cuatro) dominios CARD, preferentemente comprenden uno o más (por ejemplo dos, tres o cuatro) dominios CARD de RIG1, MDA5, y/o MAVS/IPS-1, preferentemente de RIG1 y/o MAVS/IPS-1. En una modalidad más preferida las proteínas heterólogas involucradas en la inducción o regulación de una respuesta de IFN tipo I comprenden ambos dominios CARD de RIG1 o MDA5, en particular RIG1.

En algunas modalidades las proteínas heterólogas involucradas en la inducción o regulación de una respuesta de IFN tipo I se seleccionan del grupo que consiste en una proteína que induce respuesta de IFN tipo I sin función enzimática o una proteína que induce respuesta de IFN tipo I con función enzimática. Una proteína que induce respuesta de IFN tipo I sin función enzimática abarcada en la presente invención comprende usualmente al menos un dominio CARD preferentemente dos dominios CARD. Un dominio CARD se compone normalmente de un racimo de seis a siete alfa-hélices, preferentemente una disposición de seis a siete alfa hélices antiparalelas con un núcleo hidrofóbico y una cara externa compuesta de residuos con carga. Una proteína que induce respuesta de IFN tipo I con función enzimática abarcada en la presente invención comprende usualmente una enzima que genera dinucleótidos cíclicos (ciclasas de di-AMP cíclico, di-GMP

cíclico y di-GAMP cíclico) o un dominio de esta que conduce a la estimulación de STING, preferentemente una diadenilato ciclasa (DAC), diguanilato ciclasa (DGC) o GMP-AMP ciclasa (GAC) o dominio de estas.

De acuerdo con la presente invención las "proteínas involucradas en la apoptosis o la regulación de la apoptosis" incluyen, pero no se limitan a, Bad, Bcl2, Bak, Bmt, Bax, Puma, Noxa, Bim, Bcl-xL, Apaf1, Caspasa 9, Caspasa 3, Caspasa 6, Caspasa 7, Caspasa 10, DFFA, DFFB, ROCK1, APP, CAD, ICAD, CAD, EndoG, AIF, HtrA2, Smac/Diablo, Arts, ATM, ATR, Bok/Mtd, Bmf, Mcl-1(S), familia IAP, LC8, PP2B, proteínas 14-3-3, PKA, PKC, PI3K, Erk1/2, p90RSK, TRAF2, TRADD, FADD, Daxx, Caspasa8, Caspasa2, RIP, RAIDD, MKK7, JNK, FLIP, FKHR, GSK3, las CDK y sus inhibidores como la familia INK4 (p16(Ink4a), p15(Ink4b), p18(Ink4c), p19(Ink4d)), y la familia Cip1/Waf1/Kip1-2 (p21(Cip1/Waf1), p27(Kip1), p57(Kip2). Preferentemente se usan Bad, Bmt, Bcl2, Bak, Bax, Puma, Noxa, Bim, Bcl-xL, Caspasa9, Caspasa3, Caspasa6, Caspasa7, Smac/Diablo, Bok/Mtd, Bmf, Mcl-1(S), LC8, PP2B, TRADD, Daxx, Caspasa8, Caspasa2, RIP, RAIDD, FKHR, las CDK y sus inhibidores como la familia INK4 (p16(Ink4a), p15(Ink4b), p18(Ink4c), p19(Ink4d)), con la máxima preferencia BIM, Bid, Bid truncada, FADD, Caspasa 3 (y subunidades de esta), Bax, Bad, Akt, las CDK y sus inhibidores como la familia INK4 (p16(Ink4a), p15(Ink4b), p18(Ink4c), p19(Ink4d)) [11-13]. Otras proteínas involucradas en la apoptosis o la regulación de la apoptosis incluyen DIVA, Bcl-Xs, Nbk/Bik, Hrk/Dp5, Bid y tBid, Egl-1, Bcl-Gs, Citocromo C, Beclina, CED-13, BNIP1, BNIP3, Bcl-B, Bcl-W, Ced-9, A1, NR13, Bfl-1, Caspasa 1, Caspasa 2, Caspasa 4, Caspasa 5, Caspasa 8.

Las proteínas involucradas en la apoptosis o la regulación de la apoptosis se seleccionan del grupo que consiste en proteínas proapoptóticas, proteínas antiapoptóticas, inhibidores de rutas de prevención de la apoptosis e inhibidores de señalización o rutas prosupervivencia. Las proteínas proapoptóticas comprenden proteínas seleccionadas del grupo que consiste en Bax, Bak, Diva, Bcl-Xs, Nbk/Bik, Hrk/Dp5, Bmf, Noxa, Puma, Bim, Bad, Bid y tBid, Bok, Apaf1, Smac/Diablo, BNIP1, BNIP3, Bcl-Gs, Beclina 1, Egl-1 y CED-13, Citocromo C, FADD, la familia de las caspasas, y las CDK y sus inhibidores como la familia INK4 (p16(Ink4a), p15(Ink4b), p18(Ink4c), p19(Ink4d)) o seleccionadas del grupo que consiste en Bax, Bak, Diva, Bcl-Xs, Nbk/Bik, Hrk/Dp5, Bmf, Noxa, Puma, Bim, Bad, Bid y tBid, Bok, Egl-1, Apaf1, Smac/Diablo, BNIP1, BNIP3, Bcl-Gs, Beclina 1, Egl-1 y CED-13, Citocromo C, FADD, y la familia de las caspasas. Se prefieren Bax, Bak, Diva, Bcl-Xs, Nbk/Bik, Hrk/Dp5, Bmf, Noxa, Puma, Bim, Bad, Bid y tBid, Bok, Egl-1, Apaf1, BNIP1, BNIP3, Bcl-Gs, Beclina 1, Egl-1 y CED-13, Smac/Diablo, FADD, la familia de las

caspasas, las CDK y sus inhibidores como la familia INK4 (p16(Ink4a), p15(Ink4b), p18(Ink4c), p19(Ink4d)). Se prefieren igualmente Bax, Bak, Diva, Bcl-Xs, Nbk/Bik, Hrk/Dp5, Bmf, Noxa, Puma, Bim, Bad, Bid y tBid, Bok, Apaf1, BNIP1, BNIP3, Bcl-Gs, Beclina 1, Egl-1 y CED-13, Smac/Diablo, FADD, la familia de las caspasas.

Las proteínas antiapoptóticas comprenden proteínas seleccionadas del grupo que consiste en Bcl-2, Bcl-Xl, Bcl-B, Bcl-W, Mcl-1, Ced-9, A1, NR13, la familia de IAP y Bfl-1. Se prefieren Bcl-2, Bcl-Xl, Bcl-B, Bcl-W, Mcl-1, Ced-9, A1, NR13 y Bfl-1.

Los inhibidores de rutas de prevención de la apoptosis comprenden proteínas seleccionadas del grupo que consiste en Bad, Noxa y Cdc25A. Se prefieren Bad y Noxa.

Los inhibidores de señalización o rutas prosupervivencia comprenden proteínas seleccionadas del grupo que consiste en PTEN, ROCK, PP2A, PHLPP, JNK, p38. Se prefieren PTEN, ROCK, PP2A y PHLPP.

En algunas modalidades, las proteínas heterólogas involucradas en la apoptosis o la regulación de la apoptosis se seleccionan del grupo que consiste en proteínas solo BH3, caspasas y proteínas de señalización intracelular del control de la apoptosis por receptor de muerte. Se prefieren las proteínas solo BH3.

Las proteínas solo BH3 comprenden proteínas seleccionadas del grupo que consiste en Bad, BIM, Bid y tBid, Puma, Bik/Nbk, Bod, Hrk/Dp5, BNIP1, BNIP3, Bmf, Noxa, Mcl-1, Bcl-Gs, Beclina 1, Egl-1 y CED-13. Se prefieren Bad, BIM, Bid y tBid, en particular tBid.

Las caspasas comprenden las proteínas seleccionadas del grupo que consiste en Caspasa 1, Caspasa 2, Caspasa 3, Caspasa 4, Caspasa 5, Caspasa 6, Caspasa 7, Caspasa 8, Caspasa 9, Caspasa 10. Se prefieren Caspasa 3, Caspasa 8 y Caspasa 9.

Las proteínas de señalización intracelular de control de la apoptosis por receptor de muerte comprenden las proteínas seleccionadas del grupo que consiste en FADD, TRADD, ASC, BAP31, GULP1/CED-6, CIDEA, MFG-E8, CIDEC, RIPK1/RIP1, CRADD, RIPK3/RIP3, Crk, SHB, CrkL, DAXX, la familia 14-3-3, FLIP, DFF40 y 45, PEA-15, SODD. Se prefieren FADD y TRADD.

En algunas modalidades dos proteínas heterólogas involucradas en la apoptosis o la regulación de la apoptosis se encuentran comprendidas en la cepa bacteriana gramnegativa, en donde una proteína es una proteína proapoptótica y la otra proteína es un inhibidor de rutas de prevención de la apoptosis o en donde una proteína es una proteína proapoptótica y la otra proteína es un inhibidor de la señalización o rutas prosupervivencia.

Las proteínas proapoptóticas abarcadas en la presente invención tienen usualmente una estructura en alfa hélice, preferentemente una hélice hidrofóbica rodeada por hélices anfipáticas y usualmente comprenden al menos uno de los dominios BH1, BH2, BH3 o BH4, preferentemente comprenden al menos un dominio BH3. Usualmente las proteínas proapoptóticas abarcadas en la presente invención no tienen actividad enzimática.

Las proteínas antiapoptóticas abarcadas en la presente invención usualmente tienen una estructura en alfa hélice, preferentemente una hélice hidrofóbica rodeada por hélices anfipáticas y comprenden una combinación de dominios BH1, BH2, BH3 y BH4 diferentes, preferentemente una combinación de dominios BH1, BH2, BH3 y BH4 diferentes en donde está presente un dominio BH1 y un BH2, con mayor preferencia BH4-BH3-BH1-BH2, BH1-BH2, BH4-BH1-BH2 o BH3-BH1-BH2 (del N- al C-terminal). Además, también se abarcan proteínas que contienen al menos un dominio BIR.

Los inhibidores de rutas de prevención de la apoptosis abarcados en la presente invención usualmente tienen una estructura en alfa hélice, preferentemente una hélice hidrofóbica rodeada por hélices anfipáticas y usualmente comprenden un dominio BH3.

Los dominios BH1, BH2, BH3 o BH4 tienen cada uno usualmente entre aproximadamente 5 a aproximadamente 50 aminoácidos de longitud. Por lo tanto en algunas modalidades las proteínas heterólogas involucradas en la apoptosis o la regulación de la apoptosis se seleccionan del grupo que consiste en proteínas heterólogas involucradas en la apoptosis o la regulación de la apoptosis que tienen aproximadamente 5 a aproximadamente 200, preferentemente aproximadamente 5 a aproximadamente 150, con mayor preferencia aproximadamente 5 a aproximadamente 100, con la máxima preferencia aproximadamente 5 a aproximadamente 50, en particular aproximadamente 5 a aproximadamente 25 aminoácidos de longitud.

En algunas modalidades la cepa bacteriana gramnegativa de la presente invención comprende una secuencia de nucleótidos que codifica dos dominios de una proteína heteróloga involucrada en la apoptosis o la regulación de la apoptosis, preferentemente dos repetidos, con mayor preferencia dos dominios idénticos repetidos de una proteína involucrada en la apoptosis o la regulación de la apoptosis o dos dominios de proteínas involucradas en la apoptosis o la regulación de la apoptosis diferentes, con la máxima preferencia dos dominios idénticos repetidos de una proteína involucrada en la apoptosis o la regulación de la apoptosis. En algunas modalidades la cepa bacteriana gramnegativa de la presente invención comprende una secuencia de nucleótidos que codifica dos dominios de una proteína heteróloga involucrada en la apoptosis o la regulación de la

apoptosis, en donde uno es un dominio de una proteína proapoptótica y el otro es un dominio de una proteína que es un inhibidor de rutas de prevención de la apoptosis o en donde uno es un dominio de una proteína proapoptótica y el otro dominio es un dominio de una proteína que es un inhibidor de señalización o rutas prosupervivencia.

Una proteína heteróloga preferida particular es el dominio BH3 del inductor de la apoptosis tBID, más particularmente el dominio BH3 que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 29-32, preferentemente la SEQ ID NO: 31 o la SEQ ID NO: 32.

Se prefiere igualmente el dominio BH3 del regulador de la apoptosis BAX, más particularmente el dominio BAX que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 33-36, preferentemente la SEQ ID NO: 35 o la SEQ ID NO: 36. Las secuencias humana y murina se proporcionan en las SEQ ID NO, pero los dominios BH3 de tBID y BAX del resto de las especies se incluyen igualmente.

En algunas modalidades los dominios repetidos de las proteínas heterólogas son el dominio BH3, preferentemente los dominios BH3 repetidos del inductor de la apoptosis tBID, con mayor preferencia los dominios BH3 repetidos del inductor de la apoptosis tBID comprendidos en las SEQ ID NO: 29-32 o la SEQ ID NO: 25 o la SEQ ID NO: 19, aun con mayor preferencia dos dominios BH3 repetidos del inductor de la apoptosis tBID, con la máxima preferencia dos dominios BH3 repetidos del inductor de la apoptosis tBID comprendidos en las SEQ ID NO: 29-32 o la SEQ ID NO: 25 o la SEQ ID NO: 19, en particular dos dominios BH3 repetidos del inductor de la apoptosis tBID comprendidos en la secuencia de SEQ ID NO: 27. Por lo tanto en una modalidad preferida la cepa bacteriana gramnegativa y/o el vector de la presente invención comprende una segunda secuencia de ADN que codifica dos dominios repetidos de un dominio BH3, con mayor preferencia dos dominios BH3 repetidos del inductor de la apoptosis tBID. Los dos dominios repetidos pueden conectarse mediante un enlazador de 1-30 aminoácidos de longitud, preferentemente 2-15 aminoácidos, con mayor preferencia 3-10 aminoácidos de longitud.

En algunas modalidades los dos o más dominios de proteínas heterólogas diferentes son dominios de proteínas heterólogas que pertenecen a la misma clase funcional de proteínas, preferentemente las proteínas heterólogas diferentes de los dos o más dominios son proteínas heterólogas diferentes de la clase de proteínas involucradas en la apoptosis o la regulación de la apoptosis. En una modalidad preferida los dos o más dominios de proteínas heterólogas diferentes son el dominio BH3 del inductor de la apoptosis tBID y el dominio BH3 del regulador de la apoptosis BAX, en particular los dominios BH3 fusionados comprendidos en la secuencia de las SEQ ID NO: 24 y 28.

Los dos dominios de proteínas heterólogas diferentes pueden conectarse mediante un enlazador de 1-30 aminoácidos de longitud, preferentemente 2-15 aminoácidos, con mayor preferencia 3-10 aminoácidos de longitud.

Otra proteína heteróloga preferida particular es un dominio de una proteína involucrada en la inducción o la regulación de una respuesta de IFN tipo I, más particularmente un dominio CARD de RIG1 que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 37, 38, 110, 111, 128, 129, un dominio CARD de MDA5 que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 44-47,112, 113, preferentemente las SEQ ID NO: 112 o 113, o un dominio CARD de MAVS/IPS-1 que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 116, 48-49, preferentemente la SEQ ID NO: 116, cGAS de longitud completa tal como cGAS de N. vectensis (SEQ ID NO: 43), cGAS humana$_{161-522}$ (SEQ ID NO: 115), cGAS de N. vectensis$_{60-422}$ (SEQ ID NO: 117) o cGAS murina$_{146-507}$ (SEQ ID NO: 131). Lo más particular un dominio CARD de RIG1 que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 37, 38, 110, 111, 128, 129, una proteína con dominio CARD que comprende MAVS/IPS-1 que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 116, 48-49, preferentemente la SEQ ID NO: 116, y cGAS de longitud completa tal como cGAS de N. vectensis (SEQ ID NO: 43), cGAS humana$_{161-522}$ (SEQ ID NO: 115) , cGAS de N. vectensis$_{60-422}$ (SEQ ID NO: 117) o cGAS murina$_{146-507}$ (SEQ ID NO: 131).

En algunas modalidades la proteína heteróloga es una enzima convertidora de profármaco. En estas modalidades la cepa bacteriana gramnegativa con virulencia atenuada recombinante expresa, preferentemente expresa y secreta una enzima convertidora de profármaco. Una enzima convertidora de profármaco como se refiere en la presente descripción comprende enzimas que convierten profármacos no tóxicos en un fármaco tóxico, preferentemente enzimas seleccionadas del grupo que consiste en citosina desaminasa, purina nucleósido fosforilasa, timidina quinasa, beta-galactosidasa, carboxilesterasas, nitrorreductasa, carboxipeptidasas y beta-glucuronidasas, con mayor preferencia enzimas seleccionadas del grupo que consiste en citosina desaminasa, purina nucleósido fosforilasa, timidina quinasa, y beta-galactosidasa.

El término "sitio de escisión por proteasa" como se usa en la presente descripción se refiere a un motivo de aminoácidos específico dentro de una secuencia de aminoácidos por ejemplo dentro de una secuencia de aminoácidos de una proteína o una proteína de fusión, que se escinde con una proteasa específica, que reconoce el motivo de aminoácidos. Para una reseña ver [14]. Los ejemplos de sitios de escisión por proteasas son motivos de aminoácidos, que se escinden con una proteasa

seleccionada del grupo que consiste en enteroquinasa (cadena ligera), enteropeptidasa, proteasa de precisión, proteasa de rinovirus humano (HRV 3C), proteasa de TEV, proteasa de TVMV, proteasa del Factor Xa y trombina.

El siguiente motivo de aminoácidos se reconoce por la proteasa respectiva:

- Asp-Asp-Asp-Asp-Lys: Enteroquinasa (cadena ligera) / Enteropeptidasa

- Leu-Glu-Val-Leu-Phe-Gln/Gly-Pro: Proteasa de precisión/proteasa de rinovirus humano (HRV 3C)

-Glu-Asn-Leu-Tyr-Phe-Gln-Ser y motivos modificados basados en el Glu-X-X-Tyr-X-Gln-Gly/Ser (donde X es cualquier aminoácido) reconocido por la proteasa de TEV (virus del grabado del tabaco)

-Glu-Thr-Val-Arg-Phe-Gln-Ser: Proteasa de TVMV

- Ile-(Glu o Asp)-Gly-Arg: Proteasa del Factor Xa

- Leu-Val-Pro-Arg/Gly-Ser: Trombina.

Abarcada en los sitios de escisión por proteasas como se usa en la presente descripción está la ubiquitina. Por lo tanto en algunas modalidades preferidas la ubiquitina se usa como sitio de escisión por proteasa, es decir una secuencia de nucleótidos codifica ubiquitina como sitio de escisión por proteasa, que puede escindirse con una de las proteasas de procesamiento de ubiquitina específicas en el sitio N-terminal, por ejemplo que pueden escindirse con proteasas de procesamiento de ubiquitina específicas llamadas enzimas desubiquitizantes en el sitio N-terminal de manera endógena en la célula donde la proteína de fusión se ha suministrado. La ubiquitina se procesa en su extremo C-terminal mediante un grupo de proteasas de C-terminal específicas de ubiquitina endógenas (enzimas desubiquitizantes, DUB). Se supone que la escisión de la ubiquitina por las DUB ocurre en el mismo extremo C-terminal de la ubiquitina (después de G76).

Un "individuo," "sujeto" o "paciente" es un vertebrado. En ciertas modalidades, el vertebrado es un mamífero. Los mamíferos incluyen, pero no se limitan a, primates (que incluyen los primates humanos y no humanos) y roedores (por ejemplo, ratones y ratas). En modalidades preferidas, un sujeto es un ser humano.

El término "mutación" se usa en la presente descripción como un término general e incluye cambios de un solo par de bases y de múltiples pares de bases. Tales mutaciones pueden incluir sustituciones, mutaciones de desplazamiento del marco de lectura, deleciones, inserciones y truncamientos.

El término “señal de localización nuclear” como se usa en la presente descripción se refiere a una secuencia de aminoácidos que marca una proteína para su importación al núcleo de una célula eucariota e incluye preferentemente una señal de localización nuclear viral tal como la NLS derivada del antígeno T grande de SV40 (PPKKKRKV).

El término “sitio de clonación múltiple” como se usa en la presente descripción se refiere a una secuencia de ADN corta que contiene varios sitios de restricción para la escisión por endonucleasas de restricción tales como AclI, HindIII, SspI, MluCI, Tsp509I, PciI, AgeI, BspMI, BfuAI, SexAI, MluI, BceAI, HpyCH4IV, HpyCH4III, BaeI, BsaXI, AflIII, SpeI, BsrI, BmrI, BglII, AfeI, AluI, StuI, ScaI, ClaI, BspDI, PI-SceI, NsiI, AseI, SwaI, CspCI, MfeI, BssSI, BmgBI, PmlI, DraIII, AleI, EcoP15I, PvuII, AlwNI, BtsIMutI, TspRI, NdeI, NlaIII, CviAII, FatI, MslI, FspEI, XcmI, BstXI, PflMI, BccI, NcoI, BseYI, FauI, SmaI, XmaI, TspMI, Nt.CviPII, LpnPI, AciI, SacII, BsrBI, MspI, HpaII, ScrFI, BssKI, StyD4I, BsaJI, BslI, BtgI, NciI, AvrII, MnlI, BbvCI, Nb.BbvCI, Nt.BbvCI, SbfI, Bpu10I, Bsu36I, EcoNI, HpyAV, BstNI, PspGI, StyI, BcgI, PvuI, BstUI, EagI, RsrII, BsiEI, BsiWI, BsmBI, Hpy99I, MspA1I, MspJI, SgrAI, BfaI, BspCNI, XhoI, EarI, AcuI, PstI, BpmI, DdeI, SfcI, AflII, BpuEI, SmlI, AvaI, BsoBI, MboII, BbsI, XmnI, BsmI, Nb.BsmI, EcoRI, HgaI, AatII, ZraI, Tth111I PflFI, PshAI, AhdI, DrdI, Eco53kI, SacI, BseRI, PleI, Nt.BstNBI, MlyI, HinfI, EcoRV, MboI, Sau3AI, DpnII BfuCI, DpnI, BsaBI, TfiI, BsrDI, Nb.BsrDI, BbvI, BtsI, Nb.BtsI, BstAPI, SfaNI, SphI, NmeAIII, NaeI, NgoMIV, BglI, AsiSI, BtgZI, HinP1I, HhaI, BssHII, NotI, Fnu4HI, Cac8I, MwoI, NheI, BmtI, SapI, BspQI, Nt.BspQI, BlpI, TseI, ApeKI, Bsp1286I, AlwI, Nt.AlwI, BamHI, FokI, BtsCI, HaeIII, PhoI, FseI, SfiI, NarI, KasI, SfoI, PluTI, AscI, EciI, BsmFI, ApaI, PspOMI, Sau96I, NlaIV, KpnI, Acc65I, BsaI, HphI, BstEII, AvaII, BanI, BaeGI, BsaHI, BanII, RsaI, CviQI, BstZ17I, BciVI, SalI, Nt.BsmAI, BsmAI, BcoDI, ApaLI, BsgI, AccI, Hpy166II, Tsp45I, HpaI, PmeI, HincII, BsiHKAI, ApoI, NspI, BsrFI, BstYI, HaeII, CviKI-1, EcoO109I, PpuMI, I-CeuI, SnaBI, I-SceI, BspHI, BspEI, MmeI, TaqαI, NruI, Hpy188I, Hpy188III, XbaI, BclI, HpyCH4V, FspI, PI-PspI, MscI, BsrGI, MseI, PacI, PsiI, BstBI, DraI, PspXI, BsaWI, BsaAI, EaeI, preferentemente XhoI, XbaI, HindIII, NcoI, NotI, EcoRI, EcoRV, BamHI, NheI, SacI, SalI, BstBI. El término “sitio de clonación múltiple” como se usa en la presente descripción se refiere además a una secuencia de ADN corta usada para eventos de recombinación como por ejemplo en la estrategia de clonación Gateway o para métodos tales como el ensamblaje de Gibbson o la clonación Topo.

El término “cepa de tipo silvestre” o “tipo silvestre de la cepa bacteriana gramnegativa” como se usa en la presente descripción se refiere a una variante de origen natural o una variante de origen

natural que contiene modificaciones genéticas que permiten el uso de vectores, tales como mutaciones de deleción en endonucleasas de restricción o genes de resistencia a antibióticos. Estas cepas contienen ADN cromosómico así como en algunos casos (por ejemplo *Y. enterocolitica*, *S. flexneri*) un plásmido de virulencia no modificado.

El término "cepa de tipo silvestre de *Yersinia*" como se usa en la presente descripción se refiere a una variante de origen natural (como *Y. enterocolitica* E40) o una variante de origen natural que contiene modificaciones genéticas que permiten el uso de vectores, tales como mutaciones de deleción en endonucleasas de restricción o genes de resistencia a antibióticos (como la *Y. enterocolitica* MRS40, el derivado sensible a ampicilina de la *Y. enterocolitica* E40) Estas cepas contienen ADN cromosómico así como un plásmido de virulencia no modificado (llamado pYV).

Y. enterocolitica subespecie *palearctica* se refiere a las cepas de *Y. enterocolitica* de baja patogenicidad, que se contraponen a las cepas de mayor virulencia de la subespecie *enterocolitica* [15,16]. *Y. enterocolitica* subsp. *palearctica* carece, en comparación con *Y. enterocolitica* subsp. *enterocolitica*, de una isla de alta patogenicidad (HPI). Esta HPI codifica el sideróforo de hierro llamado yersiniabactina [17]. La carencia de yersiniabactina en *Y. enterocolitica* subsp. *palearctica* hace a esta subespecie menos patogénica y dependiente del hierro accesible sistémico inducido para la infección persistente en por ejemplo hígado o bazo [17]. El hierro puede hacerse accesible a las bacterias en un individuo por ejemplo mediante el pretratamiento con deferoxamina, un quelante de hierro usado para tratar la sobrecarga de hierro en los pacientes [18].

El término "comprende" se usa generalmente en el sentido de incluir, es decir permitir la presencia de una o más características o componentes.

El término "aproximadamente" se refiere a un intervalo de valores ± 10 % de un valor especificado. Por ejemplo, la frase "aproximadamente 200" incluye ± 10 % de 200, o de 180 a 220.

En un aspecto la presente invención proporciona una cepa bacteriana gramnegativa con virulencia atenuada recombinante que comprende una molécula de nucleótidos 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 deleción 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.

En un aspecto adicional la presente invención proporciona una cepa bacteriana gramnegativa con virulencia atenuada recombinante que comprende una molécula de nucleótidos 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 un ARN dentro de una región termosensora de ARN corriente arriba de un gen que codifica una proteína de unión al ADN del tipo AraC endógena.

En un aspecto adicional la presente invención proporciona una cepa bacteriana gramnegativa con virulencia atenuada recombinante que comprende una molécula de nucleótidos 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 proteína heteróloga es una proteína involucrada en la inducción o regulación de una respuesta de interferón (IFN).

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona una cepa bacteriana gramnegativa con virulencia atenuada recombinante como se describe en la presente descripción, para el uso en un método para tratar el cáncer en un sujeto, el método 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. Preferentemente la presente invención proporciona una cepa bacteriana gramnegativa con virulencia atenuada recombinante como se describe en la presente descripción para el uso en un método para tratar un cáncer de tumor sólido maligno en un sujeto, en donde la cepa bacteriana gramnegativa con virulencia atenuada recombinante se acumula en el tumor sólido maligno, el método 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.

En algunas modalidades la cepa bacteriana gramnegativa con virulencia atenuada recombinante es deficiente en la producción de al menos una proteína efectora bacteriana que es virulenta hacia células eucariotas.

En una modalidad de la presente invención la cepa bacteriana gramnegativa con virulencia atenuada recombinante se transforma con una molécula de nucleótidos por ejemplo un vector que comprende en la dirección 5’ a 3’:

un promotor;

una primera secuencia de nucleótidos que codifica una señal de suministro de una proteína efectora bacteriana, unida operativamente a dicho promotor;

una segunda secuencia de nucleótidos que codifica una proteína heteróloga fusionada en marco al extremo 3’ de dicha primera secuencia de nucleótidos.

En una modalidad de la presente invención la cepa bacteriana gramnegativa con virulencia atenuada recombinante se transforma con una molécula de nucleótidos por ejemplo un vector que comprende en la dirección 5’ a 3’:

una primera secuencia de nucleótidos que codifica una señal de suministro o un fragmento de esta de una proteína efectora bacteriana;

una segunda secuencia de nucleótidos que codifica una proteína heteróloga fusionada en marco al extremo 3’ de dicha primera secuencia de nucleótidos.

Preferentemente la secuencia de nucleótidos que codifica una proteína heteróloga está flanqueada en su extremo 3’ por una secuencia de nucleótidos homóloga a la secuencia de nucleótidos del cromosoma o del plásmido de virulencia endógeno en el extremo 3’ de una señal de suministro de una proteína efectora bacteriana o a un fragmento de esta. Con mayor preferencia, esta secuencia de nucleótidos que flanquea la proteína homóloga en su extremo 3’ es homóloga a una secuencia de nucleótidos que reside dentro de 10 kbp en el cromosoma o en un plásmido de virulencia endógeno en el extremo 3’ de la señal de suministro de una proteína efectora bacteriana o a un fragmento de esta. En particular, esta secuencia de nucleótidos que flanquea la proteína homóloga en su extremo 3’ es homóloga a una secuencia de nucleótidos dentro del mismo operón en el cromosoma o en un plásmido de virulencia endógeno que la señal de suministro de una proteína efectora bacteriana o un fragmento de esta. En esta modalidad, la transformación se realiza usualmente de manera que la secuencia de nucleótidos fusionada se inserte por recombinación homóloga en un plásmido de virulencia endógeno o un cromosoma, preferentemente en un plásmido de virulencia endógeno, de la cepa bacteriana gramnegativa con virulencia atenuada

recombinante, y la secuencia de nucleótidos fusionada se une operativamente a un promotor de un plásmido de virulencia endógeno o de un cromosoma por ejemplo de una isla de patogenicidad cromosómica. Preferentemente la secuencia de nucleótidos fusionada se une operativamente a un promotor de un plásmido de virulencia endógeno. En esta modalidad la secuencia de nucleótidos comprende una señal de suministro o fragmento de esta de una proteína efectora bacteriana, preferentemente un fragmento de esta, que proporciona recombinación homóloga en el sitio homólogo en el cromosoma o en un plásmido de virulencia endógeno, preferentemente en un plásmido de virulencia endógeno, para dar como resultado la colocación de la secuencia de nucleótidos en marco al extremo 3' de la señal de suministro cromosómica o del plásmido de virulencia endógeno que se une operativamente al promotor endógeno.

En una modalidad adicional de la presente invención la cepa bacteriana gramnegativa con virulencia atenuada recombinante o la cepa bacteriana gramnegativa con virulencia atenuada recombinante, se transforma con una molécula de nucleótidos, preferentemente una molécula de nucleótidos de ADN, que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína heteróloga y una secuencia de nucleótidos que es homóloga o idéntica a una secuencia de nucleótidos que codifica una señal de suministro de una proteína efectora bacteriana o que es homóloga o idéntica a una secuencia de nucleótidos que codifica un fragmento de una señal de suministro de una proteína efectora bacteriana, en donde la señal de suministro de una proteína efectora bacteriana o un fragmento de esta se codifica en el cromosoma o en un plásmido de virulencia endógeno de la cepa bacteriana gramnegativa con virulencia atenuada recombinante. Preferentemente la secuencia de nucleótidos que es homóloga o idéntica a una secuencia de nucleótidos de una señal de suministro de una proteína efectora bacteriana o a un fragmento de esta se ubica en el extremo 5' de la secuencia de nucleótidos que codifica una proteína heteróloga. Con mayor preferencia la secuencia de nucleótidos que codifica una proteína heteróloga está flanqueada en su extremo 3' por una secuencia de nucleótidos homóloga a la secuencia de nucleótidos del cromosoma o del plásmido de virulencia endógeno en el extremo 3' de la señal de suministro de una proteína efectora bacteriana o a un fragmento de esta. Aun con mayor preferencia, esta secuencia de nucleótidos que flanquea la proteína homóloga en su extremo 3' es homóloga a la secuencia de nucleótidos que reside dentro de 10 kbp en el cromosoma o en un plásmido de virulencia endógeno en el extremo 3' de la señal de suministro de una proteína efectora bacteriana o a un fragmento de esta. En particular, esta secuencia de nucleótidos que flanquea la proteína homóloga en su extremo 3' es homóloga a la secuencia de nucleótidos y está dentro del mismo

operón en el cromosoma o en un plásmido de virulencia endógeno que la señal de suministro de una proteína efectora bacteriana o un fragmento de esta. En esta modalidad, la transformación se realiza usualmente de manera que la secuencia de nucleótidos que codifica una proteína heteróloga se inserte en un plásmido de virulencia endógeno o un cromosoma de la cepa bacteriana gramnegativa con virulencia atenuada recombinante, preferentemente en un plásmido de virulencia endógeno, en el extremo 3' de una señal de suministro de una proteína efectora bacteriana codificada por el cromosoma o el plásmido de virulencia endógeno, en donde la proteína heteróloga fusionada a la señal de suministro se expresa y se secreta.

En una modalidad de la presente invención la cepa bacteriana gramnegativa con virulencia atenuada recombinante comprende una deleción 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. Normalmente el gen que codifica la proteína endógena esencial para el crecimiento en el plásmido de virulencia endógeno codifica la misma proteína endógena esencial para el crecimiento codificada por el gen cromosómico eliminado. Preferentemente el gen que codifica una enzima endógena esencial para el crecimiento ubicado en el plásmido de virulencia endógeno comprende su promotor endógeno y su terminador de la transcripción endógeno. En caso que la cepa bacteriana gramnegativa con virulencia atenuada recombinante sea una cepa de Yersinia, el gen que codifica una enzima endógena esencial para el crecimiento se ubica en el plásmido de virulencia endógeno pYV y preferentemente comprende su promotor endógeno y su terminador de la transcripción endógeno. El gen que codifica la enzima endógena esencial para el crecimiento, el promotor endógeno y el terminador de la transcripción endógeno se ubica preferentemente 122 pb corriente arriba del inicio del orf155 (SycO) en el plásmido de virulencia endógeno por ejemplo en pYV. El gen que codifica la enzima endógena esencial para el crecimiento, el promotor endógeno y el terminador de la transcripción endógeno usualmente reemplaza una secuencia de inserción que se encuentra en pYVe40, el plásmido de virulencia de las cepas de *Y. enterocolitica* MRS40 y E40, pero no en pYVe227, el plásmido de virulencia de *Y. enterocolitica* W227O3 (Genbank: AF102990.1).

En caso que la cepa bacteriana gramnegativa con virulencia atenuada recombinante sea una cepa de *Yersinia* el plásmido de virulencia endógeno es pYV (plásmido de virulencia de Yersinia). En caso que la cepa bacteriana gramnegativa con virulencia atenuada recombinante sea una cepa de Salmonella, la ubicación endógena de la inserción es uno de los grupos de genes llamados SpiI o

SpiII (para la isla de patogenicidad de *Salmonella*), una posición donde una proteína efectora se codifica en otra parte o alternativamente uno de los plásmidos de virulencia de Salmonella (SVP). Preferentemente la 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 se inserta en un plásmido de virulencia endógeno en el sitio nativo de una proteína efectora bacteriana por ejemplo en el sitio nativo de un factor de virulencia, preferentemente en caso que la cepa bacteriana gramnegativa con virulencia atenuada recombinante sea una cepa de Yersinia, en el sitio nativo de YopE u otra Yop (YopH, YopO, YopP, YopM, YopT), preferentemente en el sitio nativo de YopE o en caso que la cepa bacteriana gramnegativa con virulencia atenuada recombinante sea una cepa de Salmonella en el sitio nativo de una proteína efectora codificada dentro de SpiI, SpiII o codificada en otra parte, preferentemente en el sitio nativo de una proteína efectora codificada dentro de SpiI o SpiII, con mayor preferencia en el sitio nativo de SopE o SteA. Preferentemente la 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 se une operativamente a un promotor nativo de una proteína efectora bacteriana presente en un plásmido de virulencia endógeno por ejemplo en caso que la cepa bacteriana gramnegativa con virulencia atenuada recombinante sea una cepa de *Yersinia* a un promotor nativo de un gen de virulón de *Yersinia* como se explica a continuación, con mayor preferencia al promotor nativo de YopE u otro promotor de Yop (YopH, YopO, YopP, YopM, YopT), preferentemente al promotor nativo de YopE o en caso que la cepa bacteriana gramnegativa con virulencia atenuada recombinante sea una cepa de Salmonella a un promotor nativo de la isla de patogenicidad SpiI o SpiII o de una proteína efectora codificada en otra parte como se explica a continuación, con mayor preferencia al promotor nativo de SopE, InvB o SteA.

En una modalidad de la presente invención la cepa bacteriana gramnegativa con virulencia atenuada recombinante comprende una deleción 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, 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 involucrada en biosíntesis de péptidoglicanos, un gen que codifica una enzima involucrada en la biosíntesis de LPS, un gen que

codifica una enzima involucrada en la síntesis de nucleótidos y un gen que codifica un factor de iniciación de la traducción.

En una modalidad de la presente invención la cepa bacteriana gramnegativa con virulencia atenuada recombinante comprende una deleción 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, y 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 se selecciona del grupo que consiste en aspartato-beta-semialdehído deshidrogenasa (asd), glutamina sintetasa (glnA), triptofanil ARNt sintetasa (trpS) o serina hidroximetil transferasa (glyA), o Transcetolasa 1 (tktA), Transcetolasa 2 (tktB), Ribulosa-fosfato 3-epimerasa (rpe), Ribosa-5-fosfato isomerasa A (rpiA), Transaldolasa A (talA), Transaldolasa B (talB), Fosforribosilpirofosfato sintasa (prs), ATP fosforribosiltransferasa (hisG), Proteína bifuncional HisIE de la biosíntesis de histidina (hisI), 1-(5-fosforribosil)-5-[(5-fosforribosilamino)metilidenamino] imidazol-4-carboxamida isomerasa (hisA), Subunidad HisH de imidazol glicerol fosfato sintasa (hisH), Subunidad HisF de imidazol glicerol fosfato sintasa (hisF), Proteína bifuncional HisB de la biosíntesis de histidina (hisB), Histidinol-fosfato aminotransferasa (hisC), Histidinol deshidrogenasa (hisD), 3-deshidroquinato sintasa (aroB), 3-deshidroquinato deshidratasa (aroD), Shikimato deshidrogenasa (NADP(+)) (aroE), Shikimato quinasa 2 (aroL), Shikimato quinasa 1 (aroK), 3-fosfoshikimato 1-carboxiviniltransferasa (aroA), Corismato sintasa (aroC), Proteína P (pheA), Proteína T (tyrA), Aminotransferasa de aminoácidos aromáticos (tyrB), Fosfo-2-deshidro-3-desoxiheptonato aldolasa (aroG), Fosfo-2-deshidro-3-desoxiheptonato aldolasa (aroH), Fosfo-2-deshidro-3-desoxiheptonato aldolasa (aroF), Quinato/shikimato deshidrogenasa (ydiB), 6-fosfofructoquinasa dependiente de ATP isozima 1 (pfkA), 6-fosfofructoquinasa dependiente de ATP isozima 2 (pfkB), Fructosa-bisfosfato aldolasa clase 2 (fbaA), Fructosa-bisfosfato aldolasa clase 1 (fbaB), Triosafosfato isomerasa (tpiA), Piruvato quinasa I (pykF), Piruvato quinasa II (pykA), Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa A (gapA), Fosfoglicerato quinasa (pgk), Fosfoglicerato mutasa dependiente de 2,3-bisfosfoglicerato (gpmA), Fosfoglicerato mutasa independiente de 2,3-bisfosfoglicerato (gpmM/yibO), Fosfoglicerato mutasa probable (ytjC/gpmB), Enolasa (eno), D-3-fosfoglicerato deshidrogenasa (serA), Fosfoserina aminotransferasa (serC), Fosfoserina fosfatasa (serB), L-serina deshidratasa 1

(sdaA), L-serina deshidratasa 2 (sdaB), L-treonina deshidratasa catabólica (tdcB), L-treonina deshidratasa biosintética (ilvA), L-serina deshidratasa (tdcG), Serina acetiltransferasa (cysE), Cisteína sintasa A (cysK), Cisteína sintasa B (cysM), beta-cistationasa (malY), Cistationina beta-liasa (metC), 5-metiltetrahidropteroiltriglutamato-homocisteína metiltransferasa (metE), Metionina sintasa (metH), S-adenosilmetionina sintasa (metK), Cistationina gamma-sintasa (metB), Homoserina O-succiniltransferasa (metA), 5'-metiltioadenosina/S-adenosilhomocisteína nucleosidasa (mtnN), S-ribosilhomocisteína liasa (luxS), Cistatión beta liasa, Cistatión gamma liasa, Serina hidroximetiltransferasa (glyA), Glicina hidroximetiltransferasa (itaE), Subunidad pequeña de 3-isopropilmalato deshidratasa (leuD), Subunidad grande de 3-isopropilmalato deshidratasa (leuC), 3-isopropilmalato deshidrogenasa (leuB), L-treonina deshidratasa biosintética (ilvA), Subunidad grande de acetolactato sintasa isozima 3 (ilvI), Subunidad pequeña de acetolactato sintasa isozima 3 (ilvH), Subunidad pequeña de acetolactato sintasa isozima 1 (ilvN), Subunidad pequeña de acetolactato sintasa isozima 2 (ilvM), Cetoácido reductoisomerasa (NADP(+)) (ilvC), Dihidroxiácido deshidratasa (ilvD), Aminotransferasa de aminoácidos de cadena ramificada (ilvE), Aspartoquinasa/homoserina deshidrogenasa 1 bifuncional (thrA), Aspartoquinasa/homoserina deshidrogenasa 2 bifuncional (metL), 2-isopropilmalato sintasa (leuA), Glutamato-piruvato aminotransferasa (alaA), Aspartato aminotransferasa (aspC), Aspartoquinasa/homoserina deshidrogenasa 1 bifuncional (thrA), Aspartoquinasa/homoserina deshidrogenasa 2 bifuncional (metL), Aspartoquinasa 3 sensible a lisina (lysC), Aspartato-semialdehído deshidrogenasa (asd), 2-ceto-3-desoxi-galactonato aldolasa (yagE), 4-hidroxi-tetrahidrodipicolinato sintasa (dapA), 4-hidroxi-tetrahidrodipicolinato reductasa (dapB), 2,3,4,5-tetrahidropiridina-2,6-dicarboxilato N-succiniltransferasa (dapD), Succinil-diaminopimelato desuccinilasa (dapE), Diaminopimelato epimerasa (dapF), Liasa putativa (yjhH), Acetilornitina/succinildiaminopimelato aminotransferasa (argD), Citrato sintasa (gltA), Aconitato hidratasa B (acnB), Aconitato hidratasa A (acnA), Aconitato hidratasa putativa no caracterizada (ybhJ), Isocitrato deshidrogenasa (icd), Aspartato aminotransferasa (aspC), Glutamato-piruvato aminotransferasa (alaA), Glutamato sintasa [NADPH] cadena grande (gltB), Glutamato sintasa [NADPH] cadena pequeña (gltD), Glutamina sintetasa (glnA), Acetiltransferasa de aminoácidos (argA), Acetilglutamato quinasa (argB), N-acetil-gamma-glutamil-fosfato reductasa (argC), Acetilornitina/succinildiaminopimelato aminotransferasa (argD), Acetilornitina desacetilasa (argE), Ornitina carbamoiltransferasa cadena F (argF), Ornitina carbamoiltransferasa cadena I (argI), Argininosuccinato sintasa (argG), Argininosuccinato liasa (argH), Glutamato 5-quinasa

(proB), Gamma-glutamil fosfato reductasa (proA), Pirrolino-5-carboxilato reductasa (proC), Ornitina ciclodesaminasa, Leucina-ARNt ligasa (leuS), Glutamina-ARNt ligasa (glnS), Serina-ARNt ligasa (serS), Subunidad beta de glicina-ARNt ligasa (glyS), Subunidad alfa de glicina-ARNt ligasa (glyQ), Tirosina-ARNt ligasa (tyrS), Treonina-ARNt ligasa (thrS), Subunidad alfa de fenilalanina-ARNt ligasa (pheS), Subunidad beta de fenilalanina-ARNt ligasa (pheT), Arginina-ARNt ligasa (argS), Histidina-ARNt ligasa (hisS), Valina-ARNt ligasa (valS), Alanina-ARNt ligasa (alaS), Isoleucina-ARNt ligasa (ileS), Prolina-ARNt ligasa (proS), Cisteína-ARNt ligasa (cysS), Asparagina-ARNt ligasa (asnS), Aspartato-ARNt ligasa (aspS), Glutamato-ARNt ligasa (gltX), Triptófano-ARNt ligasa (trpS), Subunidad beta de glicina-ARNt ligasa (glyS), Metionina-ARNt ligasa (metG), Lisina-ARNt ligasa (lysS). Las enzimas esenciales preferidas para la producción de aminoácidos son tktA, rpe, prs, aroK, tyrB, aroH, fbaA, gapA, pgk, eno, tdcG, cysE, metK, glyA, asd, dapA/B/D/E/F, argC, proC, leuS, glnS, serS, glyS/Q, tyrS, thrS, pheS/T, argS, hisS, valS, alaS, ileS, proS, cysS, asnS, aspS, gltX, trpS, glyS, metG, lysS, las de mayor preferencia son asd, glyA, leuS, glnS, serS, glyS/Q, tyrS, thrS, pheS/T, argS, hisS, valS, alaS, ileS, proS, cysS, asnS, aspS, gltX, trpS, glyS, metG, lysS, la de máxima preferencia es asd.

En una modalidad de la presente invención 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. 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 puede ser una deleción, una inserción, o una sustitución dentro de la región termosensora de ARN. Una deleción o una inserción comprende usualmente una deleción o una inserción de uno o varios, preferentemente entre aproximadamente 30 y aproximadamente 100 nucleótidos, con mayor preferencia entre aproximadamente 40 y aproximadamente 60 nucleótidos. Una sustitución comprende usualmente una sustitución de uno o varios, preferentemente entre aproximadamente 3 y aproximadamente 30 nucleótidos, con mayor preferencia entre aproximadamente 3 y aproximadamente 15 nucleótidos. Preferentemente, 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 es una deleción, preferentemente una deleción de entre aproximadamente 30 y aproximadamente 100 nucleótidos, con mayor preferencia de entre aproximadamente 40 y aproximadamente 60 nucleótidos dentro de una región termosensora de ARN corriente arriba de un gen que codifica una proteína de unión al ADN del tipo AraC endógena. La proteína de unión al ADN del tipo AraC endógena y la región

termosensora de ARN corriente arriba de un gen que codifica la proteína de unión al ADN del tipo AraC se ubican usualmente en el plásmido de virulencia endógeno comprendido en la cepa bacteriana gramnegativa con virulencia atenuada recombinante. La proteína de unión al ADN del tipo AraC se selecciona preferentemente del grupo que consiste en VirF, LcrF, MxiE, ExsA, PerA, HrpX, HrpB, GadX, HilC, HilD e InvF. Con mayor preferencia, la proteína de unión al ADN del tipo AraC se selecciona del grupo que consiste en VirF y LcrF. En algunas modalidades la cepa bacteriana gramnegativa con virulencia atenuada recombinante es *Yersinia* enterolitica la proteína de unión al ADN del tipo AraC es VirF.

Preferentemente 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 modulación que interfiere con una horquilla de ARN, preferentemente con la Horquilla I, corriente arriba del gen que codifica una proteína de unión al ADN del tipo AraC endógena. Con mayor preferencia 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 deleción que elimina una estructura en horquilla de ARN o partes de esta, preferentemente partes de la horquilla I, corriente arriba del gen que codifica una proteína de unión al ADN del tipo AraC endógena. Una deleción que elimina una estructura en horquilla de ARN o partes de esta, comprende usualmente una deleción de entre aproximadamente 30 y aproximadamente 100 nucleótidos, preferentemente de entre aproximadamente 40 y aproximadamente 60 nucleótidos. En algunas modalidades la cepa bacteriana gramnegativa con virulencia atenuada recombinante es *Yersinia* enterolitica la deleción comprende una deleción de los nucleótidos en la posición -111 a -57 corriente arriba de la secuencia codificante de virF (donde -1 es 1 base corriente arriba de la A del codón de iniciación ATG de la secuencia codificante de virF).

En una modalidad de la presente invención la cepa bacteriana gramnegativa con virulencia atenuada recombinante se selecciona del grupo que consiste en los géneros *Yersinia*, *Escherichia*, *Salmonella* y *Pseudomonas*. En una modalidad la cepa bacteriana gramnegativa con virulencia atenuada recombinante se selecciona del grupo que consiste en los géneros *Yersinia* y *Salmonella*. Preferentemente la cepa bacteriana gramnegativa con virulencia atenuada recombinante es una *cepa de Yersinia*, con mayor preferencia una cepa de *Yersinia enterocolitica*. La de máxima preferencia es *Yersinia enterocolitica* E40 (O:9, biotipo 2) [19] o derivados de esta sensibles a la ampicilina como *Y. enterocolitica* MRS40 (también llamada *Y. enterocolitica* subsp. *palearctica* MRS40) como se describe en [20]. *Y. enterocolitica* E40 y su derivado *Y. enterocolitica* MRS40

como se describe en [20] es idéntica a *Y. enterocolitica* subsp. *palearctica* E40 y su derivado *Y. enterocolitica* subsp. *palearctica* MRS40 como se describe en [15,17,21]. Además preferentemente la cepa bacteriana gramnegativa con virulencia atenuada recombinante es una *cepa de Salmonella*, con mayor preferencia una cepa de *Salmonella enterica*. La de máxima preferencia es *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium SL1344 como se describe en la colección de cultivos inglesa de salud pública (NCTC 13347).

En algunas modalidades de la presente invención la cepa bacteriana gramnegativa con virulencia atenuada recombinante es una cepa que no produce un sideróforo por ejemplo es deficiente en la producción de un sideróforo, preferentemente no produce sideróforos por ejemplo es deficiente en la producción de cualquier sideróforo. Una cepa de este tipo es por ejemplo *Y. enterocolitica* subsp. *palearctica* MRS40 como se describe en [15,17,20,21] que no produce yersiniabactina y que se prefiere.

En una modalidad de la presente invención la señal de suministro de una proteína efectora bacteriana comprende una proteína efectora bacteriana o un fragmento del extremo N-terminal de esta, preferentemente una proteína efectora bacteriana que es virulenta hacia células eucariotas o un fragmento del extremo N-terminal de esta.

En una modalidad de la presente invención la señal de suministro de una proteína efectora bacteriana es una proteína efectora del T3SS bacteriano que comprende una proteína efectora del T3SS bacteriano o un fragmento del extremo N-terminal de esta en donde la proteína efectora del T3SS o un fragmento del extremo N-terminal de esta puede comprender un sitio de unión a chaperonas. Una proteína efectora del T3SS o un fragmento del extremo N-terminal de esta que comprende un sitio de unión a chaperonas es particularmente útil como señal de suministro en la presente invención. Las proteínas efectoras del T3SS preferidas o los fragmentos del extremo N-terminal de estas se seleccionan del grupo que consiste en SopE, SopE2, SptP, YopE, ExoS, SipA, SipB, SipD, SopA, SopB, SopD, IpgB1, IpgD, SipC, SifA, SseJ, Sse, SrfH, YopJ, AvrA, AvrBsT, YopT, YopH, YpkA, Tir, EspF, TccP2, IpgB2, OspF, Map, OspG, OspI, IpaH, SspH1,VopF, ExoS, ExoT, HopAB2, XopD, AvrRpt2, HopAO1, HopPtoD2, HopU1, familia de proteínas GALA, AvrBs2, AvrD1, AvrBS3, YopO, YopP, YopE, YopM, YopT, EspG, EspH, EspZ, IpaA, IpaB, IpaC, VirA, IcsB, OspC1, OspE2, IpaH9.8, IpaH7.8, AvrB, AvrD, AvrPphB, AvrPphC, AvrPphEPto, AvrPpiBPto, AvrPto, AvrPtoB, VirPphA, AvrRpm1, HopPtoE, HopPtoF, HopPtoN, PopB, PopP2, AvrBs3, XopD y AvrXv3. Las proteínas efectoras del T3SS más preferidas o los fragmentos del extremo N-terminal de estas se seleccionan del grupo que consiste en SopE, SptP,

YopE, ExoS, SopB, IpgB1, IpgD, YopJ, YopH, EspF, OspF, ExoS, YopO, YopP, YopE, YopM, YopT, donde las proteínas efectoras del T3SS más preferidas o los fragmentos del extremo N-terminal de estas se seleccionan del grupo que consiste en IpgB1, SopE, SopB, SptP, OspF, IpgD, YopH, YopO, YopP, YopE, YopM, YopT, en particular YopE o un fragmento del extremo N-terminal de esta.

Las proteínas efectoras del T3SS igualmente preferidas o los fragmentos del extremo N-terminal de estas se seleccionan del grupo que consiste en SopE, SopE2, SptP, SteA, SipA, SipB, SipD, SopA, SopB, SopD, IpgB1, IpgD, SipC, SifA, SifB, SseJ, Sse, SrfH, YopJ, AvrA, AvrBsT, YopH, YpkA, Tir, EspF, TccP2, IpgB2, OspF, Map, OspG, OspI, IpaH, VopF, ExoS, ExoT, HopAB2, AvrRpt2, HopAO1, HopU1, familia de proteínas GALA, AvrBs2, AvrD1, YopO, YopP, YopE, YopT, EspG, EspH, EspZ, IpaA, IpaB, IpaC, VirA, IcsB, OspC1, OspE2, IpaH9.8, IpaH7.8, AvrB, AvrD, AvrPphB, AvrPphC, AvrPphEPto, AvrPpiBPto, AvrPto, AvrPtoB, VirPphA, AvrRpm1, HopPtoD2, HopPtoE, HopPtoF, HopPtoN, PopB, PopP2, AvrBs3, XopD y AvrXv3. Las proteínas efectoras del T3SS igualmente más preferidas o los fragmentos del extremo N-terminal de estas se seleccionan del grupo que consiste en SopE, SptP, SteA, SifB, SopB, IpgB1, IpgD, YopJ, YopH, EspF, OspF, ExoS, YopO, YopP, YopE, YopT, donde las proteínas efectoras del T3SS igualmente más preferidas o los fragmentos del extremo N-terminal de estas se seleccionan del grupo que consiste en IpgB1, SopE, SopB, SptP, SteA, SifB, OspF, IpgD, YopH, YopO, YopP, YopE, y YopT, en particular SopE, SteA, o YopE o un fragmento del extremo N-terminal de estas, más en particular SteA o YopE o un fragmento del extremo N-terminal de esta, más en particular YopE o un fragmento del extremo N-terminal de esta.

En algunas modalidades la señal de suministro de una proteína efectora bacteriana es codificada por una secuencia de nucleótidos que comprende la proteína efectora bacteriana o un fragmento del extremo N-terminal de esta, en donde el fragmento del extremo N-terminal de esta incluye al menos los primeros 10, preferentemente al menos los primeros 20, con mayor preferencia al menos los primeros 100 aminoácidos de la proteína efectora del T3SS bacteriano.

En algunas modalidades la señal de suministro de la proteína efectora bacteriana es codificada por una secuencia de nucleótidos que comprende la proteína efectora del T3SS bacteriano o un fragmento del extremo N-terminal de esta, en donde la proteína efectora del T3SS bacteriano o el fragmento del extremo N-terminal de esta comprende un sitio de unión a chaperonas.

Las proteínas efectoras del T3SS preferidas o un fragmento del extremo N-terminal de esta, que comprenden un sitio de unión a chaperonas comprenden las siguientes combinaciones del sitio de

unión a chaperonas y la proteína efectora del T3SS o el fragmento del extremo N-terminal de esta: SycE-YopE, InvB-SopE, SicP-SptP, SycT-YopT, SycO-YopO, SycN/YscB-YopN, SycH-YopH, SpcS-ExoS, CesF-EspF, SycD-YopB, SycD-YopD. Las de mayor preferencia son SycE-YopE, InvB-SopE, SycT-YopT, SycO-YopO, SycN/YscB-YopN, SycH-YopH, SpcS-ExoS, CesF-EspF. La de máxima preferencia es una YopE o un fragmento del extremo N-terminal de esta que comprende el sitio de unión a chaperonas SycE tal como un fragmento del extremo N-terminal de una proteína efectora YopE que contiene los 138 aminoácidos del extremo N-terminal de la proteína efectora YopE designada en la presente descripción como $YopE_{1-138}$ y como se muestra en la SEQ ID NO. 2 o una SopE o un fragmento del extremo N-terminal de esta que comprende el sitio de unión a chaperonas InvB tal como un fragmento del extremo N-terminal de una proteína efectora SopE que contiene los 81 o 105 aminoácidos del extremo N-terminal de la proteína efectora SopE designada en la presente descripción como $SopE_{1-81}$ o $SopE_{1-105}$ respectivamente, y como se muestra en las SEQ ID NO.: 6 y 7.

En una modalidad de la presente invención la cepa bacteriana gramnegativa con virulencia atenuada recombinante es una cepa de *Yersinia* y la señal de suministro de la proteína efectora bacteriana comprende una proteína efectora YopE o una parte N-terminal, preferentemente la proteína efectora YopE de *Y. enterocolitica* o una parte N-terminal de esta. Preferentemente el sitio de unión a SycE está comprendido dentro de la parte N-terminal de la proteína efectora YopE. En esta conexión un fragmento del extremo N-terminal de una proteína efectora YopE puede comprender los 12, 16, 18, 52, 53, 80 o 138 aminoácidos del extremo N-terminal [22-24]. El de máxima preferencia es un fragmento del extremo N-terminal de una proteína efectora YopE que contiene los 138 aminoácidos del extremo N-terminal de la proteína efectora YopE, por ejemplo, como se describe en Forsberg y Wolf-Watz [25] designada en la presente descripción como $YopE_{1-138}$ y como se muestra en la SEQ ID NO.: 2.

En una modalidad de la presente invención la cepa bacteriana gramnegativa con virulencia atenuada recombinante es una cepa de *Salmonella* y la señal de suministro de la proteína efectora bacteriana codificada por una secuencia de nucleótidos comprende una proteína efectora SopE o SteA o una parte N-terminal de esta, preferentemente la proteína efectora SopE o SteA de *Salmonella* enterica o una parte N-terminal de esta. Preferentemente el sitio de unión a chaperonas está comprendido dentro de la parte N-terminal de la proteína efectora SopE. En esta conexión un fragmento del extremo N-terminal de una proteína efectora SopE puede comprender los aminoácidos 81 o 105 N-terminal. La de máxima preferencia es la SteA de longitud completa

(SEQ ID NO: 5) y un fragmento del extremo N-terminal de una proteína efectora SopE que contiene los aminoácidos 105 N-terminal de la proteína efectora, por ejemplo, como se describe en la SEQ ID NO.: 7.

Un experto en la técnica está familiarizado con los métodos para identificar las secuencias polipeptídicas de una proteína efectora que son capaces de suministrar una proteína. Por ejemplo, un método tal es el descrito por Sory y otros [19]. En resumen, las secuencias polipeptídicas, por ejemplo, de diversas porciones de las proteínas Yop pueden fusionarse en marco a una enzima reportera tal como el dominio adenilato ciclasa activado por calmodulina (o Cya) de la ciclolisina de *Bordetella pertussis*. El suministro de una proteína híbrida Yop-Cya al citosol de células eucariotas se indica por la aparición de actividad ciclasa en las células eucariotas infectadas que conduce a la acumulación de AMPc. Mediante el empleo de un enfoque tal, un experto en la técnica puede determinar, si desea, el requerimiento de secuencia mínima, es decir, una secuencia aminoacídica contigua de la longitud más corta, que es capaz de suministrar una proteína, ver, por ejemplo [19]. En consecuencia, las señales de suministro preferidas de la presente invención consisten en al menos la secuencia aminoacídica mínima de una proteína efectora del T3SS que es capaz de suministrar una proteína.

En una modalidad, la presente invención proporciona una cepa bacteriana gramnegativa con virulencia atenuada recombinante que es deficiente en la producción de al menos una proteína efectora bacteriana, con mayor preferencia que es deficiente en la producción de al menos una proteína efectora bacteriana que es virulenta hacia células eucariotas, incluso con mayor preferencia que es deficiente en la producción de al menos una proteína efectora del T3SS, con la máxima preferencia que es deficiente en la producción de al menos una proteína efectora del T3SS que es virulenta hacia células eucariotas. En algunas modalidades las cepas bacterianas gramnegativas con virulencia atenuada recombinante son deficientes en la producción de al menos una, preferentemente al menos dos, con mayor preferencia al menos tres, incluso con mayor preferencia al menos cuatro, en particular al menos cinco, más particular al menos seis, más particular todas las proteínas efectoras bacterianas que son virulentas hacia células eucariotas. En algunas modalidades las cepas bacterianas gramnegativas con virulencia atenuada recombinantes son deficientes en la producción de al menos una preferentemente al menos dos, con mayor preferencia al menos tres, incluso con mayor preferencia al menos cuatro, en particular al menos cinco, más particular al menos seis, más particular todas las proteínas efectoras bacterianas funcionales que son virulentas hacia células eucariotas de manera que la cepa bacteriana

gramnegativa con virulencia atenuada recombinante resultante produce menos proteínas efectoras bacterianas o produce proteínas efectoras bacterianas en menor medida en comparación con la cepa de tipo silvestre bacteriana gramnegativa con virulencia no atenuada, es decir, en comparación con la cepa de tipo silvestre bacteriana gramnegativa que normalmente produce proteínas efectoras bacterianas o de manera que la cepa bacteriana gramnegativa con virulencia atenuada recombinante resultante no produce más ninguna de las proteínas efectoras bacterianas funcionales que son virulentes hacia células eucariotas.

De acuerdo con la presente invención, una cepa bacteriana gramnegativa mutante tal, es decir, una cepa bacteriana gramnegativa con virulencia atenuada recombinante tal que es deficiente en la producción de al menos una proteína efectora bacteriana, por ejemplo, que es deficiente en la producción de al menos una proteína efectora bacteriana que es virulenta hacia células eucariotas, por ejemplo, una cepa de *Yersinia* mutante tal puede generarse mediante la introducción de al menos una mutación en al menos un gen codificante de efector. Preferentemente, tales genes codificantes de efector incluyen YopE, YopH, YopO/YpkA, YopM, YopP/YopJ y YopT en lo que se refiere a una cepa de *Yersinia*. Preferentemente, tales genes codificantes de efector incluyen AvrA, CigR, GogB, GtgA, GtgE, PipB, SifB, SipA/SspA, SipB, SipC/SspC, SipD/SspD, SlrP, SopB/SigD, SopA, SpiC/SsaB, SseB, SseC, SseD, SseF, SseG, SseI/SrfH, SopD, SopE, SopE2, SspH1, SspH2, PipB2, SifA, SopD2, SseJ, SseK1, SseK2, SseK3, SseL, SteC, SteA, SteB, SteD, SteE, SpvB, SpvC, SpvD, SrfJ, SptP, en lo que se refiere a una cepa de *Salmonella*. Con la máxima preferencia, se delecionan todos los genes codificantes de efector. El experto puede emplear cualquier cantidad de técnicas estándar para generar mutaciones en estos genes de efectores T3SS. Sambrook y otros describen en general tales técnicas. Ver Sambrook y otros [26].

De acuerdo con la presente invención, la mutación puede generarse en la región promotora de un gen codificante de efector de manera que se suprime la expresión de tal gen de efector.

La mutación puede generarse también en la región codificante de un gen codificante de efector de manera que se suprime la actividad catalítica de la proteína efectora codificada. La "actividad catalítica" de un proteína efectora se refiere normalmente a la función anti-célula diana de una proteína efectora, es decir, la toxicidad. Tal actividad es gobernada por los motivos catalíticos en el dominio catalítico de una proteína efectora. Los enfoques para identificar el dominio catalítico y/o los motivos catalíticos de una proteína efectora son bien conocidos por los expertos en la técnica. Ver, por ejemplo, [27,28].

En consecuencia, una mutación preferida de la presente invención es una deleción del dominio catalítico completo. Otra mutación preferida es una mutación de desplazamiento del marco de lectura en un gen codificante de efector de manera que el dominio catalítico no está presente en el producto proteico expresado a partir de tal gen "con marco desplazado". Una mutación más preferida es una mutación con la deleción de la región codificante completa de la proteína efectora. Otras mutaciones también se contemplan por la presente invención, tales como pequeñas deleciones o sustituciones de pares de bases, que se generan en los motivos catalíticos de una proteína efectora conduciendo a la destrucción de la actividad catalítica de una proteína efectora dada.

Las mutaciones que se generan en los genes de las proteínas efectoras bacterianas funcionales pueden introducirse en la cepa particular mediante un número de métodos. Un método tal implica clonar un gen mutado en un vector "suicida" que es capaz de introducir la secuencia mutada en la cepa a través del intercambio alélico. Un ejemplo de un vector "suicida" tal se describe en [29].

De esta manera, las mutaciones generadas en múltiples genes pueden introducirse sucesivamente en una cepa bacteriana gramnegativa dando lugar a un polimutante, por ejemplo, una cepa recombinante con seis mutaciones. No es importante el orden en el que se introducen estas secuencias mutadas. Bajo algunas circunstancias, puede ser conveniente mutar solo algunos pero no todos los genes de efectores. En consecuencia, la presente invención también contempla *Yersinia* polimutante en lugar de *Yersinia* con seis mutaciones, por ejemplo, cepas con dos mutaciones, con tres mutaciones, con cuatro mutaciones y con cinco mutaciones. Para el propósito de suministrar proteínas, el sistema de secreción y translocación de la cepa mutante de la presente necesita estar intacto.

Una cepa bacteriana gramnegativa con virulencia atenuada recombinante preferida de la presente invención es una cepa de *Yersinia* con seis mutaciones en la que todos los genes codificantes de efector se mutan de manera que la *Yersinia* resultante no produce más ninguna de las proteínas efectoras funcionales. Tal cepa de *Yersinia* con seis mutaciones es designada como ΔyopH,O,P,E,M,T para *Y. enterocolitica*. Como un ejemplo un mutante síxtuple tal puede producirse a partir de la cepa *Y. enterocolitica* MRS40 lo que da lugar a *Y. enterocolitica* MRS40 ΔyopH,O,P,E,M,T, (también llamada *Y. enterocolitica* subsp. *palearctica* MRS40 ΔyopH,O,P,E,M,T o *Y. enterocolitica* ΔyopH,O,P,E,M,T en la presente descripción) la cual se prefiere. *La Y. enterocolitica* MRS40 ΔyopH,O,P,E,M,T que es deficiente en la producción de Yersiniabactina se ha descrito en el documento WO02077249 y se depositó el 24 de septiembre de

2001, de acuerdo con el Tratado de Budapest sobre el Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos a los Propósitos del Procedimiento en materia de Patentes con las Colecciones Coordinadas de Microorganismos de Bélgica (BCCM) y se le proporcionó el número de acceso LMG P-21013.

La de mayor preferencia es la *Y. enterocolitica* MRS40 ΔyopH,O,P,E,M,T que comprende una deleción en el plásmido pYV de virulencia endógeno que elimina una estructura de horquilla de ARN o partes de esta tal como una deleción de Horquilla I corriente arriba del gen que codifica una proteína de unión al ADN del tipo AraC endógena (ΔHorquillaI-virF) tal como *Y. enterocolitica* MRS40 ΔyopH,O,P,E,M,T ΔHorquillaI-virF (también llamada *Y. enterocolitica* ΔyopH,O,P,E,M,T ΔHorquillaI-virF). Igualmente preferida es la *Y. enterocolitica* MRS40 ΔyopH,O,P,E,M,T que comprende una deleción de un gen cromosómico que codifica asd y el plásmido pYV de virulencia endógeno que comprende una secuencia de nucleótidos que comprende un gen que codifica asd unido operativamente a un promotor (pYV-asd) tal como *Y. enterocolitica* MRS40 ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd pYV-asd (también llamada *Y. enterocolitica* ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd pYV-asd en la presente descripción). Particularmente preferida es la *Y. enterocolitica* MRS40 ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd ΔHorquilla-virF pYV-asd que comprende ambas modificaciones como se describió anteriormente (también llamada *Y. enterocolitica* ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd ΔHorquillaI-virF pYV-asd en la presente descripción). Las cepas particularmente preferidas son *Y. enterocolitica* MRS40 ΔyopH,O,P,E,M,T ΔHorquillaI-virF (también llamada *Y. enterocolitica* ΔyopH,O,P,E,M,T ΔHorquillaI-virF), *Y. enterocolitica* MRS40 ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd pYV-asd (también llamada *Y. enterocolitica* ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd pYV-asd en la presente descripción) o *Y. enterocolitica* MRS40 ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd ΔHorquillaI-virF pYV-asd (también llamada *Y. enterocolitica* ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd ΔHorquillaI-virF pYV-asd en la presente descripción) que son deficientes en la producción de un sideróforo, preferentemente no producen sideróforos, por ejemplo, son deficientes en la producción de cualquier sideróforo, como es el caso para todas las cepas de Y. enterocolitica subsp. palearctica. Por lo tanto, las cepas particulares igualmente preferidas son *Y. enterocolitica* subsp. palearctica ΔyopH,O,P,E,M,T ΔHorquillaI-virF (también llamada *Y. enterocolitica* subsp. palearctica ΔyopH,O,P,E,M,T ΔHorquillaI-virF), *Y. enterocolitica* subsp. palearctica ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd pYV-asd también llamada *Y. enterocolitica* ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd pYV-asd en la presente descripción) o *Y. enterocolitica* subsp. palearctica ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd

ΔHorquillaI-virF pYV-asd (también llamada *Y. enterocolitica* ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd ΔHorquillaI-virF pYV-asd en la presente descripción).

Las moléculas de nucleótidos como los vectores que pueden usarse de acuerdo con la invención para transformar una cepa bacteriana gramnegativa pueden depender de las cepas bacterianas gramnegativas usadas como conoce el experto. Las moléculas de nucleótidos que pueden usarse de acuerdo con la invención incluyen vectores de expresión (que incluyen versiones sintéticas o de cualquier otra manera modificadas generadas de los plásmidos de virulencia endógenos), vectores para la inserción cromosómica o en el plásmido de virulencia y secuencias de nucleótidos tales como, por ejemplo, fragmentos de ADN para la inserción cromosómica o en el plásmido de virulencia. Los vectores de expresión que son útiles, por ejemplo, en una cepa de *Yersinia, Escherichia, Salmonella* o *Pseudomonas* son, por ejemplo, los plásmidos pUC, pBad, pACYC, pUCP20 y pET. Los vectores para la inserción cromosómica o en el plásmido de virulencia que son útiles, por ejemplo, en una cepa de *Yersinia, Escherichia, Salmonella* o *Pseudomonas* son, por ejemplo, pKNG101. Los fragmentos de ADN para la inserción cromosómica o en el plásmido de virulencia se refiere a métodos usados, por ejemplo, en una cepa de *Yersinia, Escherichia, Salmonella* o *Pseudomonas* como, por ejemplo, ingeniería genética con lambda-red. Los vectores para la inserción cromosómica o en el plásmido de virulencia o fragmentos de ADN para la inserción cromosómica o en el plásmido de virulencia pueden insertar las secuencias de nucleótidos de la presente invención de manera que, por ejemplo, la 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 se une operativamente a un promotor endógeno de la cepa bacteriana gramnegativa con virulencia atenuada recombinante. Por lo tanto si se usa un vector para la inserción cromosómica o en el plásmido de virulencia o un fragmento de ADN para la inserción cromosómica o en el plásmido de virulencia, un promotor endógeno puede codificarse en el ADN bacteriano endógeno (ADN cromosómico o plasmídico) y solo la secuencia de nucleótidos respectiva será proporcionada por el vector transformado para la inserción cromosómica o en el plásmido de virulencia o un fragmento de ADN para la inserción cromosómica o en el plásmido de virulencia. Alternativamente, si se usa un vector para la inserción cromosómica o en el plásmido de virulencia o una molécula de nucleótido tal como, por ejemplo, una secuencia de nucleótidos para la inserción cromosómica o en el plásmido de virulencia, pueden codificarse un promotor endógeno y la señal de suministro de una proteína efectora bacteriana en el ADN bacteriano endógeno (ADN cromosómico o plasmídico) y solo la molécula de nucleótido

tal como, por ejemplo, una secuencia de nucleótidos que codifica la proteína heteróloga será proporcionada por un vector para la inserción cromosómica o en el plásmido de virulencia o por una molécula de nucleótido tal como, por ejemplo, una secuencia de nucleótidos para la inserción cromosómica o en el plásmido de virulencia. Por lo tanto, no es necesario que un promotor esté comprendido por el vector usado para la transformación de las cepas bacterianas gramnegativas con virulencia atenuada recombinantes, es decir, las cepas bacterianas gramnegativas con virulencia atenuada recombinantes de la presente invención pueden transformarse con un vector que no comprende un promotor.

En una modalidad preferida la molécula de nucleótido, por ejemplo, el vector de la presente invención comprende en la dirección 5' a 3':

una primera secuencia de nucleótidos que codifica una señal de suministro o un fragmento de esta de una proteína efectora bacteriana;

una segunda secuencia de nucleótidos que codifica una proteína heteróloga fusionada en marco al extremo 3' de dicha primera secuencia de nucleótidos.

Un vector preferido, por ejemplo, un vector de expresión preferido para *Yersinia* se selecciona del grupo que consiste en pBad_Si_1 y pBad_Si_2. pBad_Si2 se construyó mediante la clonación del fragmento SycE-YopE$_{1-138}$ que contenía promotores endógenos para YopE y SycE a partir de pYV40 purificado en el sitio de KpnI/HindIII de pBad-MycHisA (Invitrogen). Las modificaciones adicionales incluyen la eliminación del fragmento de NcoI/BglII de pBad-MycHisA mediante digestión, tratamiento y religación del fragmento Klenow. Además, en el extremo 3' de YopE$_{1-138}$ se añadieron los siguientes sitios de escisión: XbaI-XhoI-BstBI-(HindIII). pBad_Si1 es igual a pBad_Si2 pero codifica EGFP amplificado a partir de pEGFP-C1 (Clontech) en el sitio de NcoI/BglII bajo el promotor inducible por Arabinosa. Igualmente preferido es el uso de versiones modificadas del plásmido pYV de virulencia hacia *Yersinia* endógeno que codifican proteínas heterólogas como fusiones a una secuencia señal de T3SS.

Un vector preferido, por ejemplo, un vector de expresión preferido para *Salmonella* se selecciona del grupo que consiste en pSi_266, pSi_267, pSi_268 y pSi_269. Los plásmidos pSi_266, pSi_267, pSi_268 y pSi_269 que contenían el promotor endógeno correspondiente y el fragmento SteA$_{1-20}$ (pSi_266), la secuencia de SteA de longitud completa (pSi_267), el fragmento SopE$_{1-81}$ (pSi_268) o el fragmento SopE$_{1-105}$ (pSi_269) se amplificaron a partir del ADN genómico de *S. enterica* SL1344 y se clonaron en el sitio de NcoI/KpnI de pBad-MycHisA (Invitrogen).

Las moléculas de nucleótidos, por ejemplo, los vectores de la presente invención pueden incluir otros elementos de secuencia tales como una secuencia de terminación 3' (que incluye un codón de parada y una secuencia poli A), o un gen que confiere una resistencia a fármacos que permite la selección de transformantes que han recibido el vector de la presente.

Las moléculas de nucleótidos, por ejemplo, los vectores de la presente invención pueden transformarse mediante una serie de métodos conocidos en las cepas bacterianas gramnegativas con virulencia atenuada recombinantes. Para el propósito de la presente invención, los métodos de transformación para introducir un vector incluyen, pero no se limitan a, electroporación, transformación mediada por fosfato de calcio, conjugación, o combinaciones de estos. Por ejemplo, unas moléculas de nucleótidos, por ejemplo, un vector pueden transformarse en una primera cepa bacteriana mediante un procedimiento de electroporación estándar. Posteriormente, unas moléculas de nucleótidos tales, por ejemplo, un vector pueden transferirse desde la primera cepa bacteriana a la cepa deseada mediante conjugación, un proceso también llamado "movilización". El transformante (es decir, las cepas bacterianas gramnegativas que han captado el vector) puede seleccionarse, por ejemplo, con antibióticos. Estas técnicas son bien conocidas en la técnica. Ver, por ejemplo, [19].

De acuerdo con la presente invención, el promotor unido operativamente a la proteína efectora bacteriana de la cepa bacteriana gramnegativa con virulencia atenuada recombinante de la invención puede ser un promotor nativo de una proteína efectora del T3SS de la cepa respectiva o una cepa bacteriana compatible o un promotor usado en vectores de expresión que son útiles, por ejemplo, en una cepa de *Yersinia, Escherichia, Salmonella* o *Pseudomonas*, por ejemplo, pUC y pBad. Tales promotores son el promotor T7, el promotor Plac o el promotor Ara-bad inducible por Ara-bad.

Si la cepa bacteriana gramnegativa con virulencia atenuada recombinante es una cepa de *Yersinia* el promotor puede ser de un gen de virulón de *Yersinia*. Un "gen de virulón de Yersinia" se refiere a los genes en el plásmido pYV de *Yersinia*, cuya expresión es controlada tanto por la temperatura como por cualquier contacto con una célula diana. Tales genes incluyen los genes que codifican elementos de la maquinaria de secreción (los genes Ysc), genes que codifican translocadores (YopB, YopD, y LcrV), genes que codifican los elementos de control (YopN, TyeA y LcrG), genes que codifican chaperonas de efectores T3SS (SycD, SycE, SycH, SycN, SycO y SycT), y genes que codifican efectores (YopE, YopH, YopO/YpkA, YopM, YopT y YopP/YopJ) así como otras proteínas codificadas por pYV como VirF y YadA.

En una modalidad preferida de la presente invención, el promotor es el promotor nativo de un gen que codifica un efector funcional T3SS. Si la cepa bacteriana gramnegativa con virulencia atenuada recombinante es una cepa de *Yersinia* el promotor se selecciona de cualquiera de YopE, YopH, YopO/YpkA, YopM y YopP/YopJ. Con mayor preferencia, el promotor es de YopE o SycE. El de máxima preferencia es el promotor de YopE.

Si la cepa bacteriana gramnegativa con virulencia atenuada recombinante es una cepa de *Salmonella* el promotor puede ser de la isla de patogenicidad SpiI o SpiII o de una proteína efectora codificada en cualquier otro sitio. Tales genes incluyen genes que codifican elementos de la maquinaria de secreción, genes que codifican translocadores, genes que codifican los elementos de control, genes que codifican chaperonas de efectores T3SS y genes que codifican efectores así como otras proteínas codificadas por SPI-1 o SPI-2. En una modalidad preferida de la presente invención, el promotor es el promotor nativo de un gen que codifica un efector funcional T3SS. Si la cepa bacteriana gramnegativa con virulencia atenuada recombinante es una cepa de *Salmonella* el promotor se selecciona de cualquiera de las proteínas efectoras. Con mayor preferencia, el promotor es de SopE, InvB o SteA.

En algunas modalidades el promotor es un promotor artificialmente inducible, por ejemplo, como el promotor inducible por arabinosa, el cual se prefiere. En este caso, la arabinosa se proporciona generalmente a las bacterias y después inducirá la expresión bacteriana de la proteína a suministrar.

En una modalidad de la presente invención la cepa bacteriana gramnegativa con virulencia atenuada recombinante comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un sitio de escisión por proteasas. El sitio de escisión por proteasas se localiza generalmente en la 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 entre la secuencia de nucleótidos que codifica una proteína heteróloga y la secuencia de nucleótidos que codifica una señal de suministro. La generación de un sitio de escisión funcional y generalmente aplicable permite la escisión de la señal de suministro después de la translocación. Como la señal de suministro puede interferir con la localización y/o función correcta de la proteína translocada dentro de las células diana la introducción de un sitio de escisión por proteasas entre la señal de suministro y la proteína de interés proporciona el suministro de las proteínas casi nativas a las células eucariotas. Preferentemente el sitio de escisión por proteasas es un motivo aminoacídico que es escindido por una proteasa o los dominios catalíticos de esta seleccionada del grupo que consiste en

enteroquinasa (cadena ligera), enteropeptidasa, proteasa de precisión, proteasa de rinovirus humano 3C, proteasa de TEV, proteasa de TVMV, proteasa de FactorXa y trombina, con mayor preferencia un motivo aminoacídico que es escindido por una proteasa de TEV. Igualmente preferible el sitio de escisión por proteasas es un motivo aminoacídico que es escindido por una proteasa o los dominios catalíticos de esta seleccionada del grupo que consiste en enteroquinasa (cadena ligera), enteropeptidasa, proteasa de precisión, proteasa de rinovirus humano 3C, proteasa de TEV, proteasa de TVMV, proteasa de FactorXa, proteasa de procesamiento de ubiquitina, llamada enzimas desubiquitinadoras y trombina. El de máxima preferencia es un motivo aminoacídico que es escindido por una proteasa de TEV o por una proteasa de procesamiento de ubiquitina.

Por lo tanto en una modalidad adicional de la presente invención, la proteína heteróloga es escindida de la señal de suministro de una proteína efectora bacteriana por una proteasa. Los métodos de escisión preferidos son los métodos en donde:

a) la proteasa se transloca a la célula eucariota por una cepa bacteriana gramnegativa con virulencia atenuada recombinante según se describe en la presente descripción la cual expresa una proteína de fusión que comprende la señal de suministro de la proteína efectora bacteriana y la proteasa como proteína heteróloga; o

b) la proteasa se expresa constitutivamente o transitoriamente en la célula eucariota.

En general la cepa bacteriana gramnegativa con virulencia atenuada recombinante usada para suministrar una proteína deseada en una célula eucariota y la cepa bacteriana gramnegativa con virulencia atenuada recombinante que transloca la proteasa a la célula eucariota son diferentes.

En una modalidad de la presente invención la cepa bacteriana gramnegativa con virulencia atenuada recombinante comprende una secuencia de nucleótidos adicional que codifica una molécula de marcaje o un sitio aceptor para una molécula de marcaje. La secuencia de nucleótidos adicional que codifica una molécula de marcaje o un sitio aceptor para una molécula de marcaje se fusiona generalmente al extremo 5’ o al extremo 3’ de la secuencia de nucleótidos que codifica una proteína heteróloga. Una molécula de marcaje preferida o un sitio aceptor para una molécula de marcaje se selecciona del grupo que consiste en proteína fluorescente verde mejorada (EGFP), cumarina, sitio aceptor de cumarina ligasa, resorufin, sitio aceptor de resurofin ligasa, el motivo de tetra-Cisteína en uso con el colorante FlAsH/ReAsH (life technologies). El de mayor preferencia es resorufin y un sitio aceptor de resurofin ligasa o EGFP. El uso de una molécula de marcaje o un sitio aceptor para una molécula de marcaje conducirá a la unión de una molécula de marcaje a la

proteína heteróloga de interés, que después se suministrará como tal a la célula eucariota y posibilitará el seguimiento de la proteína, por ejemplo, mediante microscopía de células vivas.

En una modalidad de la presente invención la cepa bacteriana gramnegativa con virulencia atenuada recombinante comprende una secuencia de nucleótidos adicional que codifica una etiqueta peptídica. La secuencia de nucleótidos adicional que codifica una etiqueta peptídica se fusiona generalmente al extremo 5' o al extremo 3' de la secuencia de nucleótidos que codifica una proteína heteróloga. Una etiqueta peptídica preferida se selecciona del grupo que consiste en etiqueta Myc, etiqueta His, etiqueta Flag, etiqueta HA, etiqueta Strep o etiqueta V5 o una combinación de dos o más etiquetas de estos grupos. La de mayor preferencia es la etiqueta Myc, etiqueta Flag, etiqueta His y etiquetas de Myc y de His combinadas. El uso de una etiqueta peptídica conducirá a la trazabilidad de la proteína etiquetada, por ejemplo, mediante inmunofluorescencia o transferencia Western con el uso de anticuerpos anti-etiqueta. Además, el uso de una etiqueta peptídica permite la purificación por afinidad de la proteína deseada ya sea después de la secreción en el sobrenadante de cultivo o después de la translocación a células eucariotas, en ambos casos con el uso de un método de purificación adecuado a la etiqueta correspondiente (por ejemplo la purificación por afinidad con quelatos metálicos en uso con una etiqueta His o purificación basada en anticuerpos anti-Flag en uso con la etiqueta Flag).

En una modalidad de la presente invención la cepa bacteriana gramnegativa con virulencia atenuada recombinante comprende una secuencia de nucleótidos adicional que codifica una señal de localización nuclear (NLS). La secuencia de nucleótidos adicional que codifica una señal de localización nuclear (NLS) se fusiona generalmente al extremo 5' o al extremo 3' de la secuencia de nucleótidos que codifica una proteína heteróloga en donde dicha secuencia de nucleótidos adicional codifica una señal de localización nuclear (NLS). Una NLS preferida se selecciona del grupo que consiste en NLS del antígeno T largo de SV40 y derivados de esta [30] así como otra NLS viral. La de mayor preferencia es la NLS del antígeno T largo de SV40 y derivados de esta.

En una modalidad de la presente invención la cepa bacteriana gramnegativa con virulencia atenuada recombinante comprende un sitio de clonación múltiple. El sitio de clonación múltiple se localiza generalmente en el extremo 3' de la secuencia de nucleótidos que codifica una señal de suministro de una proteína efectora bacteriana y/o en el extremo 5' o extremo 3' de la secuencia de nucleótidos que codifica una proteína heteróloga. Uno o más de uno de los sitios de clonación múltiples pueden estar comprendidos por el vector. Un sitio de clonación múltiple se selecciona del

grupo de enzimas de restricción que consiste en XhoI, XbaI, HindIII, NcoI, NotI, EcoRI, EcoRV, BamHI, NheI, SacI, SalI, BstBI. La de mayor preferencia es XbaI, XhoI, BstBI y HindIII.

La proteína fusionada expresada por la cepa bacteriana gramnegativa con virulencia atenuada recombinante de la presente invención se denomina además una "proteína de fusión" o una "proteína híbrida", es decir, una proteína fusionada o híbrida de la señal de suministro y una proteína heteróloga. La proteína de fusión puede comprender además, por ejemplo, una señal de suministro y dos o más proteínas heterólogas diferentes.

La presente invención contempla los métodos para tratar el cáncer en un sujeto, por ejemplo, para tratar tumores sólidos malignos que incluye suministrar proteínas heterólogas como se describió anteriormente a células cancerígenas, por ejemplo, a células de un tumor sólido maligno. Las proteínas pueden suministrarse, es decir, translocarse a la célula cancerígena, por ejemplo, a células de un tumor sólido maligno en el momento de administrar la cepa bacteriana gramnegativa con virulencia atenuada recombinante a un sujeto o pueden suministrarse, es decir, translocarse a la célula cancerígena, por ejemplo, a células de un tumor sólido maligno en un momento posterior, por ejemplo, después de que la cepa bacteriana gramnegativa con virulencia atenuada recombinante haya alcanzado una célula cancerígena, por ejemplo, el sitio del tumor sólido maligno y/o haya alcanzado una célula cancerígena, por ejemplo, el sitio del tumor sólido maligno y se haya replicado como se describió anteriormente. El momento de suministro puede ser regulado, por ejemplo, por el promotor usado para expresar las proteínas heterólogas en la cepa bacteriana gramnegativa con virulencia atenuada recombinante. En el primer caso, un promotor constitutivo o, de mayor preferencia, un promotor endógeno de una proteína efectora bacteriana podría conducir la proteína heteróloga. En el caso del suministro proteico retardado, un promotor artificialmente inducible, como el promotor inducible por arabinosa, podría conducir la proteína heteróloga. En este caso, la arabinosa se administrará a un sujeto una vez que las bacterias hayan alcanzado y se hayan acumulado en el sitio deseado. La arabinosa después inducirá la expresión bacteriana de la proteína a suministrar.

Por lo tanto, en una modalidad el método para tratar el cáncer comprende

i) cultivar la cepa bacteriana gramnegativa con virulencia atenuada recombinante según se describe en la presente descripción;

ii) administrar al sujeto dicha cepa bacteriana gramnegativa con virulencia atenuada recombinante mediante el contacto de una célula cancerígena con la cepa bacteriana gramnegativa con virulencia atenuada recombinante de i) en donde una proteína de fusión que comprende una señal de

suministro de una proteína efectora bacteriana y la proteína heteróloga es expresada por la cepa bacteriana gramnegativa con virulencia atenuada recombinante y se transloca a la célula cancerígena; y opcionalmente

iii) escindir la proteína de fusión de manera que la proteína heteróloga sea escindida de la señal de suministro de la proteína efectora bacteriana dentro de la célula cancerígena,

en donde la cepa bacteriana gramnegativa con virulencia atenuada recombinante se administra en una cantidad que es suficiente para tratar al sujeto.

Las células cancerígenas para suministrar proteínas heterólogas en general son células cancerígenas de cánceres seleccionados de tumores no sólidos seleccionados del grupo que consiste en Sarcoma, Leucemia, Linfoma, mieloma múltiple, cánceres del sistema nervioso central, y tumores sólidos malignos, que incluyen, pero no se limitan a, masa anormal de células que pueden ser la madre de diferentes tipos de tejidos tales como hígado, colon, colorrecto, piel, mama, páncreas, cuello uterino, cuerpo uterino, vejiga, vesícula biliar, riñón, laringe, labio, cavidad oral, esófago, ovario, próstata, estómago, testículos, glándula tiroides o pulmón y, por lo tanto, incluyen tumores sólidos malignos de hígado, colon, colorrecto, piel, mama, páncreas, cuello uterino, cuerpo uterino, vejiga, vesícula biliar, riñón, laringe, labio, cavidad oral, esófago, ovario, próstata, estómago, testículo, glándula tiroides o pulmón. Preferentemente, las células cancerígenas para suministrar proteínas heterólogas son tumores sólidos malignos.

Por lo tanto, en una modalidad preferida el cáncer es un tumor sólido maligno y el método r comprende

i) cultivar la cepa bacteriana gramnegativa con virulencia atenuada recombinante según se describe en la presente descripción;

ii) administrar al sujeto dicha cepa bacteriana gramnegativa con virulencia atenuada recombinante mediante el contacto de una célula de un tumor sólido maligno con la cepa bacteriana gramnegativa con virulencia atenuada recombinante de i) en donde una proteína de fusión que comprende una señal de suministro de una proteína efectora bacteriana y la proteína heteróloga es expresada por la cepa bacteriana gramnegativa con virulencia atenuada recombinante y se transloca a la célula de un tumor sólido maligno; y opcionalmente

iii) escindir la proteína de fusión de manera que la proteína heteróloga se escinde de la señal de suministro de la proteína efectora bacteriana dentro de la célula de un tumor sólido maligno,

en donde la cepa bacteriana gramnegativa con virulencia atenuada recombinante se administra en una cantidad que es suficiente para tratar al sujeto.

En algunas modalidades al menos dos proteínas de fusión cada una que comprende una señal de suministro de una proteína efectora bacteriana y una proteína heteróloga son expresadas por la cepa bacteriana gramnegativa con virulencia atenuada recombinante y se translocan a la célula eucariota, por ejemplo, la célula cancerígena mediante los métodos de las presentes invenciones.

La cepa bacteriana gramnegativa con virulencia atenuada recombinante puede cultivarse de manera que se expresa una proteína de fusión que comprende la señal de suministro de la proteína efectora bacteriana y la proteína heteróloga de acuerdo con los métodos conocidos en la técnica (por ejemplo FDA, Bacteriological Analytical Manual (BAM), capítulo 8: *Yersinia enterocolitica*). Preferentemente, la cepa bacteriana gramnegativa con virulencia atenuada recombinante puede cultivarse en caldo de infusión Brain Heart, por ejemplo, a 28 °C. Para la inducción de la expresión de T3SS y, por ejemplo, los genes dependientes del promotor de YopE/SycE, las bacterias pueden cultivarse a 37 °C.

En una modalidad, la célula cancerígena, por ejemplo, la célula de un tumor sólido maligno se pone en contacto con dos cepas bacterianas gramnegativas con virulencia atenuada recombinantes de i), en donde la primera cepa bacteriana gramnegativa con virulencia atenuada recombinante expresa una primera proteína de fusión que comprende la señal de suministro de la proteína efectora bacteriana y una primera proteína heteróloga y la segunda cepa bacteriana gramnegativa con virulencia atenuada recombinante expresa una segunda proteína de fusión que comprende la señal de suministro de la proteína efectora bacteriana y una segunda proteína heteróloga, de manera que la primera y la segunda proteína de fusión se translocan a la célula de un tumor sólido maligno. Esta modalidad proporciona la coinfección de una célula cancerígena, por ejemplo, una célula de un tumor sólido maligno con dos cepas bacterianas como un método válido para suministrar, por ejemplo, dos proteínas híbridas diferentes en células únicas para dirigir su interacción funcional.

El experto en la técnica puede usar además un número de ensayos para determinar si el suministro de una proteína de fusión es exitoso. Por ejemplo, la proteína de fusión puede detectarse a través de inmunofluorescencia con el uso de anticuerpos que reconocen una etiqueta fusionada (como la etiqueta Myc). La determinación también puede basarse en la actividad enzimática de la proteína que se suministra, por ejemplo, el ensayo descrito en [19].

La presente invención proporciona además una composición farmacéutica que comprende una cepa bacteriana gramnegativa con virulencia atenuada recombinante según se describe en la presente descripción opcionalmente que comprende un portador farmacéuticamente aceptable adecuado.

Por lo tanto, la presente invención proporciona además una composición farmacéutica que comprende una cepa bacteriana gramnegativa con virulencia atenuada recombinante según se describe en la presente descripción para el uso en un método para tratar el cáncer, por ejemplo, un tumor sólido maligno en un sujeto.

Las bacterias gramnegativas con virulencia atenuada recombinantes pueden combinarse para la administración conveniente y eficaz en una cantidad que sea suficiente para tratar al sujeto como una composición farmacéutica con un portador farmacéuticamente aceptable adecuado. Una forma de dosificación unitaria de las bacterias gramnegativas con virulencia atenuada recombinantes o de la composición farmacéutica a administrar puede contener, por ejemplo, las bacterias gramnegativas con virulencia atenuada recombinantes en una cantidad de aproximadamente 10^5 a aproximadamente 10^9 bacterias por ml, preferentemente aproximadamente 10^6 a aproximadamente 10^8 bacterias por ml, con mayor preferencia aproximadamente 10^7 a aproximadamente 10^8 bacterias por ml, con la máxima preferencia aproximadamente 10^8 bacterias por ml.

Por "cantidad que es suficiente para tratar al sujeto " o “cantidad eficaz” los cuales se usan en la presente descripción indistintamente pretende ser una cantidad de una bacteria o bacterias, lo suficientemente alta para modificar positivamente de manera significativa la afección a tratar pero lo suficientemente baja para evitar efectos secundarios graves (en una relación beneficio/riesgo razonable), dentro del alcance de un buen juicio médico. Una cantidad eficaz de una bacteria variará con el objetivo particular a lograr, la edad y la condición física del sujeto a tratar, la duración del tratamiento, la naturaleza de la terapia concurrente y la bacteria específica empleada. La cantidad eficaz de una bacteria será, por lo tanto la cantidad mínima, que proporcionará el efecto deseado. En general una cantidad de aproximadamente 10^5 a aproximadamente 10^9 bacterias, por ejemplo, de aproximadamente 10^5 a aproximadamente 10^9 bacterias/m^2 de superficie corporal, preferentemente de aproximadamente 10^6 a aproximadamente 10^8 bacterias, por ejemplo, de aproximadamente 10^6 a aproximadamente 10^8 bacterias/m^2 de superficie corporal, con mayor preferencia de aproximadamente 10^7 a aproximadamente 10^8 bacterias, por ejemplo, de aproximadamente 10^7 a aproximadamente 10^8 bacterias/m^2 de superficie corporal, con la máxima preferencia 10^8 bacterias, por ejemplo, 10^8 bacterias/m^2 de superficie corporal se administran al sujeto.

Una dosis única de la cepa bacteriana gramnegativa con virulencia atenuada recombinante a administrar a un sujeto, por ejemplo a un ser humano para tratar el cáncer, por ejemplo, un tumor sólido maligno es en general de aproximadamente 10^4 a aproximadamente 10^{10} bacterias, por

ejemplo, de aproximadamente 10^4 bacterias/m^2 de superficie corporal a aproximadamente 10^{10} bacterias/m^2 de superficie corporal, preferentemente de aproximadamente 10^5 a aproximadamente 10^9 bacterias, por ejemplo, de aproximadamente 10^5 a aproximadamente 10^9 bacterias/m^2 de superficie corporal, con mayor preferencia de aproximadamente 10^6 a aproximadamente 10^8 bacterias, por ejemplo, de aproximadamente 10^6 a aproximadamente 10^8 bacterias/m^2 de superficie corporal, incluso con mayor preferencia de aproximadamente 10^7 a aproximadamente 10^8 bacterias, por ejemplo, de aproximadamente 10^7 a aproximadamente 10^8 bacterias/m^2 de superficie corporal, con la máxima preferencia 10^8 bacterias, por ejemplo, 10^8 bacterias/m^2 de superficie corporal de las bacterias gramnegativas con virulencia atenuada recombinantes totales.

Los ejemplos de sustancias que pueden servir como portadores farmacéuticos son azúcares, tales como lactosa, glucosa y sacarosa; almidones tales como almidón de maíz y almidón de papa; celulosa y sus derivados tales como carboximetilcelulosa de sodio, acetatos de etilcelulosa y celulosa; tragacanto en polvo; malta; gelatina; talco; ácidos esteáricos; estearato de magnesio; sulfato de calcio; carbonato de calcio; aceites vegetales, tales como aceite de cacahuate, aceite de semilla de algodón, aceite de sésamo, aceite de oliva, aceite de maíz y aceite de teobroma; polioles tales como propilenglicol, glicerina, sorbitol, manitol, y polietilenglicol; agar; ácidos algínicos; agua libre de pirógenos; salina isotónica; extractos de arándanos y solución de tampón fosfato; polvo de leche descremada; así como otras sustancias compatibles no tóxicas usadas en formulaciones farmacéuticas tales como Vitamina C, estrógeno y equinacea, por ejemplo. También pueden estar presentes agentes humectantes y lubricantes tales como laurilsulfato de sodio, así como agentes colorantes, agentes saborizantes, lubricantes, excipientes, agentes de formación de tabletas, estabilizantes, antioxidantes y conservantes.

Los modos de administración de las bacterias gramnegativas con virulencia atenuada recombinantes a un sujeto pueden seleccionarse del grupo que consiste en administración intravenosa, intratumoral, intraperitoneal y peroral. Aunque no se pretende limitar esta invención a algún modo de aplicación particular, se prefieren la administración intravenosa o intratumoral de las bacterias o las composiciones farmacéuticas.

Dependiendo de la ruta de administración, puede ser necesario revestir los ingredientes activos que comprenden bacterias en un material para proteger a dichos organismos de la acción de las enzimas, ácidos y otras condiciones naturales que puedan inactivar dichos organismos. Para administrar bacterias por otra administración diferente de la parenteral, estas deberían revestirse por, o administrarse con, un material para prevenir la inactivación. Por ejemplo, las bacterias

pueden coadministrarse con inhibidores enzimáticos o en liposomas. Los inhibidores enzimáticos incluyen el inhibidor de tripsina pancreática, diisopropilfluorofosfato (DFP) y trasilol. Los liposomas incluyen emulsiones de P40 de agua en aceite en agua así como liposomas convencionales y diseñados específicamente que transportan bacterias, tales como Lactobacillus, o sus subproductos a una diana interna de un sujeto huésped.

Una bacteria puede administrarse sola o junto con una segunda bacteria diferente. Cualquier cantidad de bacterias diferentes pueden usarse juntas. Por "junto con" se entiende junto, de manera sustancialmente simultánea o secuencial. Las composiciones pueden administrarse además en la forma de una tableta, píldora o cápsula, por ejemplo, tal como una cápsula liofilizada que comprende las bacterias o las composiciones farmacéuticas de la presente invención o como soluciones de bacterias congeladas o las composiciones farmacéuticas de la presente invención que contienen DMSO o glicerol. Otra forma de aplicación preferida implica la preparación de una cápsula liofilizada de las bacterias o las composiciones farmacéuticas de la presente invención. Aún otra forma de aplicación preferida implica la preparación de una cápsula secada al calor de las bacterias o las composiciones farmacéuticas de la presente invención.

Las bacterias gramnegativas con virulencia atenuada recombinantes o la composición farmacéutica a administrar pueden administrarse mediante inyección. Las formas adecuadas para uso inyectable incluyen soluciones acuosas monosépticas o estériles (solubles en agua) o dispersiones y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. En todos los casos la forma debe ser monoséptica o estéril y debe ser fluida para que exista una fácil inyectabilidad. Debería ser estable bajo las condiciones de fabricación y almacenamiento. El portador puede ser un solvente o medio de dispersión que contenga, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, polietilenglicol líquido y similares), mezclas adecuadas de estos y aceites vegetales. La fluidez apropiada puede mantenerse, por ejemplo, mediante el uso de un revestimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersión. En muchos casos será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares o cloruro de sodio. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede proporcionarse mediante el uso en las composiciones de agentes de absorción retardada, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

En algunas modalidades de la presente invención la cepa bacteriana gramnegativa con virulencia atenuada recombinante se coadministra con un sideróforo al sujeto. Se prefieren estas modalidades. Los sideróforos que pueden coadministrarse son sideróforos que incluyen hidroxamato, catecolato

y ligandos sideróforos mixtos. Los sideróforos preferidos son Deferoxamina (también conocida como desferrioxamina B, desferoxamina B, DFO-B, DFOA, DFB o desferal), Desferrioxamina E, Deferasirox (Exjade, Desirox, Defrijet, Desifer) y Deferiprona (Ferriprox), el de mayor preferencia es Deferoxamina. La Deferoxamina es un sideróforo bacteriano producido por la Actinobacteria *Streptomyces pilosus* y está disponible comercialmente de, por ejemplo, Novartis Pharma Schweiz AG (Suiza).

La coadministración con un sideróforo puede ser antes, simultáneamente o después de la administración de la cepa bacteriana gramnegativa con virulencia atenuada recombinante. Preferentemente un sideróforo se administra antes de la administración de una cepa bacteriana gramnegativa con virulencia atenuada recombinante, con mayor preferencia se administra al menos 1 hora, preferentemente al menos 6 horas, con mayor preferencia al menos 12 horas, en particular al menos 24 horas antes de la administración de la cepa bacteriana gramnegativa con virulencia atenuada recombinante al sujeto. En una modalidad particular el sujeto se trata previamente con desfreoxamina 24 h antes de la infección con la cepa bacteriana gramnegativa con virulencia atenuada recombinante para permitir el crecimiento bacteriano. En general un sideróforo se coadministra a una dosis única de aproximadamente $0.5x10^{-5}$ Mol a aproximadamente $1x10^{-3}$ Mol, con mayor preferencia de aproximadamente $1x10^{-5}$ Mol a aproximadamente $1x10^{-4}$ Mol preferentemente de aproximadamente $3.5x10^{-5}$ Mol a aproximadamente $1.1x10^{-4}$ Mol por kg de peso corporal. En general la desferoxamina se coadministra a una dosis única de aproximadamente 20 mg a aproximadamente 60 mg preferentemente de aproximadamente 20 mg a aproximadamente 60 mg por kg de peso corporal.

Los regímenes de dosis de la administración de la cepa bacteriana gramnegativa con virulencia atenuada recombinante o la composición farmacéutica descrita en la presente descripción variarán con el objetivo particular a lograr, la edad y condición física del sujeto que se trata, la duración del tratamiento, la naturaleza de la terapia concurrente y la bacteria específica empleada, como es conocido por el experto. La cepa bacteriana gramnegativa con virulencia atenuada recombinante en general se administra al sujeto de acuerdo con un régimen de dosificación que consiste en una dosis única cada 1-20 días, preferentemente cada 1-10 días, con mayor preferencia cada 1-7 días. El período de administración en general es de aproximadamente 20 a aproximadamente 60 días, preferentemente aproximadamente 30-40 días. Alternativamente el período de administración en general es de aproximadamente 8 a aproximadamente 32 semanas, preferentemente

aproximadamente 8 a aproximadamente 24 semanas, con mayor preferencia aproximadamente 12 a aproximadamente 16 semanas.

En una modalidad adicional la presente invención proporciona un kit para tratar el cáncer, por ejemplo, tal como tumores sólidos malignos, preferentemente en un ser humano. Tales kits generalmente comprenderán la cepa bacteriana gramnegativa con virulencia atenuada recombinante o la composición farmacéutica descrita en la presente descripción y las instrucciones para usar el kit. En algunas modalidades, los kits incluyen un portador, paquete o recipiente que está compartimentado para recibir uno o más recipientes tales como viales, tubos y similares, cada uno de los recipientes incluye uno de los elementos separados a usar en un método descrito en la presente descripción. Los recipientes adecuados incluyen, por ejemplo, botellas, viales, jeringas y tubos de ensayo. En otras modalidades, los recipientes están formados a partir de una variedad de materiales tales como vidrio o plástico.

Ejemplos

Ejemplo 1:

A) Materiales y métodos

Cepas bacterianas y condiciones de cultivo. Las cepas usadas en este estudio se enumeran en las Figuras 3A a M. La *E. coli* Top10, usada para la purificación y clonaje de plásmidos, y la *E. coli* Sm10 λ pir, usada para la conjugación, así como la *E. coli* BW19610 [31], usada para propagar pKNG101, se cultivaron de manera rutinaria en placas de agar LB y en caldo LB a 37 °C. Se usó la ampicilina a una concentración de 200 μg/ml (*Yersinia*) o 100 μg/ml (*E. coli*) para seleccionar vectores de expresión. Se usó la estreptomicina a una concentración de 100 μg/ml para seleccionar vectores suicidas. *La Y. enterocolitica* MRS40 (O:9, biotipo 2) [20], un derivado de E40 no resistente a Ampicilina [19] y las cepas derivadas de este se cultivaron de manera rutinaria en Brain Heart Infusion (BHI; Difco) a RT. Se añadió ácido nalidíxico a todas las cepas de *Y. enterocolitica* (35 μg/ml) y todas las cepas de *Y. enterocolitica asd* se complementaron adicionalmente con 100 μg/ml de ácido *meso*-2,6-diaminopimélico (*m*DAP, Sigma Aldrich). *La S. enterica* SL1344 se cultivó de manera rutinaria en placas de agar LB y en caldo LB a 37 °C. Se usó Ampicilina a una concentración de 100 μg/ml para seleccionar vectores de expresión en *S. enterica*.

Manipulaciones genéticas de *Y. enterocolitica*. Se han descrito las manipulaciones genéticas de *Y. enterocolitica* [32,33]. En resumen, los mutadores para la modificación o deleción de genes en los plásmidos pYV o en el cromosoma se construyeron mediante la PCR por solapamiento de 2 fragmentos con el uso del plásmido pYV40 o el ADN genómico purificado como plantilla, lo que

conduce a 200–250 pb de secuencias flanqueantes en ambos lados de la parte delecionada o modificada del gen respectivo. Los fragmentos resultantes se clonaron en pKNG101 [29] en *E. coli* BW19610 [31]. Los plásmidos con secuencia verificada se transformaron en *E. coli* Sm10 λ pir, desde donde se movilizaron los plásmidos a las cepas de *Y. enterocolitica* correspondientes. Los mutantes que portaban el vector integrado se propagaron durante varias generaciones sin presión de selección. Después se usó la sacarosa para seleccionar los clones que perdieron el vector. Finalmente, los mutantes se identificaron mediante PCR de colonias. Los mutadores específicos (pSi_408, pSi_419) se enumeran en la Tabla III.

Construcción de plásmidos. El plásmido pBad_Si2 o pBad_Si1 (Figura 2) se usó para la clonación de proteínas de fusión con los 138 aminoácidos del extremo N-terminal de YopE (SEQ ID No. 2). pBad_Si2 se construyó mediante la clonación del fragmento SycE-$YopE_{1-138}$ que contenía promotores endógenos para YopE y SycE de pYV40 purificado en el sitio de KpnI/HindIII de pBad-MycHisA (Invitrogen). Las modificaciones adicionales incluyen la eliminación del fragmento de NcoI/BglII de pBad-MycHisA mediante la digestión, tratamiento y religación del fragmento Klenow. Se clonó un terminador de la transcripción bidireccional (BBa_B1006; fundación iGEM) en el sitio de corte de KpnI y en el sitio tratado con Klenow (pBad_Si2) o el sitio de corte de BglII (pBad_Si1). Además, en el extremo 3' de $YopE_{1-138}$ se añadieron los siguientes sitios de escisión: XbaI-XhoI-BstBI-(HindIII) (Figura 2 B). pBad_Si1 es igual a pBad_Si2 pero codifica EGFP amplificada a partir de pEGFP-C1 (Clontech) en el sitio de NcoI/BglII bajo el promotor inducible por Arabinosa. Los plásmidos pSi_266, pSi_267, pSi_268 y pSi_269 que contenían el promotor endógeno correspondiente y el fragmento $SteA_{1-20}$ (pSi_266), la secuencia de SteA de longitud completa (pSi_267), el fragmento $SopE_{1-81}$ (pSi_268) o el fragmento $SopE_{1-105}$ (pSi_269) se amplificaron a partir del ADN genómico de *S. enterica* SL1344 y se clonaron en el sitio de NcoI/KpnI de pBad-MycHisA (Invitrogen).

Los genes de longitud completa o los fragmentos de estos se amplificaron con los cebadores específicos enumerados en la Tabla I más adelante y se clonaron como fusiones a $YopE_{1-138}$ en el plásmido pBad_Si2 o en el caso de z-BIM (SEQ ID No. 16) en pBad_Si1 (ver la Tabla II más adelante). Para la fusión a SteA o SopE, los constructos de ADN sintético se escindieron con KpnI/HindII y se clonaron en pSi_266, pSi_267, pSi_268 o pSi_269 respectivamente. En el caso de los genes de especies bacterianas, se usó el ADN genómico purificado como plantilla (*S. flexneri* M90T, *Salmonella enterica* subsp. enterica serovar *Typhimurium* SL1344, *Bartonella henselae* ATCC 49882). Para los genes humanos se usó una biblioteca de ADNc universal (Clontech) si no fue indicado de cualquier otra manera (Figuras 3A a M, los genes de pez cebra se amplificaron a partir de una biblioteca de ADNc (un amable obsequio de M. Affolter). Los plásmidos ligados se clonaron en *E. coli* Top10. Los plásmidos secuenciados se electroporaron en la cepa de *Y. enterocolitica* o *S. enterica* deseada con el uso de los ajustes para la electroporación estándar de *E. coli*.

Tabla I (Cebador núm. Si_:Secuencia)

Seq_Id_No_51: Cebador núm. : Si_285
CATACCATGGGAGTGAGCAAGGGCGAG

Seq_Id_No_52: Cebador núm. : Si_286
GGAAGATCTttACTTGTACAGCTCGTCCAT

Seq_Id_No_53: Cebador núm. : Si_287
CGGGGTACCTCAACTAAATGACCGTGGTG

Seq_Id_No_54: Cebador núm. : Si_288
GTTAAAGCTTttcgaatctagactcgagCGTGGCGAACTGGTC

Seq_Id_No_55: Cebador núm. : Si_387
CGTAtctagaATGGACTGTGAGGTCAACAA

Seq_Id_No_56: Cebador núm. : Si_391
CGTAtctagaGGCAACCGCAGCA

Seq_Id_No_57: Cebador núm. : Si_389
GTTAAAGCTTTCAGTCCATCCCATTTCTg

Seq_Id_No_58: Cebador núm. : Si_436
CGTAtctagaATGCCCCGCCCC

Seq_Id_No_59: Cebador núm. : Si_437
GTTAAAGCTTCTACCCACCGTACTCGTCAAT

Seq_Id_No_60: Cebador núm. : Si_438
CGTAtctagaATGTCTGACACGTCCAGAGAG

Seq_Id_No_61: Cebador núm. : Si_439
GTTAAAGCTTTCATCTTCTTCGCAGGAAAAAG

Seq_Id_No_62: Cebador núm. : Si_463
CAGTctcgaggaaagcttgtttaaggggc

Seq_Id_No_63: Cebador núm. : Si_464
cagtTTCGAAttagcgacggcgacg

Seq_Id_No_64: Cebador núm. : Si_476
GTTAAAGCTTttACTTGTACAGCTCGTCCAT

Seq_Id_No_65: Cebador núm. : Si_494
CGTAtctagaATGGCCGAGCCTTG

Seq_Id_No_66: Cebador núm. : Si_495
GTTAAAGCTTttaTTGAAGATTTGTGGCTCC

Seq_Id_No_67: Cebador núm. : Si_504
CGTAtctagaGAAAATCTGTATTTTCAAAGTGAAAATCTGTATTTTCAAAGTATGCCCCGC

CCC

Seq_Id_No_68: Cebador núm. : Si_505
GTTAAAGCTTCCCACCGTACTCGTCAATtc

Seq_Id_No_69: Cebador núm. : Si_508
CGTAtctagaGAAAATCTGTATTTTCAAAGTGAAAATCTGTATTTTCAAAGTATGGCCGAG
CCTTG

Seq_Id_No_70: Cebador núm. : Si_509
GTTAAAGCTTTTGAAGATTTGTGGCTCCc

Seq_Id_No_71: Cebador núm. : Si_511
CGTAtctagaGAAAATCTGTATTTTCAAAGTGAAAATCTGTATTTTCAAAGTGTGAGCAAG
GGCGAG

Seq_Id_No_72: Cebador núm. : Si_512
CGTAtctagaGAAAATCTGTATTTTCAAAGTGAAAATCTGTATTTTCAAAGTCCGCCGAAA
AAAAAACGTAAAGTTGTGAGCAAGGGCGAG

Seq_Id_No_73: Cebador núm. : Si_513
GTTAAAGCTTttAAACTTTACGTTTTTTTTTCGGCGGCTTGTACAGCTCGTCCAT

Seq_Id_No_74: Cebador núm. : Si_515
CGTAtctagaGAAAATCTGTATTTTCAAAGTGAAAATCTGTATTTTCAAAGTGATTATAAA
GATGATGATGATAAAATGGCCGAGCCTTG

Seq_Id_No_75: Cebador núm. : Si_677
TTACTATTCGAAGAAATTATTCATAATATTGCCCGCCATCTGGCCCAAATTGGTGATG
AAATGGATCATTAAGCTTGGAGTA

Seq_Id_No_76: Cebador núm. : Si_678

TACTCCAAGCTTAATGATCCATTTCATCACCAATTTGGGCCAGATGGCGGGCAATATT
ATGAATAATTTCTTCGAATAGTAA

Seq_Id_No_77: Cebador núm. : Si_682
TTACTACTCGAGAAAAAACTGAGCGAATGTCTGCGCCGCATTGGTGATGAACTGGATA
GCTAAGCTTGGAGTA

Seq_Id_No_78: Cebador núm. : Si_683
TACTCCAAGCTTAGCTATCCAGTTCATCACCAATGCGGCGCAGACATTCGCTCAGTTTT
TTCTCGAGTAGTAA

Seq_Id_No_79: Cebador núm. : Si_580
catgccatggatttatggtcatagatatgacctc

Seq_Id_No_80: Cebador núm. : Si_612
CGGGGTACCatgaggtagcttatttcctgataaag

Seq_Id_No_81: Cebador núm. : Si_613
CGGGGTACCataattgtccaaatagttatggtagc

Seq_Id_No_82: Cebador núm. : Si_614
catgccatggCGGCAAGGCTCCTC

Seq_Id_No_83: Cebador núm. : Si_615
cggggtaccTTTATTTGTCAACACTGCCC

Seq_Id_No_84: Cebador núm. : Si_616
cggggtaccTGCGGGGTCTTTACTCG

Seq_Id_No_85: Cebador núm. : Si_585
CAGTctcgagATGCAGATCTTCGTCAAGAC

Seq_Id_No_86: Cebador núm. : Si_586
GTTAAAGCTTgctagcttcgaaACCACCACGTAGACGTAAGAC

Seq_Id_No_87: Cebador núm. : Si_588
cagtTTCGAAGATTATAAAGATGATGATGATAAAATGGCCGAGCCTTG

Seq_Id_No_88: cebador núm. 733
TTACTACTCGAGGGTGCCATCGATGCCGAAGAAATTATTCATAATATTGCCCG

Seq_Id_No_89: cebador núm. 735
TACTCCTTCGAATTAATGATCCATTTCATCACCAATTTG

Seq_Id_No_90: cebador núm. 736
TTACTACTCGAGGGTGCCATCGATGCCAAAAAACTGAGCGAATGTCTGCG

Seq_Id_No_91: cebador núm. 738
TACTCCTTCGAATTAGCTATCCAGTTCATCACCAATG

Seq_Id_No_92: cebador núm. 734
TACTCCTTCGAAGGCACCATGATCCATTTCATCACCAATTTGG

Seq_ID_No_93: cebador núm. 725:
TTACTATTCGAAGAAATTATTCATAATATTGCC

Seq_ID_No_94: cebador núm. 726:
TACTCCAAGCTTACGGTTGAATATTATGATCCATTTCATCACCAATTTGG

Seq_ID_No_95: cebador núm. 727:
TTACTATTCGAAGCCGGTGGTGCCGAAGAAATTATTCATAATATTGCCC

Seq_ID_No_96: cebador núm. 728:
TACTCCAAGCTTAATGATCCATTTCATCA

Seq_ID_No_97: cebador núm. 737:
TACTCCTTCGAAGGCACCGCTATCCAGTTCATCACCAATG

Seq_ID_No_101: cebador núm. 869:
gatcgtcgacTTAAGTTCAATGGAGCGTTTAATATC

Seq_ID_No_102: cebador núm. 870:
ctttgactggcgagaaacgcTCTTAACATGAGGCTGAGCTC

Seq_ID_No_103: cebador núm. 871:
GAGCTCAGCCTCATGTTAAGAgcgtttctcgccagtcaaag

Seq_ID_No_104: cebador núm. 872:
gatagcccccgagcctgtGCACTTTGTCATTAACCTCAGC

Seq_ID_No_105: cebador núm. 873:
GCTGAGGTTAATGACAAAGTGCacaggctcgggggctatc

Seq_ID_No_106: cebador núm. 874:
catgtctagaCCCTCAGCATAATAACGACTC

Seq_ID_No_107: cebador núm. 600:
catgacatgtTGGCGTTTCTCGCC

Seq_ID_No_108: cebador núm. 601:
catgacatgtATTAACCTCAGCCCTGACTATAAG

Seq_ID_No_119: cebador núm. 1010:
cacatgtctagaCAACCGTTTCCGAAAGGTGATCTG

Seq_ID_No_120: cebador núm. 1012:
atccCAagctTATTGGCGTTGGGTGGTAAAAATTTTG

Seq_ID_No_121: cebador núm. 1021:
cacatgtctagaATGACCGCCGAACAACGC

Seq_ID_No_122: cebador núm. 1022:
catgaagcttaCGGACCCGGATTTTGGCTC

>Seq_ID_No_123: cebador núm. 1023:
catgaagcttaCGGTTCTTCTTGAATAAAAATTTGAATG

Seq_ID_No_124: cebador núm. 1024:
catgaagcttaTTGCAGCACTTTCGGCCAATTT

Seq_ID_No_125: cebador núm. 1025:
cacatgtctagaATGAGCATTGTGTGTAGCGC

Seq_ID_No_126: cebador núm. 1026:
catgaagcttaGCTTTCATCCACGGCCGG

Seq_ID_No_127: cebador núm. 1027:
catgaagcttaATTACCGGTTTGGCGCAGC

Tabla II: Proteínas de fusión clonadas

Proteína a ser suministrada por T3SS	Seq. ID. Núm. de la proteína	Cadena principal del plásmido	Nombre del plásmido resultante	Cebadores. Si_Nr.:	Seq. ID Núm. del cebador
YopE1-138-MycHis	3	pBad-	pBad_Si_1	285/286	51/52 y

		MycHisA (Invitrogen)		(EGFP), 287/288 (sycE-YopE1-138)	53/54
YopE1-138-MycHis	3	pBad-MycHisA (Invitrogen)	pBad_Si_2	287/288 (sycE-YopE1-138)	53/54
YopE1-138- Bid humana	16	pBad_Si_2	pSi_85	387/391	55/56
YopE1-138- tBid humana	17	pBad_Si_2	pSi_87	389/391	55/57
YopE1-138-ET1	9	pBad_Si_2	pSi_120	436/437	58/59
YopE1-138-z-BIM	16	pBad_Si_1	pSi_121	438/439	60/61
YopE1-138-proteasa de TEV S219V	12	pBad_Si_2	pSi_132	463/464	62/63
YopE1-138-Ink4C	8	pBad_Si_2	pSi_151	494/495	65/66
YopE1-138-2x sitio de TEV - ET1	11	pBad_Si_2	pSi_156	504/505	67/68
YopE1-138-2xsitio de TEV- EGFP	98	pBad_Si_2	pSi_158	511/476	71/64
YopE1-138-2xsitio de TEV - EGFP - NLS	99	pBad_Si_2	pSi_159	511/513	71/73
YopE1-138-2xsitio de TEV - NLS - EGFP	100	pBad_Si_2	pSi_160	512/476	72/64
YopE1-138-2x sitio de TEV - INK4C	10	pBad_Si_2	pSi_161	508/509	69/70
YopE1-138-2x sitio de TEV - Flag - INK4C	13	pBad_Si_2	pSi_164	515/509	74/70

YopE1-138-Parte BH3 de tBid murina optimizada en codones de Y. enterocolitica	19	pBad_Si_2	pSi_318	677/678	75/76
YopE1-138-Parte BH3 de Bax murina optimizada en codones de Y. enterocolitica	20	pBad_Si_2	pSi_322	682/683	77/78
SteA1-20	5	pBad-MycHisA (Invitrogen)	pSi_266	580/612	79/80
SteA	4	pBad-MycHisA (Invitrogen)	pSi_267	580/613	79/81
SopE1-81	6	pBad-MycHisA (Invitrogen)	pSi_268	614/615	82/83
SopE1-105	7	pBad-MycHisA (Invitrogen)	pSi_269	614/616	82/84
YopE1-138-tBid murina optimizada en codones de Y. enterocolitica	21	pBad_Si_2	pSi_315	constructo sintético	/
YopE1-138-Ubiquitina	14	pBad_Si_2	pSi_236	585/586	85/86
YopE1-138-Ubiquitina-Flag-INK4C-MycHis	15	pSi_236	pSi_237_II	588/509	87/70

YopE1-138-(parte BH3 de tBid murina optimizada en codones de Y. enterocolitica) lista para la inserción de dominios adicionales	25	pBad_Si_2	pSi_357	733/735	88/89
YopE1-138-(parte BH3 de BAX murina optimizada en codones de Y. enterocolitica) lista para la inserción de dominios adicionales	26	pBad_Si_2	pSi_358	736/738	90/91
YopE1-138-(parte BH3 de tBid murina optimizada en codones de Y. enterocolitica)$_2$	27	pSi_357	pSi_371	733/734	88/92
YopE1-(138-parte BH3 de tBid murina optimizada en codones de Y. enterocolitica- parte BH3 de BAX murina optimizada en codones de Y. enterocolitica	28	pSi_358	pSi_373	733/734	88/92
YopE$_{1-138}$- Parte extendida BH3 de tBid murina	22	pBad_Si_2	pSi_353	725/726	93/94

optimizada en codones					
$YopE_{1-138}$-enlazador de 10 Aa - parte BH3 de tBid murina optimizada en codones de Y. enterocolitica	23	pBad_Si_2	pSi_354	727/728	95/96
$YopE_{1-138}$-parte BH3 de Bax murina optimizada en codones de Y. enterocolitica- parte BH3 de tBid murina optimizada en codones de Y. enterocolitica	24	pSi_357	pSi_374	736/737	90/97
$YopE_{1-138}$- dos dominios CARD de RIG-1 humana optimizada en codones de Y. enterocolitica (Aa. 1-245)	37	pBad_Si_2	pSi_453	constructo sintético	/
$YopE_{1-138}$- dos dominios CARD de RIG-1 murina optimizada en codones de Y. enterocolitica (Aa. 1-246)	38	pBad_Si_2	pSi_454	constructo sintético	/

$YopE_{1-138}$- GCN4 de S. cerevisiae optimizada en codones de Y. enterocolitica (Aa. 249-278) - WspR de P. aeruginosa optimizada en codones de Y. enterocolitica (Aa. 172-347)	39	pBad_Si_2	pSi_452	constructo sintético	/
$YopE_{1-138}$- IRF3 S397D murina optimizada en codones de Y. enterocolitica	40	pBad_Si_2	pSi_428	constructo sintético	/
$YopE_{1-138}$- DncV de V. Cholerae optimizada en codones de Y. enterocolitica (M3aL413)	41	pBad_Si_2	pSi_482	constructo sintético	/
$YopE_{1-138}$- similar a DisA de B. cereus optimizada en codones de Y. enterocolitica (PDB: 2FB5; Aa. 76-205)	42	pBad_Si_2	pSi_483	constructo sintético	/
$YopE_{1-138}$- cGAS de anémona (N. vectensis) optimizada	43	pBad_Si_2	pSi_484	constructo sintético	/

en codones de Y. enterocolitica (Ensembl: A7SFB5.1)					
YopE1-138 - dominios CARD de RIG1 murina optimizada en codones de Y. enterocolitica (Aa. 1-229)	110	pBad_Si_2	pSi_521	1021/1022	122/123
YopE1-138 - dominios CARD de RIG1 murina optimizada en codones de Y. enterocolitica (Aa. 1-218)	111	pBad_Si_2	pSi_522	1021/1023	122/124
YopE1-138 - MDA5 murina optimizada en codones de Y. enterocolitica (Aa. 1-294)	112	pBad_Si_2	pSi_517	constructo sintético	/
YopE1-138 - MDA5 murina optimizada en codones de Y. enterocolitica (Aa. 1-231)	113	pBad_Si_2	pSi_524	1025/1026	126/127
YopE1-138- cGAS humana optimizada en codones de Y. enterocolitica (Aa.	115	pBad_Si_2	pSi_515	constructo sintético	/

161-522)					
YopE1-138- CARD de MAVS humana optimizada en codones de Y. enterocolitica (Aa. 1-100)	116	pBad_Si_2	pSi_539	constructo sintético	/
YopE1-138- cGAS de anémona (N. vectensis) optimizada en codones de Y. enterocolitica (Aa. 60-422) (Ensembl: A7SFB5.1)	117	pBad_Si_2	pSi_503	1010/1012	120/121
YopE1-138- CdaA de Listeria optimizada en codones de Y. enterocolitica (Aa. 101-273)	118	pBad_Si_2	pSi_518	constructo sintético	/

Tabla III: Mutadores para la modificación genética

Mutador/Constructo	A insertar en:	Cadena principal del plásmido	Nombre del plásmido resultante	Cebadores Si_Nr.:	Seq.Id No. de los cebadores	usadas con la cepa progenitora especial
$YopE_{1-138}$-BH3 de tBID murina	pYV	pKNG101	pSi_408	Gen sintético	/	/

$YopE_{1-138}$-(BH3 de tBID murina)$_2$	pYV	pKNG101	pSi_437	Gen sintético	/	Cepa mutada con pSi_408
$YopE_{1-138}$-dos dominios CARD de RIG-1 murina optimizada en codones de Y. enterocolitica (Aa. 1-246)	pYV	pKNG101	pSi_456 (Seq ID No 50)	Gen sintético	/	/
pYV-asd	pYV	pKNG101	pSi_417	PCR1: 869/870; PCR2: 871/872; PCR3: 873/874; PCR por solapamiento 869/874	PCR1: 101/102; PCR2: 103/104; PCR3: 105/106; PCR por solapamiento 101/106	Δ*asd*
pYV-virF-horquillaI	pYV	pKNG101	pSi_441	Gen sintético	/	/
pYV-	pYV	pKNG101	pSi_439	Gen	/	/

pAra-VirF				sintético		

Secreción de Yop. La inducción del regulón *yop* se realizó mediante el recambio del cultivo a 37 °C en BHI-Ox (condiciones que permiten la secreción) [34]. Se añadió glucosa como fuente de carbono (4 mg/ml).

Las fracciones de células totales y de sobrenadantes se separaron mediante centrifugación a 20,800 *g* durante 10 min a 4 °C. El sedimento celular se tomó como la fracción de células totales. Las proteínas en el sobrenadante se precipitaron con ácido tricloroacético al 10 % (p/v) final durante 1 h a 4 °C. Después de la centrifugación (20,800 *g* durante 15 min) y de la eliminación del sobrenadante, el sedimento resultante se lavó en Acetona enfriada en hielo durante toda la noche. Las muestras se centrifugaron de nuevo, el sobrenadante se descartó y el sedimento se secó al aire y se resuspendió en colorante de aplicación con SDS 1x.

Las proteínas secretadas se analizaron mediante SDS–PAGE; en cada caso, se cargaron por carril las proteínas secretadas por 3×10^8 bacterias. La detección de proteínas secretadas específicas mediante inmunotransferencia se realizó con el uso de geles de SDS-PAGE al 12.5 %. Para la detección de proteínas en células totales, se cargaron por carril 2×10^8 bacterias, si no fue indicado de cualquier otra manera, y las proteínas se separaron en geles de SDS-PAGE al 12.5 % antes de la detección mediante inmunotransferencia.

La inmunotransferencia se llevó a cabo con el uso de anticuerpos monoclonales de ratas contra YopE (MIPA193 – 13A9 ; 1:1,000, [35]). El antisuero se absorbió previamente dos veces durante toda la noche contra *Y. enterocolitica* ΔHOPEMT *asd* para reducir la tinción de fondo. La detección se realizó con anticuerpos secundarios dirigidos contra anticuerpos de ratas y conjugados a peroxidasa de rábano picante (1:5,000; Southern biotech), antes de desarrollar el color con sustrato quimioluminiscente ECL (LumiGlo, KPM).

Cultivo celular e infecciones. Las células HeLa Ccl2 y B16F10 se cultivaron en medio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) complementado con FCS al 10 % y L-Glutamina 2 mM (cDMEM). Las células 4T1 se cultivaron en RPMI 1640 complementado con FCS al 10 % y L-Glutamina 2 mM. *Y. enterocolitica* se cultivó en BHI con aditivos durante toda la noche a RT, se diluyó en BHI fresca hasta una DO_{600} de 0.2 y se cultivó durante 2 h a RT antes de cambiar la temperatura de un agitador en baño de agua a 37 °C durante 30 min adicionales o durante 1 h en el caso del suministro de EGFP. Finalmente, las bacterias se recolectaron mediante centrifugación (6,000 rcf, 30 seg) y se lavaron una vez con DMEM complementado con HEPES 10 mM y L-

glutamina 2 mM. Finalmente, las bacterias se recolectaron mediante centrifugación (6,000 rcf, 30 seg) y se lavaron una vez con DMEM complementado con HEPES 10 mM y L-glutamina 2 mM. Las células sembradas en placas de 96 pocillos (para Inmunofluorescencia) o de 6 pocillos (para transferencia Western) se infectaron a las MOI indicadas en DMEM complementado con HEPES 10 mM y L-glutamina 2 mM. Después de la adición de bacterias, las placas se centrifugaron durante 1 min a 1,750 rpm y se colocaron a 37 °C durante períodos de tiempo indicados. Las bacterias extracelulares se destruyeron con gentamicina (100 mg/ml) si fue indicado. En el caso de análisis de inmunofluorescencia, los ensayos de infección se detuvieron con una fijación con PFA al 4 %. Para el análisis de transferencia Western las células se lavaron dos veces con PBS enfriado en hielo y se añadió tampón de lisis Phospho-safe (Novagen) para lisar las células. Después de la incubación en hielo, las células se centrifugaron (16,000 rcf, 25 min, 4 °C). Los sobrenadantes se recolectaron y se analizaron para determinar el contenido de proteínas totales mediante el ensayo de Bradford con BCA (Pierce) antes de la SDS PAGE y la transferencia Western con el uso de un anticuerpo anti-Actina (Millipore), Anti-Bid (Cell Signaling), anti-Myc (Santa Cruz), anti-Caspasa-3 p17 (Cell Signaling) y anti-Ink4C (Cell Signaling).

Transferencia Western, a partir de células infectadas, de proteínas translocadas por T3SS. Las células HeLa en placas de 6 pocillos se infectaron a una MOI de 100 según se describió anteriormente. En el caso de la coinfección con la cepa de *Y. enterocolitica* de translocación de proteasa de TEV, se ajustó la DO_{600} de las cepas y las dos suspensiones bacterianas se mezclaron en un tubo a una relación de 1:1 (si no fue indicado de cualquier otra manera) antes de la adición a las células. Al final de la infección, las células se lavaron dos veces con PBS enfriado en hielo y se recolectaron mediante raspado en un volumen pequeño de PBS enfriado en hielo. Después de la centrifugación (16,000 rcf, 5 min, 4 °C) el sedimento se disolvió en digitonina al 0.002 % complementada con un coctel de inhibidores de proteasas (Roche complete, Roche). Los sedimentos disueltos se incubaron durante 5 minutos en hielo y se centrifugaron después (16,000 rcf, 25 min, 4 °C). Los sobrenadantes se recolectaron y se analizaron para determinar el contenido de proteínas totales mediante el ensayo de Bradford con BCA (Pierce) antes de la SDS PAGE y la transferencia Western con el uso de un anticuerpo anti-Myc (Santa Cruz, 9E11) o anti-Ink4C (Cell Signaling).

Microscopía automatizada y análisis de imágenes. Las imágenes se adquirieron de manera automática con un ImageXpress Micro (Molecular devices, Sunnyvale, Estados Unidos). La cuantificación de las intensidades de la tinción con anti-Myc se realizó con el uso de MetaXpress

(Molecular devices, Sunnyvale, Estados Unidos). Las regiones dentro de las células que excluían las regiones nucleares y las regiones que contenían bacterias se escogieron de manera manual (círculos con un área de 40 pixeles) y se registró la intensidad promedio.

Biodistribución en modelos de ratones con aloinjerto de tumor B16-F10 y 4T1

Todos los experimentos en animales fueron aprobados (licencia 1908; Kantonales Veterinäramt Basel-Stadt) y se realizaron de acuerdo con las directrices locales (Tierschutz-Verordnung, Basel-Stadt) y la ley de protección animal Suiza (Tierschutz-Gesetz). Se ordenaron ratones C57Bl/6 y BALB/c de 6 semanas de edad a Janvier Labs. Después de al menos una semana de adaptación, los ratones se sometieron a eutanasia con el uso de isoflurano y 100 ul de células B16-F10 o 4T1 ($1x10^5$-$1x10^6$ células) se inyectaron por vía subcutánea en el costado de C57Bl/6 y BALB/c, respectivamente. En todo el experimento, se calificó el comportamiento y la apariencia física de los ratones y se midió la temperatura superficial, así como el peso corporal.

Una vez desarrollados los tumores, se administró a los ratones una solución de desferal de 8 mg/ml (10 ml/kg) mediante inyección i.p. Al día siguiente, los ratones se infectaron con *Y. enterocolitica* MRS40 o *Y. enterocolitica* MRS40 ΔHOPEMT ($2x10^5$, $1x10^6$ o $1x10^7$ bacterias) mediante la inyección en la vena de la cola. El inóculo administrado i.v. a los ratones se validó mediante la siembra en placas por dilución. En algunos experimentos, se le dio seguimiento a la progresión tumoral mediante mediciones diarias del largo y ancho tumoral con calibradores digitales. El volumen tumoral se determinó como $0.523xlargoxancho^2$. En los días respectivos posteriores a la infección, los ratones se sacrificaron mediante la inhalación de CO_2. Una muestra de sangre se aisló inmediatamente mediante la aspiración del corazón. Se aislaron el hígado, el bazo y el tumor y se determinaron sus pesos. Los órganos y el tumor se homogeneizaron. Se determinó la CFU en cada muestra colocando diluciones seriadas en placas de agar LB que contenían ácido nalidíxico (35 ug/ml).

Ensayo directo de activación de interferón de tipo I. Las células de melanoma B16F10 murinas, los macrófagos de tipo silvestre RAW264.7 murinos o con MAVS inactivo que expresaban de manera estable la fosfatasa alcalina embrionaria secretada (SEAP) o la luciferasa Lucia secretada bajo el control del promotor I-ISG54 que está comprendido por el promotor ISG54 inducible por IFN mejorado por un ISRE multimérico se adquirieron de InvivoGen (B16-Blue ISG, RAW-Blue ISG, RAW-Lucia ISG y RAW-Lucia ISG-KO-MAVS). Las condiciones de crecimiento y el ensayo de IFN de tipo I se adaptaron de los protocolos proporcionados por InvivoGen. En resumen, se sembraron 12,500 células B16-Blue ISG o 30,000 células RAW-Blue, RAW-Lucia o RAW-Lucia

KO-MAVS ISG en 150 µl de medio de prueba (RPMI + L-glutamina 2 mM + FCS al 10 % para células B16-Blue ISG; DMEM + L-glutamina 2 mM + FCS al 10 % para células RAW-Blue, RAW-Lucia y RAW-Lucia KO-MAVS ISG) por pocillo en una placa de 96 pocillos de fondo plano (NUNC o Corning). Al siguiente día, las células se infectaron con las cepas bacterianas a evaluar mediante la adición de 15 µl por pocillo de la multiplicidad de infección deseada (MOI, diluido en medio de prueba). Después de 2 horas de incubación (37 °C y CO_2 al 5 %) las bacterias se destruyeron mediante la adición de medio de prueba que contenía penicilina (100 U/ml) y estreptomicina (100 ug/ml). La incubación continuó durante 20-24 h. La detección de SEAP y luciferasa siguió el protocolo QUANTI-Blue™ y QUANTI-Luc™ (InvivoGen), respectivamente. Para la detección de SEAP: Se incubaron 20 µl del sobrenadante celular con 180 µl de reactivo de detección (QUANTI-Blue™, InvivoGen). La placa se incubó a 37 °C y la actividad de SEAP se midió mediante la lectura de la DO a 650 nm con el uso de un lector de microplacas (Molecular Devices). Como un control positivo se usó el IFNγ murino (solución madre: 1,000,000 U/ml) diluido a las concentraciones respectivas en el medio de prueba. Para la detección de luciferasa: A 20 µl del sobrenadante celular se añadió 50 µl de reactivo de detección (QUANTI-Luc™, InvivoGen) en placas opacas (ThermoScientific). La luminiscencia se midió inmediatamente con el uso de un lector de placas (BioTek).

Ensayo indirecto de activación de Interferón de tipo I. Las células B16F10 o 4T1 murinas se infectaron con las multiplicidades de infección deseadas (MOI) de las cepas bacterianas a evaluar durante un total de 4 h como se describió anteriormente. El sobrenadante celular se transfirió después a células de melanoma B16F10 murinas que expresaban de manera estable fosfatasa alcalina embrionaria secretada (SEAP) bajo el control del promotor I-ISG54 (comprendido por el promotor ISG54 inducible por IFN mejorado por un ISRE multimérico; comprado de InvivoGen, células B16-Blue ISG). Las condiciones de crecimiento y el ensayo de IFN de tipo I se adaptaron de los protocolos proporcionados por InvivoGen. En resumen, se sembraron 12,500 células B16-Blue ISG en 150 µl de medio de prueba (RPMI + L-glutamina 2 mM + FCS al 10 %) por pocillo en una placa de 96 pocillos de fondo plano (NUNC). Al siguiente día, se eliminó todo el medio y se añadieron 100 ul del sobrenadante celular de B16F10 o 4T1 previamente infectadas. La placa se incubó durante 20-24 h a 37 °C y CO_2 al 5 %. La detección de SEAP siguió el protocolo QUANTI-Blue™ (InvivoGen). Se incubaron 20 µl del sobrenadante celular con 180 µl de reactivo de detección (QUANTI-Blue™, InvivoGen). La placa se incubó a 37 °C y la actividad de SEAP se

midió mediante la lectura de la DO a 650 nm con el uso de un lector de microplacas (Molecular Devices).

Estudio de la progresión tumoral en el modelo de ratón con aloinjerto tumoral B16F10 tras el tratamiento intratumoral. Todos los experimentos en animales fueron aprobados por las autoridades responsables y se realizaron de acuerdo con las directrices locales y las leyes de protección animal. Se ordenaron ratones C57Bl/6 hembras de 5-7 semanas de edad a Charles River (L'Arbresles). Después de al menos una semana de adaptación, los ratones se sometieron a eutanasia con el uso de isoflurano y se inyectaron $1x10^6$ células B16-F10 en 200 µl de RPMI 1640 por vía subcutánea en el costado derecho de los ratones. A intervalos regulares, se monitoreó el comportamiento y la apariencia física de los ratones y se midió el peso corporal.

Los tratamientos comenzaron una vez que los tumores alcanzaron un volumen de 60-130 mm^3 (definido como el día 0). Los ratones se administraron con las cepas bacterianas a evaluar los días 0, 1, 2, 3, 6 y 9 mediante inyección intratumoral ($7.5x10^7$ bacterias en 50 ul de PBS por administración) bajo la anestesia con isoflurano. El inóculo administrado por vía intratumoral a los ratones se validó mediante la siembra en placas por dilución. Como control, los ratones se inyectaron solo con PBS libre de endotoxinas. 24 horas antes del último tratamiento bacteriano (día 8) se administró a los ratones una solución de desferal de 8 mg/ml (10 ml/kg) mediante inyección i.p. Se dio seguimiento a la progresión tumoral mediante las mediciones del largo y ancho tumoral con calibradores digitales. El volumen tumoral se determinó como $0.5xlargoxancho^2$. Un volumen tumoral superior a 1,500 mm^3 se definió como el criterio de valoración para aplicar eutanasia.

Estudio de la progresión tumoral y de recaída en los modelos de ratón con aloinjerto tumoral EMT-6 tras el tratamiento intratumoral. Todos los experimentos en animales fueron aprobados por las autoridades responsables y se realizaron de acuerdo con las directrices locales y las leyes de protección animal. Se ordenaron ratones BALB/c (BALB/cByJ) hembras de 5-7 semanas de edad a Charles River (L'Arbresles). Después de al menos una semana de adaptación, los ratones se sometieron a eutanasia con el uso de isoflurano y se inyectaron $1x10^6$ células EMT-6 en 200 µl de RPMI 1640 por vía subcutánea en el costado derecho del ratón. A intervalos regulares, se monitoreó el comportamiento y la apariencia física de los ratones y se midió el peso corporal.

Los tratamientos comenzaron una vez que los tumores alcanzaron un volumen de 60-130 mm^3 (definido como el día 0). Los ratones se administraron con las cepas bacterianas a evaluar los días 0, 1, 5, 6, 10 y 11 mediante inyección intratumoral ($7.5x10^7$ bacterias en 50 ul de PBS por administración) bajo la anestesia con isoflurano. El inóculo administrado por vía intratumoral a los

ratones se validó mediante la siembra en placas por dilución. Como control, los ratones se inyectaron solo con PBS libre de endotoxinas. 24 horas antes del último tratamiento bacteriano (día 10) se administró a los ratones una solución de desferal de 8 mg/ml (10 ml/kg) mediante inyección i.p. Se dio seguimiento a la progresión tumoral mediante las mediciones del largo y ancho tumoral con calibradores digitales. El volumen tumoral se determinó como $0.5 \times largo \times ancho^2$. Un volumen tumoral superior a 1,500 mm^3 se definió como el criterio de valoración para aplicar eutanasia. Los ratones que mostraban una regresión tumoral completa el día 54 después del inicio del tratamiento, se sometieron a eutanasia con el uso de isoflurano y se inyectaron 1×10^6 células EMT-6 en 200 µl de RPMI 1640 por vía subcutánea en el costado contralateral (izquierdo) en relación con la primera inyección de células tumorales. Como grupo de control, se incluyeron ratones vírgenes que no se habían injertado antes con células EMT-6. Se dio seguimiento a la progresión tumoral mediante las mediciones del largo y ancho tumoral con calibradores digitales. El volumen tumoral se determinó como $0.5 \times largo \times ancho^2$. Un volumen tumoral superior a 1,500 mm^3 se definió como el criterio de valoración para aplicar eutanasia.

Estudio de la progresión tumoral en los modelos de ratón con aloinjerto tumoral EMT-6 tras el tratamiento intravenoso. Todos los experimentos en animales fueron aprobados por las autoridades responsables y se realizaron de acuerdo con las directrices locales y las leyes de protección animal. Se ordenaron ratones BALB/c (BALB/cByJ) hembras de 5-6 semanas de edad a Charles River (L'Arbresles). Después de al menos una semana de adaptación, los ratones se sometieron a eutanasia con el uso de isoflurano y se inyectaron 1×10^6 células EMT-6 en 200 µl de RPMI 1640 por vía subcutánea en el costado derecho del ratón. A intervalos regulares, se monitoreó el comportamiento y la apariencia física de los ratones y se midió el peso corporal.

Los ratones se aleatorizaron en grupos de tratamiento una vez que los tumores alcanzaron un volumen de 80-250 mm^3 (definido como el día 0). 24 horas antes de la aleatorización (D-1) se administró a los ratones una solución de desferal de 8 mg/ml (10 ml/kg) mediante inyección i.p. El día 0, los ratones se administraron con las cepas bacterianas a evaluar mediante inyección intravenosa (5×10^6 bacterias en 100 ul de PBS por administración) bajo la anestesia con isoflurano. El inóculo administrado por vía intravenosa a los ratones se validó mediante la siembra en placas por dilución. Como control, los ratones se inyectaron solo con PBS libre de endotoxinas. Se dio seguimiento a la progresión tumoral mediante las mediciones del largo y ancho tumoral con calibradores digitales. El volumen tumoral se determinó como $0.5 \times largo \times ancho^2$. Un volumen tumoral superior a 1,500 mm^3 se definió como el criterio de valoración para aplicar eutanasia.

Medición de la secreción de IFNβ tras la infección de aislados de células tumorales. Todos los experimentos en animales fueron aprobados (licencia 1908; Kantonales Veterinäramt Basel-Stadt) y se realizaron de acuerdo con las directrices locales (Tierschutz-Verordnung, Basel-Stadt) y la ley de protección animal Suiza (Tierschutz-Gesetz). Se ordenaron ratones BALB/c de 6 semanas de edad a Janvier Labs. Después de una semana de adaptación, los ratones se sometieron a eutanasia con el uso de isoflurano y se inyectaron 100 ul de células EMT-6 ($1x10^6$ células) por vía subcutánea en el costado de los ratones. En todo el experimento, se calificó el comportamiento y la apariencia física de los ratones, y se midió la temperatura superficial y el peso corporal. Se dio seguimiento a la progresión tumoral mediante las mediciones del largo y ancho tumoral con calibradores digitales. El volumen tumoral se determinó como $0.5xlargoxancho^2$. El día del ensayo, los tumores se aislaron, se cortaron en pequeñas piezas de 1-2 mm, se digirieron durante 1-1.5 horas y se pasaron a través de una malla de nilon de 70 μm para obtener una suspensión celular única. Se determinó el recuento celular de este aislado celular crudo y se sembraron 300,000 células por pocillo en una placa de 24 pocillos de fondo plano (Corning) en medio de cultivo (DMEM + L-Glutamina + aminoácidos no esenciales + FCS al 10 %). Después de 1 hora de incubación a 37 °C y CO_2 al 5 %, las células se infectaron con las cepas bacterianas a evaluar mediante la adición de 100 μl por pocillo de una titulación de bacterias (MOI diferente, diluida en medio de cultivo). Después de 1 hora de incubación (37 °C y CO_2 al 5 %) las bacterias se destruyeron mediante la adición de medio de cultivo que contenía penicilina (100 U/ml) y estreptomicina (100 ug/ml). La incubación continuó durante otras 3 horas. La placa se centrifugó para recolectar todas células en el fondo del pocillo y el sobrenadante se analizó para determinar la concentración de IFNβ mediante el ELISA de IFN-β murino LumiKine™ Xpress (Invivogen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

B) RESULTADOS

Un sistema de suministro de proteínas basado en la secreción tipo 3 de proteínas de fusión YopE

Mientras que el extremo más N-terminal de la YopE efectora del T3SS de *Y. enterocolitica* (SEQ ID No. 1) contiene la señal de secreción suficiente para translocar proteínas heterólogas [22], no se incluye el sitio de unión a chaperonas (CBS) para su chaperona (SycE) [36]. Se seleccionaron los 138 aminoácidos del extremo N-terminal de YopE (SEQ ID No. 2) para fusionar a las proteínas a suministrar, ya que se ha demostrado que esto brinda los mejores resultados para la translocación de otros sustratos de T3S heterólogos [24]. Ya que estos 138 aminoácidos del extremo N-terminal de YopE contienen el CBS, se decidió coexpresar SycE. El fragmento SycE-$YopE_{1-138}$ clonado a

partir del plásmido de virulencia pYV40 de *Y. enterocolitica* purificado contiene los promotores endógenos de YopE y de su chaperona SycE (Figura 2). Por lo tanto, SycE y cualquier proteína de fusión a $YopE_{1-138}$ se inducen por un cambio rápido de la temperatura desde el cultivo a RT hasta 37 °C. El tiempo de cultivo a 37 °C afectará la cantidad de proteína de fusión presente en las bacterias. Se añadió un sitio de clonación múltiple (MCS) al extremo 3' de $YopE_{1-138}$ (Figura 2 B) seguido de un Myc y una etiqueta 6xHis y un codón de parada.

La cepa de fondo se seleccionó cuidadosamente. En primer lugar, para limitar la translocación de efectores endógenos, se usó una cepa de *Y. enterocolitica* que se delecionó para todos los efectores conocidos, Yop H, O, P, E, M y T (llamada ΔHOPEMT) [37]. Además, se usó ocasionalmente un mutante auxótrofo que no puede crecer en ausencia de ácido *meso*-2,6-diaminopimélico exógeno [38]. Esta cepa se delecionó para el gen de la aspartato-beta-semialdehído deshidrogenasa (Δ*asd*), y fue clasificada como nivel de bioseguridad 1 por la agencia de seguridad de Suiza (enmienda a A010088/2). Además, se delecionaron las proteínas de adhesión YadA y/o InvA para ofrecer una mayor selección de las cepas de fondo. Mientras que el uso de las cepas *yadA* o *yadA/invA* reduce la señalización de fondo inducida [39], también se afecta la cantidad de proteína suministrada [40].

Eliminación del apéndice $YopE_{1-138}$ después de la translocación de la proteína de fusión a la célula eucariota

Mientras que para el suministro bacteriano el fragmento $YopE_{1-138}$ es de gran beneficio, podría obstaculizar la función y/o la localización de las proteínas de fusión. Por lo tanto, su eliminación después del suministro de proteínas sería óptima. Para este fin, se introdujeron dos sitios de escisión de TEV (ENLYFQS) [41-43] entre $YopE_{1-138}$ y una pareja de fusión (el regulador de la transcripción ET1-Myc (SEQ ID No. 9 y 11) [44] e INK4C humano (SEQ ID No. 8 y SEQ ID No. 10)). Para mantener las ventajas del método presentado, se fusionó además la proteasa de TEV (variante S219V; [45]) a $YopE_{1-138}$ (SEQ ID No. 12) en otra cepa de *Y. enterocolitica*. Las células HeLa se infectaron con ambas cepas a la vez. Para permitir el análisis de la fracción de proteínas translocadas solamente, las células HeLa infectadas se lisaron a 2 h p.i. con Digitonina, la cual se conoce que no lisa las bacterias ([46];). El análisis de transferencia Western reveló la presencia de $YopE_{1-138}$-2x-sitio de escisión de TEV-ET1-Myc o $YopE_{1-138}$-2x-sitio de escisión de TEV-Flag-INK4C-Myc solamente cuando las células se han infectado con la cepa correspondiente. Tras la digestión durante toda la noche de este lisado celular con proteasa de TEV purificada, pudo observarse una banda desplazada. Esta banda corresponde a ET1-Myc o Flag-INK4C con los remanentes del extremo N-terminal del sitio de escisión de TEV, probablemente solo una Serina.

Tras la coinfección de células con la cepa que suministra la proteasa de TEV, el mismo fragmento de ET1-Myc o Flag-INK4C escindido se hace visible, lo que indica que la proteasa de TEV suministrada a través del T3SS es funcional y que las células únicas se han infectado por ambas cepas bacterianas. Si bien la escisión no está completa, la mayoría de las proteínas translocadas ya se escindieron 2 h después de la infección e incluso la digestión durante toda la noche con proteasa de TEV purificada no produjo mejores tasas de escisión. Como se informó, la escisión dependiente de proteasa de TEV podría necesitar una optimización dependiente de la proteína de fusión [47,48]. La eliminación dependiente de proteasa de TEV del apéndice $YopE_{1-138}$ después de la translocación por lo tanto proporciona por primera vez un suministro de proteínas por T3SS de proteínas heterólogas casi nativas, cambiando la composición aminoacídica por un solo aminoácido del extremo N-terminal.

Un enfoque alternativo a la escisión dependiente de proteasa de TEV del fragmento de YopE consiste en incorporar Ubiquitina en la proteína de fusión de interés. De hecho, la Ubiquitina se procesa en su extremo C-terminal por un grupo de proteasas de C-terminal específicas a Ubiquitina endógena (Enzimas Desubiquitinadoras, DUB). Ya que se supone que la escisión ocurre en el extremo más C-terminal de la Ubiquitina (después de G76), la proteína de interés podría estar libre de una secuencia aminoacídica adicional. Este método se probó en la proteína de fusión YopE1-138-Ubiquitina-Flag-INK4C-MycHis. En células de control infectadas por bacterias que expresan YopE1-138-Flag-INK4C-MycHis, se encontró una banda que corresponde a YopE1-138-Flag-INK4C-MycHis, indicativo de la translocación eficiente de la proteína de fusión. Cuando las células se infectaron durante 1 h con las bacterias que expresan YopE1-138-Ubiquitina-Flag-INK4C-MycHis, fue visible una banda adicional que corresponde al tamaño de Flag-INK4C-MycHis, lo que indica que se escindió parte de la proteína de fusión. Este resultado demuestra que la introducción de Ubiquitina en la proteína de fusión permite escindir el fragmento YopE1-138 sin la necesidad de una proteasa exógena.

Atenuación de la virulencia mediante la deleción/mutación de proteínas efectoras bacterianas con actividad de virulencia hacia células eucariotas

En el caso de *Y. enterocolitica*, la virulencia se redujo mediante la deleción de las seis proteínas efectoras endógenas, llamadas "proteínas externas de Yersinia" (Yop), en detalle YopH, O, P, E, M, T (MRS40 pIML421 [yopHΔ1–352, yopOΔ65–558, yopP23, yopE21, yopM23, yopT135]) [37]. Estas Yop se codifican en el "plásmido de virulencia de *Yersinia*" (pYV), un plásmido de aproximadamente 70 kpb de tamaño, en el cual se codifican el sistema de secreción tipo 3 (T3SS)

completo así como otros actores de virulencia (Figura 4). YopH, O, P, E, M y T son las seis proteínas efectoras, que son suministradas a las células huésped por el sistema de secreción tipo tres bacteriano para modular y moderar el sistema inmunitario. Cada Yop tiene una actividad bioquímica específica en la célula huésped. YopT escinde la Cisteína C-terminal de las GTPasas Rho y por lo tanto elimina el grupo isoprenilo anclando las GTPasas a la membrana. Esta inactivación de las Rho debido a la pérdida de localización evita la fagocitosis por las células inmunitarias como macrófagos y neutrófilos [49]. En la misma vía, YopE actúa como una proteína activadora de GTPasa (GAP) para GTPasas Rho, desactivándolas. Esto resulta en la disminución de la fagocitosis y la inhibición de la liberación de IL-1 beta por las células inmunitarias [49]. Además, YopO actúa como un inhibidor de la disociación del nucleótido guanidina (GDI), desactivando las GTPasas Rho. YopO tiene además un dominio de serina/treonina quinasa que actúa de una manera aún no definida sobre el citoesqueleto de actina [49]. YopH es una tirosina fosfatasa que actúa sobre proteínas de adhesión focal como la Quinasa de adhesión focal (Fak), paxilina y otros, por lo tanto previniendo fuertemente la fagocitosis por macrófagos y neutrófilos [49]. Se encontró que YopP, nombrada YopJ en Y. *pseudotuberculosis* o *Y. pestis*, inactiva la ruta de MAPK/NFkB en células inmunitarias, lo que previene la liberación de TNFa e IL-8 desde células inmunitarias estimuladas por la presencia de las bacterias. Además, se encontró que YopP induce la apoptosis en células inmunitarias, lo que podría estar relacionado con el efecto sobre la ruta de MAPK, que en su estado activado protege a las células de la apoptosis [49]. El papel de YopM no está completamente claro, pero se encontró asociado con la S6 quinasa 1 ribosomal (RSK1) y la proteína similar a quinasa C 2 (PRK2). Parece que YopM podría estimular la fosforilación de RSK1 y, por lo tanto, afectar corriente abajo las dianas, como por ejemplo, la progresión del ciclo celular [49]. Mediante la deleción de una o varias de estas Yop, el mecanismo de defensa de las bacterias contra el sistema inmunitario se afecta dramáticamente [50]. La mutación de las yop respectivas se confirmó mediante PCR en la región respectiva, y mediante un ensayo de secreción in vitro. El análisis de la secreción in vitro mediante SDS-PAGE y tinción con azul Coomassie confirmó la ausencia de YopH,O,M y YopE de longitud completa.

Además, se construyó una cepa de *Y. enterocolitica* con deleciones en *asd* (aspartato semialdehído deshidrogenasa). La mutación en *asd* conduce a una pérdida completa de la capacidad de crecimiento sin la adición de ácido meso-diamino-pimélico. Esto permite generar sistemas de mantenimiento de plásmido libres de antibióticos basados en la presencia de *asd* en el plásmido respectivo. De una manera similar, podrían usarse otros mutantes auxótrofos.

Generación de bacterias proapoptóticas mejoradas

Para optimizar el suministro de las proteínas proapoptóticas, las cepas transformadas con diferentes proteínas proapoptóticas se han generado de acuerdo con la Tabla IV.

Tabla IV: Cepas transformadas con diferentes proteínas proapoptóticas

Nombre de la cepa	Cepa de fondo	Proteína a ser suministrada por T3SS	Cadena principal del plásmido	Nombre del plásmido resultante	Cebadores. Si_Nr.:	resistencias
YopE1-138-(parte extendida BH3 de tBid murina optimizada en codones de Y. enterocolitica)	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd	YopE1-138-parte extendida BH3 de tBid murina optimizada en codones de Y. enterocolitica (por 4 Aa)	pBad_Si_2	pSi_353	725/726	Nal Amp
YopE1-138-enlazador de 10 Aa-(parte BH3 de tBid murina optimizada en codones de Y. enterocolitica)	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd	YopE1-138-enlazador de 10 Aa-BH3 de tBid murina optimizada en codones de Y. enterocolitica	pBad_Si_2	pSi_354	727/728	Nal Amp
YopE1-(138-parte BH3 de Bax murina optimizada en codones de Y. enterocolitica-parte BH3 de tBid murina	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd	YopE1-138-BH3 de Bax murina optimizada en codones de Y. enterocolitica-. BH3 de tBid murina	pSi_357	pSi_374	736/737	Nal Amp

optimizada en codones de Y. enterocolitica		optimizada en codones de Y. enterocolitica				

El acortamiento de las proteínas suministradas a los dominios esenciales necesarios para la señalización (por ejemplo el dominio BH3 de t-BID (SEQ ID No. 19)) podría aumentar la eficiencia de la destrucción celular (Figura 5). Sin unirse a ninguna teoría, es probable que este aumento de la eficacia esté relacionado con el aumento de la cantidad de la producción de proteínas y después del suministro a través de T3SS debido a un menor tamaño de la proteína suministrada. La introducción de un enlazador entre la parte YopE y el dominio BH3 de tBID (SEQ ID No. 23) disminuyó la eficacia, así como la extensión del dominio BH3 por 4 aminoácidos adicionales (SEQ ID No. 22) (Figura 5).

Además, se generaron las cargas sintéticas con repeticiones de tales dominios esenciales (por ejemplo, el dominio BH3 de t-BID (SEQ ID No. 27)) o combinaciones de estos dominios esenciales (por ejemplo, el dominio BH3 de t-BID y el dominio BH3 de BAX (SEQ ID No. 24 y 28)). Sorprendentemente, se encontró que las repeticiones en serie de dominios BH3 iguales o diferentes dan como resultado la inducción mejorada de la apoptosis en líneas de células cancerosas (incluidas las células 4T1 y B16F10, Figura 5). Se encontró que la IC50 (la mitad de la concentración inhibitoria máxima), en referencia al número de bacterias por célula eucariota (MOI) necesarias para destruir el 50 % de tales células, disminuye tras el suministro de las repeticiones en serie del dominio BH3 de tBID en comparación con un dominio BH3 de tBID único (Figura 5). Este hallazgo fue sorprendente, ya que el tamaño de la proteína aumenta mediante la fusión al segundo dominio BH3 de t-BID. Debido a esto, se esperaría una disminución de los niveles de expresión y suministro de $YopE_{1-138}$-(BH3 de tBID)$_2$ (SEQ ID No. 27) en comparación con $YopE_{1-138}$-BH3 de tBID (SEQ ID No. 19 y 25), y podrían alcanzar los niveles equivalentes máximos. Para alcanzar un aumento en la actividad de destrucción celular, los dominios BH3 de tBID fusionados deben actuar simultáneamente lado a lado tras el suministro por el T3SS en células eucariotas. En el caso de que solo un dominio BH3 de tBID en el constructo $YopE_{1-138}$-(BH3 de tBID)$_2$ sea funcional, en el mejor de los casos podría esperarse la misma eficiencia que con $YopE_{1-138}$-BH3 de tBID.

Para aumentar la estabilidad genética de $YopE_{1-138}$-(BH3 de tBID)$_2$ (SEQ ID No. 27) para estudios in vivo, se clonó $YopE_{1-138}$-(BH3 de tBID)$_2$ (SEQ ID No. 27) mediante recombinación homóloga

en el plásmido pYV de virulencia de Yersinia en el sitio nativo de YopE y bajo el promotor de YopE nativo (con el uso de los plásmidos mutadores pSI_408 y pSI_419). Tales mutadores contienen la secuencia de ADN que codifica la proteína deseada, flanqueada por 200–250 pb de las secuencias en ambos lados que corresponden al sitio del gen respectivo, donde la integración tendrá lugar. Estos plásmidos se transforman en *E. coli* Sm10 λ pir, desde donde se movilizaron los plásmidos a la cepa de *Y. enterocolitica* correspondiente. Los mutantes que portaban el vector integrado se propagaron durante varias generaciones sin presión de selección. Después se usó la sacarosa para seleccionar los clones que perdieron el vector. Finalmente, los mutantes se identificaron mediante PCR de colonias. Las proteínas endógenas para el transporte por el T3SS (llamadas "proteínas externas de *Yersinia*", Yop) son codificadas por *Y. enterocolitica* en este plásmido de 70 kb, nombrado plásmido de virulencia de *Yersinia* (pYV), el cual codifica además el aparato de T3SS.

Las cepas de Yersinia que codifican $YopE_{1-138}$-(BH3 de tBID) (SEQ ID No. 19 y 25) o $YopE_{1-138}$-$(BH3\ de\ tBID)_2$ (SEQ ID No. 27) en el plásmido pYV de virulencia de Yersinia en el sitio nativo de YopE y bajo el promotor de YopE nativo se evaluaron para determinar su capacidad de inducir la apoptosis en células cancerosas (incluidas las células 4T1 y B16F10, Figura 6). Se encontró que la IC50 (la mitad de la concentración inhibidora máxima), en referencia al número de bacterias por célula eucariota (MOI) necesarias para destruir el 50 % de tales células, disminuye tras el suministro de las repeticiones en serie del dominio BH3 de tBID en comparación con un dominio BH3 de tBID único, cuando ambas proteínas se codifican en el plásmido pYV de virulencia de Yersinia en el sitio nativo de YopE y bajo el promotor de YopE nativo (Figura 6). Esto está de acuerdo con los hallazgos del suministro de estas proteínas mediante el plásmido de expresión (Figura 5). De nuevo, este hallazgo fue sorprendente, ya que el tamaño de la proteína aumenta mediante la fusión de un segundo dominio BH3 de t-BID. Debido a esto, se esperaría una disminución de los niveles de expresión y suministro de $YopE_{1-138}$-$(BH3\ de\ tBID)_2$ (SEQ ID No. 27) en comparación con $YopE_{1-138}$-BH3 de tBID (SEQ ID No. 19 y 25), y podrían alcanzar los niveles equivalentes máximos. Para alcanzar un aumento en la actividad de destrucción celular, los dominios BH3 de tBID fusionados deben actuar simultáneamente lado a lado tras el suministro por el T3SS en células eucariotas. En el caso de que solo un dominio BH3 de tBID en el constructo $YopE_{1-138}$-$(BH3\ de\ tBID)_2$ sea funcional, en el mejor de los casos podría esperarse la misma eficiencia que con $YopE_{1-138}$-BH3 de tBID. Además, las cepas de Yersinia que codificaban $YopE_{1-138}$-$(BH3\ de\ tBID)_2$ (SEQ ID No. 27) en el plásmido pYV de virulencia de Yersinia en el sitio

nativo de YopE y bajo el control del promotor de YopE nativo se compararon para su capacidad de inducir la apoptosis en células cancerosas con respecto al plásmido (basado en pBad-MycHisA) derivado del suministro de $YopE_{1-138}$-(BH3 de $tBID)_2$. De acuerdo con el mayor número de copias de pBad-MycHisA (20-25 copias) en comparación con el pYV (se informan 1-6 copias), el suministro basado en pBad-MycHisA de $YopE_{1-138}$-(BH3 de $tBID)_2$ (SEQ ID No. 27) dio como resultado una disminución ligera del valor de IC50 en células 4T1 y B16F10 (Figura 6).

Estudios de biodistribución en un modelo murino de melanoma

Para validar las bacterias gramnegativas con mutaciones en determinantes de virulencia claves similares a los efectores de T3SS como el vehículo específico de tumor, se realizaron estudios de tumor aloinjertado murino con el uso del modelo de melanoma B16F10 bien establecido (núm. de ATCC CRL-6475). Cuando los tumores s.c. alcanzaron un determinado tamaño (aproximadamente 100-200 mm^3), los ratones se infectaron i.v. con $2x10^5$ cfu de Y. enterocolitica subsp. palearctica MRS40 o Y. enterocolitica subsp. palearctica MRS40 ΔyopH,O,P,E,M,T. Para permitir el crecimiento bacteriano, los ratones se trataron previamente 24 h antes de la infección con desfreoxamina. La calificación de la apariencia física y el comportamiento de los ratones infectados con la cepa Y. enterocolitica subsp. palearctica MRS40 de tipo silvestre aumentó (Figura 47-48) y los ratones exhibieron una pérdida de peso significativa durante las primeras 48 h de infección (Figura 49), lo que instó al sacrificio de todos los ratones en este grupo el día 2 después de la infección. Al contrario, los ratones infectados con la cepa Y. enterocolitica subsp. palearctica MRS40 ΔyopH,O,P,E,M,T con virulencia atenuada no mostraron una pérdida de peso significativa y tuvieron una puntuación normal de la apariencia física o el comportamiento (Figura 47-49) aún el día 4 después de la infección. En los ratones infectados con la cepa de tipo silvestre (Y. enterocolitica subsp. palearctica MRS40) las bacterias vivas se detectaron en todos los órganos evaluados, y además en la sangre (Figura 51). Mientras que las bacterias de tipo silvestre se encontraron presentes en el tumor sólido maligno, se encontraron recuentos igualmente altos o más altos en otros órganos, los más altos en el bazo (Figura 51). Muy al contrario, en los ratones infectados con Y. enterocolitica subsp. palearctica MRS40 ΔyopH,O,P,E,M,T las bacterias vivas se encontraron principalmente en el tumor sólido maligno el día 1 después de la infección, con bajos recuentos bacterianos observados en bazo, hígado y pulmón. Notablemente, el día 4 después de la infección, el recuento bacteriano en el tumor sólido maligno aumentó en algunos órdenes de magnitud (alcanzando más de 10^8 cfu/g de tejido tumoral), mientras que en todos los demás órganos evaluados los recuentos bacterianos cayeron por debajo del límite de detección (Figura

50). Por lo tanto, la Y. enterocolitica subsp. palearctica MRS40 ΔyopH,O,P,E,M,T acumulada el día 4 después de la infección con una relación de aproximadamente (mínimamente) un millón de veces en el sitio del tumor sólido maligno en comparación con el bazo o hígado (cuando se calcula la relación contra el límite de detección).

Se midieron cantidades similares altas de bacterias por gramo de tumores sólidos el día 5 u 8 después de la administración intravenosa en la vena lateral de la cola de ratones que portaban el melanoma B16F10 para Y. enterocolitica dHOPEMT, Y. enterocolitica dHOPEMT + pYV-$YopE_{1-138}$-CARD de RIG1 murina o Y. enterocolitica dHOPEMT ΔHorquillaI-VirF + pYV-$YopE_{1-138}$ -CARD de RIG1 murina (Figura 26). Esto valida, que la carga de proteínas heterólogas y las mutaciones adicionales que afectan la regulación de T3SS (VirF) no influyen en la colonización bacteriana de tumores sólidos en modelos murinos.

Estos resultados validan esta estrategia para la atenuación de la virulencia mediante la mutación de determinantes de virulencia claves para generar un vehículo bacteriano que se dirige específicamente al tumor sólido maligno.

Validación del crecimiento tumoral específico in vivo hasta el día 14 después de la administración bacteriana

El experimento de la colonización en tumores por *Y. enterocolitica* genéticamente modificada se repitió en un modelo de aloinjerto murino singénico (modelo de cáncer de mama 4T1) y la colonización bacteriana se continuó durante dos semanas. Esta vez, los ratones se infectaron con $1*10^6$ unidades formadoras de colonias (CFU) de *Y. enterocolitica* Δ*yopH,O,P,E,M,T*. Si bien se obtienen resultados similares con respecto al modelo B16F10 en los primeros días después de la infección, podría demostrarse que la colonización al tumor se encuentra consecuentemente el día 8 y hasta el día 14 después de la infección (Figura 7). Además, la colonización se mantiene altamente específica solamente con bajos recuentos de bacterias detectados en los demás órganos evaluados (Figura 8). Estos hallazgos indican que *Y. enterocolitica* Δ*yopH,O,P,E,M,T* es capaz de establecer una colonización persistente del tumor lo que previene de este modo la eliminación por el sistema inmunitario.

Eficacia de *Y. enterocolitica* Δ*HOPEMT* en el retardo de la progresión tumoral

Para evaluar el impacto de $YopE_{1-138}$-$(BH3\ de\ tBID)_2$ suministrada a células tumorales in vivo, se realizaron estudios en ratones Balb/C de tipo silvestre aloinjertados s.c. con células de cáncer de mama 4T1. El objetivo era evaluar la cepa Y. enterocolitica ΔHOPEMT que codifica $YopE_{1-138}$-$(BH3\ de\ tBID)_2$ en el plásmido pYV de virulencia de Yersinia en el sitio nativo de YopE y bajo el

promotor de YopE nativo, que se optimiza aún más mediante la deleción de la región de horquilla I corriente arriba de VirF para aumentar la cantidad de proteínas suministradas. Los ratones se inyectaron i.v. con PBS o $1*10^7$ de Y. enterocolitica ΔHOPEMT ΔHorquillaI-virF pYV-$YopE_{1-138}$-$(tBID\ BH3)_2$, una vez que el tumor alcanzó un tamaño de 150-250 mm3. El día de la inyección i.v. de bacterias se definió como el día 0. El volumen tumoral se midió durante los siguientes días (día 0 al día 9 después de la inyección i.v. de las bacterias) con calibradores. El volumen tumoral se normalizó con respecto al volumen tumoral el día 0 para compensar cualquier heterogeneidad inicial en el tamaño tumoral. El tratamiento con Y. enterocolitica ΔHOPEMT ΔHorquillaI-VirF pYV-$YopE_{1-138}$-$(tBID\ BH3)_2$ mostró un impacto en la progresión del volumen tumoral, con una reducción tumoral estadísticamente significativa el día 8, 9 y 10 después de la administración bacteriana (Figura 9). Es importante destacar que, se encontró que Y. enterocolitica ΔHOPEMT sola no tiene impacto en la progresión tumoral en el modelo de cáncer murino 4T1 (Figura 10). Estos hallazgos resaltan que tales bacterias y sus T3SS pueden emplearse para la interferencia con la progresión tumoral.

Y. enterocolitica Δ*HOPEMT* con una deleción dentro de una región termosensora de ARN corriente arriba de un gen que codifica una proteína de unión al ADN del tipo AraC

Los genes de virulencia de Yersinia más conocidos no se expresan fuera del huésped eucariota y se inducen solo después de la entrada en el entorno del huésped. La expresión de estos genes de virulencia es inducida por el aumento repentino de la temperatura en relación con la entrada en el huésped. En especial, los factores de virulencia codificados por pYV como el T3SS y sus proteínas efectoras (las Yop) se regulan de esta manera. A temperatura ambiente (20-25 °C), no se expresan los genes requeridos para la regulación del T3SS, la propia formación de T3SS y los efectores suministrados y solo se induce la expresión tras un aumento de temperatura tal a 37 °C. La expresión de la mayoría de los genes de virulencia codificados por pYV (genes relacionados a yadA y T3SS) es inducida por la temperatura y requiere de la proteína VirF de unión al ADN del tipo AraC en Y. enterocolitica (LcrF en otras especies de Yersinia). Se considera que regulación térmica de la expresión de LcrF ocurre a través de la fusión de un tallo-bucle de ARN en el ARNm a mayores temperaturas, el cual cuando no se fusiona secuestra el sitio de unión ribosomal, lo que previene por lo tanto la traducción [51]. Al contrario, se ha demostrado que en Y. enterocolitica la transcripción de VirF es dependiente principalmente de la temperatura [52]. Estudios más recientes demuestran un panorama más complejo con la implicación de un regulador termolábil llamado YmoA [51], mientras que se encontró que el termosensor de ARN corriente arriba de LcrF es

responsable principalmente de la regulación de la temperatura de LcrF y, por lo tanto, de los genes de virulencia dependientes de temperatura.

Para aumentar los niveles de secreción de una carga heteróloga expresada a partir del pYV bajo el control del promotor de YopE nativo, el objetivo fue delecionar una de estas estructuras de horquilla de ARN en Y. enterocolitica corriente arriba de VirF. Mientras que la importancia de tales tallos-bucles de ARN no se demuestra claramente en Y. enterocolitica y la inducción por temperatura se atribuyó más bien a cambios en la transcripción, podría identificarse la horquilla I [51] corriente arriba de VirF de Y. enterocolitica. Mediante recombinación homóloga se eliminaron después partes de la horquilla I (-111 a -57 como en [51]) y se evaluó la capacidad de secreción de la proteína $YopE_{1-138}$-$(BH3\ de\ tBID)_2$ (SEQ ID NO: 27) o $YopE_{1-138}$– RIG-1 $CARD_2$ murino (SEQ ID NO: 38) codificadas por pYV (cada una en el sitio nativo de YopE) en un ensayo de secreción in vitro (Figura 11). Sorprendentemente, la deleción de parte de la región de horquilla I corriente arriba de VirF en Y. enterocolitica aumentó la secreción de las proteínas heterólogas in vitro (Figura 11 A y B), lo que contrasta con los informes anteriores sobre Y. enterocolitica [52], donde se consideraba que la transcripción de VirF era el principal impulsor de la regulación térmica.

Para ser capaz de inducir artificialmente la expresión del T3SS y el suministro de proteínas por el T3SS, se reemplazó en otra cepa el promotor endógeno de VirF en el pYV por un promotor inducible por Arabinosa como se conoce para Bad-MycHisA. Además de reemplazar el promotor de VirF, se introdujo corriente arriba (en orientación invertida) el gen de araC completo. Después se evaluó la capacidad de secreción de $YopE_{1-138}$-$(BH3\ de\ tBID)_2$ (SEQ ID NO: 27) (codificada por pYV; en el sitio nativo de YopE) en ausencia o presencia de Arabinosa en un ensayo de secreción in vitro (Figura 11 A). Solo tras la adición de Arabinosa se encontró que la proteína heteróloga era secretada por el T3SS, lo cual está de acuerdo con una regulación de la expresión de VirF por Arabinosa.

Y. enterocolitica ΔHOPEMT con aumento de la estabilidad de la carga heteróloga (in vitro e in vivo)

*Se demostró que Y. enterocolitia Δyop**H,O,P,E,M,T*** es una cepa altamente específica a tumores sólidos diana en los experimentos con ratones, mientras que se encontró que el suministro dependiente de T3SS de proteínas citotóxicas es eficaz en el cultivo celular en células cancerígenas. Para combinar estos dos rasgos, se necesita modificar genéticamente las bacterias colonizadoras de tumores sólidos para codificar establemente la carga citotóxica durante varios días, o incluso semanas, *in vivo*. Debido a los requerimientos regulatorios, no es favorable el uso

de las resistencias a antibióticos clásicas para mantener un plásmido extraño en las bacterias. En estudios de aloinjerto murino, por lo tanto, se ha evaluado un sistema de mantenimiento de plásmidos libre de resistencia a antibióticos. Este sistema se basa en la deleción cromosómica de un gen esencial (tal como el de la aspartato-semialdehído deshidrogenasa, *asd*) y la codificación del mismo gen en un plásmido heterólogo para mantener el crecimiento bacteriano. La complementación de una deleción de *asd* para el mantenimiento del plásmido se ha demostrado antes [53], mientras que se han informado dificultades en la reproducibilidad y persistencia durante varios días [54]. Se adaptó el sistema para el uso en *Y. enterocolitica* Δ*yopH,O,P,E,M,T*, donde se delecionó además el asd cromosómicamente codificado (lo que resulta en *Y. enterocolitica* Δ*yopH,O,P,E,M,T* Δ*asd)*, que después se devolvió a un plásmido de número de copias intermedio, pBad-MycHisA (pBad-MycHisA-asd). El gen de asd se clonó a partir de Y. enterocolitica 8081 y se insertó en el sitio de PciI de pBad-MycHisA en orientación directa e inversa, respectivamente, con su promotor endógeno y el terminador de la transcripción. El comportamiento del crecimiento de las cepas resultantes *Y. enterocolitica* Δ*yopH,O,P,E,M,T* Δ*asd* + pBad-MycHisA-asd (orientación de asd directa o inversa) se comparó en matraces de cultivo in vitro (medio BHI) con respecto a las cepas de tipo silvestre y progenitora de *Y. enterocolitica* Δ*yopH,O,P,E,M,T* Δ*asd* (Figura 12). En ambas orientaciones, pBad-MycHisA-asd rescató el fenotipo observado tras la deleción de asd (Figura 12). Al contrario, en el modelo de ratón de melanoma B16F10 así como en el modelo 4T1, se encontró que *Y. enterocolitica* Δ*yopH,O,P,E,M,T* Δasd + pBad-MycHisA-asd no coloniza tumores sólidos lo suficientemente (Figuras 13 y 14) y no pudo recuperarse el plásmido pBad-MycHisA-asd de las pocas colonias aisladas. Además, se verificó el crecimiento de las colonias aisladas a partir del modelo de ratón de melanoma B16F10 en placas que contenían Ampicilina, lo que podría favorecer a la presencia del plásmido pBad-MycHisA-asd que codifica una resistencia a Ampicilina. El día 4 después de la inyección i.v., solo una pequeña fracción de colonias aisladas exhibió resistencia a Ampicilina (Figura 13). Esto podría ser el reflejo de una pérdida de pBad-MycHisA-asd, pero también podría estar relacionado con la pérdida del gen de resistencia a Ampicilina solo o con las dificultades para reiniciar la expresión del gen de resistencia a Ampicilina lo suficientemente rápido como para evitar la destrucción por la Ampicilina. En cualquier caso, la colonización en tumor con *Y. enterocolitica* Δ*yopH,O,P,E,M,T* Δ*asd* + pBad-MycHisA-asd observada en el modelo de ratón de melanoma B16F10 así como en el modelo 4T1 mostró una rápida disminución de los recuentos bacterianos dentro del tumor sólido, al contrario de *Y. enterocolitica* Δ*yopH,O,P,E,M,T*. Por lo tanto, la deleción de asd cromosómico y la

complementación en pBad-MycHisA conduce a una reducción drástica de la aptitud bacteriana in vivo. Esta observación está de acuerdo con los informes sobre la reducción de la viabilidad en niveles desbalanceados de asd [54].

Las proteínas endógenas para el transporte por el T3SS (llamadas "proteínas externas de *Yersinia*", Yop) son codificadas por *Y. enterocolitica* en un plásmido de 70 kb. Este plásmido, llamado plásmido de Virulencia de *Yersinia* (pYV), codifica además el aparato de T3SS. Se ha evaluado la estabilidad del plásmido pYV en el modelo de aloinjerto murino 4T1. Se ha aislado exitosamente el pYV de cepas recolectadas el día 9 o 10 después de la infección de los ratones (Figura 15). Adicionalmente, se han realizado pruebas que confirman la presencia y funcionalidad del T3SS de cepas bacterianas aisladas después de ocho días de crecimiento en un tumor sólido *in vivo*. Por lo tanto, se considera el pYV como un vector de elección para codificar la carga heteróloga para el suministro in vivo. Sin embargo, se encontró que el porcentaje de colonias bacterianas que portaban el plásmido pYV es heterogéneo después del crecimiento durante 9-10 días en tumores sólidos 4T1 en ratones (Figura 15). Además de la inestabilidad intrínseca del pYV, la cepa *Y. enterocolitica* Δ*yopH,O,P,E,M,T* ha perdido la ventaja selectiva de la virulencia que aumenta las Yop in vivo.

Para estabilizar el pYV y por lo tanto la carga heteróloga codificada en el pYV, se adaptó el sistema de "asd" para el uso en *Y. enterocolitica* Δ*yopH,O,P,E,M,T* en el pYV. Se delecionó el asd cromosómicamente codificado (que dio como resultado *Y. enterocolitica* Δ*yopH,O,P,E,M,T* Δ*asd)*, que después se devolvió al pYV (llamado pYV-asd). El gen de asd se clonó a partir de Y. enterocolitica 8081 (Y. enterocolitica subsp. enterocolitica 8081; Secuencia de Referencia de NCBI: NC_008800.1) y se insertó mediante recombinación homóloga en el pYV (en la región de inserción natural antes de SycO) con su promotor endógeno y el terminador de la transcripción. El comportamiento del crecimiento de las cepas resultantes *Y. enterocolitica* Δ*yopH,O,P,E,M,T* Δ*asd* + pYV-asd se comparó en matraces de cultivo in vitro (medio BHI) a las cepas de tipo silvestre y progenitora *Y. enterocolitica* Δ*yopH,O,P,E,M,T* Δ*asd* (Figura 12). El pYV-asd fue capaz de rescatar el fenotipo observado tras la deleción de asd (Figura 12), mientras que el rescate no fue completo y pudo observarse una ligera reducción del crecimiento in vitro. Al contrario, en el modelo de cáncer murino 4T1 singénico in vivo, se encontró que *Y. enterocolitica* Δ*yopH,O,P,E,M,T* Δasd + pYV-asd coloniza tumores sólidos eficientemente (Figura 16). Sorprendentemente, se encontró que todas las colonias aisladas el día 9-10 después de la inyección aún contenían el plásmido pYV (selección en placas de cultivo que contenían Arsenito; la

resistencia a Arsenito se relaciona con la presencia de genes de arsRBC en el pYV [55]) (Figura 15). Por lo tanto, se demostró sorprendentemente que pYV-asd es un vector estable in vivo para codificar proteínas heterólogas a expresar en tumores sólidos mediante la colonización de bacterias durante varios días y semanas en una cepa de fondo *Y. enterocolitica* Δ*yopH,O,P,E,M,T* Δ*asd*.

Eficacia de *Y. enterocolitica* Δ*HOPEMT* en el retardo de la progresión tumoral y el impacto de alterar la actividad de VirF así como de aumentar la estabilidad

Se realizaron experimentos similares a los de las células 4T1 (Figura 9 y 10) en el modelo de ratón de cáncer de mama EMT6, en el cual los ratones Balb/C de tipo silvestre se aloinjertaron s.c. con células de cáncer de mama EMT6 y se trataron con una única administración i.v. de bacterias una vez que el tumor alcanzó un tamaño de aproximadamente 80-250 mm3. El día de la inyección i.v. de las bacterias se definió como el día 0, todos los ratones tuvieron una inyección i.p de Desferal un día antes del d0. El tratamiento con Y. enterocolitica ΔHOPEMT no tuvo impacto en la progresión tumoral en comparación con solución salina. Y. enterocolitica ΔHOPEMT pYV-YopE$_{1-138}$-(BH3 de tBID) $_2$ mostró un ligero impacto en la progresión tumoral, lo cual se reforzó mediante el uso de Y. enterocolitica ΔHOPEMT ΔHorquillaI-VirF pYV-YopE$_{1-138}$-(BH3 de tBID)$_2$ (Figura 45). Estos hallazgos señalan que tales bacterias y sus T3SS pueden emplearse para la interferencia con la progresión tumoral y que la manipulación de la actividad de VirF puede usarse para modular la actividad de T3SS bacteriano tras la administración in vivo. Además, con el uso de Y. enterocolitica ΔHOPEMT ΔHorquillaI-VirF Δasd pYV-asd-YopE$_{1-138}$-(BH3 de tBID)$_2$ se fortaleció aún más el impacto en la progresión tumoral (Figura 45), resaltando los beneficios de aumentar la estabilidad genética tras la administración sistémica.

Suministro de proteínas que desencadenan la ruta del receptor similar a RIG-1 a través del T3SS bacteriano para la inducción de una respuesta de IFN del tipo I

Los ácidos nucleicos citosólicos son sensados por un receptor como los miembros de la familia del receptor similar a RIG-1 (RLR) que detecta el ARN derivado de patógenos en el citosol [56]. RIG-1 y MDA5 consisten en dos dominios CARD en el extremo N-terminal y un dominio helicasa central (DExD/H) que sensa nucleótidos específicos [56]. La unión al ARN estimulador induce un reordenamiento estructural en RIG-I (y MDA5) que libera sus CARD para la asociación posterior con cadenas de ubiquitina enlazadas a K63 no anclado para formar oligómeros[56] (y en el caso de MDA5 para la formación de filamentos [56]). Los dominios CARD oligomerizados de RIG-I y MDA5 interactúan con el dominio CARD de MAVS. Esta interacción promueve la polimerización

del dominio CARD único de MAVS, lo que induce la señalización corriente abajo que conduce finalmente a la inducción de genes de IFN del tipo I [56].

Se generaron cepas bacterianas que expresaban los dos dominios CARD en el extremo N-terminal de RIG-1 de origen humano o murino fusionado a una señal de secreción bacteriana N-terminal para el suministro por el T3SS, específicamente $YopE_{1-138}$ (SEQ ID NO: 37 y 38). El suministro de la proteína de fusión $YopE_{1-138}$ - RIG-1 $CARD_2$ se evaluó mediante un ensayo de secreción in vitro estándar y la funcionalidad de las proteínas suministradas se evaluó en una línea de células reporteras para la inducción de IFN del tipo I. Las células reporteras de melanoma B16F10 murino para la estimulación de IFN del tipo I se basan en la actividad de la fosfatasa alcalina secretada, que está bajo el control del promotor I-ISG54, el cual está comprendido por el promotor ISG54 inducible por IFN mejorado por un ISRE multimérico. Las células reporteras se infectaron con diversas cantidades (MOI) de cepas bacterianas que expresaban un plásmido derivado de pBadMycHisA (pBad_Si2) y que translocaban la proteína $YopE_{1-138}$ - RIG-1 $CARD_2$. Se demostró que los dominios CARD del extremo N-terminal de RIG-1 murina y humana inducen una respuesta de IFN del tipo I dependiente de dosis en la línea de células reporteras (Figura 17), mientras que la cepa bacteriana de fondo (*Y. enterocolitica* Δ*HOPEMT*) no pudo inducir una respuesta tal (Figura 17). Los dominios CARD de RIG-1 humana y murina indujeron una respuesta de IFN del tipo I similar en la línea de células reporteras murinas (Figura 17), lo cual está de acuerdo con la alta identidad (76 %) y similitud (88.5 %) de secuencia.

Por lo tanto, la fusión a la señal de secreción N-terminal de bacterias condujo al suministro exitoso de proteínas $YopE_{1-138}$ - RIG-1 $CARD_2$ humanas y murinas expresadas en bacterias y no previno el plegamiento y la función de los dominios CARD de RIG-1 dentro de la célula eucariota. Esto implica, que los dominios CARD de RIG1 fusionados a YopE aún pueden multimerizar entre sí e inducir la multimerización de MAVS, lo que es sorprendente.

En experimentos adicionales usando esta línea de células reporteras de IFN del tipo I B16F10, se comparó *Y. enterocolitica* Δ*HOPEMT*, con *Y. enterocolitica* Δ*HOPEMT* que codifica en un plásmido derivado de pBadMycHisA (pBad_Si2) $YopE_{1-138}$-MycHis o $YopE_{1-138}$ - Rig1 $CARD_2$ humano. De nuevo, el suministro de los dominios CARD de RIG-1 humana indujo una respuesta de IFN del tipo I dependiente de dosis, mientras que *Y. enterocolitica* Δ*HOPEMT* o *Y. enterocolitica* Δ*HOPEMT* que suministraba $YopE_{1-138}$-MycHis no tuvo efecto en la respuesta de IFN del tipo I (Figura 18). En el mismo ensayo se comparó el potencial de inducción de IFN del tipo I de bacterias que suministraban los dominios CARD de RIG-1 a un control positivo, el

Interferón gamma murino (IFNγ). Muy sorprendentemente, el suministro bacteriano de los dominios CARD de RIG-1 pudo inducir una respuesta máxima de la línea de células reporteras similar a la respuesta obtenida por el control positivo para la inducción de IFN del tipo I, IFNγ (Figuras 18 y 19).

En experimentos adicionales se infectaron células de cáncer de mama murinas 4T1 o células de melanoma B16F10 de tipo silvestre, y se transfirió el sobrenadante que posiblemente contenía IFN después de 4 h a la línea de células reporteras de IFN del tipo I B16F10. De esta manera, se comparó *Y. enterocolitica* Δ*HOPEMT*, con *Y. enterocolitica* Δ*HOPEMT* que codifica en el plásmido de virulencia endógeno (pYV) $YopE_{1-138}$ - Rig1 $CARD_2$ murina. El suministro de los dominios CARD de RIG-1 murina codificados por pYV indujo una respuesta de IFN del tipo I dependiente de dosis, mientras que *Y. enterocolitica* Δ*HOPEMT* no tuvo efecto en la respuesta de IFN del tipo I en las células B16F10 (Figura 20) o 4T1 (Figura 21) de tipo silvestre.

En un experimento adicional, se han evaluado varias versiones que consisten en diferentes longitudes de los CARD de RIG-1 murinos para determinar su potencial para inducir una respuesta de IFN del tipo I. Se predice que los dominios CARD de RIG-1 son codificados por los aminoácidos 1-172 (secuencia murina, núm. de Uniprot Q6Q899). Se evaluaron $YopE_{1-138}$-dominios CARD de RIG1 $murina_{1-246}$, $YopE_{1-138}$-dominios CARD de RIG1 $murina_{1-229}$, y $YopE_{1-138}$-dominios CARD de RIG1 $murina_{1-218}$ en células reporteras de IFN de melanoma B16F10 así como en células reporteras de IFN de macrófagos RAW (Figura 27-28). Se encontraron igualmente activos $YopE_{1-138}$-dominios CARD de RIG1 $murina_{1-246}$, $YopE_{1-138}$-dominios CARD de RIG1 $murina_{1-229}$ y $YopE_{1-138}$-dominios CARD de RIG1 $murina_{1-218}$.

En un experimento de seguimiento se evaluó la potencia de MAD5 suministrado a través de bacterias. Se clonaron varias versiones que consistían en una longitud diferente de los CARD de MDA5 murinas y se evaluaron para determinar su potencial para inducir una respuesta de IFN del tipo I en células reporteras de IFN B16F10. Se predice que los dominios CARD de MDA5 son codificados por los aminoácidos 1-190 (secuencia murina, núm. de Uniprot Q8R5F7). Se evaluaron $YopE_{1-138}$-dominios CARD de MDA5 $murina_{1-294}$ y $YopE_{1-138}$-dominios CARD de MDA5 $murina_{1-231}$, en células reporteras de IFN de melanoma B16F10. Se encontró que todas las variantes eran activas (Figura 29). Sorprendentemente, se encontró que la actividad de los CARD de MDA5 suministrados era por mucho menos fuerte que la de los CARD de RIG-1, incluso aunque las proteínas compartieran una función biológica muy similar y una estructura proteica que

consiste en dos dominios CARD en el extremo N-terminal y un dominio helicasa central (DExD/H) que sensa nucleótidos específicos [56].

Suministro de proteínas que desencadenan la ruta de cGAS/STING a través del T3SS bacteriano para la inducción de una respuesta de IFN del tipo I

En la ruta de cGAS/STING, el ADN bicatenario citosólico se detecta mediante la unión a la enzima GMP–AMP cíclico sintasa (cGAS). Tras la unión del dsADN, cGAS se activa y produce un segundo mensajero de CDN cíclico, GMP-AMP cíclico (cGAMP). Después el cGAMP se une directamente a la proteína receptora del retículo endoplásmico STING (estimulador de los genes de IFN). Tras la unión de cGAMP, STING se activa e induce una ruta de señalización que conduce a la transcripción del gen de IFN del tipo I y otros genes corregulados [57]. La cGAS humana produce cGAMP 2',3' (que contiene enlaces fosfodiéster 2'-5' y 3'-5'), pero se ha demostrado que otros CDN pueden inducir la STING murina o humana a diversos niveles. Esto incluye el cGAMP 3',3' (por ejemplo, producido por DncV de Vibrio cholera o algunas cGAS eucariotas), di-AMP cíclico (por ejemplo, producido por CdaA o DisA de diferentes especies grampositivas) o di-GMP cíclico (por ejemplo, producido por WspR de Pseudomonas aeruginosa) [57,58]. Mientras que la STING humana de tipo silvestre (y la STING murina) reconocen cGAMP 2',3', cGAMP 3',3', di-AMP cíclico y di-GMP cíclico, varias variantes de STING humana natural responden de manera diferente a estos agonistas [59].

Para activar la ruta de cGAS/STING tras el suministro de proteínas por bacterias, se clonó WspR de P. aeruginosa que produce el di-GMP cíclico a expresar y suministrar por *Y. enterocolitica* a través del T3SS. Para aumentar la actividad de WspR, se usó solo su dominio GGDEF (dominio de diguanilato ciclasa) y el dominio de tallo corriente arriba se reemplazó por el motivo de zipper de leucina de GCN4 de levadura. Se sabe que la dimerización de WspR es necesaria para su actividad y se ha demostrado que el zipper de leucina de GCN4 forma bobinas enrolladas paralelas y, por lo tanto, sirve como un módulo de dimerización fuerte. El motivo GCN4 se fusionó al dominio GGDEF de WspR, incluido el enlazador natural entre el GGDEF y el tallo helicoidal para permitir una flexibilidad entre los dominios comparable con WspR de tipo silvestre [60].

El suministro de la proteína de fusión $YopE_{1-138}$ – zipper de leucina de GCN4 - dominio GGDEF de WspR (corto: $YopE_{1-138}$ – WspR) (SEQ ID NO: 39) se evaluó en una línea de células reporteras para la inducción de IFN del tipo I. Las células reporteras de melanoma B16F10 murino para la estimulación de IFN del tipo I se basan en la actividad de la fosfatasa alcalina secretada, que está bajo el control del promotor I-ISG54, el cual está comprendido por el promotor ISG54 inducible

por IFN mejorado por un ISRE multimérico. Las células reporteras se infectaron con diversas cantidades (MOI) de cepas bacterianas que expresaban a partir de un plásmido derivado de pBadMycHisA (pBad_Si2) y translocaban la proteína $YopE_{1-138}$ - WspR. Se demostró que el dominio GGDEF de WspR de P. areuginosa fusionado al motivo de zipper de leucina de GCN4 induce de una manera dependiente de dosis una respuesta de IFN del tipo I en la línea de células reporteras (Figura 22), mientras que la cepa bacteriana de fondo (*Y. enterocolitica* Δ*HOPEMT*) no pudo inducir una respuesta tal (Figura 22).

Por lo tanto, la fusión a la señal de secreción N-terminal de bacterias condujo al suministro exitoso de la proteína $YopE_{1-138}$ - zipper de leucina de GCN4 (levadura) - GGDEF de WspR (P. aeruginosa) expresada en bacterias y no previno el plegamiento y la función de la proteína tri-partita dentro de la célula eucariota. Esto implica, que el zipper de leucina de GCN4 fusionado a YopE - GGDEF de WspR aún puede dimerizar y por lo tanto conducir a dominios de GGDEF activos, lo que es sorprendente.

Para experimentos adicionales, se clonó DncV de V. cholerae (que produce cGAMP 3',3') [57], una proteína similar a DisA de Bacillus cereus (que produce di-AMP cíclico) [61] y la cGAS de anémona eucariota (Nematostella vectensis) (que produce cGAMP 3',3') [57], los cuales se han informado que son activos en ausencia de estímulos externos, para la expresión y translocación por bacterias. Las ciclasas de tipo DisA generalmente forman octámeros [61], que podrían no ser compatibles con la fusión de YopE en el extremo N-terminal y el suministro bacteriano. Se identificó la proteína similar a DisA de B. cereus (código de PDB 2fb5) basado en la similitud estructural con el dominio de diadenilato ciclasa (DAC) de las proteínas DisA clásicas [61], pero curiosamente carece de todas las hélices conocidas de otras proteínas DisA requeridas para la multimerización. Por lo tanto, se decidió aprovechar la proteína similar a DisA activa posiblemente monomérica de B. cereus (código de PDB 2fb5; residuos 76-205).

El suministro de la proteína de fusión $YopE_{1-138}$ – DncV de V. cholerae (SEQ ID NO: 41), $YopE_{1-138}$ - proteína similar a DisA de B. cereus (SEQ ID NO: 42) y $YopE_{1-138}$- cGAS de anémona (SEQ ID NO: 43) se evaluó en una línea de células reporteras para la inducción de IFN del tipo I. Las células reporteras de melanoma B16F10 murino para la estimulación de IFN del tipo I se basan en la actividad de la fosfatasa alcalina secretada, que está bajo el control del promotor I-ISG54, el cual está comprendido por el promotor ISG54 inducible por IFN mejorado por un ISRE multimérico. Las células reporteras se infectaron con diversas cantidades (MOI) de cepas bacterianas que expresaban a partir de un plásmido derivado de pBadMycHisA (pBad_Si2) y que

translocaban la $YopE_{1-138}$ – DncV de V. cholerae, $YopE_{1-138}$ - proteína similar a DisA de B. cereus y $YopE_{1-138}$- cGAS de anémona. Se demostró que $YopE_{1-138}$ – DncV de V. cholerae, $YopE_{1-138}$ - proteína similar a DisA de B. cereus y $YopE_{1-138}$- cGAS de anémona inducen de una manera dependiente de dosis una respuesta de IFN del tipo I en la línea de células reporteras (Figura 23), mientras que la cepa bacteriana de fondo (*Y. enterocolitica* Δ*HOPEMT*) o *Y. enterocolitica* Δ*HOPEMT* que suministra $YopE_{1-138}$-MycHis no pudo inducir una respuesta tal (Figura 23). La cGAS de anémona (Nematostella vectensis) que produce cGAMP 3',3' mostró la actividad más alta, mientras que se encontró que DncV de V. cholerae (que produce cGAMP 3',3') y la proteína similar a DisA de Bacillus cereus (que produce di-AMP cíclico) activaban de igual manera una respuesta de IFN del tipo I.

Por lo tanto, la fusión a la señal de secreción N-terminal de bacterias condujo a el suministro exitoso de las proteínas $YopE_{1-138}$ – DncV de V. cholerae, $YopE_{1-138}$ - proteína similar a DisA de B. cereus y $YopE_{1-138}$- cGAS de anémona expresadas en y no previno el plegamiento y función de estas proteínas dentro de la célula eucariota, lo que no podría haberse predicho.

Alternativamente, el IRF3 murino, un factor de la transcripción central corriente abajo de la señalización dependiente de RLR o cGAS/STING [62], se clonó para la expresión y transporte por bacterias. En la ausencia de activación, el IRF-3 se encuentra en una conformación latente en el citoplasma. Solo tras la activación de los receptores corriente arriba como RIG-1, MDA5 o STING, el IRF-3 se fosforila a través de TBK1 e IKKε y por lo tanto se activa. La fosforilación de IRF-3 conduce a la dimerización, translocación al núcleo, y asociación con coactivadores [62]. Para lograr una versión activa constitutiva de IRF3, se reemplazó uno de los sitios de fosforilación más importantes (Ser397 en IRF3 murino) por Asp [62].

El suministro de la proteína de fusión $YopE_{1-138}$ – IRF3 murino Ser397Asp (SEQ ID NO: 40) se evaluó en un ensayo de secreción in vitro, donde se induce artificialmente la secreción de proteínas en el líquido circundante. Después de la precipitación de proteínas basada en TCA, se usó el análisis de transferencia Western con un anticuerpo anti-YopE para determinar las cantidades de proteínas secretadas (Figura 24). Mientras que unas cepas de ΔHOPEMT que codifican $YopE_{1-138}$-BH3 de tBID murina dieron como resultado una fuerte banda en la fracción secretada (a 15-20 kDa), se encontró que $YopE_{1-138}$ – IRF3 murino Ser397Asp (at 50-75 Da) también se secretó, aunque en menor medida (Figura 24). El análisis de la fracción celular bacteriana reveló que son comparables los niveles de expresión de $YopE_{1-138}$- BH3 de tBID murina y $YopE_{1-138}$ – IRF3

murino Ser397Asp, mientras que $YopE_{1-138}$ – IRF3 murino Ser397Asp mostró un patrón de bandas de degradación (Figura 24).

Suministro de las proteínas que desencadenan la ruta de cGAS/STING y del receptor similar a RIG-1 a través del T3SS bacteriano para la inducción de una respuesta de IFN del tipo I en células inmunitarias.

El suministro de la proteína de fusión $YopE_{1-138}$ – RIG-1 $CARD_2$ murino, $YopE_{1-138}$ – DncV de V. cholerae, $YopE_{1-138}$ - proteína similar a DisA de B. cereus y $YopE_{1-138}$- cGAS de anémona se evaluó en una línea de células reporteras inmunitarias para la inducción de IFN del tipo I. Las células reporteras de macrófagos RAW264.7 murinas para la estimulación de IFN del tipo I se basan en la actividad de la fosfatasa alcalina secretada, que está bajo el control del promotor I-ISG54, que está comprendido por el promotor ISG54 inducible por IFN mejorado por un ISRE multimérico. Las células reporteras se infectaron con diversas cantidades (MOI) de cepas bacterianas que expresaban a partir de un plásmido derivado de pBadMycHisA (pBad_Si2) y translocaban $YopE_{1-138}$ – RIG-1 $CARD_2$ murino, $YopE_{1-138}$ – DncV de V. cholerae, $YopE_{1-138}$ - proteína similar a DisA de B. cereus y $YopE_{1-138}$- cGAS de anémona. Se demostró que $YopE_{1-138}$ – RIG-1 $CARD_2$ murino, $YopE_{1-138}$ – DncV de V. cholerae, y $YopE_{1-138}$- cGAS de anémona inducen de manera dependiente de dosis una respuesta de IFN del tipo I en esta línea de células reporteras inmunitarias (Figura 25), mientras que la cepa bacteriana de fondo (*Y. enterocolitica* Δ*HOPEMT*) no pudo inducir una respuesta tal (Figura 25). $YopE_{1-138}$ – RIG-1 $CARD_2$ murino mostró la actividad más alta, seguido por cGAS de anémona (Nematostella vectensis) que produce cGAMP 3',3' y DncV de V. cholerae (que produce cGAMP 3',3'). Se encontró que la proteína similar a DisA de Bacillus cereus (que produce di-AMP cíclico) tenía solo una débil activación de una respuesta de IFN del tipo I.

Para experimentos adicionales, se clonaron los aminoácidos 161-522 de cGAS humana (núm. de Uniprot Q8N884 y SEQ ID No. 115; que produce cGAMP 2',3')[57], para la expresión y translocación por bacterias. Las células reporteras de melanoma B16F10 murino y de macrófagos RAW murinos para la estimulación de IFN del tipo I se basan en la actividad de la fosfatasa alcalina secretada, que está bajo el control del promotor I-ISG54, que está comprendido por el promotor ISG54 inducible por IFN mejorado por un ISRE multimérico. Las células reporteras se infectaron con diversas cantidades (MOI) de cepas bacterianas que expresaban a partir de un plásmido derivado de pBadMycHisA (pBad_Si2) y translocaban la $YopE_{1-138}$ – cGAS $humana_{161-522}$ y se demostró que inducían de manera dependiente de dosis una respuesta de IFN del tipo I en

la línea de células reporteras, así como con una cepa bacteriana que expresaba a partir de un plásmido derivado de pBadMycHisA (pBad_Si2) y translocaba $YopE_{1-138}$- cGAS de anémona, $YopE_{1-138}$- cGAS de anémona$_{60-422}$, $YopE_{1-138}$- CdaA de Listeria$_{101-273}$, $YopE_{1-138}$- DncV de V. cholerae o $YopE_{1-138}$- proteína similar a DisA de B. cereus (Figura 32-33). La activación más fuerte se observó con $YopE_{1-138}$ – cGAS humana$_{161-522}$, seguido por $YopE_{1-138}$- cGAS de anémona, $YopE_{1-138}$- cGAS de anémona$_{60-422}$. De manera interesante, la variante más corta de cGAS de anémona$_{60-422}$ fue ligeramente más activa. $YopE_{1-138}$- CdaA de Listeria$_{101-273}$, $YopE_{1-138}$- DncV de V. cholerae o $YopE_{1-138}$- proteína similar a DisA de B. cereus también exhibió una activación de IFN dependiente de dosis, aunque en menor medida que las proteínas cGAS (Figura 32-33).

Suministro de MAVS a través del T3SS bacteriano para la inducción de una respuesta de IFN del tipo I

Los ácidos nucleicos citosólicos son sensados por un receptor como los miembros de la familia del receptor similar a RIG-1 (RLR) que detecta el ARN derivado de patógenos en el citosol [56]. RIG-1 y MDA5 consisten en dos dominios CARD en el extremo N-terminal y un dominio helicasa central (DExD/H) que sensa nucleótidos específicos [56]. La unión al ARN estimulador induce un reordenamiento estructural en RIG-I (y MDA5) que libera sus CARD para la asociación posterior con cadenas de ubiquitina enlazadas a K63 no anclado para formar oligómeros[56] (y en el caso de MDA5 para la formación de filamentos [56]). Los dominios CARD oligomerizados de RIG-I y MDA5 interactúan con el dominio CARD de MAVS. Esta interacción promueve la polimerización del dominio CARD único de MAVS, lo que induce la señalización corriente abajo que conduce finalmente a la inducción de genes de IFN del tipo I [56].

Se generaron cepas bacterianas (basado en *Y. enterocolitica* Δ*HOPEMT)* que expresaban los dominios CARD en el extremo N-terminal de MAVS de origen humano fusionado a una señal de secreción bacteriana N-terminal para el suministro por el T3SS, específicamente $YopE_{1-138}$. El suministro de la proteína de fusión $YopE_{1-138}$ – CARD de MAVS se evaluó mediante un ensayo de secreción in vitro estándar y la funcionalidad de las proteínas suministradas se evaluó en una línea de células reporteras para la inducción de IFN del tipo I. Las células reporteras de melanoma B16F10 murino y de macrófagos RAW murinos para la estimulación de IFN del tipo I se basan en la actividad de la fosfatasa alcalina secretada, que está bajo el control del promotor I-ISG54, que está comprendido por el promotor ISG54 inducible por IFN mejorado por un ISRE multimérico. Las células reporteras se infectaron con diversas cantidades (MOI) de *Y. enterocolitica* Δ*HOPEMT* que expresaba a partir de un plásmido derivado de pBadMycHisA (pBad_Si2) y translocaba la

proteína $YopE_{1-138}$ – CARD de MAVS humana. Se demostró que el dominio CARD N-terminal murino de MAVS induce de manera dependiente de dosis una respuesta de IFN del tipo I en la línea de células reporteras (Figura 30-31), mientras que la cepa bacteriana de fondo (*Y. enterocolitica* Δ*HOPEMT*) no pudo inducir una respuesta tal (Figura 30-31). Los dominios CARD de cGAS humana y de RIG-1 murina indujeron una respuesta de IFN del tipo I de una manera similar en las líneas de células reporteras murinas (Figura 30-31), con RIG-1 que muestra el potencial de activación más alto, seguido por MAVS y cGAS.

Por lo tanto, la fusión a la señal de secreción N-terminal de bacterias condujo al suministro exitoso de la proteína $YopE_{1-138}$ - CARD de MAVS humana expresada en bacterias y no previno el plegamiento y la función del dominio CARD de MAVS dentro de la célula eucariota. Esto implica, que el dominio CARD de MAVS fusionado a YopE aún sea capaz de multimerizar entre sí e inducir la multimerización de MAVS, lo cual es sorprendente. Incluso más sorprendente, se ha demostrado que el CARD de MAVS no puede inducir la señalización corriente abajo del IFN [64], mientras que se encontró que el dominio CARD de MAVS fusionado a YopE activa fuertemente la ruta de IFN del tipo I.

Además, se ha demostrado que el dominio transmembrana C-terminal se MAVS es esencial para la función de MAVS tras la transfección del ADN y se demostró que el dominio CARD de MAVS solo está inactivo cuando se expresa a partir de los constructos de ADN transfectados [66]. Más aún, se demostró que el CARD de MAVS fusionado a la región transmembrana, el cual tiene la capacidad de activar una respuesta de IFN del tipo I cuando se expresa a partir del ADN transfectado o como proteína purificada [64,66], se basa en MAVS endógena, la cual comenzó a agregarse y por lo tanto a activar [64]. Pudo demostrarse mediante el uso de una línea celular KO para MAVS (Figura 52), que el CARD de MAVS fusionado a YopE suministrado por bacterias se activa sin la presencia de MAVS endógena en la mitocondria. Este CARD de MAVS fusionado a YopE es capaz de multimerizar y activar parejas corriente abajo sin el dominio transmembrana y además sin MAVS endógena, es sorprendente.

Punto de referencia para el agonista de STING molecular pequeño para la inducción de una respuesta de IFN del tipo I in vitro

Los dinucleótidos cíclicos son agonistas bien conocidos de la ruta de STING, que conducen a la inducción corriente abajo de la señalización de IFN del tipo I. Los agonistas de STING se han descrito en la bibliografía [59] y se ha demostrado que actúan principalmente sobre células inmunitarias, con la actividad más alta mostrada en las células dendríticas [59]. Al contrario, se

encontró que la señalización de RLR se expresaba de manera más ubicua [63]. Por lo tanto se compararon las bacterias *Y. enterocolitica* Δ*HOPEMT* que suministran enzimas generadoras de dinucleótidos cíclicos ($YopE_{1-138}$-cGAS de anémona y $YopE_{1-138}$-cGAS humana) o bacterias que suministran $YopE_{1-138}$-dominios CARD de RIG1 $murina_{1-218}$ con el agonista de STING molecular pequeño 2'3'-c-di-AM(PS)2 (Rp,Rp) (similar a ADU-S100 de Aduro Biotech) en células inmunitarias (células reporteras de IFN de macrófagos RAW) y células no inmunitarias (células reporteras de IFN de melanoma B16F1) para el potencial inductor de Interferón. En células inmunitarias, se observó un potencial de activación similar para el agonista de STING molecular pequeño 2'3'-c-di-AM(PS)2 (Rp,Rp) y para las tres cepas bacterianas probadas que suministraban una proteína ($YopE_{1-138}$-cGAS de anémona, $YopE_{1-138}$-cGAS humana o $YopE_{1-138}$-dominios CARD de RIG1 $murina_{1-218}$) mientras que las bacterias *Y. enterocolitica* Δ*HOPEMT* que no suministraban una proteína mostraron un potencial de activación muy débil (Figura 34-37). En células no inmunitarias (células cancerígenas, melanoma), $YopE_{1-138}$-dominios CARD de RIG1 $murina_{1-218}$, suministrado por bacterias, $YopE_{1-138}$-cGAS de anémona y $YopE_{1-138}$-cGAS humana derivados de bacterias funcionaron igual de bien y casi superaron al agonista de STING molecular pequeño, destacando una presencia más ubicua de RLR en comparación con STING (Figura 34-37).

Dependencia estricta al T3SS de los dominios CARD de RIG1 suministrados por bacterias o CARD de MAVS

Para probar el transporte dependiente de T3SS estricto, se delecionó una de las proteínas T3SS que forman el poro de translocación en la membrana de la célula eucariota (YopB). El potencial de tales bacterias con yopB delecionado (llamadas *Y. enterocolitica* Δ*HOPEMT-yopB)* que expresaban $YopE_{1-138}$-dominios CARD de RIG1 $murina_{1-246}$ o $YopE_{1-138}$ – CARD de MAVS $humana_{1-100}$ se evaluó en una línea de células reporteras de IFN de macrófagos RAW y en comparación con bacterias *Y. enterocolitica* Δ*HOPEMT* que expresaban yopB que expresaban también $YopE_{1-138}$-dominios CARD de RIG1 $murina_{1-246}$ o $YopE_{1-138}$ – CARD de MAVS $humana_{1-100}$ (Figura 38). Mientras que las bacterias de tipo silvestre para yopB que expresaban $YopE_{1-138}$-dominios CARD de RIG1 $murina_{1-246}$ o $YopE_{1-138}$ – CARD de MAVS $humana_{1-100}$ exhibían una activación dependiente de dosis de una respuesta de IFN del tipo I, las cepas con yopB delecionado que expresaban las mismas proteínas no pudieron inducir una respuesta tal por encima del nivel de fondo inducido por la cepa bacteriana de fondo no expresaban una proteína a suministrar (Figura

38). Esto valida, que $YopE_{1-138}$-dominios CARD de RIG1 $murina_{1-246}$ o $YopE_{1-138}$ – CARD de MAVS $humana_{1-100}$ se transportan ambos a través del T3SS en células eucariotas dianas.

Inducción de la respuesta de IFN del tipo I en aislado tumoral crudo

Para verificar que la respuesta de IFN del tipo I puede iniciarse dentro del microentorno tumoral, se realizó un análisis en los aislados tumorales crudos infectados ex vivo con cepas bacterianas seguido de un ELISA de Interferón beta. Los ratones Balb/C de tipo silvestre aloinjertados s.c. con células de cáncer de mama EMT6 se sacrificaron cuando el tumor alcanzó un volumen de. Los tumores se maceraron, se digirieron y se sembraron como suspensiones de células individuales en placas de 24 pocillos. Tales células de dos tumores diferentes se dejaron sin infectar (líneas punteadas en la Figura 39) o se infectaron con *Y. enterocolitica* Δ*HOPEMT*, o *Y. enterocolitica* Δ*HOPEMT* que codifica en un plásmido derivado de pBadMycHisA $YopE_{1-138}$-dominios CARD de RIG1 $murina_{1-246}$. La estimulación del IFN se evaluó con el uso de un ELISA de Interferón beta y demostró que mientras que *Y. enterocolitica* Δ*HOPEMT* no pudo inducir la secreción del Interferón beta, la infección con *Y. enterocolitica* Δ*HOPEMT* que codifica $YopE_{1-138}$-dominios CARD de RIG1 $murina_{1-246}$ dio como resultado la secreción dependiente de dosis de Interferón beta por el aislado tumoral crudo de dos tumores diferentes (Figura 39). Esto valida, que los dominios CARD de RIG1 suministrados por bacterias son capaces de inducir la producción de Interferón en una población de células mixtas que consiste en células cancerígenas, células inmunitarias y todas las demás células dentro del microentorno tumoral.

Eficacia de *Y. enterocolitica* Δ*HOPEMT* que suministra los CARD de RIG1 o cGAS en el retardo de la progresión tumoral

Para evaluar el impacto de $YopE_{1-138}$-dominios CARD de RIG1 $murina_{1-246}$ y $YopE_{1-138}$-cGAS humana suministrados a las células tumorales in vivo, se realizaron estudios en ratones Balb/C de tipo silvestre aloinjertados s.c. con células de cáncer de mama EMT6. Los ratones se inyectaron por vía intratumoral (it) con PBS (Figura 40) o $7.5*10^7$ de Y. enterocolitica ΔHOPEMT, Y. enterocolitica ΔHOPEMT + $YopE_{1-138}$ dominios CARD de RIG1 $murina_{1-246}$ o Y. enterocolitica ΔHOPEMT + $YopE_{1-138}$ cGAS humana una vez que el tumor alcanzó un tamaño de aproximadamente 60-130 mm3. El día de la primera inyección de bacterias se definió como el día 0. Los ratones se inyectaron el día d0, d1, d5, d6, d10 y d11. El volumen tumoral se midió durante los días siguientes con calibradores. El tratamiento con Y. enterocolitica ΔHOPEMT sola mostró un impacto en la progresión del volumen tumoral, donde 4/14 ratones exhibieron regresión tumoral completa (Figura 41). Se encontró que Y. enterocolitica ΔHOPEMT que suministra una proteína

que induce una respuesta de IFN del tipo I, que es CARD de RIG1 o cGAS, conduce a un impacto más pronunciado en la progresión tumoral donde cada 8/14 (CARD de RIG1) o 8/15 (cGAS) ratones muestran una regresión tumoral completa y durable (Figura 42-43). Estos hallazgos señalan que tales bacterias y sus T3SS pueden emplearse para una interferencia muy significativa con la progresión tumoral y que el suministro de proteínas inductoras de IFN del tipo I es muy adecuado para inducir la regresión de un tumor primario.

Los ratones con regresión tumoral completa se observaron aún más hasta el día 65 después del aloinjerto tumoral inicial, seguido en el día 65 de una recaída con células de cáncer de mama EMT6 en el costado contralateral para evaluar la memoria mediada por el sistema inmunitario y la actividad sistémica hacia estas células cancerígenas. En este estudio de recaída no se administró tratamiento adicional y los ratones se observaron simplemente para la progresión tumoral en el costado contralateral y en comparación con ratones vírgenes (ratones sin una exposición anterior a células de cáncer de mama EMT6, pero todos los demás parámetros son idénticos, como la edad). Mientras que en células tumorales de ratones vírgenes aloinjertadas s.c. dio como resultado el crecimiento tumoral, se encontró que todos los ratones con un tumor EMT6 tratado anteriormente en el costado opuesto con regresión completa estaban protegidos del crecimiento tumoral (Figura 44). Sorprendentemente, los tumores en ratones con una regresión completa anterior inducida por el tratamiento bacteriano en el costado contralateral comenzaron a crecer durante varios días y alcanzaron volúmenes de hasta >100 mm3 (con un volumen máximo alrededor del día 10 después del segundo injerto) y después se escogieron (Figura 44). Este período de demora puede ser indicativo de una respuesta del sistema inmunitario adaptativo que necesita varios días antes de estar completamente montado.

En experimentos adicionales para evaluar el impacto de $YopE_{1-138}$-dominios CARD de RIG1 $murina_{1-246}$ y $YopE_{1-138}$-cGAS humana suministrados a células tumorales in vivo, se realizaron estudios en ratones C57BL/6 de tipo silvestre aloinjertados s.c. con células de cáncer de melanoma B16F10. Los ratones se inyectaron por vía intratumoral (it) con PBS o $7.5*10^7$ de Y. enterocolitica ΔHOPEMT, Y. enterocolitica ΔHOPEMT + $YopE_{1-138}$ dominios CARD de RIG1 $murina_{1-246}$ o Y. enterocolitica ΔHOPEMT + $YopE_{1-138}$ cGAS humana una vez que el tumor alcanzó un tamaño de aproximadamente 75 mm3. El día de la primera inyección de bacterias se definió como el día 0. Los ratones se inyectaron el día d0, d1, d2, d3, d6 y d9. El volumen tumoral se midió durante los días siguientes con calibradores. El tratamiento con Y. enterocolitica ΔHOPEMT sola mostró un impacto en la progresión del volumen tumoral, donde 1/15 ratones exhibieron regresión tumoral

completa (Figura 46). Se encontró que la Y. enterocolitica ΔHOPEMT que suministra una proteína que induce una respuesta de IFN del tipo I, que es CARD de RIG1 o cGAS, conduce a un impacto muy pronunciado en la progresión tumoral donde cada 5/15 (CARD de RIG1) o 8/15 (cGAS) ratones muestran regresión tumoral completa y durable (Figura 46). Estos hallazgos señalan que tales bacterias y sus T3SS pueden emplearse para una interferencia muy significativa con la progresión tumoral y que el suministro de proteínas inductoras de IFN del tipo I es muy adecuado para inducir la regresión de un tumor primario. Sorprendentemente, en especial en el caso de bacterias que suministran $YopE_{1-138}$-cGAS humana, se observó un aumento en el volumen tumoral poco después de las primeras administraciones en comparación con el control tratado con PBS, el cual puede ser inducido por la entrada de leucocitos al tumor (pseudo-progresión) inducida por el suministro intracelular de la proteína cGAS inductora de IFN del tipo I.

Lista de referencias

1 Hayes, C. S., Aoki, S. K. & Low, D. A. Bacterial contact-dependent delivery systems. *Annu Rev Genet* 44, 71-90, doi:10.1146/annurev.genet.42.110807.091449 (2010).

2 Cornelis, G. R. The type III secretion injectisome. *Nat Rev Microbiol* 4, 811-825, doi:nrmicro1526 [pii]10.1038/nrmicro1526 (2006).

3 Blanco-Toribio, A., Muyldermans, S., Frankel, G. & Fernandez, L. A. Direct injection of functional single-domain antibodies from E. coli into human cells. *PLoS One* 5, e15227, doi:10.1371/journal.pone.0015227 (2010).

4 Bichsel, C. y otros Direct reprogramming of fibroblasts to myocytes via bacterial injection of MyoD protein. *Cell Reprogram* 15, 117-125, doi:10.1089/cell.2012.0058 (2013).

5 Bichsel, C. y otros Bacterial delivery of nuclear proteins into pluripotent and differentiated cells. *PLoS One* 6, e16465, doi:10.1371/journal.pone.0016465 (2011).

6 Chamekh, M. y otros Delivery of biologically active anti-inflammatory cytokines IL-10 and IL-1ra in vivo by the Shigella type III secretion apparatus. *J Immunol* 180, 4292-4298 (2008).

7 Skurnik, M. & Wolf-Watz, H. Analysis of the yopA gene encoding the Yop1 virulence determinants of Yersinia spp. *Mol Microbiol* 3, 517-529 (1989).

8 Isberg, R. R., Voorhis, D. L. & Falkow, S. Identification of invasin: a protein that allows enteric bacteria to penetrate cultured mammalian cells. *Cell* 50, 769-778 (1987).

9 Mota, L. J. & Cornelis, G. R. The bacterial injection kit: type III secretion systems. *Ann Med* 37, 234-249, doi:R673752030212825 [pii]10.1080/07853890510037329 (2005).

10 Trosky, J. E., Liverman, A. D. & Orth, K. Yersinia outer proteins: Yops. *Cell Microbiol* 10, 557-565, doi:10.1111/j.1462-5822.2007.01109.x (2008).

11 Brenner, D. & Mak, T. W. Mitochondrial cell death effectors. *Curr Opin Cell Biol* 21, 871-877, doi:S0955-0674(09)00160-4 [pii]10.1016/j.ceb.2009.09.004 (2009).

12 Chalah, A. & Khosravi-Far, R. The mitochondrial death pathway. *Adv Exp Med Biol* 615, 25-45, doi:10.1007/978-1-4020-6554-5_3 (2008).

13 Fuchs, Y. & Steller, H. Programmed cell death in animal development and disease. *Cell* 147, 742-758, doi:S0092-8674(11)01283-9 [pii]10.1016/j.cell.2011.10.033 (2011).

14 Waugh, D. S. An overview of enzymatic reagents for the removal of affinity tags. *Protein Expr Purif* 80, 283-293, doi:S1046-5928(11)00203-8 [pii]10.1016/j.pep.2011.08.005 (2011).

15 Howard, S. L. y otros Application of comparative phylogenomics to study the evolution of Yersinia enterocolitica and to identify genetic differences relating to pathogenicity. *J Bacteriol* 188, 3645-3653, doi:10.1128/JB.188.10.3645-3653.2006 (2006).

16 Thomson, N. R. y otros The complete genome sequence and comparative genome analysis of the high pathogenicity Yersinia enterocolitica strain 8081. *PLoS Genet* 2, e206, doi:10.1371/journal.pgen.0020206 (2006).

17 Pelludat, C., Hogardt, M. & Heesemann, J. Transfer of the core region genes of the Yersinia enterocolitica WA-C serotype O:8 high-pathogenicity island to Y. enterocolitica MRS40, a strain with low levels of pathogenicity, confers a yersiniabactin biosynthesis phenotype and enhanced mouse virulence. *Infect Immun* 70, 1832-1841 (2002).

18 Mulder, B., Michiels, T., Simonet, M., Sory, M. P. & Cornelis, G. Identification of additional virulence determinants on the pYV plasmid of Yersinia enterocolitica W227. *Infect Immun* 57, 2534-2541 (1989).

19 Sory, M. P. & Cornelis, G. R. Translocation of a hybrid YopE-adenylate cyclase from Yersinia enterocolitica into HeLa cells. *Mol Microbiol* 14, 583-594 (1994).

20 Sarker, M. R., Neyt, C., Stainier, I. & Cornelis, G. R. The Yersinia Yop virulon: LcrV is required for extrusion of the translocators YopB and YopD. *J Bacteriol* 180, 1207-1214 (1998).

21 Neubauer, H., Aleksic, S., Hensel, A., Finke, E. J. & Meyer, H. Yersinia enterocolitica 16S rRNA gene types belong to the same genospecies but form three homology groups. *Int J Med Microbiol* 290, 61-64, doi:10.1016/S1438-4221(00)80107-1 (2000).

22 Feldman, M. F., Muller, S., Wuest, E. & Cornelis, G. R. SycE allows secretion of YopE-DHFR hybrids by the Yersinia enterocolitica type III Ysc system. *Mol Microbiol* 46, 1183-1197, doi:3241 [pii] (2002).

23 Ramamurthi, K. S. & Schneewind, O. A synonymous mutation in Yersinia enterocolitica yopE affects the function of the YopE type III secretion signal. *J Bacteriol* 187, 707-715, doi:10.1128/JB.187.2.707-715.2005 (2005).

24 Wolke, S., Ackermann, N. & Heesemann, J. The Yersinia enterocolitica type 3 secretion system (T3SS) as toolbox for studying the cell biological effects of bacterial Rho GTPase modulating T3SS effector proteins. *Cell Microbiol* 13, 1339-1357, doi:10.1111/j.1462-5822.2011.01623.x (2011).

25 Forsberg, A. & Wolf-Watz, H. Genetic analysis of the yopE region of Yersinia spp.: identification of a novel conserved locus, yerA, regulating yopE expression. *J Bacteriol* 172, 1547-1555 (1990).

26 Sambrook, J. (ed David W. Russell) (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. , 2001).

27 Alto, N. M. & Dixon, J. E. Analysis of Rho-GTPase mimicry by a family of bacterial type III effector proteins. *Methods Enzymol* 439, 131-143, doi:S0076-6879(07)00410-7 [pii]10.1016/S0076-6879(07)00410-7 (2008).

28 Alto, N. M. y otros Identification of a bacterial type III effector family with G protein mimicry functions. *Cell* 124, 133-145, doi:S0092-8674(05)01229-8 [pii]10.1016/j.cell.2005.10.031 (2006).

29 Kaniga, K., Delor, I. & Cornelis, G. R. A wide-host-range suicide vector for improving reverse genetics in gram-negative bacteria: inactivation of the blaA gene of Yersinia enterocolitica. *Gene* 109, 137-141, doi:0378-1119(91)90599-7 [pii] (1991).

30 Yoneda, Y. y otros A long synthetic peptide containing a nuclear localization signal and its flanking sequences of SV40 T-antigen directs the transport of IgM into the nucleus efficiently. *Exp Cell Res* 201, 313-320 (1992).

31 Metcalf, W. W., Jiang, W. & Wanner, B. L. Use of the rep technique for allele replacement to construct new Escherichia coli hosts for maintenance of R6K gamma origin plasmids at different copy numbers. *Gene* 138, 1-7 (1994).

32 Diepold, A. y otros Deciphering the assembly of the Yersinia type III secretion injectisome. *Embo J* 29, 1928-1940, doi:emboj201084 [pii]10.1038/emboj.2010.84 (2010).

33 Iriarte, M., Stainier, I. & Cornelis, G. R. The rpoS gene from Yersinia enterocolitica and its influence on expression of virulence factors. *Infect Immun* 63, 1840-1847 (1995).

34 Cornelis, G., Vanootegem, J. C. & Sluiters, C. Transcription of the yop regulon from Y. enterocolitica requires trans acting pYV and chromosomal genes. *Microb Pathog* 2, 367-379, doi:0882-4010(87)90078-7 [pii] (1987).

35 Grosdent, N., Maridonneau-Parini, I., Sory, M. P. & Cornelis, G. R. Role of Yops and adhesins in resistance of Yersinia enterocolitica to phagocytosis. *Infect Immun* 70, 4165-4176 (2002).

36 Boyd, A. P., Lambermont, I. & Cornelis, G. R. Competition between the Yops of Yersinia enterocolitica for delivery into eukaryotic cells: role of the SycE chaperone binding domain of YopE. *J Bacteriol* 182, 4811-4821 (2000).

37 Iriarte, M. & Cornelis, G. R. YopT, a new Yersinia Yop effector protein, affects the cytoskeleton of host cells. *Mol Microbiol* 29, 915-929 (1998).

38 Kudryashev, M. y otros In situ structural analysis of the Yersinia enterocolitica injectisome. *Elife* 2, e00792, doi:10.7554/eLife.0079200792 [pii] (2013).

39 Schulte, R. y otros Yersinia enterocolitica invasin protein triggers IL-8 production in epithelial cells via activation of Rel p65-p65 homodimers. *FASEB J* 14, 1471-1484 (2000).

40 Mota, L. J., Journet, L., Sorg, I., Agrain, C. & Cornelis, G. R. Bacterial injectisomes: needle length does matter. *Science* 307, 1278, doi:307/5713/1278 [pii]10.1126/science.1107679 (2005).

41 Carrington, J. C. & Dougherty, W. G. A viral cleavage site cassette: identification of amino acid sequences required for tobacco etch virus polyprotein processing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 3391-3395 (1988).

42 Kapust, R. B., Tozser, J., Copeland, T. D. & Waugh, D. S. The P1' specificity of tobacco etch virus protease. *Biochem Biophys Res Commun* 294, 949-955, doi:10.1016/S0006-291X(02)00574-0S0006-291X(02)00574-0 [pii] (2002).

43 Liang, H., Gao, H., Maynard, C. A. & Powell, W. A. Expression of a self-processing, pathogen resistance-enhancing gene construct in Arabidopsis. *Biotechnol Lett* 27, 435-442, doi:10.1007/s10529-005-1884-9 (2005).

44 Weber, W. y otros Macrolide-based transgene control in mammalian cells and mice. *Nat Biotechnol* 20, 901-907, doi:10.1038/nbt731nbt731 [pii] (2002).

45 Kapust, R. B. y otros Tobacco etch virus protease: mechanism of autolysis and rational design of stable mutants with wild-type catalytic proficiency. *Protein Eng* 14, 993-1000 (2001).

46 Lee, V. T., Anderson, D. M. & Schneewind, O. Targeting of Yersinia Yop proteins into the cytosol of HeLa cells: one-step translocation of YopE across bacterial and eukaryotic membranes is dependent on SycE chaperone. *Mol Microbiol* 28, 593-601 (1998).

47 Gray, D. C., Mahrus, S. & Wells, J. A. Activation of specific apoptotic caspases with an engineered small-molecule-activated protease. *Cell* 142, 637-646, doi:S0092-8674(10)00783-X [pii]10.1016/j.cell.2010.07.014 (2010).

48 Henrichs, T. y otros Target-directed proteolysis at the ribosome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 4246-4251, doi:102/12/4246 [pii]10.1073/pnas.0408520102 (2005).

49 Aepfelbacher, M., Trasak, C. & Ruckdeschel, K. Effector functions of pathogenic Yersinia species. *Thromb Haemost* 98, 521-529 (2007).

50 Trulzsch, K., Sporleder, T., Igwe, E. I., Russmann, H. & Heesemann, J. Contribution of the major secreted yops of Yersinia enterocolitica O:8 to pathogenicity in the mouse infection model. *Infect Immun* 72, 5227-5234, doi:10.1128/IAI.72.9.5227-5234.2004 (2004).

51 Bohme, K. y otros Concerted actions of a thermo-labile regulator and a unique intergenic RNA thermosensor control Yersinia virulence. *PLoS Pathog* 8, e1002518, doi:10.1371/journal.ppat.1002518 (2012).

52 Rohde, J. R., Luan, X. S., Rohde, H., Fox, J. M. & Minnich, S. A. The Yersinia enterocolitica pYV virulence plasmid contains multiple intrinsic DNA bends which melt at 37 degrees C. *J Bacteriol* 181, 4198-4204 (1999).

53 Curtiss, R., 3rd, Galan, J. E., Nakayama, K. & Kelly, S. M. Stabilization of recombinant avirulent vaccine strains in vivo. *Res Microbiol* 141, 797-805 (1990).

54 Spreng, S. & Viret, J. F. Plasmid maintenance systems suitable for GMO-based bacterial vaccines. *Vaccine* 23, 2060-2065, doi:10.1016/j.vaccine.2005.01.009 (2005).

55 Neyt, C., Iriarte, M., Thi, V. H. & Cornelis, G. R. Virulence and arsenic resistance in Yersiniae. *J Bacteriol* 179, 612-619 (1997).

56 Wu, J. & Chen, Z. J. Innate immune sensing and signaling of cytosolic nucleic acids. *Annu Rev Immunol* 32, 461-488, doi:10.1146/annurev-immunol-032713-120156 (2014).

57 Kranzusch, P. J. y otros Ancient Origin of cGAS-STING Reveals Mechanism of Universal 2',3' cGAMP Signaling. *Mol Cell* 59, 891-903, doi:10.1016/j.molcel.2015.07.022 (2015).

58 Commichau, F. M., Dickmanns, A., Gundlach, J., Ficner, R. & Stulke, J. A jack of all trades: the multiple roles of the unique essential second messenger cyclic di-AMP. *Mol Microbiol* 97, 189-204, doi:10.1111/mmi.13026 (2015).

59 Corrales, L. y otros Direct Activation of STING in the Tumor Microenvironment Leads to Potent and Systemic Tumor Regression and Immunity. *Cell Rep* 11, 1018-1030, doi:10.1016/j.celrep.2015.04.031 (2015).

60 De, N., Navarro, M. V., Raghavan, R. V. & Sondermann, H. Determinants for the activation and autoinhibition of the diguanylate cyclase response regulator WspR. *J Mol Biol* 393, 619-633, doi:10.1016/j.jmb.2009.08.030 (2009).

61 Witte, G., Hartung, S., Buttner, K. & Hopfner, K. P. Structural biochemistry of a bacterial checkpoint protein reveals diadenylate cyclase activity regulated by DNA recombination intermediates. *Mol Cell* 30, 167-178, doi:10.1016/j.molcel.2008.02.020 (2008).

62 Panne, D., McWhirter, S. M., Maniatis, T. & Harrison, S. C. Interferon regulatory factor 3 is regulated by a dual phosphorylation-dependent switch. *J Biol Chem* 282, 22816-22822, doi:10.1074/jbc.M703019200 (2007).

63 Engel, C., G. Brugmann, S. Lambing, L.H. Muhlenbeck, S. Marx, C. Hagen, D. Horvath, M. Goldeck, J. Ludwig, A.M. Herzner, J.W. Drijfhout, D. Wenzel, C. Coch, T. Tuting, M. Schlee, V. Hornung, G. Hartmann, and J.G. Van den Boorn. 2017. RIG-I Resists Hypoxia-Induced Immunosuppression and Dedifferentiation. *Cancer Immunol Res*. 5:455-467.

64 Hou, F., L. Sun, H. Zheng, B. Skaug, Q.X. Jiang, and Z.J. Chen. 2011. MAVS forms functional prion-like aggregates to activate and propagate antiviral innate immune response. *Cell*. 146:448-461.

65 Kranzusch, P.J., A.S. Lee, J.M. Berger, and J.A. Doudna. 2013. Structure of human cGAS reveals a conserved family of second-messenger enzymes in innate immunity. *Cell Rep*. 3:1362-1368.

66 Seth, R.B., L. Sun, C.K. Ea, and Z.J. Chen. 2005. Identification and characterization of MAVS, a mitochondrial antiviral signaling protein that activates NF-kappaB and IRF 3. *Cell*. 122:669-682.

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 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).

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 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.

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 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 deleción 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.

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.

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.

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).

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*.

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.

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.

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 deleción 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 deleción 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.

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 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 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 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 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, 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 deleción 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 se 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.

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.

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.

RESUMEN

La presente invención se refiere a cepas bacterianas gramnegativas con virulencia atenuada recombinantes y su uso en un método para tratar el cáncer en un sujeto.

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference	**FOR FURTHER ACTION**	see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below.
P5239PC00		
International application No.	International filing date *(day/month/year)*	(Earliest) Priority Date *(day/month/year)*
PCT/EP2017/083853	20 December 2017 (20-12-2017)	20 December 2016 (20-12-2016)
Applicant		
UNIVERSITÄT BASEL		

This international search report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This international search report consists of a total of 8 sheets.

☐ It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1. **Basis of the report**
   a. With regard to the **language,** the international search was carried out on the basis of:
      ☒ the international application in the language in which it was filed
      ☐ a translation of the international application into _____, which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1(b))
   b. ☐ This international search report has been established taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43.6*bis*(a)).
   c. ☒ With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, see Box No. I.

2. ☐ **Certain claims were found unsearchable** (See Box No. II)

3. ☒ **Unity of invention is lacking** (see Box No III)

4. With regard to the **title,**
   ☒ the text is approved as submitted by the applicant
   ☐ the text has been established by this Authority to read as follows:

5. With regard to the **abstract,**
   ☒ the text is approved as submitted by the applicant
   ☐ the text has been established, according to Rule 38.2, by this Authority as it appears in Box No. IV. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority

6. With regard to the **drawings,**
   a. the figure of the **drawings** to be published with the abstract is Figure No. _____
      ☐ as suggested by the applicant
      ☐ as selected by this Authority, because the applicant failed to suggest a figure
      ☐ as selected by this Authority, because this figure better characterizes the invention
   b. ☒ none of the figures is to be published with the abstract

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP2017/083853

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:

   a. [X] forming part of the international application as filed:

      [X] in the form of an Annex C/ST.25 text file.

      [ ] on paper or in the form of an image file.

   b. [ ] furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.

   c. [ ] furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:

      [ ] in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).

      [ ] on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).

2. [ ] In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP2017/083853

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

1-14(completely); 29(partially)

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2017/083853

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C07K14/195 C12N15/70 C12N15/74 C07K14/52
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C07K C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 99/45098 A2 (BRUGGEN PIERRE B V D [BE]; CORNELIS GUY R [BE]; BOLAND ANNE M [BE]; BO) 10 September 1999 (1999-09-10) pages 6-7; figure 2; example 5	1,2,8, 14,29
X	M. CHAMEKH ET AL: "Delivery of Biologically Active Anti-Inflammatory Cytokines IL-10 and IL-1ra In Vivo by the Shigella Type III Secretion Apparatus", THE JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 180, no. 6, 15 March 2008 (2008-03-15), pages 4292-4298, XP055468047, US ISSN: 0022-1767, DOI: 10.4049/jimmunol.180.6.4292 abstract	1

-/--

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C.

[X] See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
18 April 2018	03/07/2018

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	van Heusden, Miranda

2

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	H. RUSSMANN ET AL: "Protection Against Murine Listeriosis by Oral Vaccination with Recombinant Salmonella Expressing Hybrid Yersinia Type III Proteins", THE JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 167, no. 1, 1 July 2001 (2001-07-01), pages 357-365, XP055362697, US ISSN: 0022-1767, DOI: 10.4049/jimmunol.167.1.357 abstract; figure 6	1
X	WO 2007/044406 A2 (LUDWIG INST CANCER RES [US]; OLD LLOYD J [US]; RITTER GERD [US]; NISHI) 19 April 2007 (2007-04-19) page 2, line 12 - page 6, line 32; figure 2	1
Y	WO 2015/177197 A1 (UNIV BASEL [CH]) 26 November 2015 (2015-11-26)	1
A	page 3, line 1 - line 10 page 28, line 17 - line 22 page 56, line 8 - line 30 page 19, line 8- - page 21, line 9	2-14,29
Y	WO 02/26819 A2 (ROGER WILLIAMS HOSPITAL [US]; BETH ISRAEL HOSPITAL [US]; CHUNG MAUREEN) 4 April 2002 (2002-04-04) page 3, lines 28-31; claims 1,6,10 page 19, lines 18-21	1
A	XIAN-YANG LI ET AL: "Tumor suppressor activity of RIG-I", MOLECULAR & CELLULAR ONCOLOGY, vol. 1, no. 4, 8 December 2014 (2014-12-08), page e968016, XP055366048, DOI: 10.4161/23723548.2014.968016 cited in the application abstract page 2, right-hand column, paragraph 3 - page 3, left-hand column, paragraph 2 page 4, right-hand column, paragraph 2	2,3

-/--

2

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KATJA BÖHME ET AL: "Concerted Actions of a Thermo-labile Regulator and a Unique Intergenic RNA Thermosensor Control Yersinia Virulence", PLOS PATHOGENS, vol. 8, no. 2, 16 February 2012 (2012-02-16), page e1002518, XP055365892, DOI: 10.1371/journal.ppat.1002518 cited in the application page 9, left-hand column, paragraph 3 - right-hand column, paragraph 2; figure 11	11-13
A	JIAXI WU ET AL: "Innate Immune Sensing and Signaling of Cytosolic Nucleic Acids", ANNUAL REVIEW OF IMMUNOLOGY., vol. 32, no. 1, 21 March 2014 (2014-03-21) , pages 461-488, XP055366371, US ISSN: 0732-0582, DOI: 10.1146/annurev-immunol-032713-120156 cited in the application page 462, paragraph 1-2 page 463, paragraph 4 - page 464, paragraph 1; figures 2,3	2,3
A	DE N ET AL: "Determinants for the Activation and Autoinhibition of the Diguanylate Cyclase Response Regulator WspR", JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY, ACADEMIC PRESS, UNITED KINGDOM, vol. 393, no. 3, 30 October 2009 (2009-10-30), pages 619-633, XP026676221, ISSN: 0022-2836, DOI: 10.1016/J.JMB.2009.08.030 [retrieved on 2009-08-18] cited in the application the whole document	2,3
A	LETICIA CORRALES ET AL: "Direct activation of STING in the tumor microenvironment with synthetic cyclic dinucleotide derivatives leads to potent and systemic tumor-specific immunity", JOURNAL FOR IMMUNOTHERAPY OF CANCER, BIOMED CENTRAL LTD, LONDON, UK, vol. 2, no. Suppl 3, 6 November 2014 (2014-11-06), page O10, XP021202342, ISSN: 2051-1426, DOI: 10.1186/2051-1426-2-S3-O10 cited in the application abstract	2,3

2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/EP2017/083853

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9945098 A2	10-09-1999	AU 2850199 A	20-09-1999
		CA 2322665 A1	10-09-1999
		CN 1304442 A	18-07-2001
		EP 1058723 A1	13-12-2000
		JP 2002508939 A	26-03-2002
		US 5965381 A	12-10-1999
		US 6602506 B1	05-08-2003
		WO 9945098 A2	10-09-1999
WO 2007044406 A2	19-04-2007	EP 1943344 A2	16-07-2008
		JP 2009510169 A	12-03-2009
		US 2009324651 A1	31-12-2009
		WO 2007044406 A2	19-04-2007
WO 2015177197 A1	26-11-2015	AU 2015261905 A1	01-12-2016
		BR 112016027196 A2	30-01-2018
		CA 2948570 A1	26-11-2015
		CN 107001431 A	01-08-2017
		EA 201692025 A1	31-05-2017
		EP 3145946 A1	29-03-2017
		JP 2017517257 A	29-06-2017
		KR 20170010803 A	01-02-2017
		SG 11201609629Y A	29-12-2016
		US 2017198297 A1	13-07-2017
		WO 2015177197 A1	26-11-2015
WO 0226819 A2	04-04-2002	AU 9483401 A	08-04-2002
		CA 2424004 A1	04-04-2002
		US 2002160502 A1	31-10-2002
		WO 0226819 A2	04-04-2002

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-14(completely); 29(partially)

A recombinant virulence attenuated Gram-negative bacterial strain which comprises a nucleotide molecule comprising a nucleotide sequence encoding a heterologous protein fused in frame to the 3' end of a nucleotide sequence encoding a delivery signal from a bacterial effector protein, wherein the nucleotide sequence encoding the delivery signal from a bacterial effector protein is operably linked to a promoter, and wherein the heterologous protein is a protein involved in induction or regulation of an interferon (IFN) response.

---

2. claims: 15-22(completely); 24-29(partially)

A recombinant virulence attenuated Gram-negative bacterial strain which comprises a nucleotide molecule comprising a nucleotide sequence encoding a heterologous protein fused in frame to the 3' end of a nucleotide sequence encoding a delivery signal from a bacterial effector protein, wherein the nucleotide sequence encoding the delivery signal from a bacterial effector protein is operably linked to a promoter, and wherein the recombinant virulence attenuated Gram-negative bacterial strain further comprises a deletion of a chromosomal gene coding for an endogenous protein essential for growth and an endogenous virulence plasmid which comprises a nucleotide sequence comprising a gene coding for said endogenous protein essential for growth operably linked to a promoter.

---

3. claims: 23(completely); 24-29(partially)

A recombinant virulence attenuated Gram-negative bacterial strain which comprises a nucleotide molecule comprising a nucleotide sequence encoding a heterologous protein fused in frame to the 3' end of a nucleotide sequence encoding a delivery signal from a bacterial effector protein, wherein the nucleotide sequence encoding the delivery signal from a bacterial effector protein is operably linked to a promoter, and wherein the recombinant virulence attenuated Gram-negative bacterial strain further comprises a modulation within a RNA thermosensor region upstream of a gene coding for an endogenous AraC-type DNA binding protein.

---

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau

(43) International Publication Date
28 June 2018 (28.06.2018)

WIPO | PCT

(10) International Publication Number
WO 2018/115140 A2

(51) International Patent Classification:
C07K 14/195 (2006.01) *C12N 15/74* (2006.01)
C12N 15/70 (2006.01) *C07K 14/52* (2006.01)

(21) International Application Number:
PCT/EP2017/083853

(22) International Filing Date:
20 December 2017 (20.12.2017)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
16205439.9 20 December 2016 (20.12.2016) EP

(71) Applicant: **UNIVERSITÄT BASEL** [CH/CH]; Petersgraben 35, 4001 Basel (CH).

(72) Inventors: **ITTIG, Simon**; Zehntenfreistrasse 32, 4103 Bottmingen (CH). **AMSTUTZ, Marlise**; Wittlingerstrasse 140, 4058 Basel (CH). **KASPER, Christoph**; Ruttigerweg 4, 4600 Olten (CH).

(74) Agent: **LATSCHA SCHÖLLHORN PARTNER AG**; Austrasse 24, 4051 Basel (CH).

(81) Designated States *(unless otherwise indicated, for every kind of national protection available)*: AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States *(unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available)*: ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), European (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Declarations under Rule 4.17:
— *as to applicant's entitlement to apply for and be granted a patent (Rule 4.17(ii))*

Published:
— *without international search report and to be republished upon receipt of that report (Rule 48.2(g))*
— *with sequence listing part of description (Rule 5.2(a))*

(54) Title: VIRULENCE ATTENUATED BACTERIA BASED PROTEIN DELIVERY

(57) Abstract: The present invention relates to recombinant virulence attenuated Gram-negative bacterial strains and its use in a method of treating cancer in a subject.

WO 2018/115140 A2

PATENT COOPERATION TREATY

From the
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

To:

see form PCT/ISA/220

PCT

WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

(PCT Rule 43*bis*.1)

Date of mailing
(day/month/year) see form PCT/ISA/210 (second sheet)

Applicant's or agent's file reference
see form PCT/ISA/220

FOR FURTHER ACTION
See paragraph 2 below

International application No.	International filing date *(day/month/year)*	Priority date *(day/month/year)*
PCT/EP2017/083853	20.12.2017	20.12.2016

International Patent Classification (IPC) or both national classification and IPC
INV. C07K14/195 C12N15/70 C12N15/74 C07K14/52

Applicant
UNIVERSITÄT BASEL

1. This opinion contains indications relating to the following items:

- ☒ Box No. I Basis of the opinion
- ☐ Box No. II Priority
- ☒ Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- ☒ Box No. IV Lack of unity of invention
- ☒ Box No. V Reasoned statement under Rule 43*bis*.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step and industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- ☐ Box No. VI Certain documents cited
- ☐ Box No. VII Certain defects in the international application
- ☒ Box No. VIII Certain observations on the international application

2. **FURTHER ACTION**

If a demand for international preliminary examination is made, this opinion will usually be considered to be a written opinion of the International Preliminary Examining Authority ("IPEA") except that this does not apply where the applicant chooses an Authority other than this one to be the IPEA and the chosen IPEA has notifed the International Bureau under Rule 66.1*bis*(b) that written opinions of this International Searching Authority will not be so considered.

If this opinion is, as provided above, considered to be a written opinion of the IPEA, the applicant is invited to submit to the IPEA a written reply together, where appropriate, with amendments, before the expiration of 3 months from the date of mailing of Form PCT/ISA/220 or before the expiration of 22 months from the priority date, whichever expires later.

For further options, see Form PCT/ISA/220.

Name and mailing address of the ISA:	Date of completion of this opinion	Authorized Officer
European Patent Office D-80298 Munich Tel. +49 89 2399 - 0 Fax: +49 89 2399 - 4465	see form PCT/ISA/210	Telephone No. +49 89 2399-0

Box No. I Basis of the opinion

1. With regard to the **language**, this opinion has been established on the basis of:

   ☒ the international application in the language in which it was filed.

   ☐ a translation of the international application into , which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1 (b)).

2. ☐ This opinion has been established taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43*bis*.1(a))

3. ☒ With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, this opinion has been established on the basis of a sequence listing:

   a. ☒ forming part of the international application as filed:

      ☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.

      ☐ on paper or in the form of an image file.

   b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.

   c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:

      ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).

      ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).

4. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

5. Additional comments:

Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

The questions whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step (to be non obvious), or to be industrially applicable have not been examined in respect of

☐ the entire international application

☒ claims Nos. 15-28(completely); 29(partially)

because:

☐ the said international application, or the said claims Nos. relate to the following subject matter which does not require an international search *(specify)*:

☐ the description, claims or drawings *(indicate particular elements below)* or said claims Nos. are so unclear that no meaningful opinion could be formed *(specify)*:

☐ the claims, or said claims Nos. are so inadequately supported by the description that no meaningful opinion could be formed *(specify)*:

☒ no international search report has been established for the whole application or for said claims Nos. 15-28(completely); 29(partially)

☐ a meaningful opinion could not be formed without the sequence listing; the applicant did not, within the prescribed time limit:

- ☐ furnish a sequence listing in the form of an Annex C/ST.25 text file, and such listing was not available to the International Searching Authority in the form and manner acceptable to it; or the sequence listing furnished did not comply with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions.
- ☐ furnish a sequence listing on paper or in the form of an image file complying with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions, and such listing was not available to the International Searching Authority in the form and manner acceptable to it; or the sequence listing furnished did not comply with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions.
- ☐ pay the required late furnishing fee for the furnishing of a sequence listing in response to an invitation under Rule 13*ter*.1(a) or (b).

☐ See Supplemental Box for further details

Box No. IV Lack of unity of invention

1. ☒ In response to the invitation (Form PCT/ISA/206) to pay additional fees, the applicant has, within the applicable time limit:

   ☐ paid additional fees

   ☐ paid additional fees under protest and, where applicable, the protest fee

   ☐ paid additional fees under protest but the applicable protest fee was not paid

   ☒ not paid additional fees

2. ☐ This Authority found that the requirement of unity of invention is not complied with and chose not to invite the applicant to pay additional fees.

3. This Authority considers that the requirement of unity of invention in accordance with Rule 13.1, 13.2 and 13.3 is

   ☐ complied with

   ☒ not complied with for the following reasons:

   see separate sheet

4. Consequently, this report has been established in respect of the following parts of the international application:

   ☐ all parts.

   ☒ the parts relating to claims Nos. 1-14(completely); 29(partially)

Box No. V Reasoned statement under Rule 43*bis*.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Yes:	Claims	3-7, 9-13
	No:	Claims	1, 2, 8, 14(completely); 29(partially)
Inventive step (IS)	Yes:	Claims	3-7, 9-13
	No:	Claims	1, 2, 8, 14(completely); 29(partially)
Industrial applicability (IA)	Yes:	Claims	1-14(completely); 29(partially)
	No:	Claims	

2. Citations and explanations

   see separate sheet

Box No. VIII Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

see separate sheet

1 **Re Item IV**

Unity of invention

The following three groups of alleged inventions do not meet the requirement of unity of invention according to Art. 3(4)(iii) and Rule 13 PCT:

1. claims: 1-14 (completely); 29 (partially)

   A recombinant virulence attenuated Gram-negative bacterial strain which comprises a nucleotide molecule comprising a nucleotide sequence encoding a heterologous protein fused in frame to the 3' end of a nucleotide sequence encoding a delivery signal from a bacterial effector protein, wherein the nucleotide sequence encoding the delivery signal from a bacterial effector protein is operably linked to a promoter, and wherein the heterologous protein is a protein involved in induction or regulation of an interferon (IFN) response.

2. claims: 15-22 (completely); 24-29 (partially)

   A recombinant virulence attenuated Gram-negative bacterial strain which comprises a nucleotide molecule comprising a nucleotide sequence encoding a heterologous protein fused in frame to the 3' end of a nucleotide sequence encoding a delivery signal from a bacterial effector protein, wherein the nucleotide sequence encoding the delivery signal from a bacterial effector protein is operably linked to a promoter, and wherein the recombinant virulence attenuated Gram-negative bacterial strain further comprises a deletion of a chromosomal gene coding for an endogenous protein essential for growth and an endogenous virulence plasmid which comprises a nucleotide sequence comprising a gene coding for said endogenous protein essential for growth operably linked to a promoter.

3. claims: 23 (completely); 24-29 (partially)

   A recombinant virulence attenuated Gram-negative bacterial strain which comprises a nucleotide molecule comprising a nucleotide sequence encoding a heterologous protein fused in frame to the 3' end of a nucleotide sequence encoding a delivery signal from a bacterial effector protein, wherein the nucleotide

sequence encoding the delivery signal from a bacterial effector protein is operably linked to a promoter, and wherein the recombinant virulence attenuated Gram-negative bacterial strain further comprises a modulation within a RNA thermosensor region upstream of a gene coding for an endogenous AraC-type DNA binding protein.

The common technical concept among the three groups of alleged inventions as defined above is the provision of a recombinant virulence attenuated Gram-negative bacterial strain which comprises a nucleotide molecule comprising a nucleotide sequence encoding a heterologous protein fused in frame to the 3' end of a nucleotide sequence encoding a delivery signal from a bacterial effector protein, wherein the nucleotide sequence encoding the delivery signal from a bacterial effector protein is operably linked to a promoter.
This concept is not novel in view of document D5 (WO 2015/177197), which discloses a recombinant virulence attenuated (e.g. deletion of siderophore yopH,O,P,E,M,T on p. 28, l. 17-22) Yersinia strain wherein a heterologous protein (e.g. a protein involved in apoptosis etc.) is fused in frame to the 3' end of the delivery signal of the T3SS effector protein and operably linked to a promoter (p. 3, l. 1-10 and p. 56, l. 8-30).
Therefore the three groups of inventions are not linked by a common novel technical feature, contrary to Rule 13 PCT.

2 **Re Item V**

Reasoned statement with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

2.1 Reference is made to the following documents:

D1 WO 99/45098 A2 (BRUGGEN PIERRE B V D [BE]; CORNELIS GUY R [BE]; BOLAND ANNE M [BE]; BO) 10 September 1999

D2 M. CHAMEKH ET AL: "Delivery of Biologically Active Anti-Inflammatory Cytokines IL-10 and IL-1ra In Vivo by the Shigella Type III Secretion Apparatus", THE JOURNAL OF IMMUNOLOGY,
vol. 180, no. 6, 15 March 2008, pages 4292-4298, XP055468047

D3 H. RUSSMANN ET AL: "Protection Against Murine Listeriosis by Oral Vaccination with Recombinant Salmonella Expressing Hybrid Yersinia Type III Proteins", THE JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 167, no. 1, 1 July 2001, pages 357-365, XP055362697

D4 WO 2007/044406 A2 (LUDWIG INST CANCER RES [US]; OLD LLOYD J [US]; RITTER GERD [US]; NISHI) 19 April 2007

D5 WO 2015/177197 A1 (UNIV BASEL [CH]) 26 November 2015

D6 WO 02/26819 A2 (ROGER WILLIAMS HOSPITAL [US]; BETH ISRAEL HOSPITAL [US]; CHUNG MAUREEN) 4 April 2002

D7 XIAN-YANG LI ET AL: "Tumor suppressor activity of RIG-I", MOLECULAR & CELLULAR ONCOLOGY, vol. 1, no. 4, 8 December 2014, page e968016, XP055366048

2.2 Novelty (Art. 33(2) PCT)

2.2.1 Document D1 (WO 99/45098) discloses a recombinant Yersinia (enterocolitica) system for the delivery of a heterologous protein (e.g. tumor associated protein MAGE), by fusion to the YopE delivery signal. The strain is defective in functional effector proteins (see p. 6, l. 20-24). The expressed peptide is shown to be capable of inducing an IFN-γ response (see example 5), falling under the broad scope of claim 1 (see below under Item VIII). Therefore D1 anticipates claims 1, 5, 8, 14 and 29.

2.2.2 Document D2 (Chameck et al., 2008) discloses the delivery of IL-10 in vivo by using the Gram-negative Shigella expressing the cytokine as fusion protein with the YopE delivery signal (first 50 residues) (see abstract). IL-10 is known to regulate IFN-γ synthesis. Therefore D2 anticipates claim 1. D2 also suggests the use of this system for delivery of proteins for immunomodulation purposes (and of abstract).

2.2.3 Document D3 (Rüssmann et al., 2001) discloses Listeria vaccination with recombinant attenuated Salmonella expressing the heterologous Listeria (large) antigen as a fusion to Yersinia YopE delivery signal. The expressed protein is able to induce an IFN-γ response (see Fig. 6). Therefore D3 anticipates claim 1.

2.2.4 Document D4 (WO 2007/044406) discloses the use of the Salmonella delivery system for delivery of a cancer antigen (see p. 6, l. 16-23), using the type III secretion system (fusion of antigen to SopE secretion signal), the expressed protein being capable of inducing an IFN-γ response (Fig. 2). Therefore D4 anticipates the subject matter of claim 1.

2.3 **Inventive step (Art. 33(3) PCT)**

2.3.1 Document D6 (WO 02/26819) relates to the treatment of cancer by introducing an attenuated Mycobacterium secreting a Th1 cytokine, such as IFN-γ (involved in an interferon response) and a tumor antigen. Claim 1 differs from D5 in that a Gram-negative bacterial strain is used, with a delivery signal from a bacterial effector protein. Therefore the problem can be defined as the provision of a further approach to administer the cytokine. The solution is the use of the gram-negative bacterial strain and the fusion of the protein to a bacterial delivery signal. Such a delivery system is well known in the art, as disclosed in e.g. D4 or D5. Therefore claim 1 does not involve inventive step.

2.4 For the subject matter of claims 2 and 3, document D7 (Li et al., 2014) could be seen as closest prior art. Claims 2 and 3 relate to the specific heterologous proteins as listed, which induce the type I IFN response, which is know to be important in cancer treatment. D7 also relates to cancer and discloses the role of RIG-I (listed in claims 2 and 3) as tumor suppressor, by inducing Type I IFN-b synthesis (see abstract). The subject matter of claim 2 differs from D7 in that the RIG-I is to be delivered by the Gram-negative bacterial delivery system, as fusion protein to a delivery signal from a bacterial effector protein. As indicated above, such a delivery system is well known in the art, as disclosed in e.g. D4 or D5. Therefore the skilled person could have tried said method of delivery of the RIG-I protein for cancer treatment. However, the skilled person would not have had a reasonable expectation that said system would allow for sufficient expression of active and properly folded proteins. The application shows (p. 130, l. 24) that the bacterially delivered RIG-I or cGAS is properly folded, can multimerize and can induce IFN-β production. Furthermore it provides for a pronounced tumor regression in vivo in mice (p. 131-132). This is surprising and confers inventive step. See, however, below under Item VIII.

2.5 Claims 4-14 and 29 are considered inventive insofar as they are dependent on claims 2 and 3.

Re Item VIII

3 **Certain observations on the international application Art. 6 PCT**

3.1 The wording "a protein involved in induction or regulation of an interferon response" in claim 1 is completely open to interpretation and not suitable to define clearly the scope of the claim. The wording "involved in" can be interpreted as directly or indirectly, regulation can be up or down, an interferon response can be any response (directly or indirectly via multiple intermediate steps) downstream from IFN, the response can be of any type of interferon. The wording encompasses any protein which can induce e.g. a gamma interferon response.
This wording in claim 1 does not comply with Art. 6 PCT.

3.2 The wording "delivery signal from a bacterial effector protein" is also open to interpretation. In addition the application provides support only for the expression of heterologous proteins (inducing an IFN response) via fusion to an T3SS effector. The examples show (on p. 130, second paragraph) that the transport of the heterologous protein is strictly dependent on the T3SS system. Upon deletion of one of the T3SS pore proteins (YopB) the system does not work anymore (no IFN response is induced). Therefore this is an essential feature and should be defined in the independent claim. All examples relate to the fusion of the heterologous protein to the N-terminal YopE sequence. The application does not provide any support for any other "delivery signal from a (any!) bacterial effector protein". The application concludes in the examples that it is surprising that the fusion of a heterologous protein (including large proteins such as several tBID BH3 domains or several RIG1 CARD domains) to the N-terminal 1-138 nucleotide long signal encoding sequence of YopE results in proper expression and folding of the heterologous proteins which retain their activity and ability to dimerize/multimerize and to induce type I IFN production. If this result is considered surprising, then it is not reasonable to expect that the fusion of any heterologous protein (inducing an IFN response) to any sequence of any "delivery signal" of any effector protein of any bacterium will have the same result.
In this context it is also noted that D3 discloses that not every delivery signal is capable of secretion and translocation of large proteins (see p. 363, right hand column, l. 32-38). Furthermore this document discloses that the

presence of SycE is essential for YopE-guided translocation (see p. 363, right hand column, l. 45-59), a further essential feature that is missing from the claims.

3.3 The wording "AraC-type DNA binding protein", in claims 11 and 12, lacks clarity in that it is not clear which proteins are covered by said functional definition and therefore it does not define clearly the scope of the claim.