

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 531 967**

51 Int. Cl.:

A61K 39/00 (2006.01)

A61K 39/02 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

C07K 14/47 (2006.01)

C07K 19/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.05.2008 E 08754370 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.12.2014 EP 2155243**

54 Título: **Composiciones y métodos que comprenden el antígeno KLK3, PSCA o FOLH1**

30 Prioridad:

10.05.2007 US 798177

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

23.03.2015

73 Titular/es:

**THE TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF PENNSYLVANIA (50.0%)
3160 Chestnut Street, Suite 200
Philadelphia, PA 19104-6283, US y
ADVAXIS, INC. (50.0%)**

72 Inventor/es:

**PATERSON, YVONNE;
ROTHMAN, JOHN y
SHAHABI, VAFA**

74 Agente/Representante:

CAMPELLO ESTEBARANZ, Reyes

ES 2 531 967 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Composiciones y métodos que comprenden el antígeno KLK3, PSCA o FOLH1.

5 CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención proporciona péptidos KLK3 recombinantes, moléculas nucleotídicas recombinantes que codifican los mismos, cepas recombinantes de *Listeria* que comprenden los mismos, y usos inmunogénicos y terapéuticos de los mismos.

10

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La estimulación de una respuesta inmune depende de la presencia de antígenos reconocidos como extraños por el sistema inmune huésped. Los antígenos bacterianos, tales como *Salmonella enterica* y *Mycobacterium bovis* BCG, permanecen en el fagosoma y estimulan los linfocitos T CD4⁺ mediante la presentación antigénica a través de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II. En contraste, los antígenos bacterianos, tales como *Listeria monocytogenes*, salen del fagosoma hacia el citoplasma. El escape fagolisosomal de *L. monocytogenes* es un mecanismo único que facilita una presentación antigénica del complejo mayor de histocompatibilidad de clase I de antígenos listerianos. Este escape depende de la citolisina activada por sulfhidrilo formadora de poros, listeriolisina O (LLO).

ActA es una proteína listeriana asociada a la superficie, y actúa como una estructura en las células huésped infectadas para facilitar la polimerización, el montaje y la activación de polímeros de actina huésped para propulsar el organismo de *Listeria* a través del citoplasma. Poco después de la entrada en el citosol de la célula mamífera, *L. monocytogenes* induce la polimerización de los filamentos de actina huésped y usa la fuerza generada por la polimerización de la actina para desplazarse, primero intracelularmente y después de célula a célula. Una única proteína bacteriana, ActA, es responsable de mediar la nucleación de la actina y la movilidad basada en actina. La proteína ActA proporciona múltiples sitios de unión para los componentes citoesqueléticos huésped, actuando de este modo como una estructura para montar la maquinaria de polimerización de la actina celular. El extremo NH₂ de ActA se une a la actina monomérica y actúa como un factor promotor de la nucleación constitutivamente activa estimulando la actividad de nucleación de la actina intrínseca. Tanto ActA como hly son miembros del grupo génico de 10 kb regulado por el activador transcripcional PrfA, y se regula al alza aproximadamente 226 veces en el citosol mamífero.

El cáncer de próstata es el tipo más frecuente de cáncer en los hombres Americanos y es la segunda causa más importante de muerte relacionada con cáncer en esta población. El antígeno prostático específico (PSA, *Prostate Specific Antigen*) es un marcador para el cáncer de próstata que se expresa altamente por los tumores prostáticos. Existe la necesidad desde hace tiempo de desarrollar composiciones y métodos para potenciar la inmunogenicidad de los antígenos, especialmente antígenos útiles en la prevención y el tratamiento de tumores y patógenos intracelulares.

RESUMEN DE LA INVENCION

La presente invención proporciona una cepa recombinante de *Listeria* que expresa un péptido de fusión de un péptido peptidasa relacionada con la calicreína 3 (KLK3) que está unido de forma operativa a un péptido listeriolisina (LLO) N-terminal no hemolítico, comprendiendo dicho péptido de fusión la secuencia de SEQ ID NO: 54 o una secuencia homóloga al menos al 99% a la misma, en la que dicho péptido LLO N-terminal mejora la inmunogenicidad del péptido de fusión, y en la que el péptido KLK3 no contiene una secuencia de señal. En una realización, la cepa recombinante de *Listeria* se pasa a través de un huésped animal.

50

La cepa recombinante de *Listeria* puede ser una cepa auxótrofa de *Listeria* o una cepa recombinante de *Listeria monocytogenes*. La cepa auxótrofa de *Listeria* puede ser un mutante dal/dat o puede comprender adicionalmente una delección en el gen endógeno ActA. La cepa auxótrofa de *Listeria* puede comprender un vector de expresión episomal que comprende una enzima metabólica que complementa la auxotrofia de la cepa auxótrofa de *Listeria*, y la enzima metabólica puede ser una enzima alanina racemasa o una enzima D-aminoácido transferasa.

55

La presente invención también proporciona un polipéptido recombinante que comprende un péptido de fusión de un péptido KLK3 que está unido de forma operativa a un péptido LLO N-terminal, en el que dicho polipéptido recombinante comprende la secuencia de SEQ ID NO: 54 o una secuencia homóloga al menos al 99% a la misma, en el que dicho péptido LLO N-terminal potencia la inmunogenicidad del péptido de fusión, y en el que el péptido KLK3 no contiene una secuencia de señal. La invención también proporciona una molécula nucleotídica que codifica

60

el polipéptido recombinante, y un vector de vacuna recombinante que codifica el polipéptido recombinante o que comprende la molécula nucleotídica que codifica el polipéptido recombinante.

La presente invención también proporciona una vacuna que comprende la cepa recombinante de *Listeria*, el polipéptido recombinante o la molécula nucleotídica que codifica el polipéptido recombinante, y un adyuvante.

La invención proporciona la cepa recombinante de *Listeria*, o una composición inmunogénica que comprende el polipéptido recombinante, o el nucleótido recombinante, para su uso como un medicamento.

10 La invención proporciona adicionalmente la cepa recombinante de *Listeria*, o una composición inmunogénica que comprende el polipéptido recombinante o el nucleótido recombinante, para su uso en la inducción de una respuesta inmune anti-KLK3 en un sujeto.

La invención también proporciona la cepa recombinante de *Listeria*, el polipéptido recombinante, o el nucleótido recombinante, para su uso en el tratamiento, inhibición o supresión de un cáncer de próstata que expresa la proteína peptidasa relacionada con la calcireina 3 (KLK3) en un sujeto, por lo que el sujeto acumula una respuesta inmune frente al cáncer de próstata que expresa la proteína KLK3.

El polipéptido recombinante puede hacerse mediante un proceso que comprende la etapa de conjugar químicamente un polipéptido que comprende el péptido KLK3 con un polipéptido que comprende el péptido LLO N-terminal.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

25 Figura 1. Lm-E7 y Lm-LLO-E7 usan diferentes sistemas de expresión para expresar y secretar E7. Lm-E7 se generó introduciendo un cassette de gen en el dominio orfZ del genoma de *L. monocytogenes* (A). El promotor *hly* impulsa la expresión de la secuencia de señal *hly* y los primeros cinco aminoácidos (AA) de LLO seguido de HPV-16 E7. B), Lm-LLO-E7 se generó transformando la cepa *prfA*⁻ XFL-7 con el plásmido pGG-55. pGG-55 tiene el promotor *hly* que impulsa la expresión de una fusión no hemolítica de LLO-E7. pGG-55 también contiene el gen *prfA* para seleccionar la retención del plásmido por XFL-7 *in vivo*.

30 Figura 2. Lm-E7 y Lm-LLO-E7 secretan E7. Lm-Gag (carril 1), Lm-E7 (carril 2), Lm-LLO-NP (carril 3), Lm-LLO-E7 (carril 4), XFL-7 (carril 5) y 10403S (carril 6) se dejaron crecer durante una noche a 37 °C en caldo Luria-Bertoni. Se granularon números equivalentes de bacterias, como se determinó por DO a 600 nm de absorbancia, y 18 ml de cada sobrenadante se precipitaron con TCA. La expresión de E7 se analizó por transferencia de Western. La transferencia se sondeó con un mAb anti-E7 seguido de anti-ratón conjugado con HRP (Amersham), y después se desarrolló usando reactivos de detección ECL.

35 Figura 3. A. Eficacia inmunoterapéutica tumoral de fusiones LLO-E7. El tamaño del tumor en milímetros en ratones se muestra en 7, 14, 21, 28 y 56 días después de la inoculación del tumor. Ratones sin tratar: triángulos blancos; Lm-LLO-E7: círculos negros; Lm-E7: rombos negros; Lm-Gag: X; y Lm-LLO-NP: símbolo +. B. Eficacia inmunoterapéutica tumoral de fusiones LLO-Ova.

40 Figura 4. Los esplenocitos de ratones inmunizados con Lm-LLO-E7 proliferan cuando se exponen a células TC-1. Los ratones C57BL/6 se inmunizaron y se reforzaron con cepas Lm-LLO-E7, Lm-E7 o rLm de control. Los esplenocitos se recuperaron 6 días después del refuerzo y se pusieron en placas con células TC-1 irradiadas en las proporcionadas mostradas. Las células se pulsaron con ³H timidina y se recuperaron. Cpm se define como (cpm experimental) - (control no TC-1).

45 Figura 5. Eficacia inmunoterapéutica tumoral del antígeno NP expresada en LM. El tamaño del tumor en milímetros en ratones se muestra en 10, 17, 24 y 38 días después de la inoculación del tumor. Ratones sin tratar: X; ratones a los que se les administró Lm-LLO-NP: rombos negros; Lm-NP: cuadrados; Lm-Gag: círculos negros.

50 Figura 6. Representación de constructos de virus vaccinia que expresan diferentes formas de proteína E7 de HPV16.

Figura 7. VacLLOE7 provoca una regresión a largo plazo de tumores establecidos de 2 x 10⁵ células TC-1 inyectadas s.c. en ratones C57BL/6. A los ratones se les inyectó 11 y 18 días después de la estimulación tumoral 10⁷ UFP de VacLLOE7, VacSigE7LAMP-1 o VacE7/ratón i.p. o se dejaron sin tratar (sin tratamiento previo). Se usaron ocho ratones por grupo de tratamiento, y se muestra la sección transversal de cada tumor (promedio de dos mediciones) para los días indicados después de la inoculación del tumor.

55 Figura 8. A. Representación esquemática de los insertos plasmídicos usados para crear 4 vacunas de LM. El inserto Lm-LLO-E7 contiene cada uno de los genes de *Listeria* usados. Contiene el promotor *hly*, las primeras 1,3 kb del gen *hly* (que codifica la proteína LLO), y el gen E7 de HPV-16. Las primeras 1,3 kb de *hly* incluyen la secuencia de señal (ss) y la región PEST. Lm-PEST-E7 incluye el promotor *hly*, la secuencia de señal, y las secuencias PEST y E7, pero excluye el resto del gen LLO truncado. Lm-ΔPEST-E7 excluye

la región PEST, pero contiene el promotor *hly*, la secuencia de señal, E7, y el resto del gen LLO truncado. Lm-E7epi tiene únicamente el promotor *hly*, la secuencia de señal y E7. B. Representación esquemática del sistema de expresión pActA-E7 usado para expresar y secretar E7 de bacterias recombinantes de *Listeria*. El promotor *hly* (pHLY) impulsa la expresión, el gen *prfA* se usa para seleccionar la retención del plásmido por *Listeria* recombinante *in vivo*. C. Panel superior: Los constructos de *Listeria* que contienen regiones PEST inducen regresión tumoral. Triángulos negros: ratones sin tratar; círculos: Lm-LLO-E7; cuadrados: Lm-E7epi; símbolo +: Lm- Δ PEST-E7; triángulos blancos: Lm-PEST-E7. D. Tamaños tumorales medios el día 28 después de la estimulación del tumor en dos experimentos separados. E. Los constructos de *Listeria* que contienen regiones PEST inducen un mayor porcentaje de linfocitos E7-específicos en el bazo. Se representan el promedio y ET de los datos de tres experimentos.

Figura 9. Tamaño del tumor en ratones a los que se les administró Lm-ActA-E7 (cuadrados blancos), Lm-E7 (círculos negros), Lm-LLO-E7 (X), y ratones sin tratar (no vacunados; triángulos blancos).

Figura 10. A. Inducción de linfocitos T CD8⁺ que secretan IFN-gamma específicos de E7 en los bazos y el número que penetra en los tumores, en ratones a los que se les administró células tumorales TC-1 y posteriormente se les administró Lm-E7, Lm-LLO-E7, Lm-ActA-E7 o ninguna vacuna (sin tratar). B. Inducción y penetración de células CD8⁺ específicas de E7 en los bazos y tumores de los ratones descritos para (A).

Figura 11. Los constructos de *Listeria* que contienen regiones PEST inducen un mayor porcentaje de linfocitos específicos de E7 en el tumor. A. Datos representativos de un experimento. B. Promedio y ET de datos de los tres experimentos.

Figura 12. **Mapa esquemático de pAdv34 en pGG55.** CAT(G-), cloranfenicol acetiltransferasa para *E. coli*; CAT(G+), cloranfenicol acetiltransferasa para *Lm*; Ori, región de replicación; *prfA*, factor A regulador de la patogenicidad de *Lm*; LLO-PSA, fusión entre el gen que codifica una listeriolisina O truncada en C-terminal, incluyendo su promotor, y el gen que codifica PSA humano.

Figura 13. **Expresión y secreción de la proteína de fusión LLO-PSA por Lm-LLO-PSA.** Las bacterias se dejaron crecer durante una noche y los sobrenadantes celulares se precipitaron en presencia de TCA al 10% a 4 °C. Las proteínas se separaron por SDS-PAGE y se eliminaron con anticuerpos anti-PSA (A) y anti-LLO (B). El control positivo de PSA fue un lisado de células Bsc1 infectado con PSA/vaccinia. La cepa bacteriana precursora XFL7 y dos cepas irrelevantes de *Lm* que expresan fragmentos del antígeno humano Her2/neu se usaron como controles negativos.

Figura 14. **Captación y crecimiento de Lm-LLO-PSA en macrófagos.** Las células tipo macrófagos murinos (J774A.1) se infectaron *in vitro* con MOI de 1:1 con Lm-LLO-PSA, la cepa precursora de *Lm* XFL7 o la cepa de *Lm* de tipo salvaje 10403s. El crecimiento intracelular se controló durante 8 horas tomando muestras por duplicado cada dos horas de las células seguido de valoración de las bacterias sobre placas BHI. UFC: Unidades Formadoras de Colonias.

Figura 15. **Regresión tumoral después de la inmunización con Lm-LLO-PSA.** Grupos de 8 ratones se inocularon s.c. con 5×10^6 células T-PSA23 el día 0 y se inmunizaron tres veces con intervalos de una semana, i.p. con Lm-LLO-PSA, Lm-LLO-E7 o no recibieron inmunización (sin tratar). Los tumores se controlaron semanalmente usando un calibre electrónico y se expresan como la media de dos diámetros perpendiculares. Los ratones se sacrificaron cuando los tumores alcanzaron un tamaño de 15-18 mm de diámetro. Los resultados se representan como tamaño tumoral de cada ratón individual. La tabla muestra el número de ratones en cada grupo que estaban libres de tumores (panel superior) o que sobrevivieron (panel inferior) con respecto al número total de ratones por grupo 1 semana o 7-8 semanas después de la inoculación del tumor. Este experimento se repitió tres veces mostrando resultados similares.

Figura 16. **Linfocitos T CD8⁺ PSA específicos en bazos y tumores.** Se implantaron células T-PSA23 s.c. como una mezcla con matrigel. Los ratones se inmunizaron dos veces con Lm-LLO-PSA o Lm-LLO-E7 o se dejaron sin tratar. Los bazos y los tumores se extrajeron 6 días después de la segunda inmunización y se ensayaron para comprobar la presencia de linfocitos T CD8⁺/tetrámero PSA positivo mediante un análisis FACS. Las inmunizaciones con Lm-LLO-PSA dieron como resultado la generación de linfocitos T CD8⁺ PSA específicos tanto en bazos (panel superior) como en tumores (panel inferior). Los números de cada esquina indican el % de células PSA positivas sobre el número total de linfocitos T CD8⁺ en cada tejido.

Figura 17. **Efecto de la vacunación con vacunas de Lm sobre la presencia de Tregs en bazos y tumores.** Los esplenocitos aislados y los TIL extraídos de 3 ratones portadores de tumor en el experimento anterior se agruparon y se tiñeron para CD4, CD25 y FoxP3 para concretar el efecto de la inmunización con Lm-LLO-PSA sobre la presencia de Tregs en estos tejidos. Cada columna presenta el % de población de linfocitos T CD25⁺/FoxP3⁺ en relación con los linfocitos CD4⁺ totales en cada grupo.

Figura 18. **Secreción de IFN- γ estimulada por la vacunación con Lm-LLO-PSA detectada por ensayo ELISpot.** Los ratones se inmunizaron tres veces con 0,1 DL₅₀ de Lm-LLO-PSA. Los esplenocitos aislados se prepararon y se incubaron durante una noche en presencia de un péptido H2D^b PSA específico 1 μ M, HCIRNKSVIL. La secreción de IFN- γ por células aisladas se detectó usando el kit ELISpot de Mabtech y se expresó como células formadoras de puntos (SFC)/millón de células. Se usaron esplenocitos de Lm-LLO-

WT1 inmunizado o ratones sin tratar como controles negativos (* indica la importancia estadística con los grupos sin tratar con $p < 0,0001$).

Figura 19. **Producción de IFN- γ estimulada por la vacuna con *Lm*-LLO-PSA detectada por tinción intracelular.** Los ratones se inmunizaron tres veces con 0,1 DL₅₀ de *Lm*-LLO-PSA. Los esplenocitos aislados se prepararon y se incubaron durante 5 horas en presencia de un péptido H2D^b PSA específico. La producción de IFN- γ por linfocitos T CD8⁺ activados se determinó como se describe en los métodos. Se usaron esplenocitos de *Lm*-LLO-WT1 inmunizado o ratones sin tratar como controles negativos.

Figura 20. **Respuestas citotóxicas específicas de PSA en ratones.** Los animales se inmunizaron tres veces con 0,1 DL₅₀ de *Lm*-LLO-PSA, *Lm*-LLO-HPV16E7E6 (como control negativo de *Lm*) o se dejaron sin tratar. Los esplenocitos aislados se prepararon y se incubaron con células estimuladoras de expresión de PSA durante 5 días. El ensayo CTL se realizó durante 4 horas incubando células efectoras (E) con células EL4 diana pulsadas con péptido H2D^b PSA: A) a una relación E:T diferente/concentración peptídica fija (1 μ M); o B) a una relación E:T fijada de 1:25 pero diferentes concentraciones peptídicas.

Figura 21. **Comparación de los efectos anti-tumorales de *Lm*-LLO-PSA con otras vacunas basadas en PSA.** Grupos de 8 ratones se inocularon s.c. con 5×10^6 células T-PSA23 el día 0 y se inmunizaron dos veces con intervalos de una semana, con *Lm*-LLO-PSA, vaccinia-PSA o pDNA (PSA+GM-CSF) o no recibieron inmunización (sin tratar). Los tumores se controlaron semanalmente usando un calibre electrónico y se expresan como la media de dos diámetros perpendiculares. Los ratones se sacrificaron cuando los tumores alcanzaron un tamaño de 20 mm de diámetro. Los resultados se representan como el tamaño tumoral de cada ratón individual (A). La tabla muestra el número de ratones en cada grupo que no tenían tumores o que sobrevivieron durante 8 semanas después de la inoculación del tumor. B) Promedio de los tamaños tumorales en cada grupo. Cuando los tumores alcanzaron un tamaño de 20 mm, los ratones se sacrificaron. Se les dio un valor de 20 mm para hacer la curva promedio. Este experimento se repitió dos veces mostrando resultados similares.

Figura 22. Estabilidad de *Lm*-PSA. *Lm*-PSA se dejó crecer y se pasó durante 7 días consecutivos *in vitro*. El ADN plasmídico se purificó a partir de muestras bacterianas tomadas cada día durante el crecimiento *in vitro* y se ensayó por amplificación del gen PSA por PCR (A) o mapeo de restricción EcoRI/HindIII del plásmido (B).

30 **DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN**

La presente invención proporciona péptidos de fusión KLK3-LLO, péptidos recombinantes que comprenden los mismos, moléculas nucleotídicas recombinantes que codifican los mismos, cepas recombinantes de *Listeria* que comprenden los mismos, y métodos inmunogénicos y terapéuticos que utilizan los mismos.

Específicamente, la presente invención proporciona una cepa recombinante de *Listeria* que expresa un péptido de fusión de un péptido peptidasa relacionada con la calicreína 3 (KLK3) que está unido de forma operativa a un péptido listeriolisina (LLO) N-terminal no hemolítico, comprendiendo dicho péptido de fusión la secuencia de SEQ ID NO: 54 o una secuencia homóloga al menos al 99% a la misma, en la que dicho péptido LLO N-terminal potencia la inmunogenicidad del péptido de fusión, y en la que el péptido KLK3 no contiene una secuencia de señal. En una realización, la cepa recombinante de *Listeria* puede haberse pasado a través de un huésped animal.

La cepa recombinante de *Listeria* puede ser una cepa auxótrofa de *Listeria* o una cepa recombinante de *Listeria monocytogenes*. La cepa auxótrofa de *Listeria* puede ser un mutante *dal/dat* o puede comprender adicionalmente una delección en el gen endógeno *ActA*. La cepa auxótrofa de *Listeria* puede comprender un vector de expresión episomal que comprende una enzima metabólica que complementa la auxotrofia de la cepa auxótrofa de *Listeria*, y la enzima metabólica puede ser una enzima alanina racemasa o una enzima D-aminoácido transferasa.

La presente invención también proporciona un polipéptido recombinante que comprende un péptido de fusión de un péptido KLK3 que está unido de forma operativa a un péptido LLO N-terminal, en el que dicho polipéptido recombinante comprende la secuencia de SEQ ID NO: 54 o una secuencia homóloga al menos al 99% a la misma, en el que dicho péptido LLO N-terminal potencia la inmunogenicidad del péptido de fusión, y en el que el péptido KLK3 no contiene una secuencia de señal. La invención también proporciona una molécula nucleotídica que codifica el polipéptido recombinante, y un vector de vacuna recombinante que codifica el polipéptido recombinante o que comprende la molécula nucleotídica que codifica el polipéptido recombinante.

La presente invención también proporciona una vacuna que comprende la cepa recombinante de *Listeria*, el polipéptido recombinante o la molécula nucleotídica que codifica el polipéptido recombinante, y un adyuvante.

La invención proporciona la cepa recombinante de *Listeria*, o una composición inmunogénica que comprende el polipéptido recombinante, o el nucleótido recombinante, para su uso como un medicamento.

La invención proporciona adicionalmente la cepa recombinante de *Listeria*, o una composición inmunogénica que comprende el polipéptido recombinante o el nucleótido recombinante, para su uso en la inducción de una respuesta inmune anti-KLK3 en un sujeto.

5

La invención también proporciona la cepa recombinante de *Listeria*, el polipéptido recombinante, o el nucleótido recombinante, para su uso en el tratamiento, inhibición o supresión de un cáncer de próstata que expresa la proteína peptidasa relacionada con la calicreína 3 (KLK3) en un sujeto, por lo que el sujeto acumula una respuesta inmune frente al cáncer de próstata que expresa la proteína KLK3.

10

El polipéptido recombinante puede hacerse mediante un proceso que comprende la etapa de conjugar químicamente un polipéptido que comprende el péptido KLK3 con un polipéptido que comprende el péptido LLO N-terminal.

15 En una realización, la presente invención proporciona una cepa recombinante de *Listeria* que expresa un péptido de fusión peptidasa relacionada con la calicreína 3 (KLK3)-LLO, comprendiendo dicho péptido de fusión la secuencia de SEQ ID NO: 54 o una secuencia homóloga al menos al 99% a la misma. En otra realización, la secuencia del péptido KLK3 en la proteína de fusión se selecciona entre las SEQ ID NOs: 25, 32, 34 y 39. En otra realización, la secuencia del péptido KLK3 comprende una secuencia seleccionada entre la SEQ ID No: 25, 32, 34 y 39. En otra
20 realización, el péptido KLK3 es un fragmento inmunogénico de un péptido KLK3 mayor, en el que la secuencia del péptido KLK3 mayor es una secuencia seleccionada entre SEQ ID No: 25, 32, 34 y 39. En otra realización, la secuencia del péptido KLK3 comprende un fragmento inmunogénico de una secuencia seleccionada entre SEQ ID No: 25, 32, 34 y 39.

25 El "péptido KLK3" está carente del péptido de señal KLK3. En otra realización, la expresión se refiere a una proteína KLK3 que contiene toda la secuencia KLK3 excepto el péptido señal KLK3. "Secuencia de señal KLK3" se refiere, en otra realización, a cualquier secuencia de señal que se encuentra en la naturaleza en una proteína KLK3. En otra realización, una proteína KLK3 de los métodos y composiciones de la presente invención no contiene ninguna secuencia de señal.

30

En una realización, "variante" se refiere a una secuencia aminoacídica o de ácidos nucleicos (o en otras realizaciones, un organismo o tejido) que es diferente de la mayor parte de la población pero aún es lo suficientemente similar al modo común para considerarse como una de ellos, por ejemplo variantes de corte y empalme.

35

En una realización, "isofoma" se refiere a una versión de una molécula, por ejemplo, una proteína, únicamente con ligeras diferencias en comparación con otra isoforma, o versión, de la misma proteína. En una realización, las isoformas pueden producirse a partir de genes diferentes pero relacionados, o en otra realización, pueden surgir del mismo gen corte y empalme alternativo. En otra realización, las isoformas son causadas por polimorfismos de un
40 único nucleótido.

En una realización, "fragmento" se refiere a una proteína o polipéptido que es más corto o comprende menos aminoácidos que la proteína o polipéptido de longitud completa. En otra realización, fragmento se refiere a un ácido nucleico que es más corto o comprende menos nucleótidos que el ácido nucleico de longitud completa. En otra
45 realización, el fragmento es un fragmento N-terminal. En otra realización, el fragmento es un fragmento C-terminal. En una realización, el fragmento es una sección intrasecuencial de la proteína, el péptido o el ácido nucleico. En una realización, el fragmento es un fragmento funcional. En otra realización, el fragmento es un fragmento inmunogénico. En una realización, un fragmento tiene 10-250 ácidos nucleicos o aminoácidos.

50 En una realización, un "homólogo" se refiere a una secuencia de ácidos nucleicos o aminoacídica que comparte un cierto porcentaje de identidad de secuencia con una secuencia de ácidos nucleicos o aminoacídica particular. En otra realización, una secuencia útil en la composición y los métodos que se proporcionan en el presente documento, puede ser un homólogo de cualquier secuencia descrita en el presente documento. En una realización, un homólogo comparte al menos un 99% de identidad con una secuencia particular. En una realización, se entenderá que un
55 homólogo de cualquiera de las secuencias que se proporcionan en el presente documento y/o que se describen en el presente documento se considerará como parte de la invención.

En una realización, "heterólogo" como se usa en el presente documento, describe un ácido nucleico, aminoácido, péptido, polipéptido, proteína, etc., que se obtienen a partir de una especie diferente de la especie de referencia. Por
60 lo tanto, por ejemplo, una cepa de *Listeria* que expresa un polipéptido heterólogo, en una realización, expresará un polipéptido que no es nativo o endógeno a la cepa de *Listeria*, o en otra realización, un polipéptido que no se

expresa normalmente por la cepa de *Listeria*, o en otra realización, un polipéptido de una fuente distinta de la cepa de *Listeria*.

5 En una realización, "endógeno" como se usa en el presente documento, describe un ácido nucleico, aminoácido, péptido, polipéptido, proteína, etc. que se ha desarrollado o generado dentro del organismo de referencia o que ha surgido por causas dentro del organismo de referencia. En otra realización, endógeno se refiere a nativo.

10 En otra realización, la peptidasa relacionada con la calicreína 3 (proteína KLK3) que es la fuente de un péptido KLK3 de los métodos y composiciones de la presente invención, es una proteína PSA.

En otra realización, la proteína KLK3 es una proteína KLK3 madura. En otra realización, la proteína KLK3 es una proteína pro-KLK3. En otra realización, la secuencia líder se ha eliminado de una proteína KLK3 madura de los métodos y composiciones de la presente invención. Un ejemplo de una proteína KLK3 madura se codifica por aa378-1088 de SEQ ID No: 40.

15 En otra realización, la proteína KLK3 que es la fuente de un péptido KLK3 de los métodos y composiciones de la presente invención, es una proteína KLK3 humana.

20 En otra realización, la proteína KLK3 tiene la secuencia de SEQ ID No: 25 (GenBank N° de Acceso X14810). En otra realización, la proteína KLK3 es un fragmento de SEQ ID No: 25.

25 En otra realización, la proteína KLK3 se codifica por una molécula nucleotídica que tiene la secuencia de SEQ ID No: 26 (GenBank N° de Acceso X14810). En otra realización, la proteína KLK3 se codifica por los residuos 401-446, 1688-1847, 3477-3763, 3907-4043, 5413-5568, o una combinación de los mismos, de SEQ ID No: 26. En otra realización, la proteína KLK3 se codifica por un homólogo de SEQ ID No: 26. En otra realización, la proteína KLK3 se codifica por una variante de SEQ ID No: 26. En otra realización, la proteína KLK3 se codifica por una isoforma de SEQ ID No: 26. En otra realización, la proteína KLK3 se codifica por un fragmento de SEQ ID No: 26.

30 En otra realización, la proteína KLK3 tiene la secuencia de SEQ ID No: 32 (GenBank N° de Acceso NM_001648). En otra realización, la proteína KLK3 es un fragmento de SEQ ID No: 32.

35 En otra realización, la proteína KLK3 se codifica por una molécula nucleotídica que tiene la secuencia de SEQ ID No: 33 (GenBank N° de Acceso NM_001648). En otra realización, la proteína KLK3 se codifica por los residuos 42-827 de SEQ ID No: 33. En otra realización, la proteína KLK3 se codifica por un homólogo de SEQ ID No: 33. En otra realización, la proteína KLK3 se codifica por una variante de SEQ ID No: 33. En otra realización, la proteína KLK3 se codifica por una isoforma de SEQ ID No: 33. En otra realización, la proteína KLK3 se codifica por un fragmento de SEQ ID No: 33.

40 En otra realización, la proteína KLK3 tiene la secuencia de SEQ ID No: 34 (GenBank N° de Acceso BC056665). En otra realización, la proteína KLK3 es un fragmento de SEQ ID No: 34.

45 En otra realización, la proteína KLK3 se codifica por una molécula nucleotídica que tiene la secuencia de SEQ ID No: 35 (GenBank N° de Acceso BC056665). En otra realización, la proteína KLK3 se codifica por los residuos 47-832 de SEQ ID No: 35. En otra realización, la proteína KLK3 se codifica por un homólogo de SEQ ID No: 35. En otra realización, la proteína KLK3 se codifica por una variante de SEQ ID No: 35. En otra realización, la proteína KLK3 se codifica por una isoforma de SEQ ID No: 35. En otra realización, la proteína KLK3 se codifica por un fragmento de SEQ ID No: 35.

50 En otra realización, la proteína KLK3 tiene la secuencia de SEQ ID No: 39 (GenBank N° de Acceso AJ459783). En otra realización, la proteína KLK3 es un fragmento de SEQ ID No: 39.

55 En otra realización, la proteína KLK3 se codifica por una molécula nucleotídica que tiene la secuencia de SEQ ID No: 40 (GenBank N° de Acceso X07730). En otra realización, la proteína KLK3 se codifica por los residuos 67-1088 de SEQ ID No: 40. En otra realización, la proteína KLK3 se codifica por un homólogo de SEQ ID No: 40. En otra realización, la proteína KLK3 se codifica por una variante de SEQ ID No: 40. En otra realización, la proteína KLK3 se codifica por una isoforma de SEQ ID No: 40. En otra realización, la proteína KLK3 se codifica por un fragmento de SEQ ID No: 40.

60 En otra realización, la proteína KLK3 tiene una secuencia expuesta en uno de los siguientes Números de Acceso al GenBank: BC005307, AJ310938, AJ310937, AF335478, AF335477, M27274 y M26663. En otra realización, la proteína KLK3 se codifica por una secuencia expuesta en uno de los anteriores Números de Acceso al GenBank.

En otra realización, la proteína KLK3 se codifica por una secuencia expuesta en uno de los siguientes Números de Acceso al GenBank: NM_001030050, NM_001030049, NM_001030048, AJ459782, AJ512346 o AJ459784.

- 5 En otra realización, la proteína KLK3 tiene la secuencia que comprende una secuencia expuesta en uno de los siguientes Números de Acceso al GenBank: X13943, X13942, X13940, X13941 y X13944.

En otra realización, la presente invención proporciona una vacuna que comprende una cepa recombinante de *Listeria* de la presente invención y un adyuvante.

10

En otra realización, la presente invención proporciona una composición inmunogénica que comprende una cepa recombinante de *Listeria* de la presente invención.

- 15 En otra realización, la cepa recombinante de *Listeria* expresa un polipéptido recombinante que comprende un péptido de fusión KLK3:LLO. En otra realización, la cepa recombinante de *Listeria* comprende un polipéptido recombinante, en la que el péptido recombinante comprende un péptido de fusión KLK3:LLO. En otra realización, la cepa recombinante de *Listeria* comprende un nucleótido recombinante que codifica el polipéptido recombinante.

20 El péptido de fusión KLK3:LLO expresado por la cepa recombinante de *Listeria* potencia la inmunogenicidad del péptido KLK3.

El péptido no KLK3/no FOLH1 en el péptido de fusión de la presente invención es un péptido LLO, que en otra realización, puede ser un péptido no hemolítico LLO.

- 25 En otra realización, la presente invención proporciona una cepa recombinante de *Listeria* que comprende un polipéptido recombinante de la presente invención. En otra realización, la presente invención proporciona una cepa recombinante de *Listeria* que comprende un nucleótido recombinante que codifica un polipéptido recombinante de la presente invención. En otra realización, la cepa de vacuna de *Listeria* es una cepa de la especie *Listeria monocytogenes* (LM). En otra realización, la presente invención proporciona una composición que comprende la cepa de *Listeria*. En otra realización, la presente invención proporciona una composición inmunogénica que comprende la cepa de *Listeria*.
- 30

En otra realización, la cepa de *Listeria* es una cepa recombinante de *Listeria seeligeri*. En otra realización, la cepa de *Listeria* es una cepa recombinante de *Listeria grayi*. En otra realización, la cepa de *Listeria* es una cepa recombinante de *Listeria ivanovii*. En otra realización, la cepa de *Listeria* es una cepa recombinante de *Listeria murrayi*. En otra realización, la cepa de *Listeria* es una cepa recombinante de *Listeria welshimeri*. En otra realización, la cepa de *Listeria* es una cepa recombinante de cualquier otra especie de *Listeria* conocida en la técnica.

35

En otra realización, una cepa recombinante de *Listeria* de la presente invención se ha pasado a través de un huésped animal. El pase puede maximizar la eficacia de la cepa como un vector de vacuna, estabilizar la inmunogenicidad de la cepa de *Listeria*, estabilizar la virulencia de la cepa *Listeria*, aumentar la inmunogenicidad de la cepa de *Listeria*, aumentar la virulencia de la cepa *Listeria*, eliminar las sub-cepas inestables de la cepa de *Listeria*, y/o reducir la prevalencia de sub-cepas inestables de la cepa de *Listeria*. En otra realización, la cepa de *Listeria* contiene una inserción genómica del gen que codifica el péptido KLK3. En otra realización, la cepa de *Listeria* lleva un plásmido que comprende el gen que codifica el péptido de fusión recombinante KLK3:LLO. Se conocen bien en la técnica métodos para pasar una cepa recombinante de *Listeria* a través de un huésped animal, y se describen, por ejemplo, en la Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos N° 2006/0233835. En otra realización, el pase se realiza mediante cualquier otro método conocido en la técnica.

40

45

50 En otra realización, la cepa recombinante de *Listeria* utilizada en los métodos de la presente invención se ha almacenado en un banco de células congeladas o en un banco de células liofilizadas. El banco de células puede ser un banco de células maestro, un banco de células de trabajo, y/o un banco de células de buenas prácticas de fabricación (GMP, *Good Manufacturing Practice*). El banco de células puede diseñarse para la producción de material de grado clínico, y/o conforme a las prácticas reguladoras para su uso en seres humanos.

55

Las "buenas practicas de fabricación" se definen, en otra realización, por (21 CFR 210-211) del Código de Reglamentos Federales de los Estados Unidos. En otra realización, las "buenas prácticas de fabricación" se definen mediante otros estándares para la producción de material de grado clínico o para el consumo humano; por ejemplo, estándares de un país distinto de Estados Unidos.

60

En otra realización, una cepa recombinante de *Listeria* utilizada en la presente invención es de un lote de dosis de

vacunas, o procede de un stock congelado o un stock liofilizado producido por un método desvelado en el presente documento.

5 En otra realización, un banco de células, stock congelado o lote de dosis de vacunas de la presente invención muestra una viabilidad tras la descongelación de más del 90%. En otra realización, la congelación se sigue del almacenamiento para crioconservación o almacenamiento congelado durante 24 horas. En otra realización, el almacenamiento es durante 2 días, 3 días, 4 días, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 1 mes, 2 meses, 3 meses, 5 meses, 6 meses, durante 9 meses, o el almacenamiento es durante 1 año.

10 En otra realización, un banco de células, un stock congelado o un lote de dosis de vacunas de la presente invención se crioconserva mediante un método que comprende cultivar un cultivo de la cepa de *Listeria* en un medio nutritivo, congelar el cultivo en una solución que comprende glicerol, y almacenar la cepa de *Listeria* por debajo de -20 grados Celsius. En otra realización, la temperatura es de aproximadamente -70 grados Celsius. En otra realización, la temperatura es de aproximadamente -70- -80 grados Celsius.

15 En otra realización, un banco de células, un stock congelado o un lote de dosis de vacunas de la presente invención se crioconserva mediante un método que comprende cultivar un cultivo de la cepa de *Listeria* en un medio definido (como se ha descrito anteriormente), congelar el cultivo en una solución que comprende glicerol, y almacenar la cepa de *Listeria* por debajo de -20 grados Celsius. En otra realización, la temperatura es de aproximadamente -70 - -80 grados Celsius. En otra realización, cualquier medio microbiológico definido puede usarse en este método.

20 En otra realización, el cultivo (por ejemplo, el cultivo de una cepa de vacuna de *Listeria* que se usa para producir un lote de dosis de vacuna de *Listeria*) se inocula de un banco de células. En otra realización, el cultivo se inocula de un stock congelado. En otra realización, el cultivo se inocula de un cultivo masa levada. En otra realización, el cultivo se inocula de una colonia. En otra realización, el cultivo se inocula en la fase media del crecimiento logarítmico. En otra realización, el cultivo se inocula en aproximadamente la fase media del crecimiento logarítmico. En otra realización, el cultivo se inocula en otra fase de crecimiento.

30 La solución usada para la congelación puede contener otro aditivo coligativo o aditivo con propiedades anti-congelantes, en lugar o además de glicerol. En otra realización, el aditivo es manitol, DMSO, sacarosa u cualquier otro aditivo coligativo o aditivo con propiedades anti-congelantes que se conoce en la técnica.

35 El medio nutritivo utilizado para cultivar un cultivo de una cepa de *Listeria* puede ser LB, TB o un caldo Terrific modificado sin productos animales. En otra realización, el medio nutritivo es un medio definido. En otra realización, el medio nutritivo es un medio definido de la presente invención. En otra realización, el medio nutritivo es cualquier otro tipo de medio nutritivo conocido en la técnica.

40 La etapa de cultivo puede realizarse en un matraz agitador, tal como un matraz agitador apantallado, en un fermentador por lotes, en un tanque o matraz agitado, en un fermentador de tipo airlift, en un reactor por lotes alimentado, en un reactor celular continuo, o en un reactor de células inmobilizadas.

45 En otra realización, se mantiene un pH constante durante el crecimiento del cultivo (por ejemplo, en un fermentador por lotes). En otra realización, el pH se mantiene a aproximadamente 7,0, aproximadamente 6, aproximadamente 6,5, aproximadamente 7,5, o el pH es aproximadamente 8. En otra realización, el pH es 6,5-7,5. En otra realización, el pH es 6-8. En otra realización, el pH es 6-7. En otra realización, el pH es 7-8.

50 En otra realización, se mantiene una temperatura constante durante el crecimiento del cultivo. En otra realización, la temperatura se mantiene a aproximadamente 37 °C. En otra realización, la temperatura es 37 °C, 25 °C, 27 °C, 30 °C, 34 °C, 36 °C, 38 °C, o en otra realización, la temperatura es 39 °C.

55 En otra realización, se mantiene una concentración de oxígeno disuelto constante durante el crecimiento del cultivo. En otra realización, la concentración de oxígeno disuelto se mantiene al 20% de saturación. En otra realización, la concentración es del 15% de saturación, o del 16% de saturación, o del 18%, o del 22%, o del 25%, o del 30%, o del 35%, o del 40%, o del 45%, o del 50%, o del 55%, o del 60%, o del 65%, o del 70%, o del 75%, o del 80%, o del 85%, o del 90%, o del 95%, o del 100% de saturación, o casi el 100% de saturación.

60 En otra realización, el cultivo de *Listeria* se ultracongela en nitrógeno líquido seguido de almacenamiento a la temperatura de congelación final. En otra realización, el cultivo se congela de manera más gradual; por ejemplo colocando un vial del cultivo en la temperatura de almacenamiento final.

En otra realización, la temperatura de almacenamiento del cultivo está entre -20 y -80 grados Celsius (°C). En otra realización, la temperatura está significativamente por debajo de -20 °C. En otra realización, la temperatura no es mayor de -70 °C, o es -70 °C o es aproximadamente -70 °C. En otra realización, la temperatura es -20 °C o aproximadamente -20 °C, -30 °C, -40 °C, -50 °C, -60 °C, -80 °C, -30 °C- -70 °C, -40 °C- -70 °C, -50 °C- -70 °C, -60 °C- -70 °C, -30 °C- -80 °C, -40 °C- -80 °C, -50 °C- -80 °C, -60 °C- -80 °C, -70 °C- -80 °C, o la temperatura es más fría de -70 °C o más fría de -80 °C.

Se conocen bien en la técnica por lo expertos en la técnica métodos para la liofilización y crioconservación de cepas recombinantes de *Listeria*.

10

La composición que contiene *Listeria* es, en otra realización, una composición inmunogénica. En otra realización, la composición es inherentemente inmunogénica comprendiendo en virtud de esto una cepa de *Listeria* de la presente invención. En otra realización, la composición comprende adicionalmente un adyuvante.

15 En algunas realizaciones, la expresión "que comprende" se refiere a la inclusión de otros polipéptidos recombinantes, secuencias aminoacídicas o secuencias de ácidos nucleicos, así como la inclusión de otros polipéptidos, secuencias aminoacídicas o secuencias de ácidos nucleicos, que pueden conocerse en la técnica, que en una realización pueden comprender antígenos o polipéptidos de *Listeria*, secuencias aminoacídicas o secuencias de ácidos nucleicos. En algunas realizaciones, la expresión "que consiste básicamente en" se refiere a una
20 composición para su uso en los métodos que se proporcionan en el presente documento, que tiene el polipéptido recombinante específico, la secuencia aminoacídica o la secuencia de ácido nucleico o un fragmento del mismo. Sin embargo, pueden incluirse otros polipéptidos, secuencias aminoacídicas o secuencias de ácidos nucleicos que no están implicados directamente en la utilidad del polipéptido o polipéptidos recombinantes. En algunas realizaciones, la expresión "que consiste en" se refiere a una composición para su uso en los métodos que se proporcionan en el
25 presente documento que tiene un polipéptido recombinante particular, una secuencia aminoacídica, o una secuencia de ácidos nucleicos, o un fragmento o combinación de polipéptidos recombinantes, secuencias aminoacídicas o secuencias de ácidos nucleicos o fragmentos como se describe en el presente documento.

En otra realización, la presente invención proporciona un polipéptido recombinante, que comprende un péptido KLK3
30 unido de forma operativa a un péptido LLO que potencia la inmunogenicidad del péptido KLK3.

Como se proporciona en el presente documento, una cepa recombinante de *Listeria* que expresa una fusión LLO-KLK3 protege los ratones contra tumores y provoca la formación de CTL específicos de antígeno. Por lo tanto, las cepas de *Listeria* que expresan antígenos específicos de próstata (por ejemplo, antígeno específico de
35 próstata/KLK3) son antigénicas y eficaces en los métodos de vacunación. Adicionalmente, las fusiones de LLO y fragmentos de las mismas a antígenos específicos de próstata (por ejemplo, antígeno específico de próstata/KLK3) son antigénicas y eficaces en los métodos de vacunación.

Adicionalmente, como se proporciona en el presente documento, Lm-LLO-E7 induce la regresión de tumores
40 inmortalizados HPV-16 subcutáneos establecidos de ratones C57B1/6 (Ejemplo 1). Además, como se proporciona en el presente documento, Lm-LLO-NP protege a los ratones de RENCA-NP, un carcinoma de células renales (Ejemplo 3). Adicionalmente, como se proporciona en el presente documento, la fusión de antígenos a secuencias de tipo ActA y PEST produce resultados similares. Por lo tanto, las secuencias de tipo LLO, ActA y PEST no hemolíticas son todas eficaces en la potenciación de la inmunogenicidad de los péptidos KLK3, PSCA y FOLH1.

45

En otra realización, la presente invención proporciona una vacuna que comprende un polipéptido de fusión recombinante de la presente invención y un adyuvante.

En otra realización, la presente invención proporciona una composición inmunogénica que comprende un polipéptido
50 de fusión recombinante de la presente invención.

En otra realización, la presente invención proporciona un vector de vacuna recombinante que codifica un polipéptido de fusión recombinante de la presente invención.

55 En otra realización, la presente invención proporciona una molécula nucleotídica que codifica un polipéptido de fusión recombinante de la presente invención.

En otra realización, la presente invención proporciona una vacuna que comprende una molécula nucleotídica de la presente invención y un adyuvante.

60

En otra realización, la presente invención proporciona una composición inmunogénica que comprende una molécula

nucleotídica de la presente invención.

En otra realización, la presente invención proporciona un vector de vacuna recombinante que comprende una molécula nucleotídica de la presente invención.

5

En otras realizaciones, el adyuvante de los métodos y composiciones de la presente invención es Montanide ISA 51. Montanide ISA 51 contiene un aceite metabolizable natural y un emulsionante refinado. En otra realización, el adyuvante es GM-CSF. En otra realización, el adyuvante es KLH. GM-CSF recombinante es un vector de crecimiento de proteína humana, en otra realización, es un vector de levadura (*S. cerevisiae*). GM-CSF promueve la expansión y diferenciación clonal de las células progenitoras hematopoyéticas, APC, y las células dendríticas y los linfocitos T.

10

El adyuvante puede ser una citocina, un factor de crecimiento de citocina, una población celular, QS21, adyuvante incompleto de Freund, fosfato de aluminio, hidróxido de aluminio, BCG, alumbre, una interleucina, un oligonucleótido CpG no metilado, glucósidos de quill, monofosforil lípido A, liposomas, un mitógeno bacteriano, una toxina bacteriana, o una quimiocina. En otra realización, el adyuvante es cualquier otro tipo de adyuvante conocido en la técnica. En otra realización, la vacuna de la presente invención comprende dos de las adyuvantes anteriores. En otra realización, la vacuna comprende más de dos de los adyuvantes anteriores.

15

20 En otra realización, la presente invención proporciona una composición que comprende una cepa recombinante de *Listeria* de la presente invención para su uso en la inducción de una respuesta inmune anti-KLK3 en un sujeto.

En otra realización, la presente invención proporciona una composición que comprende una cepa recombinante de *Listeria* de la presente invención, para su uso en el tratamiento de un tumor que expresa KLK3 en un sujeto. En otra realización, el tumor que expresa KLK3 es un cáncer de próstata que expresa KLK3. En otra realización, el tumor que expresa KLK3 es un carcinoma de próstata que expresa KLK3.

25

En una realización, "tratar" se refiere tanto a un tratamiento terapéutico como a medidas profilácticas y preventivas, donde el objeto es prevenir o disminuir la afección o trastorno patológico diana como se describe en el presente documento. Por lo tanto, en una realización, tratar puede incluir directamente afectar o curar, suprimir, inhibir, prevenir, reducir la gravedad de, retrasar la aparición de, reducir los síntomas relacionados con la enfermedad, trastorno o afección, o una combinación de los mismos. Por lo tanto, en una realización, "tratar" se refiere, entre otros, a retrasar el avance, acelerar la remisión, inducir la remisión, aumentar la remisión, acelerar la recuperación, aumentar la eficacia de o disminuir la resistencia a productos terapéuticos alternativos, o una combinación de los mismos. En una realización, "prevenir" o "impedir" se refiere, entre otros, a retrasar la aparición de síntomas, prevenir la recidiva de una enfermedad, disminuir el número o frecuencia de episodios de recaída, aumentar la latencia entre episodios sintomáticos, o una combinación de los mismos. En una realización, "suprimir" o "inhibir" o "proteger contra" se refieren, entre otros, a reducir la gravedad de los síntomas, reducir la gravedad de un episodio agudo, reducir el número de síntomas, reducir la incidencia de síntomas relacionados con la enfermedad, reducir la latencia de los síntomas, mejorar los síntomas, reducir los síntomas secundarios, reducir las infecciones secundarias, prolongar la supervivencia del paciente, o una combinación de los mismos.

30

35

40

En otra realización, la presente invención proporciona una composición que comprende una cepa recombinante de *Listeria* de la presente invención para su uso en la protección de un sujeto humano frente a un tumor que expresa KLK3. En otra realización, el tumor que expresa KLK3 es un cáncer de próstata que expresa KLK3. En otra realización, el tumor que expresa KLK3 es un carcinoma de próstata que expresa KLK3.

45

Se conocen bien en la técnica métodos para evaluar la eficacia de las vacunas para el cáncer de próstata, y se describen, por ejemplo, en Dzojic H y col. (Adenovirus-mediated CD40 ligand therapy induces tumor cell apoptosis and systemic immunity in the TRAMP-C2 mouse prostate cancer model. *Prostate*. 2006 Jun 1; 66(8): 831-8), Naruishi K y col. (Adenoviral vector-mediated RTVP-1 gene-modified tumor cell-based vaccine suppresses the development of experimental prostate cancer. *Cancer Gene Ther*. 2006 Jul; 13(7): 658-63), Sehgal I y col. (*Cancer Cell Int*. 2006 Aug 23; 6: 21), y Heinrich JE y col. (Vaccination against prostate cancer using a live tissue factor deficient cell line in Lobund-Wistar rats. *Cancer Immunol Immunother* 2007; 56(5): 725-30).

50

55

En otra realización, el modelo de cáncer de próstata usado para ensayar los métodos y composiciones de la presente invención es el modelo de tumor de ratón TRAMP-C1 que expresa PSA (TPSA23). En otra realización, el modelo de cáncer de próstata es un modelo de célula 178-2 BMA. En otra realización, el modelo de cáncer de próstata es un modelo de cáncer de adenocarcinoma PAII. En otra realización, el modelo de cáncer de próstata es un modelo PC-3M. En otra realización, el modelo de cáncer de próstata es cualquier otro modelo de cáncer de próstata conocido en la técnica.

60

En otra realización, la vacuna se ensaya en sujetos humanos, y la eficacia se controla usando métodos bien conocidos en la técnica, por ejemplo, midiendo directamente las respuestas de los linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺, o midiendo el avance de la enfermedad, por ejemplo, determinando el número o tamaño de metástasis tumorales, o controlando los síntomas de la enfermedad (tos, dolor torácico, pérdida de peso, etc.). Se conocen en la técnica métodos para evaluar la eficacia de una vacuna para el cáncer de próstata en sujetos humanos, y se describen, por ejemplo, en Uenaka A y col. (T cell immunomonitoring and tumor responses in patients immunized with a complex of cholesterol-bearing hydrophobized pullulan (CHP) and NY-ESO-1 protein. *Cancer Immun.* 2007 Apr 19; 7: 9) y Thomas-Kaskel AK y col. (Vaccination of advanced prostate cancer patients with PSCA and PSA peptide-loaded dendritic cells induces DTH responses that correlate with superior overall survival. *Int J Cancer.* 2006 Nov 15; 119(10): 2428-34).

En otra realización, la presente invención proporciona una composición inmunogénica que comprende un polipéptido de fusión recombinante de la presente invención para su uso en la inducción de una respuesta inmune anti-KLK3 en un sujeto.

En otra realización, la presente invención proporciona una composición inmunogénica que comprende un polipéptido de fusión recombinante de la presente invención para su uso en el tratamiento de un tumor que expresa KLK3 en un sujeto. En una realización, el tumor que expresa KLK3 es un cáncer de próstata que expresa KLK3. En otra realización, el tumor que expresa KLK3 es un carcinoma de próstata que expresa KLK3.

En otra realización, la presente invención proporciona una composición inmunogénica que comprende un polipéptido de fusión recombinante de la presente invención para su uso en la protección de un sujeto humano contra un tumor que expresa KLK3. En otra realización, el tumor que expresa KLK3 es un cáncer de próstata que expresa KLK3. En otra realización, el tumor que expresa KLK3 es un carcinoma de próstata que expresa KLK3.

En otra realización, la presente invención proporciona una molécula nucleotídica de la presente invención para su uso en la inducción de una respuesta inmune anti-KLK3 en un sujeto.

En otra realización, la presente invención proporciona una composición inmunogénica que comprende una molécula nucleotídica de la presente invención para su uso en el tratamiento de un tumor que expresa KLK3 en un sujeto. En otra realización, el tumor que expresa KLK3 es un cáncer de próstata que expresa KLK3. En otra realización, el tumor que expresa KLK3 es un carcinoma de próstata que expresa KLK3.

En otra realización, la presente invención proporciona una composición inmunogénica que comprende una molécula nucleotídica de la presente invención para su uso en la protección de un sujeto humano contra un tumor que expresa KLK3. En otra realización, el tumor que expresa KLK3 es un cáncer de próstata que expresa KLK3. En otra realización, el tumor que expresa KLK3 es un carcinoma de próstata que expresa KLK3.

En otra realización, la presente invención proporciona una composición que comprende una cepa recombinante de *Listeria*, en la que la cepa comprende un polipéptido de fusión recombinante de la presente invención, para su uso en la inducción de una respuesta inmune anti-KLK3 en un sujeto.

En otra realización, la presente invención proporciona una composición que comprende una cepa recombinante de *Listeria*, en la que la cepa comprende un polipéptido de fusión recombinante de la presente invención, para su uso en el tratamiento de un tumor que expresa KLK3 en un sujeto. En otra realización, el tumor que expresa KLK3 es un cáncer de próstata que expresa KLK3. En otra realización, el tumor que expresa KLK3 es un carcinoma de próstata que expresa KLK3.

En otra realización, la presente invención proporciona una composición que comprende una cepa recombinante de *Listeria*, en la que la cepa comprende un polipéptido de fusión recombinante de la presente invención para su uso en la protección de un sujeto humano contra un tumor que expresa KLK3. En otra realización, el tumor que expresa KLK3 es un cáncer de próstata que expresa KLK3. En otra realización, el tumor que expresa KLK3 es un carcinoma de próstata que expresa KLK3.

En otra realización, la presente invención proporciona una composición que comprende una cepa recombinante de *Listeria* de la presente invención para su uso en impedir un crecimiento de un tumor de cáncer de próstata que expresa KLK3 en un sujeto.

En otra realización, la presente invención proporciona una composición que comprende una cepa recombinante de *Listeria* de la presente invención para su uso en la superación de una tolerancia inmune de un sujeto a un tumor de

cáncer de próstata que expresa KLK3. En otra realización, la presente invención proporciona una combinación de los tratamientos, que en una realización comprende el cebado con *Listeria* y el refuerzo con polipéptido.

5 En otra realización, la presente invención proporciona una composición inmunogénica que comprende un polipéptido de fusión recombinante de la presente invención para su uso en interrumpir el crecimiento de un tumor de cáncer de próstata que expresa KLK3 en un sujeto.

10 En otra realización, la presente invención proporciona una composición inmunogénica que comprende un polipéptido de fusión recombinante de la presente invención para su uso en la superación de una tolerancia inmune de un sujeto a un tumor de cáncer de próstata que expresa KLK3.

15 En otra realización, la presente invención proporciona una composición inmunogénica que comprende una molécula nucleotídica de la presente invención para su uso en impedir el crecimiento de un tumor de cáncer de próstata que expresa KLK3 en un sujeto.

20 En otra realización, la presente invención proporciona una composición inmunogénica que comprende una molécula nucleotídica de la presente invención para su uso en la superación de una tolerancia inmune de un sujeto a un tumor de cáncer de próstata que expresa KLK3.

25 "Tolerancia" se refiere, en otra realización, a una falta de respuesta del huésped a un antígeno. En otra realización, el término se refiere a una falta de respuesta detectable del huésped a un antígeno. En otra realización, el término se refiere a una falta de inmunogenicidad de un antígeno en un huésped. En otra realización, la tolerancia se mide por la falta de respuesta en un ensayo CTL *in vitro*. En otra realización, la tolerancia se mide por la falta de respuesta en un ensayo de hipersensibilidad de tipo retardado. En otra realización, la tolerancia se mide por la falta de respuesta en cualquier otro ensayo conocido en la técnica. En otra realización, la tolerancia se determina o se mide como se representa en los Ejemplos en el presente documento.

30 "Superar" se refiere, en otra realización, a una reversibilidad de la tolerancia por una vacuna. En otra realización, el término se refiere a la atribución de una respuesta inmune detectable por una vacuna. En otra realización, la superación de la tolerancia inmune se determina o se mide como se representa en los Ejemplos en el presente documento.

35 En otra realización, la presente invención proporciona una cepa de *Listeria* que expresa KLK3 de la presente invención para su uso en el tratamiento de, o la interrupción del avance de, hiperplasia benigna de próstata (BPH) en un sujeto.

40 En otra realización, la presente invención proporciona una cepa de *Listeria* que expresa KLK3 de la presente invención para su uso en el tratamiento de, o la interrupción del avance de neoplasia intraepitelial prostática (PIN) en un sujeto.

45 En otra realización, la presente invención proporciona un péptido de fusión que contiene KLK3 de la presente invención para su uso en el tratamiento de, o la interrupción del avance de, BPH en un sujeto.

50 En otra realización, la presente invención proporciona un péptido de fusión que contiene KLK3 de la presente invención para su uso en el tratamiento de, o la interrupción del avance de, PIN en un sujeto

En otra realización, la presente invención proporciona una molécula nucleotídica que codifica la proteína de fusión KLK3 de la presente invención para su uso en el tratamiento de, o la interrupción del avance de, BPH en un sujeto.

55 En otra realización, la presente invención proporciona una molécula nucleotídica que codifica la proteína de fusión KLK3 de la presente invención para su uso en el tratamiento de, o la interrupción del avance de, neoplasia intraepitelial prostática en un sujeto.

60 En otra realización, las proteínas de fusión de la presente invención no han de expresarse por LM, pero en su lugar pueden expresarse y aislarse a partir de otros vectores y sistemas celulares usados para la expresión y el aislamiento de proteínas.

Como se proporciona en el presente documento, las fusiones LLO-E7 muestran una eficacia terapéutica significativa. En estos experimentos, se construyó un vector vaccinia que expresa E7 como una proteína de fusión con una forma truncada no hemolítica de LLO. La expresión del producto de fusión LLO-E7 por una placa de vaccinia purificada se verificó por transferencia de Western usando un anticuerpo dirigido contra la secuencia de

proteína LLO. Se demostró que Vac-LLO-E7 producía linfocitos T CD8⁺ específicos para LLO y E7 como se determinó usando los epítomos LLO (91-99) y E7 (49-57) de ratones Balb/c y C57/BL6, respectivamente. Los resultados se confirmaron por un ensayo CTL (Ejemplo 4).

- 5 Por lo tanto, la expresión de un antígeno, por ejemplo, KLK3, PSCA o FOLH1, como una proteína de fusión con una forma truncada no hemolítica de de LLO, ActA, o una secuencia tipo PEST en sistemas de células huésped en *Listeria* y sistemas de células huésped distintos de *Listeria* da como resultado una mejor inmunogenicidad del antígeno. Aunque los experimentos comparativos se realizaron con vaccinia, se conoce una multitud de otros plásmidos y sistemas de expresión que pueden usarse para expresar estas proteínas de fusión. Por ejemplo, los
- 10 vectores bacterianos útiles en la presente invención incluyen, pero sin limitación, *Salmonella sp.*, *Shigella sp.*, BCG, *L. monocytogenes* y *S. gordonii*. Además, las proteínas de fusión pueden administrarse por vectores bacterianos recombinantes modificados para escapar de la fusión fagolisosomal y vivir en el citoplasma de la célula. Los vectores virales útiles en la presente invención incluyen, pero sin limitación, vaccinia, avipox, adenovirus, AAV, virus vaccinia NYVAC, cepa modificada de vaccinia Ankara (MVA), virus Semliki Forest, virus de la encefalitis equina Venezolana,
- 15 herpes virus, y retrovirus. También pueden usarse vectores de ADN desnudos.

- En otra realización, una proteína KLK3 expresada por la célula tumoral diana comparte homología completa con el péptido KLK3 (por toda la longitud del péptido) expresado por el vector *Listerial*. En otra realización, la proteína KLK3 es altamente homóloga (por toda la longitud del péptido) al péptido KLK3 expresado por el vector *Listerial*.
- 20 "Altamente homólogo" se refiere, en otra realización, a una homología de más del 90%. En otra realización, la expresión se refiere a una homología de más del 92%. En otra realización, la expresión se refiere a una homología de más del 93%. En otra realización, la expresión se refiere a una homología de más del 94%. En otra realización, la expresión se refiere a una homología de más del 95%. En otra realización, la expresión se refiere a una homología de más del 96%. En otra realización, la expresión se refiere a una homología de más del 97%. En otra realización, la
- 25 expresión se refiere a una homología de más del 98%. En otra realización, la expresión se refiere a una homología de más del 99%. En otra realización, la expresión se refiere a una homología del 100%.

- El péptido KLK3 de la proteína de fusión de la presente invención tiene, en otra realización, 240-261 aminoácidos (AA) de longitud. En otra realización, la longitud es de 250-261 AA. En otra realización, la longitud es de
- 30 aproximadamente 240 AA. En otra realización, la longitud es de aproximadamente 260 AA.

- En otra realización, el fragmento KLK3 consiste en aproximadamente el 90% de la proteína KLK3. En otra realización, el fragmento consiste en aproximadamente el 95% de la misma. En otra realización, el fragmento
- 35 consiste en aproximadamente el 100% de la misma.

- En otra realización, un péptido de fusión KLK3 de la presente invención es un péptido inmunogénico. "Inmunogénico" se refiere, en otra realización, a una capacidad de inducir una respuesta inmune al administrarse a un sujeto. En otra realización, el sujeto es un sujeto humano. En otra realización, la respuesta inmune provocada es una respuesta a linfocitos T. En otra realización, la respuesta inmune provocada es una respuesta a linfocitos T
- 40 citotóxicos (CTL). En otra realización, la respuesta inmune provocada es detectable. En otra realización, la respuesta inmune provocada puede detectarse por un ensayo *in vitro*. En otra realización, el ensayo es un ensayo de liberación de citocinas (por ejemplo, clasificación de células activadas por fluorescencia; o FACS). En otra realización, el ensayo es un ensayo de liberación de cromo u otro ensayo de citotoxicidad *in vitro*.

- 45 En otra realización, la presente invención proporciona una vacuna, composición inmunogénica o vector que comprende una cepa recombinante de *Listeria* de la presente invención para su uso en la reducción del tamaño de un tumor que expresa KLK3. En otra realización, una célula del tumor expresa KLK3.

- En otra realización, la presente invención proporciona una cantidad eficaz de una vacuna que comprende: (a) una
- 50 cepa recombinante de *Listeria* que comprende un fragmento N-terminal de una proteína LLO fusionada a un péptido KLK3; o (b) un nucleótido recombinante que codifica el polipéptido recombinante para su uso en la supresión de una formación de un tumor que expresa KLK3.

- En otra realización, la presente invención proporciona una vacuna, composición inmunogénica o vector que
- 55 comprende un polipéptido de fusión recombinante de la presente invención para su uso en la reducción del tamaño de un tumor que expresa KLK3. En otra realización, una célula del tumor expresa KLK3.

- En otra realización, la presente invención proporciona una cantidad eficaz de una vacuna que comprende: (a) un
- 60 polipéptido recombinante que comprende un fragmento N-terminal de una proteína LLO fusionada a un péptido KLK3; o (b) un nucleótido recombinante que codifica el polipéptido recombinante para su uso en la supresión de una formación de un tumor que expresa KLK3.

En otra realización, la presente invención proporciona una vacuna, composición inmunogénica o vector que comprende una molécula nucleotídica recombinante de la presente invención para su uso en la reducción del tamaño de un tumor que expresa KLK3. En otra realización, una célula del tumor expresa KLK3.

5

En otra realización, la presente invención proporciona una cantidad eficaz de una vacuna que comprende: (a) una molécula nucleotídica recombinante que comprende un fragmento N-terminal de una proteína LLO fusionada a un péptido KLK3; o (b) un nucleótido recombinante que codifica el polipéptido recombinante para su uso en la supresión de una formación de un tumor que expresa KLK3.

10

En esta invención, el péptido de fusión recombinante de los usos médicos y composiciones de la presente invención es un péptido de fusión LLO-KLK3 que comprende la secuencia expuesta en la SEQ ID No: 54. En otra realización, el péptido de fusión tiene la secuencia expuesta en la SEQ ID No: 54. En otra realización, el péptido de fusión es homólogo a la secuencia expuesta en la SEQ ID No: 54, y tiene un porcentaje de identidad con respecto a SEQ ID

15

No: 54 de más del 99%.

La secuencia de la proteína LLO utilizada para construir vacunas de la presente invención es, en otra realización, un fragmento de SEQ ID NO: 17 (GenBank N° de Acceso P13128; la secuencia de ácidos nucleicos se expone en el GenBank N° de Acceso X15127). Los primeros 25 aminoácidos de la proteína correspondiente a esta secuencia son la secuencia de señal y se escinden en LLO cuando se secreta por la bacteria. Por lo tanto, en esta realización, la proteína LLO activa de longitud completa tiene 504 residuos de largo.

20

En otra realización, "péptido LLO" y "fragmento LLO" se refieren a un fragmento N-terminal de una proteína LLO. En otra realización, la expresión se refiere a una proteína LLO de longitud completa pero no hemolítica. En otra realización, los términos se refieren a una proteína no hemolítica que contiene una mutación puntual en cisteína 484 de la secuencia ID N°: 17 o un residuo correspondiente de la misma en una proteína LLO homóloga.

25

En otra realización, el fragmento N-terminal de una proteína LLO utilizada en las composiciones y métodos de la presente invención tiene la secuencia de SEQ ID NO: 18.

30

Como se desvela en el presente documento, las cepas recombinantes de *Listeria* que expresan fusiones de secuencia tipo PEST-antígeno inducen inmunidad antitumoral (Ejemplo 5) y generan linfocitos T infiltrantes de tumor específicos de antígeno (Ejemplo 6).

35

En otra realización de la presente invención, "ácidos nucleicos" o "nucleótido" se refiere a una cadena de al menos dos combinaciones base-azúcar-fosfato. La expresión incluye, en una realización, ADN y ARN. "Nucleótidos" se refiere, en una realización, a las unidades monoméricas de polímeros de ácidos nucleicos. ARN puede ser, en una realización, en forma de un ARNt (ARN de transferencia), ARNsn (ARN pequeño nuclear), ARNr (ARN ribosomal), ARNm (ARN mensajero), ARN anti-sentido, ARN pequeño inhibidor (ARNsi), micro ARN (ARNmi) y ribozimas. Se ha descrito el uso de ARNsi y ARNmi (Caudy AA y col., *Genes & Devel* 16: 2491-96 y referencias citadas en la presente). ADN puede estar en forma de ADN plasmídico, ADN vírico, ADN lineal, o ADN cromosómico o derivados de estos grupos. Además, estas formas de ADN y ARN pueden de hebra única, de doble hebra, triple o cuádruple hebra. El término también incluye, en otra realización, ácidos nucleicos artificiales que pueden contener otros tipos de estructuras pero las mismas bases. En una realización, el ácido nucleico artificial es un PNA (ácido nucleico peptídico). PNA contienen estructuras peptídicas y bases nucleotídicas y son capaces de unirse, tanto a moléculas de ADN como ARN. En otra realización, el nucleótido es oxetano modificado. En otra realización, el nucleótido se modifica por reemplazo de uno o más enlaces fosfodiéster por un enlace fosforotioato. En otra realización, el ácido nucleico artificial contiene cualquier otra variante de la estructura fosfato de ácidos nucleicos nativos conocidos en la técnica. El uso de ácidos nucleicos fosforotioato y PNA se conocen por los expertos en la técnica, y se describen, por ejemplo, en Neilsen PE, *Curr Opin Struct Biol* 9:353-57; y Raz NK y col. *Biochem Biophys Res Commun*. 297: 1075-84. La producción y uso de ácidos nucleicos se conoce por los expertos en la técnica y se describe, por ejemplo, en *Molecular Cloning*, (2001), Sambrook y Russell, eds. y *Methods in Enzymology: Methods for molecular cloning in eukaryotic cells* (2003) Purchio y G. C. Fareed.

40

45

50

55

También se describe en el presente documento un kit que comprende un reactivo utilizado en la realización de la presente invención. En otra realización, la presente invención proporciona un kit que comprende una composición, herramienta o instrumento de la presente invención.

60

En otra realización, el fragmento LLO se une al péptido KLK3 por conjugación química. En otra realización, se usa paraformaldehído para la conjugación. En otra realización, se usa maleimida para la conjugación. En otra realización, la conjugación se realiza usando cualquier método adecuado conocido en la técnica.

En otra realización, el tumor que expresa KLK3 dirigido por composiciones de la presente invención es un cáncer de próstata que expresa KLK3. En otra realización, el tumor que expresa KLK3 es un carcinoma de próstata que expresa KLK3.

5

Como se desvela en el presente documento, se demostró una inmunidad mediada por células mejorada para las proteínas de fusión que comprende un antígeno y LLO truncada que contiene la secuencia aminoacídica tipo PEST, SEQ ID NO: 1. La Δ LLO usada en algunos de los Ejemplos tenía 416 aminoácidos de largo (tras la escisión del péptido de señal), ya que se truncaron 88 residuos del extremo carboxi que es inclusivo del dominio de activación que contiene cisteína 484. Sin embargo, es evidente a partir de la presente divulgación que otras Δ LLO sin el dominio de activación, y en particular cisteína 484, son eficaces en los métodos de la presente invención.

10

Como se proporciona en el presente documento, la fusión de un antígeno a una forma truncada no hemolítica de listeriolisina O (LLO) potenció la inmunogenicidad. Un vector de LM que expresa y secreta un producto de fusión de la cepa del virus del papiloma humano (HPV) 16 E7 y LLO era un inmunoterapéutico de cáncer más potente para tumores inmortalizados con HPV que la LM que secreta la proteína E7 en solitario. Adicionalmente, un virus vaccinia recombinante que lleva el gen para la proteína de fusión LLO-E7 es un inmunoterapéutico de cáncer más potente para tumores inmortalizados con HPV que una cepa isogénica de vaccinia que lleva el gen para la proteína E7 en solitario. En comparación, una proteína de fusión corta Lm-AZ/E7 que comprende el antígeno E7 fusionado al promotor, una secuencia de señal y los primeros 7 residuos AA de LLO era un inmunoterapéutico antitumoral ineficaz. Esta proteína de fusión corta termina directamente antes de la secuencia tipo PEST y no la contiene.

15

20

"Proteína de fusión" se refiere, en otra realización, a una proteína que comprende 2 o más proteínas unidas juntas por enlaces peptídicos u otros enlaces químicos. En otra realización, las proteínas se unen juntas directamente por un péptido u otro enlace químico. En otra realización, las proteínas se unen juntas con uno o más aminoácidos (por ejemplo, un "separador") entre las dos o más proteínas.

25

Las proteínas de fusión que comprenden un péptido KLK3 se preparan, en otra realización, mediante cualquier método adecuado. En otra realización, una proteína de fusión se prepara por clonación y restricción de las secuencias apropiadas o síntesis química directa mediante métodos analizados a continuación. En otra realización, las subsecuencias se clonan y las subsecuencias apropiadas se escinden usando enzimas de restricción apropiadas. Después, los fragmentos se ligan, en otra realización, para producir la secuencia de ADN deseada. En otra realización, el ADN que codifica el péptido KLK3 se produce usando métodos de amplificación de ADN, por ejemplo reacción en cadena de la polimerasa (PCR). En primer lugar, los segmentos del ADN nativo en cualquier lado del nuevo extremo se amplifican por separado. El extremo 5' de la secuencia amplificada codifica el enlazador peptídico, mientras que el extremo 3' de la otra secuencia amplificada también codifica el enlazador peptídico. Puesto que el extremo 5' del primer fragmento es complementario al extremo 3' del segundo fragmento, los dos fragmentos (después de la purificación parcial, por ejemplo en LMP agarosa) pueden usarse como una plantilla solapante en una tercera reacción por PCR. La secuencia amplificada contendrá codones, el segmento en el lado carboxi del sitio de apertura (formando ahora la secuencia amino), el enlazador, y la secuencia en el lado amino del sitio de apertura (formando ahora la secuencia carboxilo). El gen que codifica el péptido KLK3 se liga entonces en un plásmido.

30

35

40

En otra realización, el péptido KLK3 se conjuga con la proteína LLO truncada por cualquier de un número de medios bien conocidos por los expertos en la técnica. En otra realización, el péptido KLK3 se conjuga, directamente o a través de un enlazador (separador), con la proteína. En otra realización, en la que tanto el péptido KLK3 como la proteína LLO son polipéptidos, la molécula quimérica se expresa de forma recombinante como una proteína de fusión monocatenaria.

45

En otra realización, los péptidos y proteínas de la presente invención se preparan fácilmente por síntesis peptídica en fase sólida ya establecida (SPPS) convencional como se describe por Stewart y col. en Solid Phase Peptide Synthesis, 2ª Edición, 1984, Pierce Chemical Company, Rockford, Ill.; y como se describe por Bodanszky y Bodanszky (The Practice of Peptide Synthesis, 1984, Springer-Verlag, New York). Al inicio, un residuo aminoacídico protegido adecuadamente se une a través de su grupo carboxilo a un soporte polimérico derivatizado e insoluble, tal como poliestireno reticulado o resina de poliamida. "Protegido adecuadamente" se refiere a la presencia de grupos protectores tanto en el grupo alfa-amino del aminoácido, como en cualquier grupo funcional de cadena lateral. Los grupos protectores de cadena lateral son generalmente estables a los disolventes, reactivos y condiciones de reacción usadas en toda la síntesis, y pueden eliminarse en condiciones que no afectarán al producto peptídico final. La síntesis por etapas del oligopéptido se realiza por la eliminación del grupo N-protector del aminoácido inicial, y el acoplamiento al mismo del extremo carboxilo del siguiente aminoácido en la secuencia del péptido deseado. Este aminoácido también está protegido adecuadamente. El carboxilo del aminoácido entrante puede activarse para

60

reaccionar con el extremo N del aminoácido unido al soporte mediante formación en un grupo reactivo tal como la formación en una carbodiimida, un anhídrido de ácido simétrico o un grupo de "éster activo" tal como hidroxibenzotriazol o pentafluorofenil ésteres.

- 5 Los ejemplos de métodos de síntesis peptídica en fase sólida incluyen el método BOC que utilizó terc-butiloxicarbonilo como el grupo protector alfa-amino, y el método FMOC que utiliza 9-fluorenilmetiloxicarbonilo para proteger el alfa-amino de los residuos aminoácidos, cuyos ambos métodos se conocen bien por los expertos en la técnica.
- 10 La incorporación de grupos de bloqueo N y/o C también pueden conseguirse usando protocolos convencionales a métodos de síntesis de péptidos en fase sólida. Para la incorporación de grupos de bloqueo C-terminal, por ejemplo, la síntesis del péptido deseado se realiza típicamente usando, como fase sólida, una resina de soporte que se ha modificado químicamente de manera que la escisión de la resina dé como resultado un péptido que tiene el grupo de bloqueo C-terminal deseado. Para proporcionar péptidos en los que el extremo C lleva un grupo de bloqueo amino
- 15 primario, por ejemplo, la síntesis se realiza usando una resina de p-metilbenzidrilamina (MBHA) de manera que, cuando la síntesis peptídica se complete, el tratamiento con ácido fluorhídrico libera el péptido amidado C-terminalmente deseado. De forma análoga, la incorporación de un grupo de bloqueo N-metilamina en el extremo C se consigue usando DVB derivado con N-metilaminoetilo, una resina, que tras el tratamiento de HF libera un péptido que lleva un extremo C N-metilamidado. El bloqueo del extremo C por esterificación puede conseguirse usando
- 20 procedimientos convencionales. Esto implica el uso de una combinación de resina/grupo de bloqueo que permite la liberación de un péptido de cadena lateral de la resina, para permitir una reacción posterior con el alcohol deseado, para formar la función éster. El grupo protector FMOC, en combinación con resina DVB derivada con alcohol metoxialcoybencilo o enlazador equivalente, puede usarse para este fin, realizándose la escisión del soporte por TFA en diclorometano. La esterificación de la función carboxilo activado adecuadamente, por ejemplo, con DCC,
- 25 puede entonces proseguir por la adición del alcohol deseado seguida de la desprotección y el aislamiento del producto peptídico esterificado.

La incorporación de grupos de bloqueo N-terminal puede conseguirse mientras que el péptido sintetizado está unido aún a la resina, por ejemplo, mediante tratamiento con un anhídrido y nitrilo adecuados. Para incorporar un grupo de

30 bloqueo acetilo en el extremo N, por ejemplo, el péptido acoplado a la resina puede tratarse con anhídrido acético al 20% en acetonitrilo. El producto peptídico N-bloqueado puede entonces escindirse de la resina, desprotegerse y aislarse posteriormente.

En otra realización, para garantizar que el péptido obtenido a partir de técnicas sintéticas químicas o biológicas es el

35 péptido deseado, se realiza el análisis de la composición peptídica. En otra realización, se realiza un análisis de la composición aminoacídica usando espectrometría de masas de alto rendimiento para determinar el peso molecular del péptido. Como alternativa, o adicionalmente, el contenido aminoacídico del péptido puede confirmarse hidrolizando el péptido en ácido acuoso, y separando, identificando y cuantificando los componentes de la mezcla usando HPLC, o un analizador de aminoácidos. También pueden usarse secuenciadores de proteínas, que

40 degradan secuencialmente el péptido e identifican los aminoácidos en orden, para determinar definitivamente la secuencia del péptido.

En otra realización, antes de su uso, el péptido se purifica para eliminar los contaminantes. A este respecto, se apreciará que el péptido se purificará para cumplir los estándares expuestos por las agencias reguladoras y

45 directrices apropiadas. Uno cualquiera de varios procedimientos de purificación convencionales puede usarse para conseguir el nivel requerido de pureza que incluye, por ejemplo, cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) de fase inversa usando una columna de sílice alquilada tal como C₄, C₈ o C₁₈-sílice. Se usa generalmente un gradiente de fase móvil de aumento de conteo orgánico para conseguir la purificación, por ejemplo, acetonitrilo en un tampón acuoso, que contiene normalmente una pequeña cantidad de ácido trifluoroacético. También puede usarse

50 cromatografía de intercambio iónico para separar péptidos en base a su carga.

La síntesis en fase sólida en la que el AA C-terminal de la secuencia se une a un soporte insoluble seguido de la adición secuencial de los aminoácidos restantes en la secuencia se usa, en otra realización, para la síntesis química de los polipéptidos de esta invención. Las técnicas para la síntesis en fase sólida se describen por Barany y

55 Merrifield en *Solid-Phase Peptide Synthesis*; págs. 3-284 en *The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology*. Vol. 2: *Special Methods in Peptide Synthesis, Part A*, Merrifield y col. J. Am. Chem. Soc., 85: 2149-2156 (1963), y Stewart y col., *Solid Phase Peptide Synthesis*, 2ª ed. Pierce Chem. Co., Rockford, Ill. (1984).

En otra realización, los péptidos de la presente invención pueden incorporar residuos AA que se modifican sin

60 afectar a la actividad. Por ejemplo, los extremos pueden derivarse para induir grupos de bloqueo, es decir, sustituyentes químicos adecuados para proteger y/o estabilizar los extremos N y C de una "degradación no

deseada", una expresión que pretende incluir cualquier tipo de descomposición enzimática, química o bioquímica del compuesto en sus extremos que es probable que afecte a la función del compuesto, es decir, la degradación secuencial del compuesto en un extremo terminal del mismo.

5 En otra realización, los grupos de bloqueo incluyen grupos protectores usados convencionalmente en la técnica de la química de péptidos que no afectarán de forma adversa a las actividades *in vivo* del péptido. Por ejemplo, los grupos de bloqueo N-terminal adecuados pueden introducirse por alquilación o acilación del extremo N. Los ejemplos de grupos de bloqueo N-terminal adecuados incluyen grupos alquilo C₁-C₅ ramificados o no ramificados, grupos acilo, tales como grupos formilo y acetilo, así como formas sustituidas de los mismos, tales como el grupo
10 acetamidometilo (Acm). Los análogos desamino de aminoácidos son también grupos de bloqueo N-terminal útiles, y pueden acoplarse al extremo N del péptido o se usan en lugar del residuo N-terminal. Los grupos de bloqueo C-terminal adecuados, en los que el grupo carboxilo del extremo C se incorpora o no, incluyen ésteres, cetonas o amidas. Los grupos alquilo formadores de éster o cetona, particularmente grupos alquilo inferiores, tales como metilo, etilo y propilo, y grupos amino formadores de amida, tales como aminas primarias (-NH₂), y grupo amino
15 mono y dialquilo, tales como metilamino, etilamino, dimetilamino, dietilamino, metiletilamino y similares son ejemplos de grupos de bloqueo C-terminal. Los análogos de aminoácido descarboxilado, tales como agmatina, son también grupos de bloqueo C-terminal útiles y pueden acoplarse al residuo C-terminal del péptido o se usan en lugar de éste. Adicionalmente, se apreciará que los grupos amino libre y carboxilo en los extremos pueden eliminarse completamente del péptido para producir formas desamino y descarboxiladas de los mismos sin afectar a la
20 actividad del péptido.

En otra realización, se incorporan otras modificaciones sin afectar de forma adversa a la actividad. En otra realización, dichas modificaciones incluyen, pero sin limitación, la sustitución de uno o más de los aminoácidos en la forma L-isomérica natural con aminoácidos en la forma D-isomérica. Por lo tanto, el péptido puede incluir uno o más
25 residuos D-aminoácidos, o puede comprender aminoácidos que son todos de la forma D. También se contemplan formas retro-inversas de péptidos de acuerdo con la presente invención, por ejemplo, péptidos invertidos en los que todos los aminoácidos están sustituidos con formas de D-aminoácidos.

En otra realización, se utilizan péptidos de sales de adición de ácidos de la presente invención como equivalentes
30 funcionales de los mismos. En otra realización, un péptido de acuerdo con la presente invención tratado con un ácido inorgánico, tal como ácido clorhídrico, bromhídrico, sulfúrico, nítrico, fosfórico y similares, o un ácido orgánico, tal como un ácido acético, propiónico, glicólico, pirúvico, oxálico, málico, succínico, maleico, fumárico, tartárico, cítrico, benzoico, cinnámico, mandélico, metanosulfónico, etanosulfónico, p-toluenosulfónico, salicílico y similares, para proporcionar una sal soluble en agua del péptido es adecuado para su uso en la invención.

35 En otra realización, las modificaciones (que normalmente no alteran la secuencia principal) incluyen derivación química *in vivo* o *in vitro* de polipéptidos, por ejemplo, acetilación o carboxilación. También se incluyen modificaciones de glicosilación, por ejemplo las que se hacen modificando los patrones de glicosilación de un polipéptido durante su síntesis y procesamiento o en etapas de procesamiento adicionales; por ejemplo, exponiendo
40 el polipéptido a enzimas que afectan a la glicosilación, por ejemplo, enzimas de glicosilación o de desglicosilación mamíferas. También se incluyen secuencias que tienen residuos aminoácidos fosforilados, por ejemplo, fosfotirosina, fosfoserina o fosfotreonina.

45 En otra realización, los polipéptidos se modifican usando técnicas biológicas moléculas habituales para mejorar su resistencia a la degradación proteolítica o para optimizar las propiedades de solubilidad o para hacerlos más adecuados como un agente terapéutico. Los análogos de dichos polipéptidos incluyen los que contienen residuos distintos de L-aminoácidos de origen natural, por ejemplo, D-aminoácidos o aminoácidos sintéticos de origen no natural. Los péptidos de la invención no se limitan a los productos de cualquiera de los procesos ejemplares
50 específicos enumerados en el presente documento.

55 En otra realización, las proteínas de fusión quiméricas de la presente invención se sintetizan usando metodología de ADN recombinante. En general, esto implica crear una secuencia de ADN que codifique la proteína de fusión, poner el ADN en un cassette de expresión, tal como el plásmido de la presente invención, bajo el control de un elemento promotor/regulador particular, y expresar la proteína. El ADN que codifica una proteína de fusión de la presente invención se prepara, en otra realización, mediante cualquier método adecuado, incluyendo, por ejemplo, la clonación y restricción de las células apropiadas o síntesis química directa por métodos tales como el método de fosfotriéster de Narang y col. (1979, Meth. Enzymol. 68: 90-99); el método de fosfodiéster de Brown y col. (1979, Meth. Enzymol 68: 109-151); el método de dietilfosforamidita de Beaucage y col. (1981, Tetra. Lett., 22: 1859-1862); y el método de soporte sólido de la patente de Estados Unidos N° 4.458.066.

60 La síntesis química produce un oligonucleótido monocatenario. Se convierte, en otra realización, en ADN bicatenario

por hibridación con una secuencia complementaria, o por polimerización con una ADN polimerasa usando la única hebra como una plantilla. Un experto en la técnica reconocerá que mientras que la síntesis de ADN se limita a secuencias de aproximadamente 100 bases, pueden obtenerse secuencias mayores mediante la ligación de secuencias más cortas.

5

En otra realización, "ácido nucleico aislado" incluye una secuencia de ARN o una secuencia de ADN que codifica una proteína de fusión de la invención, y cualquier forma modificada de la misma, incluyendo modificaciones químicas del ADN o el ARN que hacen la secuencia nucleotídica más estable cuando está libre de células o cuando se asocia a una célula. Las modificaciones químicas de nucleótidos también pueden usarse para potenciar la eficacia con la que una secuencia nucleotídica se recoge por una célula o la eficacia con la que se expresa en una célula. Dichas modificaciones se detallan en otra parte en el presente documento. Cualquier y todas las combinaciones de modificaciones de las secuencias nucleotídicas se contemplan en la presente invención.

En otra realización, la presente invención proporciona un ácido nucleico aislado que codifica un péptido KLK3 unido de forma operativa a una secuencia LLO no hemolítica, donde el ácido nucleico aislado comprende adicionalmente una secuencia promotora/reguladora, de tal forma que el ácido nucleico es capaz preferiblemente de dirigir la expresión de la proteína codificada por el ácido nucleico. Por lo tanto, la invención incluye vectores de expresión y métodos para la introducción de ADN exógeno en células con expresión concomitante del ADN exógeno en las células, tales como los descritos, por ejemplo, en Sambrook y col. (1989, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York), y en Ausubel y col. (1997, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Nueva York).

En otra realización, un nucleótido de la presente invención está unido de forma operativa a una secuencia promotora/reguladora que impulsa la expresión del péptido codificado en la cepa de *Listeria*. Las secuencias promotoras/reguladoras útiles para activar la expresión constitutiva de un gen se conocen bien en la técnica e incluyen, pero sin limitación, por ejemplo, los promotores P_{HlyA}, P_{ActA} y p60 de *Listeria*, el promotor bac de *Streptococcus*, el promotor *sglA* de *Streptomyces griseus*, y el promotor *phaZ* de *B. thuringiensis*. Por lo tanto, se apreciará que la invención incluye el uso de cualquier secuencia promotora/reguladora que sea capaz de impulsar la expresión de la proteína deseada unida de forma operativa a la misma.

30

La expresión de un péptido KLK3 unido de forma operativa a una secuencia LLO no hemolítica usando un vector permite el aislamiento de grandes cantidades de proteína producida de forma recombinante. Está dentro de la capacidad del experto escoger secuencias promotoras/reguladoras particulares y unir de forma operativa aquellas secuencias promotoras/reguladoras a una secuencia de ADN que codifica un polipéptido deseado. Dicha tecnología se conoce bien en la técnica y se describe, por ejemplo, en Sambrook y col. (1989, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York), y en Ausubel y col. (1997, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Nueva York).

En otra realización, la presente invención proporciona un vector que comprende un ácido nucleico aislado que codifica un péptido KLK3 unido de forma operativa a una secuencia LLO no hemolítica. La incorporación de un ácido nucleico deseado a un vector y la elección de vectores se conoce bien en la técnica como se describe en, por ejemplo, Sambrook y col. (1989, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York), y en Ausubel y col. (1997, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Nueva York).

En otra realización, la presente invención proporciona células, virus, provirus y similares, que contienen dichos vectores. Los métodos para producir células que comprenden vectores y/o ácidos nucleicos exógenos se conocen bien en la técnica. Véase, por ejemplo, Sambrook y col. (1989, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York), y en Ausubel y col. (1997, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Nueva York).

50

En otra realización, los ácidos nucleicos que codifican un péptido KLK3 unido de forma operativa a una secuencia LLO no hemolítica se donan en un vector plasmídico. En otra realización, una cepa recombinante de *Listeria* se transforma con el vector plasmídico.

Una vez armado con la presente invención, es fácilmente evidente para un experto en la técnica que pueden obtenerse otros ácidos nucleicos que codifican un péptido KLK3 unido de forma operativa a una secuencia LLO no hemolítica siguiendo los procedimientos descritos en el presente documento en la sección de detalles experimentales para la generación de otras proteínas de fusión como se desvela en el presente documento (por ejemplo, mutagénesis de sitio dirigido, mutaciones por desplazamiento de marco, y similares), y los procedimientos en la técnica.

60

Se conocen bien en la técnica métodos para la generación de formas derivadas o variantes de proteínas de fusión, e incluyen, entre otros, usar una metodología de ADN recombinante bien conocida en la técnica, tal como, por ejemplo, la descrita en Sambrook y col. (1989, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York) y Ausubel y col. (1997, *Current Protocols in Molecular Biology*, Green & Wiley, Nueva York), y en otra parte en el presente documento.

En otra realización, la presente invención proporciona un ácido nucleico que codifica un péptido KLK3 unido de forma operativa a una secuencia LLO no hemolítica, donde un ácido nucleico que codifica un polipéptido marcador se une covalentemente al mismo. Es decir, la invención incluye un ácido nucleico quimérico en el que la secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido marcador se une covalentemente al ácido nucleico que codifica una proteína que contiene el péptido KLK3. Dichos péptidos marcadores se conocen bien en la técnica e incluyen, por ejemplo, proteína verde fluorescente (GFP), myc, myc-piruvato cinasa (myc-PK), His₆, proteína de unión a maltosa (MBP), un polipéptido marcador de hemaglutinina del virus influenza, un polipéptido marcador flag (FLAG), y un polipéptido marcador de glutatión-S-transferasa (GST). Sin embargo, la invención no debe interpretarse de ningún modo como limitada a los ácidos nucleicos que codifican los polipéptidos marcadores que se han enumerado anteriormente. Por el contrario, cualquier secuencia de ácido nucleico que codifique un polipéptido que puede funcionar de una manera sustancialmente similar a estos polipéptidos marcadores debe interpretarse como incluida en la presente invención.

En otra realización, la presente invención proporciona un péptido de fusión KLK3 con una mejor inmunogenicidad. Es decir, como los datos desvelados en el presente documento demuestran, un péptido KLK3 fusionado a una proteína LLO no hemolítica truncada, al administrarse a un animal, da como resultado una eliminación de los tumores existentes y la inducción de linfocitos citotóxicos específicos de antígeno capaces de infiltrar células tumorales o infectadas. Al disponer de la presente divulgación, y los usos médicos y composiciones que se desvelan en el presente documento, el experto en la técnica reconocerá fácilmente que la presente invención es idónea para el tratamiento y/o prevención de una multitud de enfermedades.

En otra realización, se usa un plásmido disponible en el mercado en la presente invención. Dichos plásmidos están disponibles a partir de una diversas de fuentes, por ejemplo, Invitrogen (Carlsbad, Calif.), Stratagene (La Jolla, Calif.), Clontech (Palo Alto, Calif.), o pueden construirse usando métodos bien conocidos en la técnica. Un plásmido disponible en el mercado tal como pET (Gibbstown, NJ), que es un vector de expresión procariota con un origen de replicación procariota y elementos promotores/reguladores para facilitar la expresión en un organismo procariota.

La presente invención comprende adicionalmente transformar tal cepa de *Listeria* con un plásmido que comprende (a) un péptido KLK3; y (b) un ácido nucleico aislado que codifica una proteína LLO truncada. En otra realización, si una cepa de la vacuna de LM comprende una delección en el gen *prfA* o el gen *actA*, el plásmido comprende un gen *prfA* o *actA* para complementar la mutación, restaurando así la función para la cepa de la vacuna de *L. monocytogenes*. Como se describe en otra parte en el presente documento, se conocen bien en la técnica métodos para transformar bacterias, e incluyen métodos basados en células competentes de cloruro cálcico, métodos de electroporación, transducción mediada por bacteriófagos y técnicas de transformación química y física (de Boer y col., 1989, *Cell* 56: 641-649; Miller y col., 1995, *FASEB J.*, 9: 190-199; Sambrook y col. 1989, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York; Ausubel y col., 1997, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Nueva York; Gerhardt y col., eds., 1994, *Methods for General and Molecular Bacteriology*, American Society for Microbiology, Washington, D.C.; Miller, 1992, *A Short Course in Bacterial Genetics*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.).

El plásmido de la presente invención comprende, en otra realización, una secuencia promotora/reguladora unida operativamente a un gen que codifica una proteína de fusión.

Los plásmidos y otros vectores de expresión útiles en la presente invención se describen en otra parte en el presente documento, y pueden incluir dichas características como una secuencia promotora/reguladora, un origen de replicación para bacterias gram negativas y/o gram positivas, y un ácido nucleico aislado que codifica una proteína de fusión. Adicionalmente, el ácido nucleico aislado que codifica una proteína de fusión tendrá su propio promotor adecuado para impulsar la expresión de tal ácido nucleico aislado. Los promotores útiles para impulsar la expresión en un sistema bacteriano se conocen bien en la técnica, e incluyen bacteriófago lambda, el promotor bla del gen beta-lactamasa de pBR322, y el promotor CAT del gen cloranfenicol acetil transferasa de pBR325. Los ejemplos adicionales de promotores procariotas incluyen los promotores principales derecho e izquierdo del bacteriófago lambda (P_L y P_R), los promotores *trp*, *recA*, *lacZ*, *lacd* y *gal* de *E. coli*, la alfa-amilasa (Ulmanen y col., 1985, *J. Bacteriol.* 162: 176-182) y los promotores S28-específicos de *B. subtilis* (Gilman y col., 1984 *Gene* 32: 11-20), los promotores de los bacteriófagos de *Bacillus* (Gryczan, 1982, En: *The Molecular Biology of the Bacilli*, Academic Press, Inc., Nueva York), y promotores de *Streptomyces* (Ward y col., 1986, *Mol. Gen. Genet.* 203: 468-

478). Se revisan promotores procariotas adicionales contemplados en la presente invención en, por ejemplo, Glick (1987, J. Ind. Microbiol. 1: 277-282); Cenatiempo, (1986, Biochimie, 68: 505-516); y Gottesman, (1984, Ann. Rev. Genet. 18: 415-442). Los ejemplos adicionales de elementos promotores/reguladores contemplados en la presente invención incluyen, pero sin limitación, el promotor prfA de *Listerial* (GenBank Acc. N° Y07639), el promotor hly 5 *Listerial* (GenBank Acc. N° X15127), y el promotor p60 *Listerial* (GenBank Acc. N° AY126342), o fragmentos de los mismos.

En otra realización, una cepa de *Listeria* de la presente invención contiene un gen integrado que codifica un péptido que comprende un péptido de fusión KLK3.

10 En otra realización, una cepa de *Listeria* de la presente invención se crea usando un vector de integración de sitio específico. En otra realización, una cepa de *Listeria* que contiene un gen integrado se crea usando recombinación homóloga. En otra realización, una cepa de *Listeria* que contiene un gen integrado se crea usando cualquier otro método conocido en la técnica de integración de un gen en el cromosoma de *Listeria*.

15 En otra realización, el vector de integración comprende un sitio attPP' de PSA. En otra realización, el vector de integración comprende un gen que codifica una PSA integrasa. En otra realización, el vector de integración comprende un sitio attPP' de U153. En otra realización, el vector de integración comprende un gen que codifica una U153 integrasa. En otra realización, el vector de integración comprende un sitio attPP' de A118. En otra realización, 20 el vector de integración comprende un gen que codifica una A118 integrasa. En otra realización, el vector de integración comprende cualquier otro sitio attPP' conocido en la técnica. En otra realización, el vector de integración comprende cualquier otro fago integrasa conocido en la técnica.

En otra realización, una cepa de *Listeria* de los métodos y composiciones de la presente invención contiene una 25 mutación o auxotrofia en un gen metabólico. En otra realización, una cepa de *Listeria* de los métodos y composiciones de la presente invención comprende adicionalmente una mutación en el gen endógeno ActA. En otra realización, un plásmido que lleva un péptido de fusión KLK3 comprende un gen metabólico que complementa la mutación o auxotrofia. En otra realización, un vector de integración que codifica el péptido de fusión KLK3 o un constructo usado para la integración en el cromosoma de *Listeria* contiene un gen que complementa la mutación o 30 auxotrofia. En otra realización, se usa el gen metabólico para la selección en lugar de un gen de resistencia a antibióticos. En otra realización, el gen metabólico se usa para la selección además de un gen de resistencia a antibióticos.

En otra realización, el gen metabólico es un gen que codifica una enzima del metabolismo de aminoácidos. En otra 35 realización, la enzima metabólica es una enzima alanina racemasa (dal). En otra realización, la enzima metabólica es una enzima D-aminoácido transferasa (dat).

En otra realización, la enzima metabólica metaboliza un aminoácido (AA) que se usa para un proceso de crecimiento bacteriano. En otra realización, el producto AA se usa para un proceso de replicación. En otra realización, el 40 producto AA se usa para la síntesis de la pared celular. En otra realización, la enzima metabólica cataliza la formación de un aminoácido usado para la síntesis de la pared celular. En otra realización, la enzima metabólica es una enzima del metabolismo de aminoácidos. En otra realización, el producto AA se usa para la síntesis de proteínas. En otra realización, el producto AA se usa para el metabolismo de un ácido graso. En otra realización, el producto AA se usa para cualquier otro proceso de crecimiento o replicación conocido en la técnica.

45 En otra realización, la enzima metabólica cataliza la formación de un AA usado en la síntesis de la pared celular. En otra realización, la enzima metabólica cataliza la síntesis de un AA usado en la síntesis de la pared celular. En otra realización, la enzima metabólica está implicada en la síntesis de un AA usado en la síntesis de la pared celular. En otra realización, el AA se usa en la biogénesis de la pared celular.

50 En otra realización, la enzima metabólica es una enzima sintética para ácido D-glutámico, un componente de la pared celular.

En otra realización, la enzima metabólica se codifica por un gen de la alanina racemasa (dal). La síntesis de ácido D- 55 glutámico se controla en parte por el gen dal, que está implicado en la conversión de D-glu + pyr a alfa- α -cetoglutarato + D-ala, y la reacción inversa.

En otra realización, la proteína dal de los métodos y composiciones de la presente invención tiene la secuencia de SEQ ID No: 56 (GenBank Acceso N°: AF038438). En otra realización, la proteína dal es homóloga a la SEQ ID No: 60 56. En otra realización, la proteína dal es una variante de SEQ ID No: 56. En otra realización, la proteína dal es una isoforma de SEQ ID No: 56. En otra realización, la proteína dal es un fragmento de SEQ ID No: 56. En otra

realización, la proteína dal es un fragmento de un homólogo de SEQ ID No: 56. En otra realización, la proteína dal es un fragmento de una variante de SEQ ID No: 56. En otra realización, la proteína dal es un fragmento de una isoforma de SEQ ID No: 56.

5 En otra realización, la proteína dal es cualquier otra proteína dal de *Listeria* conocida en la técnica. En otra realización, la proteína dal es cualquier proteína dal de *Bacillus subtilis* conocida en la técnica. En otra realización, la proteína dal es cualquier otra proteína dal gram-positiva conocida en la técnica. En otra realización, la proteína dal es cualquier otra proteína dal conocida en la técnica.

10 La proteína dat de los métodos y composiciones de la presente invención se codifica, en otra realización, por la secuencia de SEQ ID No: 57 (GenBank Acceso N°: AF038439). En otra realización, la proteína dat es homóloga a SEQ ID No: 57. En otra realización, la proteína dat es una variante de SEQ ID No: 57. En otra realización, la proteína dat es una isoforma de SEQ ID No: 57. En otra realización, la proteína dat es un fragmento de SEQ ID No: 57. En otra realización, la proteína dat es un fragmento de un homólogo de SEQ ID No: 57. En otra realización, la proteína
15 dat es un fragmento de una variante de SEQ ID No: 57. En otra realización, la proteína dat es un fragmento de una isoforma de SEQ ID No: 57.

En otra realización, la proteína dat es cualquier otra proteína dat de *Listeria* conocida en la técnica. En otra realización, la proteína dat es cualquier otra proteína dat gram-positiva conocida en la técnica. En otra realización, la
20 proteína dat es cualquier otra proteína dat conocida en la técnica.

En otra realización, la enzima metabólica es un gen de la síntesis de ácido D-glutámico. En otra realización, la enzima metabólica se codifica por dga. En otra realización, la enzima metabólica se codifica por un gen alr (alanina racemasa). En otra realización, la enzima metabólica es cualquier otra enzima conocida en la técnica que esté
25 implicada en la síntesis de alanina.

En otra realización, la enzima metabólica se codifica por serC, una fosfoserina aminotransferasa. En otra realización, la enzima metabólica se codifica por asd (aspartato beta-semialdehído deshidrogenasa), implicado en la síntesis del ácido diaminopimélico que constituye la pared celular. En otra realización, la enzima metabólica se codifica por
30 gsaB-glutamato-1-semialdehído aminotransferasa, que cataliza la formación de 5-aminolevulinato a partir de (S)-4-amino-5-oxopentanoato. En otra realización, la enzima metabólica se codifica por HemL, que cataliza la formación de 5-aminolevulinato a partir de (S)-4-amino-5-oxopentanoato. En otra realización, la enzima metabólica se codifica por aspB, un aspartato aminotransferasa que cataliza la formación de oxalozcetato y L-glutamato a partir de L-aspartato y 2-oxoglutarato. En otra realización, la enzima metabólica se codifica por argF-1, implicado en la
35 biosíntesis de arginina. En otra realización, la enzima metabólica se codifica por aroE, implicado en la biosíntesis de aminoácidos. En otra realización, la enzima metabólica se codifica por aroB, implicado en la biosíntesis de 3-deshidroquinato. En otra realización, la enzima metabólica se codifica por aroD, implicado en una biosíntesis de aminoácidos. En otra realización, la enzima metabólica se codifica por aroC, implicado en la biosíntesis de aminoácidos. En otra realización, la enzima metabólica se codifica por hisB, implicado en la biosíntesis de histidina.
40 En otra realización, la enzima metabólica se codifica por hisD, implicado en la biosíntesis de histidina. En otra realización, la enzima metabólica se codifica por hisG, implicado en la biosíntesis de histidina. En otra realización, la enzima metabólica se codifica por metX, implicado en la biosíntesis de metionina. En otra realización, la enzima metabólica se codifica por proB, implicado en la biosíntesis de prolina. En otra realización, la enzima metabólica se codifica por argR, implicado en la biosíntesis de arginina. En otra realización, la enzima metabólica se codifica por
45 argJ, implicado en la biosíntesis de arginina. En otra realización, la enzima metabólica se codifica por thil, implicado en la biosíntesis de tiamina. En otra realización, la enzima metabólica se codifica por LMOF2365_1652, implicado en la biosíntesis de triptófano. En otra realización, la enzima metabólica se codifica por aroA, implicado en la biosíntesis de triptófano. En otra realización, la enzima metabólica se codifica por ilvD, implicado en la biosíntesis de valina e isoleucina. En otra realización, la enzima metabólica se codifica por ilvC, implicado en la biosíntesis de valina e
50 isoleucina. En otra realización, la enzima metabólica se codifica por leuA, implicado en la biosíntesis de leucina. En otra realización, la enzima metabólica se codifica por dapF, implicado en la biosíntesis de lisina. En otra realización, la enzima metabólica se codifica por thrB, implicado en la biosíntesis de treonina (todos GenBank N° de Acceso NC_002973).

55 En otra realización, la enzima metabólica es un ARNt sintetasa. En otra realización, la enzima metabólica se codifica por el gen trpS, que codifica triptofanil-ARNt sintetasa. En otra realización, la enzima metabólica es cualquier otro ARNt sintetasa conocido en la técnica.

En otra realización, la bacteria de la cepa huésped es $\Delta(\text{trpS aroA})$, y ambos marcadores se incluyen en el vector de
60 integración.

En otra realización, la enzima metabólica se codifica por murE, implicado en la síntesis de ácido diaminopimélico (GenBank Acceso N°: NC_003485).

5 En otra realización, la enzima metabólica se codifica por LMOF2365_2494, implicado en la biosíntesis de ácido teicoico.

10 En otra realización, la enzima metabólica se codifica por WecE (proteína de biosíntesis del lipopolisacárido rffA; GenBank Acceso N°: AE014075.1). En otra realización, la enzima metabólica se codifica por amiA, una N-acetilmuramoyl-L-alanina amidasa. En otra realización, la enzima metabólica es aspartato aminotransferasa. En otra realización, la enzima metabólica es histidinol-fosfato aminotransferasa (GenBank N° de Acceso NP_466347). En otra realización, la enzima metabólica es la proteína de glicosilación del ácido teicoico de la pared celular GtcA.

15 En otra realización, la enzima metabólica es una enzima sintética para un componente o precursor de peptidoglicano. En otra realización, el componente es UDP-N-acetilmuramyl-pentapéptido. En otra realización, el componente es UDP-N-acetilglucosamina. En otra realización, el componente es MurNAc-(pentapéptido)-pirofosforil-undecaprenol. En otra realización, el componente es GlcNAc- Δ -(1,4)-MurNAc-(pentapéptido)-pirofosforil-undecaprenol. En otra realización, el componente es cualquier otro componente o precursor de peptidoglicano conocido en la técnica.

20 En otra realización, la enzima metabólica se codifica por murG. En otra realización, la enzima metabólica se codifica por murD. En otra realización, la enzima metabólica se codifica por murA-1. En otra realización, la enzima metabólica se codifica por murA-2 (todos expuestos en GenBank N° de Acceso NC_002973). En otra realización, la enzima metabólica es cualquier otra enzima sintética para un componente o precursor de peptidoglicano.

25 En otra realización, la enzima metabólica es una trans-glicosilasa. En otra realización, la enzima metabólica es trans-peptidasa. En otra realización, la enzima metabólica es una carboxipeptidasa. En otra realización, la enzima metabólica es cualquier otra clase de enzima metabólica conocida en la técnica.

30 En otra realización, la enzima metabólica es cualquier otra enzima metabólica de *Listeria monocytogenes* conocida en la técnica.

En otra realización, la enzima metabólica es cualquier otra enzima metabólica de *Listeria* conocida en la técnica.

35 En otra realización, la enzima metabólica es cualquier otra enzima metabólica de bacterias Gram-positivas conocida en la técnica.

En otra realización, la enzima metabólica es cualquier otra enzima metabólica conocida en la técnica.

40 En otra realización, el vector de integración es cualquier otro vector de integración específico de sitio conocido en la técnica que sea capaz de infectar *Listeria*.

45 En otra realización, la presente invención proporciona composiciones para potenciar la inmunogenicidad de un antígeno KLK3 a través de la fusión del antígeno a una forma truncada no hemolítica de LLO (" Δ LLO"), tal como SEQ ID NO: 1 de LLO. La presente invención proporciona adicionalmente métodos y composiciones para potenciar la inmunogenicidad de un antígeno KLK3 fusionando el antígeno a una proteína LLO truncada. Como se demuestra por los datos desvelados en el presente documento, un antígeno fusionado a una proteína ActA provoca una respuesta inmune que limpia los tumores existentes y da como resultado la inducción de linfocitos citotóxicos específicos de antígeno.

50 En otra realización, las proteínas de fusión de la presente invención se producen de forma recombinante a través de la transcripción y la traducción, en una bacteria, de un plásmido o molécula nucleotídica que codifica tanto un péptido KLK3 como un péptido LLO. En otra realización, el plásmido o nucleótido se transcribe y/o se traduce *in vitro*. En otra realización, el antígeno se conjuga químicamente a la forma truncada de LLO que comprende la secuencia AA de tipo PEST de *L. monocytogenes* o una secuencia AA tipo PEST obtenida de otro organismo
55 procarionta. "Antígeno" se refiere, en otra realización, al producto génico KLK3 nativo o versiones truncadas de estos que incluyen epítopos de linfocitos T identificados. En otra realización, estas proteínas de fusión se incorporan entonces a vacunas para su administración a un sujeto, para invocar una respuesta inmune mejorada frente al antígeno de la proteína de fusión. En otras realizaciones, las proteínas de fusión de la presente invención se administran como vacunas de ADN, vacunas de ARN o vacunas de ARN replicante. Como será evidente para los
60 expertos en la técnica a partir de esta divulgación, las vacunas que comprenden las proteínas de fusión de la presente invención son particularmente útiles en la prevención y el tratamiento de enfermedades infecciosas y

neoplásicas.

La presente invención comprende adicionalmente una composición que comprende una vacuna de la presente invención adecuada para su administración a un animal o ser humano. La composición comprende, entre otras cosas, un vehículo farmacéuticamente aceptable. En otra realización, la composición incluye una cepa de vacuna de *Listeria* que comprende una proteína LLO truncada, o un fragmento de la misma, fusionada a un péptido KLK3, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

En la medida en que los siguientes Ejemplos no se refieren a la función de un péptido KLK3 y una proteína LLO, son ejemplos comparativos.

SECCIÓN DE DETALLES EXPERIMENTALES

EJEMPLO 1: LAS FUSIONES DE ANTÍGENO LLO INDUCEN INMUNIDAD ANTI-TUMORAL

15

MATERIALES Y MÉTODOS EXPERIMENTALES (EJEMPLOS 1-2)

Líneas celulares

20 El tumor TC-1 C57BL/6 singénico se inmortalizó con E6 y E7 de HPV-16 y se transformó con el oncogén c-Ha-ras. TC-1 expresa bajos niveles de E6 y E7 y es altamente tumorigénico. TC-1 creció en RPMI 1640, FCS al 10%, L-glutamina 2 mM, 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomidina, aminoácidos no esenciales 100 µM, piruvato sódico 1 mM, 2-ME50 micromolar (mM), 400 microgramos (mcg)/ml de G418, y medio 109 al 10% de la Colección Nacional de Cultivos Tipo a 37 °C con CO₂ al 10%. C3 es una célula embrionaria de ratón de ratones C57BL/6
25 inmortalizados con el genoma completo de HPV 16 y se transformaron con pEJ-ras. EL-4/E7 es el timoma EL-4 transducido retrovíricamente con E7.

Cepas de *L. monocytogenes* y propagación

30 Las cepas de *Listeria* usadas fueron Lm-LLO-E7 (gen de fusión hly-E7 en un sistema de expresión episomal; Figura 1A), Lm-E7 (cassette del gen E7 de copia única integrado en el genoma de *Listeria*), Lm-LLO-NP ("DP-L2028"; gen de fusión hly-NP en un sistema de expresión episomal), y Lm-Gag ("ZY-18"; cassette del gen Gag de HIV-1 de copia única integrado en el cromosoma).

35 Para generar pGG-55, el plásmido LLO-E7, E7 se amplificó por PCR usando los cebadores 5'-GGCTCGAGCATGGAGATACACC-3' (SEQ ID No: 8; el sitio XhoI está subrayado) y 5'-GGGGACTAGTTTATGGTTTCTGAGAACA-3' (SEQ ID No: 9; el sitio SpeI está subrayado) y se ligó a pCR2.1 (Invitrogen, San Diego, CA). E7 se extrajo de pCR2.1 por la digestión de XhoI/SpeI y se ligó a pDP-2028 (Ikonomidis G y col. Delivery of a viral antigen to the class I processing and presentation pathway by *Listeria monocytogenes*. J
40 Exp Med. 1994 Dec 1; 180(6): 2209-18). El gen de fusión hly-E7 y el factor de transcripción pluripotencial prfA se amplificaron y se subclonaron en pAM401, un plásmido lanzadera multicopia (Wirth R y col., J Bacteriol, 165: 831, 1986), generando pGG-55. El promotor hly y el fragmento génico se amplificaron usando los cebadores 5'-GGGGGCTAGCCCTCTTTGATTAGTATATTC-3' (SEQ ID No: 10; el sitio NheI está subrayado) y 5'-CTCCCTCGAGATCATAATTACTTCATC-3' (SEQ ID No: 11; el sitio XhoI está subrayado). El gen prfA se amplificó
45 por PCR usando los cebadores 5'-GACTACAAGGACGATGACCGACAAGTGATAACCCGGGATCTAAATAAATCCGTTT-3' (SEQ ID No: 12; el sitio XbaI está subrayado) y 5'-CCCCTCGACCAGCTCTTCTTGTTGAAG-3' (SEQ ID No: 13; el sitio Sall está subrayado).

En el plásmido resultante, pGG-55, el promotor hly impulsa la expresión de los primeros 441 AA del producto génico hly, incluyendo la secuencia de señal escindida posteriormente, que se une por el sitio XhoI al gen E7, produciendo un gen de fusión hly-E7 que se transcribe y se secreta como LLO-E7. Este fragmento LLO carece del extremo C hemolítico y tiene la secuencia expuesta en la SEQ ID No: 18. A continuación, se denomina como "ΔLLO", y es simplemente un ΔLLO ejemplar de las muchas que pueden usarse con los métodos y composiciones de la presente invención. Transformación de una cepa prfA-negativa de *Listeria*, XFL-7 (proporcionada por el Dr. Hao Shen,
55 University of Pennsylvania), con pGG-55 seleccionado para la retención del plásmido *in vivo* (figuras 1A-B).

Lm-E7 se generó introduciendo un cassette de expresión que contenía el promotor hly y la secuencia de señal que impulsaba la expresión y secreción de E7 en el dominio orfZ del genoma de LM. E7 se amplificó por PCR usando los cebadores 5'-GCGGATCCCATGGAGATACACCTAC-3' (SEQ ID No: 22; El sitio BamHI está subrayado) y 5'-GCTCTAGATTATGGTTTCTGAG-3' (SEQ ID No: 23; el sitio XbaI está subrayado). Después, E7 se ligó al vector lanzadera pZY-21. La cepa de LM 10403S se transformó con el plásmido resultante, pZY-21-E7, que incluye un

cassette de expresión insertado en el medio de una secuencia de 1,6 kb que corresponde al dominio orfX, Y, Z del genoma de LM. El dominio de homología permite la inserción del casete del gen E7 en el dominio orfZ mediante recombinación homóloga. Los clones se cribaron para la integración del cassette del gen E7 en el dominio orfZ. Se cultivaron bacterias en medio de infusión de cerebro-corazón con (Lm-LLO-E7 y Lm-LLO-NP) o sin (Lm-E7 y ZY-18) cloranfenicol (20 µg/ml). Las bacterias se congelaron en alícuotas a -80 °C. La expresión se verificó por transferencia de Western (figura 2)

Transferencia de Western

10 Las cepas de *Listeria* se cultivaron en medio Luria-Bertoni a 37 °C y se cosecharon a la misma densidad óptica medida a 600 nm. Los sobrenadantes se precipitaron con TCA y se suspendieron de nuevo en un tampón de muestra complementado con NaOH 0,1 N. Se cargaron cantidades idénticas de cada sedimento celular o cada sobrenadante precipitado con TCA sobre geles SDS-PAGE de Tris-glicina al 4-20% (NOVEX, San Diego, CA). Los geles se transfirieron a difluoruro de polivinilideno y se sondaron con un anticuerpo monoclonal anti-E7 (mAb) 15 (Zymed Laboratories, South San Francisco, CA), después se incubaron con Ab secundario anti-ratón conjugado con HRP (Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont, Reino Unido), se desarrollaron con reactivos de detección Amersham ECL y se expusieron a Hyperfilm (Amersham Pharmacia Biotech).

Medición del crecimiento tumoral

20 Los tumores se midieron cada dos días con calibres que abarcan los diámetros superficiales más cortos y más largos. La media de estas dos mediciones se representó como el diámetro tumoral medio en milímetros frente a diversos puntos temporales. Los ratones se sacrificaron cuando el diámetro del tumor alcanzó 20 mm. Las mediciones del tumor para cada punto temporal se muestran únicamente para los ratones supervivientes.

Efectos de los recombinantes de *Listeria* sobre el crecimiento tumoral establecido

25 Ratones C57BL/6 de seis a ocho semanas de edad (Charles River) recibieron 2×10^5 células TC-1 s.c. sobre el costado izquierdo. Una semana después de la inoculación del tumor, los tumores habían alcanzado un tamaño palpable de 4-5 mm de diámetro. Después, grupos de 8 ratones se trataron con 0,1 DL₅₀ i.p. de Lm-LLO-E7 (10^7 UFC), Lm-E7 (10^6 UFC), Lm-LLO-NP (10^7 UFC) o Lm-Gag (5×10^5 UFC) los días 7 y 14.

Ensayo de liberación de ⁵¹Cr

35 Ratones C57BL/6, de 6-8 semanas de edad, se inmunizaron i.p. con 0,1 DL₅₀ de Lm-LLO-E7, Lm-E7, Lm-LLO-NP o Lm-Gag. Diez días después de la inmunización los bazos se obtuvieron. Los esplenocitos se establecieron en cultivo con células TC-1 irradiadas (100:1, esplenocitos:TC-1) como células nutrientes; se reforzaron *in vitro* durante 5 días y después se usaron en un ensayo de liberación de ⁵¹Cr convencional, usando las siguientes dianas: EL-4, EL-4/E7 o EL-4 pulsadas con el péptido E7 H-2b (RAHYNIVTF). Las proporciones celulares E:T, realizadas por triplicado, 40 fueron 80:1, 40:1, 20:1, 10:1, 5:1 y 2.5:1. Después de una incubación de 4 h a 37 °C, las células se granularon, y se eliminaron 50 µl de sobrenadante de cada pocillo. Las muestras se ensayaron con un contador de centelleo Wallac 1450 (Gaithersburg, MD). El porcentaje de lisis específica se determinó como [(conteos experimentales por minuto - conteos espontáneos por minuto)/(conteos totales por minuto - conteos espontáneos por minuto)] x 100.

Proliferación específica de TC-1

Se inmunizaron ratones C57BL/6 con 0,1 DL₅₀ y se reforzaron por inyección i.p. 20 días después con 1 LD₅₀ de Lm-LLO-E7, Lm-E7, Lm-LLO-NP o Lm-Gag. Seis días después de la dosis de refuerzo, se recogieron los bazos de los ratones inmunizados y sin tratar. Los esplenocitos se establecieron en cultivo a 5×10^5 /pocillo en placas de fondo 50 plano de 96 pocillos con $2,5 \times 10^4$, $1,25 \times 10^4$, 6×10^3 o 3×10^3 células TC-1 irradiadas/pocillo como una fuente de E7 Ag, o sin células TC-1 o con 10 µg/ml de Con A. Las células se pulsaron 45 h más tarde con 0,5 µCi de [³H]timidina/pocillo. Las placas se cosecharon 18 h más tarde usando una cosechadora Tomtec harvester 96 (Orange, CT), y la proliferación se evaluó con un contador de centelleo Wallac 1450. El cambio en conteos por minuto se calculó como conteos experimentales por minuto - conteo no Ag por minuto.

Análisis por citometría de flujo

Se inmunizaron ratones C57BL/6 por vía intravenosa (i.v.) con 0,1 DL₅₀ de Lm-LLO-E7 o Lm-E7 y se reforzaron 30 días más tarde. La citometría de flujo de tres colores para CD8 (53-6.7, PE conjugado), ligando CD62 (CD62L; MEL- 60 14, APC conjugado) y el tetrámero H-2Db de E7 se realizó usando un citómetro de flujo FACSCalibur® con el software CellQuest® (Becton Dickinson, Mountain View, CA). Los esplenocitos recuperados 5 días después de la

dosis de refuerzo se tiñeron a temperatura ambiente (ta) con tetrámeros H-2Db cargados con el péptido E7 (RAHYNIVTF) o un péptido de control (HIV-Gag). Los tetrámeros se usaron en una dilución 1/200 y se proporcionaron por el Dr. Larry R. Pease (Mayo Clinic, Rochester, MN) y por el National Institute of Allergy and Infectious Diseases Tetramer Core Facility y los National Institutes of Health AIDS Research and Reference Reagent Program. Se analizaron el tetrámero⁺, las células CD8⁺, CD62L^{baja}.

Reducción de los componentes inmunes específicos

Las células CD8⁺, las células CD4⁺ e IFN se redujeron en ratones portadores de TC-1 inyectando al ratón 0,5 mg por ratón de mAb: 2,43, GK1.5 o xmg1.2, respectivamente, los días 6, 7, 8, 10, 12 y 14 después de la estimulación del tumor. Las poblaciones de células CD4⁺ y CD8⁺ se redujeron en un 99% (análisis por citometría de flujo). Las células CD25⁺ se redujeron por inyección i.p. de 0,5 mg/ratón de mAb anti-CD25 (PC61, proporcionado por Andrew J. Caton) los días 4 y 6. El TGF se redujo por inyección i.p. del mAb anti-TGF (2G7, proporcionado por H. I. Levitsky), en ratones portadores de TC-1 los días 6, 7, 8, 10, 12, 14, 16, 18 y 20. Los ratones se trataron con 10⁷ de Lm-LLO-E7 o Lm-E7 el día 7 tras la estimulación del tumor.

Transferencia adoptiva

Los ratones C57BL/6 donantes se inmunizaron y se reforzaron 7 días más tarde con 0,1 DL₅₀ de Lm-E7 o Lm-Gag. Los esplenocitos donantes se recogieron y se pasaron sobre columnas de lana de nylon para enriquecer los linfocitos T. Los linfocitos T CD8⁺ se redujeron *in vitro* mediante incubación con 0,1 µg de mAb 2.43 anti-CD8 durante 30 min a ta. Después, las células marcadas se trataron con complemento de conejo. Los esplenocitos donantes fueron >60% de linfocitos T CD4⁺ (análisis por citometría de flujo). Los ratones receptores portadores del tumor TC-1 se inmunizaron con 0,1 DL₅₀ 7 días después de la estimulación del tumor. Los esplenocitos donantes enriquecidos con CD4⁺ (10⁷) se transfirieron 9 días después de la estimulación del tumor a los ratones receptores por inyección i.v.

Experimento B16F0-Ova

A 24 ratones C57BL/6 se les inoculó 5 x 10⁵ células B16F0-Ova. Los días 3, 10 y 17, grupos de 8 ratones se inmunizaron con 0,1 DL₅₀ de Lm-OVA (10⁶ ufc), Lm-LLO-OVA (10⁸ ufc) y ocho animales se dejaron sin tratar.

Estadísticas

Para la comparación de los diámetros tumorales, se determinaron la media y la DE del tamaño tumoral para cada grupo, y la importancia estadística se determinó mediante la prueba t de Student. p≤0,05 se consideró insignificante.

RESULTADOS

Lm-E7 y Lm-LLO-E7 se compararon para comprobar su capacidad de afectar al crecimiento de TC-1. Se establecieron tumores subcutáneos sobre el costado izquierdo de los ratones C57BL/6. Siete días después, los tumores habían alcanzado un tamaño palpable (4-5 mm). Los ratones se vacunaron los días 7 y 14 con 0,1 DL₅₀ de Lm-E7, Lm-LLO-E7, o, como controles, Lm-Gag y Lm-LLO-NP. Lm-LLO-E7 indujo una regresión completa del 75% de los tumores TC-1 establecidos, mientras que en los otros dos ratones en el grupo controló su crecimiento tumoral (figura 3A). En cambio, la inmunización Lm-E7 y Lm-Gag no indujo una regresión tumoral. Este experimento se repitió múltiples veces, siempre con resultados muy similares. Además, se consiguieron resultados similares para Lm-LLO-E7 en protocolos de inmunización diferentes. En otro experimento, una única inmunización fue capaz de curar a los ratones de los tumores TC-1 establecidos de 5 mm.

En otros experimentos, se obtuvieron resultados similares con dos líneas celulares de tumor de expresión de E7 diferentes: C3 y EL-4/E7. Para confirmar la eficacia de la vacunación con Lm-LLO-E7, los animales a los que se les había eliminado los tumores se estimularon de nuevo con células tumorales TC-1 o EL-4/E7 el día 60 o el día 40, respectivamente. Los animales inmunizados con Lm-LLO-E7 permanecieron sin tumor hasta la finalización del experimento (el día 124 en el caso de TC-1 y el día 54 para EL-4/E7).

Se realizó un experimento similar con el antígeno de ovalbumina de pollo (OVA). Los ratones se inmunizaron con Lm-OVA o Lm-LLO-OVA, después se estimularon con un timoma EL-4 creado por ingeniería para expresar OVA o la línea celular de melanoma murino muy agresivo B16F0-Ova, que tiene una expresión MHC de clase I muy baja. En ambos casos, Lm-LLO-OVA, pero no Lm-OVA, indujo la regresión de tumores establecidos. Por ejemplo, al final del experimento con B16F0 (día 25), todos los ratones en el grupo sin tratar y el grupo Lm-OVA habían muerto. Todos los ratones del grupo Lm-LLO-OVA estaban vivos, y el 50% de ellos no tenía tumores (figura 3B).

Por lo tanto, la expresión de un gen antigénico como una proteína de fusión con Δ LLO potencia la inmunogenicidad del antígeno.

5 EJEMPLO 2: EL TRATAMIENTO CON LM-LLO-E7 PROVOCA UNA PROLIFERACIÓN DE ESPLENOCITOS ESPECÍFICA DE TC-1

Para medir la inducción de linfocitos T por Lm-E7 con Lm-LLO-E7, se evaluaron las respuestas proliferativas específicas de TC-1 de esplenocitos de ratones inmunizados con rLm, una medición de la inmunocompetencia específica de antígeno. Los esplenocitos de ratones inmunizados con Lm-LLO-E7 proliferaron cuando se expusieron a células TC-1 irradiadas como una fuente de E7, en el esplenocito: relaciones TC-1 de 20:1, 40:1, 80:1 y 160:1 (figura 4). Por el contrario, los esplenocitos de ratones inmunizados con Lm-E7 y rLm de control mostraron únicamente niveles de fondo de proliferación.

15 EJEMPLO 3: LA FUSIÓN DE NP A LLO POTENCIA SU INMUNOGENICIDAD

MATERIALES Y MÉTODOS EXPERIMENTALES

Se preparó Lm-LLO-NP como se representa en la figura 1, excepto que la nucleoproteína (NP) de influenza reemplazó E7 como el antígeno. 32 ratones BALB/c se inocularon con 5×10^5 células tumorales RENCA-NP. RENCA-NP es un carcinoma de células renales transducido retrovíricamente con nucleoproteína NP de influenza (descrito en la patente de Estados Unidos N° 5.830.702, que se incorpora en el presente documento por referencia). Después de haber crecido los tumores macroscópicos palpables, el día 10 8 animales en cada grupo se inmunizaron i.p. con 0,1 DL₅₀ del vector de *Listeria* respectivo. Los animales recibieron una segunda inmunización una semana más tarde.

RESULTADOS

Con el fin de confirmar la generalidad del hallazgo de que la fusión de LLO a un antígeno confiere una inmunidad mejorada, se construyeron Lm-LLO-NP y Lm-NP (isogénicos con los vectores Lm-E7, pero expresando el antígeno de influenza), y los vectores se compararon para evaluar su capacidad para inducir una regresión tumoral, con Lm-Gag (isogénico con Lm-NP excepto para el antígeno expresado) como control negativo. Como se representa en la figura 5, 6/8 de los ratones que recibieron Lm-LLO-NP no tenían tumores. Por el contrario, únicamente 1/8 y 2/8 ratones en los grupos de Lm-Gag y Lm-NP, respectivamente, estaban libres de tumores. Todos los ratones en el grupo sin tratar tuvieron tumores grandes o habían muerto para el día 40. Por lo tanto, las cepas LLO que expresan NP y fusiones LLO-NP son inmunogénicas. Se consiguieron resultados similares para Lm-LLO-E7 en protocolos de inmunización diferentes. Adicionalmente, sólo una única inmunización demostró curar ratones de TC-1 establecido con un diámetro de 5 mm.

40 EJEMPLO 4: LA POTENCIACIÓN DE LA INMUNOGENICIDAD POR FUSIÓN DE UN ANTÍGENO A LLO NO REQUIERE UN VECTOR DE LISTERIA

MATERIALES Y MÉTODOS EXPERIMENTALES

45 *Construcción de Vac-SigE7Lamp*

La cepa WR de vaccinia se usó como el receptor y el gen de fusión se extrajo del plásmido *Listerial* y se insertó en pSC11 bajo el control del promotor p75. Este vector se escogió debido a que es el vector de transferencia usado para los constructos de vaccinia Vac-SigE7Lamp y Vac-E7 y, por lo tanto, permitirá una comparación directa con Vac-LLO-E7. De este modo, los tres recombinantes de vaccinia se expresarán bajo el control del mismo promotor de compuesto temprano/tardío p7.5. Además, SC11 permite la selección de placas víricas recombinantes para la selección TK y el rastreo de beta-galactosidasa. La figura 6 representa los diversos constructos de vaccinia usados en estos experimentos. Vac-SigE7Lamp es un virus vaccinia recombinante que expresa la proteína E7 fusionada entre la secuencia de señal de la proteína de membrana asociada lisosómica (LAMP-1) y la secuencia de la cola citoplasmática de LAMP-1. Se diseñó para facilitar la dirección del antígeno con respecto a la ruta MHC de clase II.

Se hicieron las siguientes modificaciones para permitir la expresión del producto génico por vaccinia: (a) la secuencia T5XT que impide la transcripción temprana por vaccinia se eliminó de la porción 5' de la secuencia LLO-E7 por PCR; y (b) se introdujo un sitio de restricción XmaI adicional por PCR para permitir la inserción final de LLO-E7 en SC11. La introducción con éxito de estos cambios (sin pérdida de la secuencia original que codifica LLO-E7) se verificó por secuenciación. El constructo pSC1 1-E7 resultante se usó para transfectar la línea celular TK-ve CV1

que se había infectado con la cepa de vaccinia de tipo silvestre, WR. Los lisados celulares obtenidos de esta etapa de co-infección/transfección contienen recombinantes de vaccinia que se purificaron en placas 3 veces. La expresión del producto de fusión LLO-E7 por vaccinia purificada en placas se verificó por transferencia de Western usando un anticuerpo dirigido contra la secuencia de la proteína LLO. Además, la capacidad de Vac-LLO-E7 para producir 5 linfocitos T CD8⁺ específicos de LLO y E7 se determinó usando los epitopos LLO (91-99) y E7 (49-57) de ratones Balb/c y C57/BL6, respectivamente. Los resultados se confirmaron en un ensayo de liberación de cromo.

RESULTADOS

- 10 Para determinar si la potenciación de la inmunogenicidad por la fusión de un antígeno a LLO requiere un vector de *Listeria*, se construyó un vector de vacuna que expresaba E7 como una proteína de fusión con una forma truncada no hemolítica de LLO (Δ LLO). Se realizaron estudios de rechazo tumoral con TC-1 siguiendo el protocolo que se ha descrito para el Ejemplo 1. Se realizaron dos experimentos con diferentes demoras antes de que se iniciara el tratamiento. En un experimento, los tratamientos se iniciaron cuando los tumores tenían aproximadamente 3 mm de 15 diámetro (figura 7). A partir del día 76, el 50% de los ratones tratados con Vac-LLO-E7 están libres de tumores, mientras que únicamente el 25% de los ratones tratados con Vac-SigE7Lamp estaban libres de tumores. En otros experimentos, las fusiones Δ LLO-antígeno eran más inmunogénicas que el péptido E7 mezclado con SBAS2 u oligonucleótidos CpG no metilados en una comparación en paralelo.
- 20 Estos resultados muestran que (a) la fusión de las fusiones Δ LLO-antígeno son inmunogénicas no sólo en el contexto de *Listeria*, sino también en otros contextos; y (b) la inmunogenicidad de las fusiones Δ LLO-antígeno se compara favorablemente con otros enfoques de vacuna aceptados.

EJEMPLO 5: LAS FUSIONES ActA-ANTÍGENO Y PEST-ANTÍGENO CONFIEREN INMUNIDAD ANTI-TUMORAL

25

MATERIALES Y MÉTODOS EXPERIMENTALES

Construcción de Lm-PEST-E7, Lm- Δ PEST-E7 y Lm-E7epi (figura 8A)

- 30 Lm-PEST-E7 es idéntico a Lm-LLO-E7, excepto que contiene únicamente el promotor y la secuencia PEST del gen hly, específicamente los primeros 50 AA de LLO. Para construir Lm-PEST-E7, el promotor hly y las regiones PEST se fusionaron al gen E7 de longitud completa usando la técnica de PCR SOE (empalme génico por extensión de solapamiento). El gen E7 y el fragmento génico hly-PEST se amplificaron a partir del plásmido pGG-55, que contiene los primeros 441 AA de LLO, y se empalmaron juntos mediante técnicas PCR convencionales. Para crear un 35 plásmido final, pVS16.5, el fragmento hly-PEST-E7 y el gen prfA se subdonaron en el plásmido pAM401, que incluye un gen de resistencia a cloranfenicol para la selección *in vitro*, y el plásmido resultante se usó para transformar XFL-7.

- Lm- Δ PEST-E7 es una cepa recombinante de *Listeria* que es idéntica a Lm-LLO-E7 excepto que carece de la 40 secuencia PEST. Se hizo básicamente como se describe para Lm-PEST-E7, excepto que el sistema de expresión episomal se construyó usando los cebadores diseñados para eliminar la región que contiene PEST (pb 333-387) del gen de fusión hly-E7. Lm-E7epi es una cepa recombinante que secreta E7 sin la región PEST o LLO. El plásmido usado para transformar esta cepa contiene un fragmento génico del promotor hly y una secuencia de señal fusionada al gen E7. Este constructo difiere del Lm-E7 original, que expresó una única copia del gen E7 integrado en 45 el cromosoma. Lm-E7epi es completamente isogénico a Lm-LLO-E7, Lm-PEST-E7 y Lm- Δ PEST-E7, excepto para la forma del antígeno E7 expresado.

Construcción de Lm-actA-E7

- 50 Lm-actA-E7 es una cepa recombinante de LM, que comprende un plásmido que expresa la proteína E7 fusionada a una versión truncada de la proteína actA. Lm-actA-E7 se generó introduciendo un vector plasmídico pDD-1 construido modificando pDP-2028 en LM. pDD-1 comprende un cassette de expresión que expresa una copia del promotor hly de 310 pb y la secuencia de señal hly (ss), que impulsa la expresión y secreción de actA-E7; 1170 pb del gen actA que comprende 4 secuencias PEST (SEQ ID No: 16) (el polipéptido ActA truncado consiste en los 55 primeros 390 AA de la molécula, SEQ ID No: 15); el gen E7* de HPV de 300 pb; el gen prfA* de 1019 pb (controla la expresión de los genes de virulencia); y el gen CAT (gen de resistencia a cloranfenicol) para la selección de clones bacterianos transformados (figura 8B).

- El promotor hly (pHly) y el fragmento génico se amplificaron por PCR a partir de pGG-55 (Ejemplo 1) usando los 60 cebadores 5'-GGGGTCTAGACCTCCTTTGATTAGTATATTC-3' (el sitio Xba I está subrayado; SEQ ID NO: 46) y 5'-ATCTTCGCTATCTGTGCGCGCGCGCGTCTCAGTTTGTTCGCGC-3' (el sitio Not I está subrayado; los primeros

- 18 nucleótidos son el solapamiento del gen ActA; SEQ ID NO: 47). El gen actA se amplificó por PCR a partir del genoma de LM de tipo silvestre 10403s usando el cebador 5'-GCGCAACAACTGAAGCAGCGGCCGCGGCGACAGATAGCGAAGAT-3' (el sitio NotI está subrayado; SEQ ID NO: 48) y el cebador 5'-TGTAGGTGTATCTCCATGCTCGAGAGCTAGGCGATCAATTTTC-3' (el sitio XhoI está subrayado; SEQ ID NO: 49). El gen E7 se amplificó por PCR a partir de pGG55 (pLLO-E7) usando el cebador 5'-GGAATTGATCGCCTAGCTCTCGAGCATGGAGATACACCTACA-3' (el sitio XhoI está subrayado; SEQ ID NO: 50) y el cebador 5'-AAACGGATTATTAGATCCCGGGTTATGGTTTCTGAGAACA-3' (el sitio XmaI está subrayado; SEQ ID NO: 51). El gen prfA se amplificó por PCR a partir del genoma de LM de tipo silvestre 10403s usando el cebador 5'-TGTTCTCAGAAACCATAACCCGGGATCTAAATAAATCCGTTT-3' (el sitio XmaI está subrayado; SEQ ID NO: 52) y el cebador 5'-GGGGTTCGACCAGCTCTTCTTGGTGAAG-3' (el sitio Sall está subrayado; SEQ ID NO: 53). El promotor hly se fusionó al gen actA (pHly-actA), se generó y se amplificó por PCR a partir del ADN pHly purificado y el ADN actA purificado usando el cebador pHly corriente arriba (SEQ ID NO: 46) y el cebador actA corriente abajo (SEQ ID NO: 49).
- 15 El gen E7 fusionado al gen prfA (E7-prfA) se generó y se amplificó por PCR a partir de ADN E7 purificado y ADN prfA purificado usando el cebador E7 corriente arriba (SEQ ID NO: 50) y el cebador del gen prfA corriente abajo (SEQ ID NO: 53).

El producto de fusión pHly-actA fusionado al producto de fusión E7-prfA se generó y se amplificó por PCR a partir del producto de ADN pHly-actA fusionado y purificado y el producto de ADN E7-prfA fusionado y purificado usando el cebador pHly corriente arriba (SEQ ID NO: 46) y el cebador del gen prfA corriente abajo (SEQ ID NO: 53) y se ligó en pCRII (Invitrogen, La Jolla, Calif.). Las células *E. coli* competentes (TOP10^F, Invitrogen, La Jolla, Calif.) se transformaron con pCRII-ActAE7. Después de la lisis y el aislamiento, el plásmido se cribó mediante análisis de restricción usando BamHI (tamaños de fragmento esperados 770 pb y 6400 pb (o cuando el inserto se invirtió en el vector: 2500 pb y 4100 pb)) y BstXI (tamaños de fragmento esperados 2800 pb y 3900 pb) y también se cribó con análisis por PCR usando el cebador pHly corriente arriba (SEQ ID NO: 46) y el cebador del gen prfA corriente abajo (SEQ ID NO: 53).

El inserto de ADN pHly-ActA-E7-PrfA se extrajo de pCRII por digestión doble con Xba I y Sal I y se ligó en pDP-2028 también digerido con Xba I y Sal I. Después de transformar las células *E. coli* competentes TOP10^F (Invitrogen, La Jolla, Calif.) con el sistema de expresión pActAE7, los clones resistentes a cloranfenicol se cribaron mediante análisis por PCR usando el cebador pHly corriente arriba (SEQ ID NO: 46) y el cebador del gen PrfA corriente abajo (SEQ ID NO: 53). Un clon que llevaba pHly-ActA-E7 se cultivó en medio de fusión cerebro-corazón con 20 mcg (microgramos)/ml (mililitro) de cloranfenicol (Difco, Detroit, MI), y pActAE7 se aisló de la célula bacteriana usando un kit de sistema de purificación de ADN midiprep (Promega, Madison, Wis.). La cepa de *Listeria* tratada con penidilina XFL-7 se transformó con pActAE7, y los clones se seleccionaron para la retención del plásmido *in vivo*. Los clones se cultivaron en medio de fusión cerebro-corazón con cloranfenicol (20 mcg/ml) a 37 °C. Las bacterias se congelaron en alícuotas a -80 °C.

40 **RESULTADOS**

Para comparar la inmunidad antitumoral inducida por Lm-ActA-E7 frente a Lm-LLO-E7, 2 x 10⁵ células de tumor TC-1 se implantaron por vía subcutánea en ratones y se dejaron crecer hasta un tamaño palpable (aproximadamente 5 milímetros [mm]). Los ratones se inmunizaron i.p. con una DL₅₀ de Lm-ActA-E7 (5 x 10⁵ UFC), (cruces) Lm-LLO-E7 (10⁸ UFC) (cuadrados) o Lm-E7 (10⁶ UFC) (círculos) los días 7 y 14. El día 26, cada uno de los animales en Lm-LLO-E7 y Lm-ActA-E7 estaba libre de tumor y permanecieron así, mientras que en cada uno de los animales sin tratar (triángulos) y los animales inmunizados con Lm-E7 se desarrollaron tumores grandes (figura 9). Por lo tanto, la vacunación con fusiones ActA-E7 causa una regresión tumoral.

Además, Lm-LLO-E7, Lm-PEST-E7, Lm-ΔPEST-E7 y Lm-E7epi se compararon para evaluar su capacidad de causar la regresión de los tumores que expresan E7. Se establecieron tumores TC-1 s.c. en el costado izquierdo de 40 ratones C57BL/6. Después haber alcanzado los tumores 4-5 mm, los ratones se dividieron en 5 grupos de 8 ratones. Cada grupo se trató con 1 de 4 vacunas recombinantes de LM, y 1 grupo se dejó sin tratar. Lm-LLO-E7 y Lm-PEST-E7 indujeron la regresión de los tumores establecidos en 5/8 y 3/8 casos, respectivamente. No hubo ninguna diferencia estadística entre el tamaño tumoral medio de los ratones tratados con Lm-PEST-E7 o Lm-LLO-E7 en ningún punto temporal. Sin embargo, las vacunas que expresaron E7 sin las secuencias PEST, Lm-ΔPEST-E7 y Lm-E7epi, no pudieron causar la regresión tumoral en ningún ratón excepto en uno (figura 8C). Esto fue representativo de dos experimentos, en los que se observó una diferencia estadísticamente significativa en los tamaños tumorales medios en el día 28 entre tumores tratados con Lm-LLO-E7 o Lm-PEST-E7 y los tratados con Lm-E7epi o Lm-ΔPEST-E7; P<0,001, prueba t de Student; figura 8D). Además, el aumento de los porcentajes de esplenocitos tetrámero-positivo se observó de forma reproducible en los tres experimentos en los bazo de ratones vacunados

con vacunas que contienen PEST (figura 8E). Por lo tanto, la vacunación con fusiones PEST-E7 causa una regresión tumoral.

EJEMPLO 6: LA FUSIÓN DE E7 A LLO, ActA, O UNA SECUENCIA TIPO PEST POTENCIA LA INMUNIDAD ESPECÍFICA DE ANTÍGENO Y GENERA CÉLULAS CD8⁺ ESPECÍFICAS DE E7 INFILTRANTES DE TUMOR

MATERIALES Y MÉTODOS EXPERIMENTALES

Se implantaron por vía subcutánea 500 mcl (microlitros) de MATRIGEL®, que comprende 100 md de 2×10^5 células de tumor TC-1 en solución salina tamponada con fosfato (PBS) más 400 md de MATRIGEL® (BD Biosciences, Franklin Lakes, N.J.) en el costado izquierdo de 12 ratones C57BL/6 ($n = 3$). Los ratones se inmunizaron por vía intraperitoneal el día 7, 14 y 21, y los bazo y tumores se recuperaron el día 28. El MATRIGEL de los tumores se eliminó de los ratones y se incubó a 4 °C durante una noche en tubos que contenían 2 mililitros (ml) de medio RP 10 sobre hielo. Los tumores se picaron en trozos con fórceps, se cortaron en bloques de 2 mm y se incubaron a 37 °C durante 1 hora con 3 ml de mezcla enzimática (0,2 mg/ml de colagenasa-P, 1 mg/ml de DNAsa-1 en PBS). La suspensión tisular se filtró a través de una malla de nylon y se lavó con suero fetal bovino al 5% + 0,05% de NaN₃ en PBS para la tinción de tetrámero y IFN-gamma.

Los esplenocitos y células tumorales se incubaron con péptido E7 1 micromol (mM) durante 5 horas en presencia de brefeldina A en 10^7 células/ml. Las células se lavaron dos veces y se incubaron en 50 mcl de sobrenadante del receptor Fc anti-ratón (2.4 G2) durante 1 hora o durante una noche a 4 °C. Las células se tiñeron para poder identificar las moléculas de superficie CD8 y CD62L, se permeabilizaron, se fijaron usando el kit de permeabilización Golgi-stop® o Golgi-Plug® (Pharmingen, San Diego, Calif.), y se tiñeron para identificar IFN-gamma. Se adquirieron 500.000 acontecimientos usando citometría de flujo de dos láseres FACSCalibur y se analizaron usando el software Cellquest (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ). Se calcularon los porcentajes de células secretoras de IFN-gamma en los linfocitos T CD8⁺ activados (CD62L^{baja}).

Para la tinción de tetrámero, el tetrámero H-2D^b se cargó con el péptido E7 conjugado con ficoeritrina (PE) (RAHYNIVTF, SEQ ID NO: 24), se tiñó a ta durante 1 hora, y se tiñó con MEL-14 conjugado con anti-alofocianina (APC) (CD62L) y CD8 conjugado con FITC a 4 °C durante 30 min. Las células se analizaron comparando las células tetrámero⁺CD8⁺CD62L^{baja} en el bazo y en el tumor.

RESULTADOS

Para analizar la capacidad de Lm-ActA-E7 para potenciar la inmunidad específica de antígeno, a los ratones se les implantó células de tumor TC-1 y se inmunizaron con Lm-LLO-E7 (1×10^7 UFC), Lm-E7 (1×10^6 UFC) o Lm-ActA-E7 (2×10^8 UFC), o se dejaron sin tratar (sin tratamiento previo, vírgenes). Los tumores de los ratones de los grupos de Lm-LLO-E7 y Lm-ActA-E7 contenían un mayor porcentaje de linfocitos T CD8⁺ secretores de IFN-gamma (figura 10A) y células CD8⁺ específicas de tetrámero (figura 10B) que en Lm-E7 o ratones sin tratar.

En otro experimento, a los ratones portadores de tumor se les administró Lm-LLO-E7, Lm-PEST-E7, Lm-ΔPEST-E7 o Lm-E7epi, y se midieron los niveles de linfocitos específicos de E7 en el tumor. Los ratones se trataron los días 7 y 14 con 0,1 DL₅₀ de las cuatro vacunas. Los tumores se recuperaron el día 21 y se tiñeron con anticuerpos para CD62L, CD8, y con el tetrámero E7/Db. Se observó un aumento del porcentaje de linfocitos tetrámero-positivo en el tumor en ratones vacunados con Lm-LLO-E7 y Lm-PEST-E7 (figura 11A). Este resultado era reproducible en los tres experimentos (figura 11B).

Por lo tanto, cada uno de Lm-LLO-E7, Lm-ActA-E7 y Lm-PEST-E7 es eficaz en la inducción de linfocitos T CD8⁺ infiltrantes de tumor y la regresión tumoral.

EJEMPLO 7: CREACIÓN Y VERIFICACIÓN DE CONSTRUCTOS DE LISTERIA-LLO-PSA

MATERIALES Y MÉTODOS EXPERIMENTALES

Se adquirieron oligos y pCDNA3.1 en Invitrogen (Carlsbad, CA) y la secuenciación de ADN se realizó por Genewiz Inc (Plainfield, NJ). Los péptidos se sintetizaron por EZbiolabs (Westfield, IN). Los reactivos de citometría de flujo se adquirieron en Becton Dickinson (BD) Biosciences (San Diego, CA). Los medios de cultivo celular y los complementos eran de Gibco/Invitrogen. Los anticuerpos ELISpot se adquirieron en Mabtech AB (Cincinnati, OH). Otros reactivos, a menos que se indique, eran de Sigma (St. Louis, MO). PSA/vaccinia se proporcionó amablemente por el Dr. Schlom del National Cancer institute, Bethesda, MD.

Ratones, líneas celulares y medios

Los ratones C57BL/6 se adquirieron en Jackson Laboratories (Bar Harbor, ME). Los ratones se mantuvieron en la instalación para animales del campus Cook en la Rutgers University, New Brunswick, NJ. Los experimentos con ratones se realizaron de acuerdo con la normativa del Institutional Animal Care and Use Committee de la Rutgers University. Todas las líneas celulares se adquirieron en ATCC (Manassas, VA). La línea celular TRAMPC-1 (adenocarcinoma transgénico de la próstata de ratón (*Transgenic Adenocarcinoma of the Mouse Prostate*)), obtenida a partir de un ratón C57BL/6, se ha descrito previamente. Las células se desarrollaron y se mantuvieron en medio de Eagle modificado por Dulbecco con L-glutamina 4 mM ajustado para contener 1,5 g/l de bicarbonato sódico y 4,5 g/l de glucosa complementada con 5 µg/ml de insulina bovina, deshidroisoandrosterona 10 nM, suero fetal bovino al 5% y Nu-Serum IV al 5%. Las células de fibrosarcoma MC57G (de origen C57BL/6) se mantuvieron en medio mínimo esencial de Eagle (EMEM) con L-glutamina 2 mM y BSS de Earle ajustado para contener 1.5 g/l bicarbonato sódico, aminoácidos no esenciales 0,1 mM, y piruvato sódico 1,0 mM y suero fetal bovino al 10%. Las células de linfoma EL4 se mantuvieron en medio de Eagle modificado por Dulbecco con L-glutamina 4 mM ajustado para contener 1,5 g/l de bicarbonato sódico y 4,5 g/l de glucosa, suero fetal bovino al 10%. J774A.1, una línea celular de macrófago murino se mantuvo en medio RPMI1640 con L-glutamina 4 mM ajustado para contener 1,5 g/l de bicarbonato sódico y 4,5 g/l de glucosa y suero fetal bovino al 10%. El medio RPMI completo (C-RPMI) contenía RPMI 1640 complementado con glutamina 2 mM, aminoácidos no esenciales 0,1 mM, y piruvato sódico 1,0 mM y suero fetal bovino al 10%.

Construcción de la vacuna PSA/pCDNA3.1

Todo el marco abierto de lectura de PSA, incluyendo su secuencia de señal se donó en la estructura del vector pCDNA3.1⁽¹⁾ (Invitrogen) en los sitios XbaI y XhoI. En este plásmido, la expresión de PSA estaba bajo el control del promotor CMV y se confirmó por transfección transitoria en la línea celular 293 (ATCC). La secreción de PSA por las células transfectadas se confirmó en el sobrenadante de células cultivadas usando un kit ELISA anti-PSA (American Qualex, San Clemente, CA). El plásmido GM-CSF/pCDNA fue donado amablemente por el Dr. Vonderheide, University of Pennsylvania, Philadelphia, PA.

Construcción de la vacuna Lm-LLO-PSA

El gen que codifica PSA humano (excluyendo su secuencia de señal de secreción) se amplificó usando *pfx* polimerasa, oligo directo: gtgCTCGAGattgtggaggctgggagtg (SEQ ID NO: 58), y el oligo inverso: gatACTAGTtaggggtggccacgatgg (SEQ ID NO: 59). Los dos sitios de restricción, XhoI y SpeI que se usaron para la clonación en marco de PSA como una fusión a LLO en pGG55 se indican en letras mayúsculas. El codón de terminación para terminar la traducción de la proteína de fusión LLO-PSA está subrayado en el oligo inverso. El PSA amplificado se clonó en el plásmido de *Lm* pGG55, como una proteína de fusión a los primeros 441 aminoácidos en el N-terminal de LLO (pAdv34, figura 12), entre los sitios de restricción XhoI y SpeI. El plásmido resultante se secuenció para garantizar la ausencia de mutaciones. El plásmido pAdv34 se sometió a electroporación en la cepa de *Lm* XFL7 (que carece del gen genómico *prfA*) y se obtuvo originariamente de la cepa resistente a estreptomina de *Lm* 10403s. Se seleccionaron *Listeriae* que contenían el plásmido (Lm-LLO-PSA) usando doranfencol (34 µg/ml) y 250 µg/ml de estreptomina en placas de infusión de cerebro-corazón (BHI/ChI/S). Las colonias se cribaron por PCR para confirmar la presencia del gen PSA.

Subclonación de LLO-PSA

Un marco abierto de lectura de PSA truncado (GenBank Número de Acceso NM_001648), que carecía de su secuencia de señal de secreción, los primeros 24 AA, se amplificó usando los cebadores: Adv60-PSA(XhoI-no ATG)F: gtgCTCGAGattgtggaggctgggagtg (SEQ ID No: 58) y Adv61-PSA(SpeI-Stop)R: gatACTAGTtaggggtggccacgatgg (SEQ ID No: 59) y se subdonó en marco con los primeros 441 aminoácidos de LLO (figura 12). La estructura del plásmido, pGG55 (Ejemplo 1), también tiene una copia del gen de virulencia de *Listeria* *prfA*, y dos genes de cloranfenicol acetil-transferasa que confieren resistencia al cloranfenicol en las cepas de bacterias tanto Gram-positivas como Gram-negativas. La secuencia AA de LLO-PSA es como se indica a continuación:

MKKIMLVFITLILVSLPIAQQTEAKDASAFNKENSISSMAPPASPPASPKTPIEKKHADEIDKYIQ
 GLDYNKNNVLYVHGDAVTNVPVPRKGYKDGNEYTVVEKKKKSINQNNADIQVVNAISSLTYP
 GALVKANSELVENQPDVLPVKRDSLTLSDLPGMTNQDNKIVVKNATKSNVNNAVNTLVER
 WNEKYAQAYPNVSAKIDYDDEMAYESEQLIAKFGTAFKAVNNSLNVNFGAISEGKMQUEEVIS
 FKQIYYNVNVNEPTRPSRFFGKAVTKEQLQALGVNAENPPAYISSVAYGRQVYLKLTNSHST
 KVKAADFDAVSGKSVSGDVELTNIKNSSFKAVIYGGSAKDEVQIIDGNLGLDRDILKKGATF
 NRETPGVPIAYTTNFLKDNELAVIKNNSEYIETTSKAYTDGKINIDHSGGYVAQFNISWDEVN
YDLEIVGGWECEKHSQPWQVLVASRGRAVCGGVLVHPQWVLTAAHCIRNKS VILLGRHSLF
HPEDTGQVFQVSHSFPHPLYDMSLLKNRFLRPGDDSSHDLMLLRLSEPAELTDAVKVMDLPT
QEPALGTTTCYASGWGSIEPEEFLTPKKLQCVDLHVISNDVCAQVHPQKVTKFMLCAGRWTG
GKSTCSGDSGGPLVCYGVLOGITSWGSEPCALPERPSLYTKVVHYRKWIKDTIVANP

(SEQ ID No: 54; la secuencia PSA está subrayada)

Hay una diferencia de AA entre este PSA y la secuencia en NM_001648, en la posición N 221 Y). pGG55-LLO-PSA se sometió a electroporación en XFL-7 de *L. monocytogenes* (Ejemplo 1).

Crecimiento y almacenamiento de cepas de vacunas bacterianas

Listeria-PSA recombinante se desarrolló en un medio sin productos animales (Caldo Terrific Modificado), en presencia de 34 µg/ml de cloranfenicol y 250 µg/ml de estreptomina a 37 °C en una incubadora agitadora. Después de alcanzar una densidad óptica (DO₆₀₀) de 0,5, que indicaba una fase de crecimiento logarítmica, las bacterias se recogieron por centrifugación, y el gránulo se lavó dos veces en solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se suspendió de nuevo en PBS que contenía glicerol al 2%, después se alícuotó y se almacenó a -80 °C. Una alícuota se descongeló 1 día después y se valoró para determinar la titulación bacteriana (Unidades Formadoras de Colonias/ml). Las vacunas de *Listeria* almacenadas de esta manera son estables hasta durante 1 años. Después, estas alícuotas se descongelaron, se diluyeron en 1 x 10⁷ UFC/dosis y se usaron para los estudios de inmunogenicidad como se indica a continuación.

Expresión de LLO-PSA por *Lm*-LLO-PSA

Se desarrollaron colonias de *Lm*-LLO-PSA en caldo de BHI/Chl/S a 37 °C y a 225 rpm durante 8 horas. Las bacterias se separaron del medio de cultivo por centrifugación a 10.000 g durante 5 min y los sobrenadantes se recuperaron. Las proteínas en el sobrenadante de cultivo se precipitaron durante al menos 1 hora en presencia del 10% v/v de ácido tri-doroacético a 4 °C y se separaron en un gel al 4-20% por SDS-PAGE. Después de transferir las proteínas sobre membranas de PVDF, la proteína de fusión LLO-PSA se detectó por inmunotransferencia con anticuerpos anti-LLO policlonales de ratón (de elaboración propia) o anti-PSA (Sigma). Las señales se desarrollaron usando el kit cromogénico Western-Breeze (Invitrogen).

Paso *in vivo* de *Lm*-LLO-PSA.

Lm-LLO-PSA se pasó *in vivo* dos veces. En resumen, una dosis de 1 x 10⁶ UFC de *Lm*-LLO-PSA se inyectó por vía intraperitoneal (i.p.) a ratones de 6-8 semanas de edad. Los bazos se recuperaron 3 días después de la inyección; se prepararon suspensiones de células individuales a partir de los bazos y se pusieron en placas sobre placas de BHI/Chl/S para seleccionar el crecimiento de *Lm*-LLO-PSA. Este procedimiento se repitió una vez más usando una colonia LLO-PSA positiva del primer pase. Las colonias *Lm*-LLO-PSA recuperadas después de dos pases *in vivo* se ensayaron para evaluar la secreción de LLO-PSA. Se escogió un único don para usarse para la secuencia de ADN plasmídico, estudios de tumores y otros ensayos funcionales.

Estudio de la virulencia *in vivo*

Se realizó un estudio de virulencia para determinar una dosis segura de *Lm*-LLO-PSA en ratones. A dos grupos de 4 ratones C57BL/6 macho (7 semanas de edad) se les inyectó i.p. dos dosis diferentes de *Lm*-PSA: 1 x 10⁸ y 5 x 10⁷ UFC/dosis. Los ratones se supervisaron para comprobar síntomas de enfermedad hasta durante 5 días después de la inoculación.

Secuenciación de plásmidos

Lm-LLO-PSA se desarrolló durante una noche en 200 ml de BHI/Chl/S a 37 °C y 225 rpm. Las bacterias se separaron del caldo de cultivo por centrifugación a 10.000 g a 4 °C durante 10 min. El sedimento bacteriano se trató con lisozima (2 mg/ml) a 37 °C durante 30 min para romper la pared celular. El plásmido pAdv34 se purificó usando el kit PureLink plasmid midiprep (Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante y se secuenció en su totalidad por el método de terminador de cadena dideoxi.

10 RESULTADOS

Se creó una cepa de *Listeria* que expresa una LLO no hemolítica fusionada a un PSA truncado (peptidasa relacionada con la caliceína 3). La cepa recombinante de *Listeria* resultante secreta una proteína del tamaño predicho para LLO-PSA (75 Kd), que se detecta tanto por el anticuerpo anti-LLO como anti-PSA, mostrando que la proteína LLO-PSA se expresó y se secretó (figura 13).

Generación de *L. monocytogenes* recombinante que expresa PSA. El gen que codifica PSA humano se clonó como una proteína de fusión con un segmento truncado no hemolítico de LLO, que contiene una secuencia PEST conservada en su N terminal (figura 12). La estructura plasmídica pGG55 como se ha descrito previamente, permite la expresión y secreción de proteínas de fusión LLO de un origen episomal por la cepa atenuada de *Lm* XFL7, que carece del factor de virulencia genómica *prfA*. El gen *prfA* se requiere para la supervivencia *in vivo* de *Lm* y, por lo tanto, se complementa por una copia llevada en el plásmido. La secuencia de señal de PSA se eliminó para evitar cualquier intervención de esta secuencia con la secreción apropiada de la proteína de fusión LLO-PSA, que está mediada por la secuencia de señal de secreción de LLO en *Lm*-LLO-PSA.

***Lm*-LLO-PSA puede expresar y secretar la proteína de fusión LLO-PSA.** La expresión y secreción de la proteína de fusión LLO-PSA de *Lm* se ensayó en los sobrenadantes del cultivo celular después del crecimiento *in vitro* de las bacterias. Se ensayaron cuatro colonias de *Lm*-LLO-PSA y todas fueron capaces de secretar la proteína de fusión LLO-PSA según se detectó con los tanto con los anticuerpos anti-LLO como anti-PSA (figura 13). Esta secreción se mantuvo en bacterias aisladas después de dos pases *in vivo* en los ratones (datos no mostrados), sugiriendo que el plásmido es estable y se retiene *in vivo* durante al menos tres días. Con el fin de confirmar la estabilidad, se extrajo pAdv34 del *Lm*-LLO-PSA de pase y se secuenció en su totalidad. No se detectó ninguna mutación en la estructura plasmídica o el gen PSA después de dos pases *in vivo*, en comparación con el plásmido de referencia pGG55 y la secuencia del gen PSA humano (NCBI: NM_001648). Para determinar una dosis segura de *Lm*-LLO-PSA a usar para los estudios en animales, dos dosis de este constructo se ensayaron en ratones por inyección i.p. (1×10^8 y 5×10^7 UFC/dosis). La dosis usada en los experimentos animales (1×10^7 UFC/ratón) se definió como un décimo de la dosis mínima que se observó que tenía un efecto perjudicial sobre los ratones inmunizados.

Para ensayar la estabilidad *in vitro* de *Lm*-PSA, la cepa se desarrolló y se pasó durante 7 días consecutivos en caldo terrífico modificado. Después de este tiempo, las bacterias retuvieron el plásmido, el plásmido contenía el gen y no hubo ninguna delección o re-disposición en el plásmido, lo que indica estabilidad plasmídica (figura 22).

Para ensayar la estabilidad *in vivo* de *Lm*-PSA, la cepa se pasó dos veces a través de los ratones. Después, el plásmido se secuenció por Genewiz™ y se descubrió que tenía la siguiente secuencia:

```
AATTCGGATGAGCATTCATCAGGCGGGCAAGAATGTGAATAAAGGCCGGATAAACTT
GTGCTTATTTTTCTTTACGGTCTTTAAAAGGCCGTAATATCCAGCTGAACGGTCTGGTTA
TAGGTACATTGAGCAACTGACTGAAATGCCTCAAATGTTCTTTACGATGCCATTGGGAT
ATATCAACGGTGGTATATCCAGTGATTTTTTTCTCCATTTAGCTTCCTTAGCTCCTGAAA
ATCTCGATAACTCAAAAAATACGCCCGGTAGTGATCTTATTTTATTATGGTGAAAGTTGG
AACCTCTTACGTGCCGATCAACGTCTCATTTTCGCCAAAAGTTGGCCAGGGCTTCCCGGT
ATCAACAGGGACACCAGGATTTATTTATTCTGCGAAGTGATCTTCCGTACAGGTATTTAT
TCGGCGCAAAGTGCGTCGGGTGATGCTGCCAACTTACTGATTTAGTGATGATGGTGTTTT
TGAGGTGCTCCAGTGGCTTCTGTTTCTATCAGCTGTCCCTCCTGTTTCAGCTACTGACGGGG
```

45

TGGTGCCTAACGGCAAAGCACCGCCGGACATCAGCGCTAGCGGAGTGTATACTGGCTT
 ACTATGTTGGCACTGATGAGGGTGTGAGTGAAGTGCTTCATGTGGCAGGAGAAAAAAGG
 CTGCACCGGTGCGTCAGCAGAATATGTGATACAGGATATATCCGCTTCCTCGCTCACTG
 ACTCGCTACGCTCGGTCGTTGACTGCGGGGAGCGGAAATGGCTTACGAACGGGGCGGA
 GATTTCTGGAAGATGCCAGGAAGATACTTAACAGGGAAGTGAGAGGGCCGCGCAAAG
 CCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACAAGCATCACGAAATCTGACGCTCAAATCAG
 TGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGCGGCTCCCTC
 GTGCGCTCTCCTGTTCTGCTTTCGGTTTACCGGTGTCATTCCGCTGTTATGGCCGCGTTT
 GTCTCATTCCACGCTGACACTCAGTTCCGGGTAGGCAGTTCGCTCCAAGCTGGACTGTAT
 GCACGAACCCCCGTTCAGTCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCC
 AACCCGAAAGACATGCAAAGCACCACTGGCAGCAGCCACTGGTAATTGATTTAGAGG
 AGTTAGTCTTGAAGTCATGCGCCGGTTAAGGCTAAACTGAAAGGACAAGTTTTGGTGACT
 GCGCTCCTCCAAGCCAGTTACCTCGGTTCAAAGAGTTGGTAGCTCAGAGAACCTTCGAAA
 AACCGCCCTGCAAGGCGGTTTTTTCGTTTTTTCAGAGCAAGAGATTACGCGCAGACCAAAC
 GATCTCAAGAAGATCATCTTATTAATCAGATAAAATATTTCTAGCCCTCCTTTGATTAGTA
 TATTCCTATCTTAAAGTTACTTTTTATGTGGAGGCATTAACATTTGTTAATGACGTCAAAG
 GATAGCAAGACTAGAATAAAGCTATAAAGCAAGCATATAATATTGCGTTTCATCTTTAGA
 AGCGAATTCGCCAATATTATAATTATCAAAAAGAGAGGGGTGGCAAACGGTATTTGGCAT
 TATTAGGTTAAAAAATGTAGAAGGAGAGTGAAACCCATGAAAAAATAATGCTAGTTTTT
ATTACACTTATATTAGTTAGTCTACCAATTGCGCAACAACTGAAGCAAAGGATGCATCT
GCATTCAATAAAGAAAATTCAATTTTCATCCATGGCACCACCAGCATCTCCGCCTGCAAGT
CCTAAGACGCCAATCGAAAAGAAACACGCGGATGAAATCGATAAGTATATACAAGGATT
GGATTACAATAAAAAACAATGTATTAGTATACCACGGAGATGCAGTGACAAATGTGCCGC
CAAGAAAAGGTTACAAAGATGGAAATGAATATATTGTTGTGGAGAAAAAGAAGAAATCC
ATCAATCAAAATAATGCAGACATTCAAGTTGTGAATGCAATTTGAGCCTAACCTATCCA
GGTGCTCTCGTAAAAGCGAATTCGGAATTAGTAGAAAATCAACCAGATGTTCTCCCTGTA
AAACGTGATTCATTAACACTCAGCATTGATTTGCCAGGTATGACTAATCAAGACAATAAA
ATAGTTGTAAAAAATGCCACTAAATCAAACGTTAACAACGCAGTAAATACATTAGTGGG
AAGATGGAATGAAAAATATGCTCAAGCTTATCCAAATGTAAGTGCAAAAATTGATTATGA
TGACGAAATGGCTTACAGTGAATCACAATTAATTGCGAAATTTGGTACAGCATTAAAGC
TGTAATAATAGCTTGAATGTAAACTTCGGCGCAATCAGTGAAGGGAAAAATGCAAGAAG
AAGTCATTAGTTTTAAACAAATTTACTATAACGTGAATGTTAATGAACCTACAAGACCTT
CCAGATTTTTCGGCAAAGCTGTTACTAAAGAGCAGTTGCAAGCGCTTGGAGTGAATGCAG
AAAAATCCTCCTGCATATATCTCAAGTGTGGCGTATGGCCGTCAAGTTTATTGAAATTATC
AACTAATCCCATAGTACTAAAGTAAAAGCTGCTTTTGATGCTGCCGTAAGCGGAAAATC
TGTCTCAGGTGATGTAGAATAACAAATATCATCAAAAATCTTCCTTCAAAGCCGTAAT
TTACGGAGGTTCCGCAAAGATGAAGTTCAAATCATCGACGGCAACCTCGGAGACTTACC

CGATATTTTGAAAAAGGCGCTACTTTTAATCGAGAAACACCAGGAGTTCCCATTGCTTA
TACAACAACTTCCTAAAAGACAATGAATTAGCTGTTATTAACAACACTCAGAATATAT
TGAAACAACCTCAAAAGCTTATACAGATGGAAAAATTAACATCGATCACTCTGGAGGATA
CGTTGCTCAATTCAACATTTCTTGGGATGAAGTAAATTATGATCTCGAGatttgggaggctgggagt
gcgagaagcattcccaacctggcagtgcttctggcctctcgtggcaggcagctcggcgggttctgtgcacccccagtggtcctcacag
ctgccactgcatcaggaaacaaagcgtgatcttctggcggcacagcctgttcalcctgaagacacagccaggatttcaggtcagccacag
ctccacacccgctctacgatagcctcctgaagaatcgattcctcagccaggtgatgactccagccacgacctcatgctcctccgctgcag
agcctgccgagctcacggatgctgtgaagtcaggaacctccccaccaggagccagcactgggaccacctgctacgctcaggctggggca
gcattgaaccagaggagtcttgaacccaagaactcagtgctggacctcatttccaatgacgtgtgcgcaagttcacctcagaagg
tgaccaagtcatgctgtgtgctgacgctggacaggggcaaaagcacctgctcgggtgattctggggcccactgtctgttatggtgcttcaa
ggtatcagctatggggcagtgaaacatgtcccctgcccgaaggccttcccctgtacaccaaggtggtgcattaccggaagtgatcaaggacac
atcgtggccaacccTAAACTAGTGACTACAAGGACGATGACGACAAGTGATACCCGGGATCTAA
 ATAAATCCGTTTTTAAATATGTATGCATTTCTTTTTCGAAATCAAATTTGTATAATAAAA
 TCCTATATGAAAAAACATCATTTAGCGTGACTTTCTTTCAACAGCTAACAAATTGTTGTTA
 CTGCCTAATGTTTTTAGGGTATTTTAAAAAAGGCGGATAAAAAACGATTGGGGGATGAGA
 CATGAACGCTCAAGCAGAAGAATTCAAAAAATATTTAGAAACTAACGGGATAAAACCAA
 AACAAATTCATAAAAAAGAACTTATTTTAAACCAATGGGATCCACAAGAATATTGTATTT
 TCCTATATGATGGTATCACAAAGCTCACGAGTATTAGCGAGAACGGGACCATCATGAATT
 TACAATACTACAAAGGGGCTTTTCGTTATAATGTCTGGCTTTATTGATACAGAAACATCGG
 TTGGCTATTATAATTTAGAAGTCATTAGCGAGCAGGCTACCGCATACGTTATCAAATAA
 ACGAACTAAAAGAACTACTGAGCAAAAATCTTACGCACTTTTTCTATGTTTTCCAAACCTT
 ACAAAAACAAGTTTCATACAGCCTAGCTAAATTTAATGATTTTTTCGATTAACGGGAAGCT
 TGGCTCTATTTGCGGTCAACTTTTAATCCTGACCTATGTGTATGGTAAAGAAACTCCTGAT
 GGCATCAAGATTACACTGGATAATTTAACAATGCAGGAGTTAGGATATTCAAGTGGCATC
 GCACATAGCTCAGCTGTTAGCAGAATTATTTCCAAATTAAGCAAGAGAAAAGTTATCGTG
 TATAAAAATTCATGCTTTTATGTACAAAATCGTGATTATCTCAAAGATATGCCCTAAAT
 TAGATGAATGGTTTTATTTAGCATGTCCTGCTACTTGGGAAAATTAATTAATCAAAA
 ACAGTATTCCTCAATGAGGAATACTGTTTTATTTTTATTCGAATAAAGAACTTACAGAA
 GCATTTTCATGAACGCGTACGATTGCTTACCAAGAAGAGCTGGTCGACCGATGCCCTTG
 AGAGCCTTCAACCCAGTCAGCTCCTTCCGGTGGGCGCGGGGCATGACTATCGTCGCCGCA
 CTTATGACTGTCTTCTTTATCATGCAACTCGTAGGACAGGTGCCGGCAGCGCTCTGGGTCA
 TTTTCGGCGAGGACCGCTTTCGCTGGAGCGCGACGATGATCGGCCTGTCGCTTGGGAT
 TCGGAATCTTGCACGCCCTCGCTCAAGCCTTCGTCACTGGTCCC GCCACCAAACGTTTCGG
 CGAGAAGCAGGCCATTATCGCCGGCATGGCGGCCGACGCGCTGGGCTACGTCTTGCTGGC
 GTTCGCGACGCGAGGCTGGATGGCCTTCCCCATTATGATTCTTCTCGCTTCCGGCGGCATC
 .GGGATGCCCGGTTGCAGGCCATGCTGTCCAGGCAGGTAGATGACGACCATCAGGGACA
 GCTTCAAGGATCGCTCGCGGCTCTTACCAGCCTAACTTCGATCATTGGACCGCTGATCGTC

ACGGCGATTTATGCCGCCTCGGGCAGCACATGGAACGGGTTGGCATGGATTGTAGGCGCC
 GCCCTATACCTTGTCTGCCTCCCCGCGTTGCGTGCGGTGCATGGAGCCGGGCCACCTCG
 ACCTGAATGGAAGCCGGCGGCACCTCGCTAACGGATTCACCACTCCAAGAATTGGAGCC
 AATCAATTCTTGCGGAGAACTGTGAATGCGCAAACCAACCCTTGGCAGAACATATCCATC
 GCGTCCGCCATCTCCAGCAGCCGCACGCGGCATCTCGGCTTTCGATTTGTTTTGAATG
 GTTTATCCGATAAAGAAGTTGAAGAACAACTGGAATCAATCGCCGAACGTTTAGAAGG
 TATCGAGCAAGATATAACGTGACAGTCGATCAAAGAAAAACAATGAAAAGAGGGATAG
 TTAATGAGTACGGTTATTTTAGCTGAAAAACCAAGCCAGGCATTAGCCTACGCAAGTGCT
 TTAANAACAAAGCACCAAAAAAGACGGTTATTTTGAGATCAAAGACCCACTATTTACAGAT
 GAAACGTTTATCACCTTTGGTTTTGGGCATTTAGTGGAATTAGCAGAACCAGGTCATTATG
 ACGAAAAGTGGAATAATTGGAACCTTGAATCTTTGCCGATTTTTCCTGATCGATACGATT
 TTGAAGTTGCAAAAGATAAGGGAAAGCAGTTTAAAATTGTTGCAGAACTTCTCAAAAAG
 GCAAATACAATTATTGTTGCAACAGATAGCGACAGAGAAGGTGAAAATATCGCCTGGTC
 GATTATCCATAAAGCAAATGCCTTTTCAAAAAGATAAAACATTTAAAAGACTATGGATCAA
 TAGCTTAGAAAAAGATGTAATCCGAAGCGGTTTTCAAAATTGCAACCTGGAATGAATTA
 CTATCCCTTTTATCAAGAAGCGCAAACACGCCAAATTGCCGATTGGTTGATCGGCATGAA
 CGCAAGCCCTTTGTATACGTTAAATTTACAACAGAAGGGCGTACAAGGTACATTTTCACT
 AGGACGTGTTCAAACGCCACCTTATACCTTATTTTCAGCGCCAGGAAGCCATAGAGAA
 TTTTAAAAAAGAACCTTTTTTCGAGGTGGAAGCTAGTATAAAAAGTAAACCAAGGGTCGTT
 TAAGGGCGTTCTAAGCCCCACACAGCGTTTTAAAACCCAAGAGGAGCTTTTAGCTTTTGT
 TTCTTCTAAACAAGCTAAAATAGGCAATCAAGAGGGGATAATTGCTGATGTTCAAACCAA
 AGAGAAGAAAACGAATAGTCCGAGTTTGTCTTTTAAAGTAGTTTGCAATCAAAAAGTCAA
 TCAGCTTTATAAAGCGACAGCGAGCCAACTTTAAAAGCTATTTCTTTTTTAATAACTTAA
 AAATAA ACTTAAATGTAACAGCAAGCACAGTCAAGGTATACACCTTTGACAAAAAATAGC
 ACATTCTCTATCGAAAATTTTGCTTATTTTAAATTAATTTGGGAAATTTCCCAATCCC
 TTTTCTAACTCAAAAAATATAATCACTCAAAATTTAAAAGGGCGCACTTATACATCATTT
 TAAAAAATTGATGTAACGTGCTAAGTTCAAACAAAGGGCGCACTTATACACGATTTTCA
 ATCTTGATATTTCTAACGAAAAGCGTGCGCCAAAAAACCCCTTCGTCAATTTTGACAG
 GGGGCTTTTTGATGTAAAAATTTCTATCGAAATTTAAAATTCGCTTCACTCATGTTATAA
 AGACTTAAAATAAAATAACTCTTTAAAATCTTTTGCTAGTTGTTCTTCAATATTTTTTATTC
 GGTGCATCTTCCAAGTAAAGTATAACACACTAGACTTATTTACTACGTTTCATAAGTCATT
 AATGCGTGTGCTCTGCGAGGCTAGTTTTTGTCGAAGCACAAAAAATGGACTGAATAAATC
 AGTCCATAAGTTCAAACCAAATTCAAAATCAAACCACAAGCAACCAAAAAATGTGGT
 TGTTATACGTTTATAAATTTATGATCACTTACGTGTATAAAATTAATTCACCTTTCAAAA
 TCTAAAAACTAAATCCAATCATCTACCCTATGAATTATATCTTGAAATTCATTCATAAATA
 GTGAAGCATGGTAACCATCACATACAGAATGATGAAGTTGCAGAGCAACTGGTATATAA
 ATTTTATTATTCTCACTATAAAATTTACCTATCGTAATAATAGGCAATAAAAAGCTGCTAT

TGTTACCAATATTTAAATTAATGAACTAAAATCAATCCAAGGAATCATTGAAATCGGTA
TGGTGTTTTCAGGTATCGGTTTTTTAGGAAACATTTCTTCTTTATCTTTATATTCAAGCAAG
TCATTTTTATAATTATTATAAAAAGAAATGAAGTTTTATCAGATTCAGTCCAAATGTTAG
TAAATTTTTTCAGTTTGCTTATTA AAAACTGTATACAAAGGATTTAACTTATCCCAATAACC
TAATTTATTCTCACTATTAATTCCTGTTCTAAACACTTTATTTTTATTTACAACCTCCATAA
TTGCATAAATTAAGAGGGGATAAATTCATATCCTTTCTTTTTATCATATCTTTAAACAA
AGTAATATCAATTTCTTTAGTAATGCTATAAGTAGTTTGCTGATTAAAATAGTGTTCAAAA
TATTCTTTTCTATCCCAATTTTCTAATTCATAATATTTAAAAGTCATATATAACTTCCTCCT
AAATTTTTAAATTTTTATTTAGGAGGAATAATCCTCTGATTTTTTCATACGTTATGTCACC
TCGTAATATTAATTATACTGAATTAGCAATTTTTATCAAATAAAACTTATTTTACTTCCA
AAACCTAAATTCACGTTGCCAAAAATCAATCTGCTTTTGCAATTGTTTTTCGTTCCGTTTT
AAAGTCGATTTCAATTAATCCGTTAAATCAATTGGAGATATTTCTCTAATCAATTTTTTAA
ATTTAGTCTTAGTATTCTTACTTAGCTTTCCCACATACTTTCTTCATGCAACAAAGTATAA
ACCATAGCTTGCTCATTATTTTTCTAAAGTAGCCACGCAGGTTTCAAGATGTGTAAT
CATTAAAACAATCATTCCAGTAATCAACCATATCTCTTTTAATCAACTTCTACACGCCA
TAAATGTTTCAGACACAACCTCAACATCTGCGTTATCTTTACGTTCTTGTTTTTTATTATAAA
TTCTAATAAATCTATCACTATCACGGACACCAAAATATTTTGTTCGGCTTGCCATTACG
ACCATAAAAAACAGTTTTCTTAACTGCTTTATCAGTCATTGCATAGTAATCGCTCAAATCA
TCTTCAAATCAAAGCTAAGTCTAATCTTGTA AAACCGTCATCTTCCATGTAGTCGATAA
TATTTTGTTTTAAACCAAATCATTCTTCATGTGTGAGTTTATTGGGATTAAATTCAACACG
CATATTACGTCTATCCCAAGTATCTGCTTTTACTTTGTCATATTCGATATAAACTTTTTCTT
GAAGTGCCTTAGCTTTAACTTTGTTTGAAGTATATCCCAAAGTCGTATTTGTGGCTCTAC
ACTCATAAAGTCAGATAGCTTTTTAGCATTAGTTTTGTTCAAATTTCCAACGATTGTCATG
GCATCAAACTTAATGCGGGTTGAGATTTCCCAAAGTTTGACCACTTAACCGGCTATTA
CTTAACCGGCTATTAGAGACGGAACCTAACTCAACGCTAGTAGTGGATTTAATCCCAAATG
AGCCAACAGAACCAGAACCAGAAACAGAACAAGTAACATTGGAGTTAGAAATGGAAGA
AGAAAAAGCAATGATTCGTGTGAATAATGCACGAAATCATTGCTTATTTTTTTAAAAA
GCGATATACTAGATATAACGAAACAACGAACCTGAATAAAGAATACAAAAAAGAGCCAC
GACCAGTTAAAGCCTGAGAACTTTAACTGCGAGCCTTAATTGATTACCACCAATCAATT
AAAGAAGTCGAGACCCAAAATTTGGTAAAGTATTTAATTACTTTATTAATCAGATACTTA
AATATCTGTAAACCCATTATATCGGGTTTTGAGGGGATTTCAAGCTTTAAGAAGATAACC
AGGCAATCAATTAAGAAAACTTAGTTGATTGCCTTTTTTGTGTTGATTCAACTTTGATCG
TAGCTTCTAACTAATTAATTTTCGTAAGAAAGGAGAACAGCTGAATGAATATCCCTTTTGT
TGTAGAACTGTGCTTCATGACGGCTTGTTAAAGTACAAATTTAAAAATAGTAAAATTCG
CTCAATCACTACCAAGCCAGGTA AAAAGTAAAGGGGCTATTTTTGCGTATCGCTCAAAAAA
AAGCATGATTGGCGGACGTGGCGTTGTTCTGACTTCCGAAGAAGCGATTACGAAAATCA
AGATACATTTACGCATTGGACACCAAACGTTTATCGTTATGGTACGTATGCAGACGAAAA

CCGTTCATACACTAAAGGACATTCTGAAAACAATTTAAGACAAATCAATACCTTCTTTATT
 GATTTTGATATTCACACGGAAAAAGAACTATTTTCAGCAAGCGATATTTTAACAACAGCT
 ATTGATTTAGGTTTTATGCCTACGTTAATTATCAAATCTGATAAAGGTTATCAAGCATATT
 TTGTTTTAGAAAACGCCAGTCTATGTGACTTCAAAAATCAGAATTTAAATCTGTCAAAGCAG
 CCAAAAATAATCTCGCAAAATATCCGAGAATATTTTGGAAAAGTCTTTGCCAGTTGATCTAA
 CGTGCAATCATTTTGGGATTGCTCGTATACCAAGAACGGACAATGTAGAATTTTTTGATCC
 CAATTACCGTTATTCTTTCAAAGAATGGCAAGATTGGTCTTTCAAACAAACAGATAATAA
 GGGCTTTACTCGTTCAAGTCTAACGGTTTTAAGCGGTACAGAAGGCAAAAAACAAGTAGA
 TGAACCTGGTTAATCTCTTATTGCACGAAACGAAATTTTCAGGAGAAAAGGGTTTAGT
 AGGGCGCAATAGCGTTATGTTTACCCTCTCTTTAGCCTACTTTAGTTCAGGCTATTCAATC
 GAAACGTGCGAATATAATATGTTTGAGTTTAATAATCGATTAGATCAACCCTTAGAAGAA
 AAAGAAGTAATCAAAATTGTTAGAAGTGCCTATTCAGAAAATCAAGGGGGCTAATAG
 GGAATACATTACCATTCTTTGCAAAGCTTGGGTATCAAGTGATTTAACAGTAAAGATT
 ATTTGTCCGTCAAGGGTGGTTTAAATTCAAGAAAAAAGAAGCGAACGTCAACGTGTTCA
 TTTGTCAGAATGGAAAGAAGATTTAATGGCTTATATTAGCGAAAAAAGCGATGTATACAA
 GCCTTATTTAGCGACGACCAAAAAAGAGATTAGAGAAGTGCTAGGCATTCCTGAACGGA
 CATTAGATAAATTGCTGAAGGTACTGAAGGCGAATCAGGAAATTTTCTTTAAGATTAAAC
 CAGGAAGAAATGGTGGCATTCAACTTGCTAGTGTTAAATCATTGTTGCTATCGATCATT
 AATTAAGAAAGAAAGAACGAGAAAGCTATATAAAGGCGCTGACAGCTTCGTTTAATTTA
 GAACGTACATTTATTCAAGAACTCTAAACAAATTGGCAGAACGCCCAAAACGGACCC
 ACAACTCGATTTGTTAGCTACGATACAGGCTGAAAATAAAACCCGCACTATGCCATTAC
 ATTTATATCTATGATACGTGTTTGTCTTTTCTTTGCTGTTTAGTGAATGATTAGCAGAAATAT
 ACAGAGTAAGATTTTAATTAATTATAGGGGGAGAAGGAGAGAGTAGCCCGAAAACCTT
 TAGTTGGCTTGGACTGAACGAAGTGAGGGAAAGGCTACTAAAACGTGAGGGGCAGTGA
 GAGCGAAGCGAACACTTGATCTTTAAGTTGCTATCATTTATAGGTCAATAGAGTATAACC
 TATTTGTCCTAATATGATTTTAGCAGTATAATTGACTTGGTGAATAGGTCATTTAAGTTGG
 GCATAATAGGAGGAGTAAAATGAAAAATTTATTTATCGAGTTTTAGAAAATGACGAAG
 TGGTGGCTATTTTTAATGAGCAACAATATGCGCAAGATTTTATCGCTTACGAAAAGACAA
 TTTCTGATAAGCAATTTGAAATTGAAAAAGTAGATATTGCTGATTGGTTATTGCAACCGA
 GAGAATTTTAGAGGTTGGTTGAAAATGGCTAAAATTGGTTATGCACGTGTAGTAGCAAA
 GAACAGAACTTAGATCGGCAATTACAAGCGTTACAGGGCGTTTCTAAGGTCTTTTCAGAC
 AAATTAAGCGGTCAATCGGTGCAACGCCACAATTACAAGCTATGCTTAACTATATTCGT
 GAAGGGGATATTGTTATTGTTACTGAATTAGATCGATTAGGACGAAATAATAAGAATTA
 ACAGAATTGATGAATCAAATTCAAATTAAGGGGGCAACCCTGGAAGTCTTAAATTTACCC
 TCAATGAATGGTATTGAAGATGAAAATTTAAGGCGTTTGATTAATAGCCTTGTCATTGAA
 TTGTACAAGTATCAAGCAGAATCAGAACGAAAAAATAAAGGAACGTCAAGGCACAAGG
 AATCGAAATTGCTAAGAAAAAGGCAAATTCAAAGGTGCTCAGCATAAATTTAAAGAAA

ATGATCCACGTTTAAAGTCGGGCAGCGTTGGGTCTTGCCACGGGTGCGCATGATCGTGC
 TCCTGTGTTGAGGACCCGGCTAGGCTGGCGGGTTGCCTTACTGGTTAGCAGAATGAAT
 CACCGATACGCGAGCGAACGTGAAGCGACTGCTGCTGCAAAACGTCTGCGACCTGAGCA
 ACAACATGAATGGTCTTCGGTTTCCGTGTTTCGTAAAGTCTGGAAACGCGGAAGTCCCCT
 ACGTGCTGCTGAAGTTGCCCGCAACAGAGAGTGGAACCAACCGGTGATACCACGATACT
 ATGACTGAGAGTCAACGCCATGAGCGGCCTCATTCTTATTCTGAGTTACAACAGTCCGC
 ACCGCTGCCGGTAGCTCCTCCGGTGGGCGCGGGGCATGACTATCGTCGCCGCACTTATG
 ACTGTCTTCTTTATCATGCAACTCGTAGGACAGGTGCCGGCAGCGCCCAACAGTCCCCCG
 GCCACGGGGCTGCCACCATACCCACGCCGAAACAAGCGCCCTGCACCATTATGTTCCGG
 ATCTGCATCGCAGGATGCTGCTGGCTACCTGTGGAACACCTACATCTGTATTAACGAAG
 CGCTAACCGTTTTTATCAGGCTCTGGGAGGCAGAATAAATGATCATATCGTCAATTATTA
 CCTCCACGGGGAGAGCCTGAGCAAACCTGGCCTCAGGCATTTGAGAAGCACACGGTCACA
 CTGCTTCCGGTAGTCAATAAACCGGTAAACCAGCAATAGACATAAGCGGCTATTTAACGA
 CCCTGCCCTGAACCGACGACCGGGTCGAATTTGCTTTTGAATTTCTGCCATTCATCCGCTT
 ATTATCACTTATTCAGGCGTAGCAACCAGGCGTTTAAAGGGCACCAATAACTGCCTTAAAA
 AAATTACGCCCCGCCCTGCCACTCATCGCAGTACTGTTGTAATTCATTAAGCATTCTGCCG
 ACATGGAAGCCATCACAAACGGCATGATGAACCTGAATCGCCAGCGGCATCAGCACCTT
 GTCGCCTTGCGTATAATATTTGCCCATGGTGAAAACGGGGGCGAAGAAGTTGTCCATATT
 GGCCACGTTTAAATCAAAACTGGTGAAACTCACCCAGGGATTGGCTGAGACGAAAAACA
 TATTCTCAATAAACCTTTAGGGAAATAGGCCAGGTTTTACCGTAACACGCCACATCTT
 GCGAATATATGTGTAGAAACTGCCGAAATCGTCGTGGTATTCACTCCAGAGCGATGAAA
 ACGTTTTAGTTGCTCATGGAAAACGGGTGTAACAAGGGTGAACACTATCCCATATCACCA
 GCTCACCGTCTTTCATTGCCATACGG (SEQ ID No: 55).

La secuencia corresponde exactamente a la secuencia predicha del PSA clonado en pGG55. El marco abierto de lectura de LLO-PSA está subrayado; las letras minúsculas indican la secuencia de PSA en solitario.

5 **EJEMPLO 8: LOS CONSTRUCTOS DE LISTERIA-LLO-PSA PROVOCAN LINFOCITOS T CITOTÓXICOS ESPECÍFICOS DE ANTÍGENO Y PROPORCIONAN PROTECCIÓN TUMORAL-I**

MATERIALES Y MÉTODOS EXPERIMENTALES

10 ***Ensayos CTL***

Ratones C57BL/6 macho se inmunizaron i.p. con 0,1 DL₅₀ de Lm-PSA o 0,1 DL₅₀ de Lm-HPV16E7E6TM y se reforzaron 1 vez después de 2 semanas. Los bazos se recuperaron 6 días después de la dosis de refuerzo. Los esplenocitos aislados se prepararon y se estimularon durante 5 días con células MC57G tratadas con mitomicina e infectadas con PSA-vaccinia como alimentadores. En el primer experimento, se realizó un ensayo CTL células EL4 pulsadas con el péptido PSA H2Db (1 μM, HCIRNKSVL; SEQ ID No: 60) como dianas marcadas con 100 μM de europio (Sigma), usando las siguientes relaciones E:T: 25:1, 8:1, 2,8:1, 0,9:1, 0,3:1, 0,1:1 y 0,03:1. Después de una incubación de 4 horas de dianas mixtas y efectores, las células se separaron del sobrenadante de cultivo por centrifugación. El europio liberado de las células lisadas en el sobrenadante se determinó como se indica a continuación: Se añadieron 10 μl del sobrenadante a 100 μl de solución de potenciación de Europio (Delfia). La absorbancia se leyó a 590 nm usando un electrofotómetro Víctor II (Perkin Elmer). La liberación máxima de Europio se determinó a partir del sobrenadante de las células diana marcadas con triton X-100 al 1% y la liberación espontánea se determinó a partir de las células diana incubadas en ausencia de células efectoras. En el segundo experimento, la relación E:T se mantuvo constante a 25:1, y las concentraciones peptídicas variaron como se indicó.

25 El porcentaje de lisis específica se determinó como [(liberación experimental - liberación espontánea)/(liberación máxima - liberación espontánea)] x 100.

Ensayos de secreción de citocinas

5 Ratonos C57BL/6 macho se inmunizaron con Lm-PSA o *Listeria* que expresaban diferentes fragmentos de antígeno de tumor de Wilm (control negativo) o se dejaron sin inmunizar. Los ratones se reforzaron una vez después de dos semanas y los bazos se recuperaron 6 días después de la dosis de refuerzo. Los esplenocitos aislados se prepararon y se estimularon *in vitro* durante una noche en presencia del péptido PSA H2Db 1 μ M. La secreción de IFN- γ por los esplenocitos aislados se determinó por ensayo ELISpot.

10 Cultivo celular, materiales y reactivos

Las células de adenocarcinoma de próstata de ratón TRAMP-C1 obtenidas a partir de un tumor de próstata de ratón C57BL/6 se adquirieron en ATCC. Esta línea celular es negativa para la expresión de PSA. Las células se mantuvieron en medio de Eagle modificado por Dulbecco con L-glutamina 4 mM ajustado para contener 1,5 g/l de bicarbonato sódico y 4,5 g/l de glucosa complementada con 0,005 mg/ml de insulina bovina y deshidroisoandrosterona 10 nM, 90%; suero fetal bovino, 5%; Nu-Serum IV, 5%. El gen que codifica la proteína PSA humana de longitud completa, incluyendo su secuencia de señal, se subclonó en un plásmido pUV6/v5 (Invitrogen). Después de la confirmación de la secuencia correcta, el plásmido se linearizó y se transfectó en células TRAMP-C1 usando Lipofectamina 2000™ (Invitrogen). Los clones positivos se seleccionaron en presencia de 10 μ g/ml de blastidina. Varios clones PSA que se expresan de forma estable se aislaron y se ensayaron para comprobar la secreción de PSA humano en el medio de cultivo celular.

Inoculación tumoral subcutánea

25 Dos clones diferentes de células TRAMP-C1 que expresan PSA se resuspendieron en 5×10^6 células por 200 μ l de dosis. Ratonos C57BL/6 macho (8 por grupo, 6-8 semanas de edad) se inocularon s.c. en el costado izquierdo.

Estudios de regresión tumoral

30 Siete días después de la inoculación del tumor, los ratones se inmunizan con 0,1 DL₅₀ de Lm-PSA (10^7 UFC), 0,1 DL₅₀ de Lm-HPV16E7 o PBS. Se administran dos dosis de refuerzo los días 15 y 25 después de la inoculación del tumor. Los tumores se supervisan durante 90 días. El tamaño del tumor se define como la media de dos diámetros perpendiculares.

35 Inyección ortotópica de células tumorales de próstata

Ratonos C57BL/6 macho de seis semanas de edad se anestesian con isoflurano al 2%. En un campo estéril, se hace una incisión en la línea media inferior para acceder a la próstata. En el lóbulo izquierdo de la próstata dorsal se inyectan 1×10^5 células tumorales TRAMP-C1/PSA de una suspensión de una única célula en PBS, usando una aguja de calibre 27 equipada en una jeringa Hamilton de 50 μ l. Los ratones se suturan, y las suturas se eliminan 10 días después de la cirugía. Siete días más tarde, los ratones se inmunizan i.v. con Lm-PSA, LmHPV16E7 o PBS. Los ratones se sacrifican en diferentes puntos temporales, las próstatas se retiran quirúrgicamente y se pesan para determinar el crecimiento del tumor.

45 Estudios de protección tumoral

Ratonos C57BL/6 se inmunizan y se refuerzan con Lm-PSA, LmHPV16E7 o PBS, como se ha descrito en el Ejemplo anterior. Siete días después de la dosis de refuerzo, a los ratones se les inyectan s.c. 5×10^6 células tumorales TRAMP-C1/PSA. El crecimiento de los tumores se supervisa midiendo con un calibre durante 90 días.

50

Inhibición de metástasis de cáncer de próstata

Para una inoculación ortotópica de tumor, se anestesian ratones C57BL/6 macho de 8-10 semanas de edad (Jackson labs) con isoflurano. Se hace una incisión en la piel abdominal baja craneal a las glándulas prepucales, y las vesículas seminales se exteriorizan cuidadosamente para exponer la próstata dorso-lateral. Usando una jeringa de insulina de calibre 29, 5×10^5 células TRAMP-C1/PSA suspendidas en PBS se inyectan en la próstata dorso-lateral en un volumen de 20 μ l. Las vesículas seminales y la próstata se mantienen durante un minuto para permitir que las células inyectadas se establezcan en la glándula y después se reemplazan suavemente en la cavidad abdominal. La pared del cuerpo y las heridas de la piel cerradas se cierran con 5-0 PDS y 5-0 nylon, respectivamente.

60

Se deja que los tumores se desarrollen durante 50 días. El tumor principal se elimina durante la necropsia, se fija en formalina, después se impregna en parafina, se secciona y se tiñe con H&E. Los nodos linfáticos agrandados de la región paralumbar se visualizan bajo microscopía quirúrgica, después se diseccionan, se fijan, se impregnan y se analizan histológicamente para determinar la presencia de células de cáncer de próstata.

5

Inmunotinción tisular

Los tejidos de tumor de próstata fijados en formalina se impregnan en parafina, se seccionan, se aplican a Plus slides™ (VWR Corp), y después se tiñen usando un sistema de autotinción Dako. Los cortes se trataron previamente con peróxido de hidrógeno al 3,0% durante 10 minutos, después se aclararon y se trataron con una solución de 10 µg/ml de solución de proteinasa K durante 3 minutos para potenciar la recuperación antigénica. Los sitios de unión no específicos se bloquean mediante la adición de suero de cabra normal durante 30 minutos, y después se aplica al tejido durante 30 minutos una solución de 10 µg/ml de anticuerpo PSA anti-humano de conejo (Sigma) o un antígeno nuclear de células proliferativas anti-humano de ratón (AB15497, AbCam antibodies). El anticuerpo principal se retira mediante lavado, y se aplica un anticuerpo secundario marcado con peroxidasa de rábano rusticano apropiado durante un período de 30 minutos y se detecta usando un sustrato NovaRed™ (Vector Labs, Burlingame, CA) en una incubación de 8 minutos. Los cortes se contratiñen con hematoxilina antes del secado.

Las células de los cortes de las secciones principal y del nodo linfático se puntúan como positivas o negativas para PSA humano. Se seleccionan de forma aleatoria cuatro regiones de cada corte, y se puntúan 20 células de cada región. La tinción de PSA en tumores se compara con las metástasis del nodo linfático del mismo ratón.

Cepas de Listeria

25 Las vacunas de *Listeria* se preparan y se almacenan como se ha descrito en el Ejemplo anterior.

RESULTADOS

Para ensayar la inmunogenicidad de LLO-PSA, ratones C57BL/6 de 6-8 semanas de edad (Jackson Laboratories) se inmunizaron i.p. con Lm-PSA (0,1 DL₅₀, 1 x 10⁷ UFC/dosis) o Lm-HPV16E7E6TM (control negativo, 0,1 DL₅₀, 1 x 10⁶ UFC/dosis) o se dejaron sin inmunizar. Los esplenocitos de ratones vacunados se ensayaron para determinar su capacidad para reconocer y lisar células que presentan el péptido PSA *in vitro* en un ensayo CTL. Los esplenocitos de los ratones inmunizados fueron capaces de reconocer y lisar células de tumor pulsadas con el péptido PSA con una elevada eficacia (figura 20A). Adicionalmente, la respuesta fue dependiente de la dosis con respecto a la cantidad de antígeno que presentaban las células diana (figura 20B).

En ensayos adicionales, los ratones se inmunizaron con Lm-PSA o cepas que expresan fragmentos de antígeno de tumor de Wilm (control negativo), y se determinó la secreción de citocinas, en respuesta a la incubación con el péptido PSA. Los esplenocitos de los ratones vacunados mostraban altos niveles de secreción de IFN-γ (figura 18).

Por lo tanto, las cepas de LM que expresan PSA y las fusiones LLO-PSA son eficaces en la inducción de CTL específicos de antígeno que son capaces de la lisis de células diana y la secreción de IFN-γ. Por consiguiente, las cepas de LM que expresan PSA y las fusiones LLO-PSA son eficaces en la vacunación terapéutica y profiláctica frente a un cáncer de próstata que expresa PSA.

Las vacunas de *Listeria* que se han descrito en el Ejemplo anterior se usan en experimentos de protección tumoral en un modelo animal de carcinoma de próstata ortotópico. Los ratones se inmunizan con Lm-PSA, LmHPV16E7 o PBS, después se les inyectó TRAMPC-1. Lm-PSA protege a los ratones de la formación de tumores.

En experimentos adicionales, a los ratones se les inyectó en primer lugar células de cáncer de próstata TRAMPC-1/PSA, se vacunaron con Lm-PSA, LmHPV16E7 o PBS 4 días más tarde y se reforzaron con la misma vacuna. Lm-PSA impide el crecimiento de metástasis prostáticas.

Por lo tanto, las cepas de LM que producen PSA y las fusiones LLO-PSA inducen la protección frente a tumores.

EJEMPLO 9: LOS CONSTRUCTOS DE LISTERIA-LLO-PSA PROVOCAN LINFOCITOS T CITOTÓXICOS ESPECÍFICOS DE ANTÍGENO Y PROPORCIONAN PROTECCIÓN TUMORAL-II

MATERIALES Y MÉTODOS EXPERIMENTALES

Estudio de invasión por macrófagos *in vitro*. Las células J774A.1 de tipo macrófago murino se pusieron en

placas a 1×10^6 células por pocillo de placas de 24 pocillos. El día después, las células se infectaron en MOI de 1:1 con diferentes cepas de *Lm* durante 1 hora en ausencia de antibióticos. Las bacterias extracelulares se eliminaron mediante lavado e incubación de las células en un medio que contenía 50 $\mu\text{g/ml}$ de gentamicina durante 30 min a 37 °C y CO_2 al 5%. El crecimiento bacteriano intracelular se supervisó tomando muestras en diferentes puntos temporales hasta durante 8 horas seguido de valoración de las bacterias en placas de BHI después de lisar las células con dH_2O .

Eficacia anti-tumoral. TRAMPC-1 es una línea celular de tumor de próstata de adenocarcinoma murino en el fondo de ratón C57BL/6 y se usó para construir un modelo de tumor de próstata que secreta PSA para ensayar la eficacia de *Lm*-LLO-PSA como una vacuna. El marco abierto de lectura de PSA humano completo, incluyendo su secuencia de señal de secreción en el N-terminal de la molécula, se clonó bajo el control del promotor UbC en el plásmido pUB6/V5 (Invitrogen). El plásmido resultante (pAdv63) se secuenció para la confirmación de la secuencia génica PSA correcta y después se transfectó en la línea celular TRAMPC-1 usando lipofectamina 2000 (Invitrogen). Las células transfectadas se seleccionaron cultivando las células en un medio que contenía 10 $\mu\text{g/ml}$ de blasticidina (Invitrogen). Los clones individuales se aislaron mediante el método de dilución limitante y se cribaron para la secreción de PSA en el medio de cultivo extracelular usando un kit ELISA de PSA anti-humano. Se obtuvieron varios clones positivos, se expandieron y se almacenaron en nitrógeno líquido. Se seleccionó un clon (T-PSA23) para estudios adicionales.

Estudio de regresión tumoral. Tres grupos de 8 ratones C57BL/6 macho (6-8 semanas de edad) se inocularon s.c. en el costado derecho con 5×10^6 células T-PSA23. Siete días más tarde, cuando los tumores alcanzaron un diámetro medio de 4-5 mm, se inmunizaron i.p. con *Lm*-LLO-PSA (1×10^7 UFC/dosis), *Lm*-LLO-E7 (1×10^8 UFC/dosis) o no se trataron. *Lm*-LLO-E7 que se ha descrito previamente por Gunn y col., se construyó de la misma manera que *Lm*-LLO-PSA, pero en lugar de PSA, expresó HPV16E7 y se usó en este experimento como un control irrelevante de *Lm*. Las inmunizaciones se repitieron dos veces con intervalos de 1 semana. Los tumores se supervisaron semanalmente durante siete semanas. Se recogieron muestras de sangre de todos los animales experimentales el día 40 después de la inoculación del tumor de la vena de la cola, y la presencia de la proteína PSA en los sueros se ensayó usando el kit ELISA de PSA. Para estudios de comparación, las células tumorales se inyectaron como se ha descrito anteriormente. Los ratones se inmunizaron dos veces con *Lm*-LLO-PSA (1×10^7 UFC/dosis en 200 μl de PBS), un PSA-vaccinia recombinante (1×10^7 UFP/dosis en 200 μl de PBS, i.p.) o una vacuna de pDNA que comprende una mezcla de PSA/pCDNA3.1 (100 μg) con GM-CSF/pCDNA3.1 (100 μg) en 50 μl de volumen, por inyección intramuscular en el cuádriceps izquierdo. Los tumores se supervisaron una vez a la semana usando un calibre electrónico y el tamaño de los tumores se expresó como la media de dos diámetros perpendiculares.

Estudios de inmunogenicidad en ratones

Ensayo ELISpot: Grupos de 4-5 ratones macho C57BL/6 (6-8 semanas de edad) se inmunizaron tres veces con *Lm*-LLO-PSA o un constructo similar que contenía un antígeno irrelevante como control negativo (*Lm*-LLO-WT1), o no se inmunizaron (sin tratar). Seis días después de la dosis de refuerzo, los bazo se recuperaron y se procesaron para dar una suspensión de célula única. Los glóbulos rojos se lisaron por incubación de 2 min con solución de lisado ACK seguida de dos lavados con medio C-RPMI. Los esplenocitos aislados se colocaron en placas en 2×10^5 células/pocillo en presencia del péptido PSA_{65-74} 1 μM (epítipo PSA H2D^b-restringido HCIRNKSVIL) en placas ELISpot cubiertas previamente con anticuerpo $\text{IFN-}\gamma$ de ratón (mAb AN18). Las placas se incubaron durante una noche a 37 °C. Las células formadoras de puntos (SFC) se detectaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Mabtech AB). Los puntos se contaron usando un microscopio de disección.

Tinción intracelular para $\text{IFN-}\gamma$. Los esplenocitos aislados de los ratones inmunizados, de control o sin tratar se estimularon en 2×10^6 células/pocillo durante 5 h en placas de 96 pocillos de fondo redondo con 1 μM de péptido PSA_{65-74} o péptidos de control en presencia de IL-2 (50 U/ml) y monensina A (StopGolgi, BD Biosciences). Las células incubadas en el medio sin péptido se usaron como control negativo. Después de la incubación, las células se tiñeron con anticuerpos CD8-FITC, CD3-PerCP-Cy5.5 y CD62L-APC anti-ratón. Posteriormente, las células se permeabilizaron y se tiñeron con anticuerpo $\text{IFN-}\gamma$ -PE anti-ratón y se analizaron en un citómetro FACS Calibur (BD Biosciences). Los datos se analizaron usando el software CellQuest Pro. Las células se separaron como $\text{CD3}^+\text{CD8}^+\text{CD62L}^{\text{baja}}$ y el número de células $\text{IFN-}\gamma$ -positivas se expresó como un porcentaje de células separadas totales.

Ensayo de citotoxicidad. La actividad citotóxica de linfocitos T en respuesta a la vacunación con *Lm*-LLO-PSA se midió por un ensayo CTL específico de PSA. A grupos de 4 ratones macho C57BL/6 se les inyectaron i.p. tres dosis de *Lm*-LLO-PSA (1×10^7 UFC) o una *Listeria* que expresa un antígeno irrelevante (HPV16E7E6), con intervalos de

una semana. El grupo sin tratar no recibió inmunización alguna. Los bazo de los ratones inmunizados y sin tratar se recuperaron 6 días después de la última dosis de refuerzo. Los esplenocitos se incubaron durante 5 días en medio C-RPMI que contenía 20 U/ml de ratón IL-2 (Sigma), en presencia de células MC57G infectadas con PSA/vaccinia (MOI 5 durante 4 horas) y se trataron con mitomicina C en una relación efector:estimulador de 1:20. El ensayo de citotoxicidad se realizó durante 4 horas incubando las células efectoras con células diana EL4, se pulsaron durante 1 hora con el péptido H2D^b, PSA₆₅₋₇₄ y se marcaron con europio. El Europio liberado de las células lisadas se midió mezclando una muestra del sobrenadante del cultivo celular con una solución de potenciación de europio (Delfia/Perkin Elmer, Waltham, MA) y una lectura de la absorbancia a 590 nm (Perkin Elmer/Wallac, VictorII). Se realizaron dos conjuntos de ensayos: a) usando diferentes relaciones efector:diana (E:T) a una concentración peptídica fija de 1 μM; y b) usando diferentes concentraciones del péptido PSA a una relación fija E:T de 25:1. Los valores SC₅₀ se calcularon como la concentración de péptidos requerida para el 50% del valor de la concentración peptídica máxima usada (1 μM) menos el nivel de fondo a 0 μM.

Análisis de linfocitos infiltrantes de tumores (TIL): Las células T-PSA23 impregnadas en matrigel se inocularon s.c. en el costado derecho de ratones C57BL/6 macho, que se inmunizaron los días 7 y 14 con *Lm*-LLO-PSA, una vacuna de control de *Lm* o se dejaron sin tratar. El día 20, los tumores se extirparon quirúrgicamente, se lavaron en PBS enfriado con hielo y se picaron con un escalpelo. El tumor se incubó en una solución de recuperación celular de matrigel (BD Biosciences) durante 2 horas sobre hielo. Se liberaron adicionalmente TIL por ruptura mecánica del tejido en un filtro de células usando un émbolo de jeringa. Las células aisladas se tiñeron con un PSA₆₅₋₇₄ H-2D^b tetrámero-PE y anticuerpos CD8-FITC, CD3-PerCP-Cy5.5 y CD62L-APC anti-ratón para caracterizar CTL específicos para el epítipo PSA. Para analizar los linfocitos T reguladores en el tumor, también se tiñeron TIL con CD4-FITC, CD3-PerCP-Cy5.5 y CD25-APC. Posteriormente, las células se permeabilizaron y se tiñeron con anticuerpo anti-FoxP3-PE (Milteny Biotec). Las células se analizaron en un citómetro FACS Calibur (BD Biosciences). Los datos se analizaron usando el software CellQuest Pro. Los linfocitos T reguladores se definieron como células CD3⁺CD4⁺CD25⁺Fop3⁺.

Análisis estadístico: Se aplicaron pruebas no paramétricas de Mann-Whitney y Kruskal Wallis para comparar los tamaños tumorales entre diferentes grupos de tratamiento. Los tamaños tumorales se compararon el día 40 para su análisis estadístico, ya que éste fue el último punto temporal con el mayor número de ratones en cada grupo. La prueba t de student se usó para comparar las medias en los experimentos ELISpot. Un valor p de menos de 0,05 se consideró estadísticamente significativo en estos análisis.

RESULTADOS

***Lm*-LLO-PSA es capaz de infectar macrófagos *in vitro*.** La captación por células que presentan antígeno tales como células dendríticas y macrófagos es un requisito básico para vacunas basadas en *Lm* para administrar con éxito y presentar antígenos en el sistema inmune. Esta propiedad puede ensayarse *in vitro* infectando la línea celular de tipo macrófago murino J774A.1 y cuantificando el crecimiento bacteriano intracelular, que es una indicación de que la cepa de vacuna de *Lm* ha sido capaz de entrar apropiadamente en las células y multiplicarse. En este ensayo, *Lm*-LLO-PSA se mostró capaz de invadir macrófagos y crecer de manera similar a la cepa de tipo silvestre de *Lm* 10403s. Por el contrario, la cepa de *Lm* XFL7, que carece de *prfA* y no escapa del fagolisosoma, no es capaz de proliferar en células J774A.1 y su titulación permanece constante varias horas tras la infección (figura 14). La complementación de *prfA* en la cepa de *Lm* XFL7 con el plásmido pAdv34 dio como resultado la restauración de las propiedades invasivas *in vitro* de la cepa y esto fue comparable a las de la cepa de tipo silvestre.

***Lm*-LLO-PSA causa la regresión de tumores que expresan PSA pre-establecidos en ratones.** La eficacia de *Lm*-LLO-PSA en la regresión de tumores que expresan PSA se ensayó en un modelo de ratón usando una línea celular TRAMP-1 transfectada con PSA. Las células TrampC-1, obtenidas originariamente a partir de un tumor de adenocarcinoma de próstata murino, se transfectan de forma estable con el gen PSA humano bajo el control del promotor de Ubiquitina C humana. La secreción de PSA por células transfectadas se confirma por ELISA. Se expandieron cuatro clones y se pasaron por 25 generaciones en ausencia del marcador de selección de antibiótico, blasticidina. Los sobrenadantes del cultivo celular se ensayaron para comprobar los niveles de secreción de PSA que se mostraron comparables entre las células en un pase temprano y el pase 25 (datos no mostrados). Uno de estos clones retuvieron tumorigenicidad *in vivo* y formaron tumores sólidos tras la inoculación s.c. en ratones C57BL/6 macho. Un pase temprano de este don se usó para los estudios de tumor y se denomina como T-PSA23. A tres grupos de 8 ratones se inocularon s.c. 5 x 10⁶ células T-PSA23 y se supervisaron para comprobar el crecimiento tumoral diario. Después de 7 días, se detectó una masa tumoral sólida de 4-5 mm de diámetro en 7 de 8 ratones en cada grupo (figura 15). En este momento, los ratones se inmunizaron con *Lm*-LLO-PSA (1 x 10⁷ UFC/ratón), *Lm*-LLO-E7 (1 x 10⁸ UFC/ratón) o se dejaron sin tratar. La inmunización primaria se siguió de dos dosis de refuerzo en intervalos de 1 semana con la misma dosis que la principal. Los ratones (7 de 8) en cada uno de los grupos de control desarrollaron tumores de crecimiento lento que alcanzaron un diámetro de 2 cm en 7 semanas

después de la inoculación (figura 15), momento en el que se sacrificaron. Un ratón en cada grupo no mostró ningún síntoma de tumor en ningún momento. Cinco días después de la primera inmunización, se observó una reducción del tumor en 7 de 8 del grupo inmunizado con *Lm*-LLO-PSA y se observó una regresión tumoral completa en 5 de estos ratones después de 1 semana. Uno de los tumores en el grupo inmunizado con *Lm*-LLO-PSA permaneció estable hasta la tercera inmunización. Sin embargo, una semana después de la tercera vacunación, este tumor también regresó y se volvió indetectable. Otro ratón en este grupo desarrolló un tumor de crecimiento lento que alcanzó un tamaño de 18-20 mm en 7 semanas y se sacrificó. Al final del estudio en la semana 8 después de la inoculación del tumor, 7 de 8 ratones en el grupo inmunizado con *Lm*-LLO-PSA estaban libres de tumores. Este experimento se repitió dos veces con resultados similares. El análisis no paramétrico estadístico de Kruskal-Wallis se realizó sobre los tamaños de tumor el día 40, antes de que los ratones en los grupos sin tratar y *Lm*-LLO-E7 se sacrificaran. No hubo ninguna diferencia estadísticamente significativa entre los tamaños tumorales de los ratones en el grupo sin tratar y los ratones inmunizados con *Lm*-LLO-E7 ($p = 0,613$). Sin embargo, se demostró que la inmunización con *Lm*-LLO-PSA tuvo un impacto significativo sobre el crecimiento del tumor T-PSA23 ($p = 0,002$). Las muestras de suero de controles y ratones inmunizados con *Lm*-LLO-PSA se recogieron el día 40 después de la estimulación del tumor y se ensayaron para comprobar la presencia de PSA usando un kit ELISA PSA anti-humano (American Qualex). Se detectaron niveles significativos de PSA (5-10 ng/ml) en el suero de ratones de control y en el ratón en el grupo de *Lm*-LLO-PSA que tenía tumores. No se encontró PSA en el suero de ratones inmunizados con *Lm*-LLO-PSA después de la regresión tumoral.

20 *Lm*-LLO-PSA provoca respuestas inmunes celulares contra PSA tanto en bazo como en tumores. Para dilucidar si la vacunación con *Lm*-LLO-PSA indujo CTL específicos de PSA capaces de infiltrar el tumor, a los ratones se les implantó s.c. con una mezcla de células T-PSA23 + matrigel y se inmunizaron con dos dosis de *Lm*-LLO-PSA, *Lm*-LLO-E7 o ninguna. Los bazo y tumores se recuperaron 6 días después de la última inmunización y se ensayaron para comprobar la presencia de linfocitos T CD8⁺/PSA₆₅₋₇₄(H2D^b restringido) tetrámero positivo mediante análisis FACS. No se observó ninguna respuesta anti-PSA significativa en los bazo de ratones sin tratar (0,05%) o vacunados con *Lm*-LLO-E7 (0,09%) (figura 16, panel superior). Sin embargo, tras la inmunización con *Lm*-LLO-PSA, se encontró un número significativo de linfocitos T CD8⁺ específicos de PSA en los bazo. De forma interesante, cuando se ensayaron los tumores extirpados de estos ratones para comprobar la presencia de TIL, se identificó un bajo número de linfocitos T CD8⁺ específicos de PSA tanto en ratones sin tratar como inmunizados con *Lm*-LLO-E7 (1,5% y 0,51% respectivamente). La inmunización con *Lm*-LLO-PSA causó un aumento considerable en este número ya que se demostró que el 16,1% de todos los TIL CD8⁺ era específico de PSA₆₅₋₇₄ (figura 16 panel inferior).

La inmunización con *Lm*-LLO-PSA causa una disminución de los linfocitos T reguladores en los tumores pero no en los bazo. La presencia de linfocitos infiltrantes de tumor T reguladores (Treg) CD4⁺/CD25⁺/FoxP3⁺ ha demostrado estar asociada al aumento de la posibilidad de progresión tumoral. Por lo tanto, se examinó la presencia de esta población de linfocitos T en tumores de ratones inmunizados con *Lm*-LLO-PSA o de control. De forma interesante, la inmunización con *Lm*-LLO-PSA o *Lm*-LLO-E7 causó un descenso considerable en la frecuencia de Tregs en los tumores en comparación con los tumores de ratones sin tratar (figura 17). De hecho, *Lm*-LLO-PSA tenía ligeramente más impacto que *Lm*-LLO-E7 en la frecuencia de Treg infiltrantes de tumor. Por otro lado, no hubo ninguna diferencia significativa entre los porcentajes de linfocitos T CD4⁺/CD25⁺/FoxP3⁺ aislados de los bazo de ratones de *Lm*-LLO-PSA o de control.

La inmunización con *Lm*-LLO-PSA da como resultado fuertes respuestas inmunes celulares contra PSA. Las respuestas inmunes provocadas por vacunas basadas en *Lm* han demostrado que dan como resultado respuestas celulares, en lugar de humorales. Se investigó la activación y funcionalidad de linfocitos T CD8⁺ inducidos por *Lm*-LLO-PSA en bazo de ratones inmunizados.

Secreción de citocinas. La secreción de IFN- γ por linfocitos T activados en respuesta a una estimulación *in vitro* con péptido H2D^b PSA se ensayó por ELISpot y tinción intracelular de citocinas. Los ratones se inmunizaron tres veces con *Lm*-LLO-PSA o *Lm*-LLO-WT-1 (*Lm*-LLO-Antígeno de tumor de Wilm como control negativo) o se dejaron sin inmunizar (sin tratar). Después, los esplenocitos aislados se prepararon y se incubaron con el péptido PSA y las células CD8⁺ secretoras de IFN- γ se cuantificaron. En ambos ensayos, los ratones inmunizados con *Lm*-LLO-PSA mostraron un número significativamente mayor de células secretoras de IFN- γ en respuesta a la pulsación peptídica que los controles negativos ($p < 0,001$). El número de células secretoras IFN- γ medido por ensayo ELISpot, era aproximadamente 11 veces mayor que los controles (figura 18). Al ensayarse por tinción intracelular de citocinas para IFN- γ , se detectó un aumento de 30 veces en el número de células secretoras de IFN- γ CD8⁺CD62L^{baja} de ratones inmunizados con *Lm*-LLO-PSA en comparación con el control (4,22% para *Lm*-LLO-PSA frente al 0,15% para ratones sin tratar) (figura 19).

Ensayo de citotoxicidad (CTL). Con el fin de determinar la actividad funcional de los linfocitos T específicos para

PSA, los esplenocitos de ratones inmunizados o sin tratar se ensayaron en un ensayo CTL contra células pulsadas con el péptido H2D^b PSA. Usando una concentración de péptidos fija (1 μ M), los esplenocitos de ratones inmunizados con *Lm*-LLO-PSA mostraron una lisis específica máxima del 60%, que se redujo en proporción con la relación E:T (figura 20A). Este resultado fue dependiente de la concentración peptídica en el ensayo de lisis con un valor máximo que alcanza una concentración peptídica de únicamente 0,1 μ M (figura 20B). El valor SC₅₀ de la población policlonal, que es una medida útil de la avidéz de linfocitos T media era aproximadamente 1 pM. Los resultados de este experimento también confirmaron que la inmunización con *Lm*-LLO-PSA generó linfocitos T citotóxicos específicos de alta avidéz capaces de lisar células que muestran el antígeno diana PSA.

- 10 **Comparación de los efectos anti-tumorales de *Lm*-LLO-PSA con otras modalidades de vacuna basada en PSA.** Finalmente, para evaluar adicionalmente la vacuna de *Lm*-LLO-PSA se comparó su eficacia antitumoral con dos vacunas basadas en PSA diferentes que se habían descrito en la bibliografía, es decir, un ADN recombinante y una vacuna basada en vaccinia. Para ello, el marco abierto de lectura completo de PSA se clonó en pCDNA3.1 bajo el control del promotor hCMV (pAdv40.1). Una vacuna de ADN similar se describió previamente por Roos y col. usando una estructura de vector similar, es decir, pVax (Invitrogen). La diferencia entre las dos estructuras de vector (pCDNA3.1 y pVax) está únicamente en su marcador de selección de antibiótico. pAdv40.1 se inyectó i.m. como una mezcla con GM-CSF/pCDNA, que se ha usado como un adyuvante eficaz para otras vacunas de ADN. La expresión de PSA del plásmido PSA/pCDNA se confirmó por transfección *in vitro* en la línea celular 293FT (datos no mostrados). PSA-vaccinia recombinante se ha descrito previamente por Hudge y col. Los ratones se implantaron con células tumorales T-PSA23 como se ha descrito anteriormente y después se inmunizaron dos veces con cada una de las vacunas por la dosis óptima y la ruta de administración como se cita en la bibliografía. La inmunización PSA/vaccinia no tuvo ningún impacto sobre el crecimiento de tumores T-PSA23 ya que todos los ratones sin tratar e inmunizados con PSA/vaccinia desarrollaron tumores que alcanzaron un tamaño de 20 cm en 7-8 semanas y tuvieron que sacrificarse (figura 21b). Sin embargo, 1 de 8 ratones inmunizados con la vacuna PSA/ADN y 3 de 8 ratones vacunados con *Lm*-LLO-PSA permanecieron sin tumor durante 90 días, momento en el que el estudio se terminó (figura 21A y el inserto de la tabla). Este experimento se repitió dos veces mostrando resultados similares. Por lo tanto, *Lm*-LLO-PSA demostró ser la vacuna más eficaz de las tres modalidades PSA-vaccinia en la regresión de los tumores establecidos que expresan PSA. Ha de apreciarse que en los estudios de comparación, debido a la disponibilidad limitada de las otras dos vacunas, únicamente se administraron dos dosis. Por lo tanto, *Lm*-LLO-PSA se mostró menos eficaz (la regresión tumoral completa se observó en únicamente 3 de 8) que al inyectarse tres veces (donde 7 de 8 tumores regresaron, como se observa en la figura 15). Esta observación se confirmó en varios estudios distintos (datos no mostrados).

35 **EJEMPLO COMPARATIVO 10: LOS CONSTRUCTOS DE *LISTERIA*-LLO-FOLATO HIDROLASA 1 (FOLH1) Y *LISTERIA*-LLO-ANTÍGENO DE CÉLULAS MADRE DE PRÓSTATA (PSCA) PROVOCAN LINFOCITOS T CITOTÓXICOS ESPECÍFICOS DE ANTÍGENO**

MATERIALES Y MÉTODOS EXPERIMENTALES

40 ***Crecimiento y almacenamiento de cepas de vacunas bacterianas***

Se dejaron crecer *Listeria*-LLO-FOLH1 y *Listeria*-LLO-PSCA recombinantes y se mantienen como se ha descrito para *Listerin*-PSA en el Ejemplo 7 anterior.

45 **RESULTADOS**

Un gen que codifica una FOLH1 truncada, que contiene el marco abierto de lectura completo de FOLH1, excepto para su secuencia de señal de secreción, se fusiona a un gen que codifica un fragmento no hemolítico truncado de Listeriolisina O, de una manera similar a la que se ha descrito para KLK3 en el Ejemplo 7 anterior. De forma análoga, un gen que codifica un PSCA truncado, que contiene el marco abierto de lectura completo de PSCA, excepto para su secuencia de señal de secreción, se fusiona a un gen que codifica un fragmento no hemolítico truncado de Listeriolisina O. Cada gen se dona en el plásmido de *Listeria* pGG55 y se electropora en LM XFL-7. Por lo tanto, la proteína LLO-FOLH1 y la proteína LLO-PSCA se expresan y se secretan episomalmente a partir de cepas recombinantes de *Listeria* separadas.

55 Para ensayar la inmunogenicidad de LLO-FOLH1 y LLO-PSCA, los ratones se inmunizaron de nuevo con *Lm*-LLO-FOLH1, *Lm*-LLO-PSCA o *Lm*WT1A (control antigénico irrelevante) o PBS (control negativo), como se ha descrito para LLO-KLK3 en el Ejemplo 7 anterior. Tras el cultivo con células estimuladoras infectadas con vaccinia-PSA durante 5 días, los esplenocitos de los ratones vacunados con FOLH1 son capaces de reorganizar y lisar células tumorales pulsadas con el péptido FOLH1 con alta eficacia en un ensayo CTL y los esplenocitos de ratones vacunados con PSCA son capaces de reorganizar y lisar células tumorales pulsadas con el péptido PSCA con alta

eficacia en un ensayo CTL. Además, los esplenocitos muestran altos niveles de secreción de IFN- γ , en respuesta a la incubación con el péptido FOLH1 o el péptido PSCA, respectivamente.

Por lo tanto, las cepas de LM que expresan FOLH1, las cepas de LM que expresan PSCA, las fusiones LLO-PSCA y las fusiones LLO-FOLH1 son eficaces en la inducción de CTL específicos de antígeno que son capaces de la lisis de células diana y la secreción de IFN- γ . Por consiguiente, las cepas de LM que expresan FOLH1, las cepas de LM que expresan PSCA, las fusiones LLO-PSCA y las fusiones LLO-FOLH1 son eficaces en la vacunación terapéutica y profiláctica frente a cáncer de próstata que expresa PSA.

10 **EJEMPLO COMPARATIVO 11: LOS CONSTRUCTOS DE LISTERIA-LLO-FOLH1 PROPORCIONAN PROTECCIÓN TUMORAL**

Las vacunas de *Listeria* que se han descrito en los Ejemplos anteriores se usan en experimentos de protección tumoral en el modelo animal de carcinoma de próstata ortotópico que se ha descrito en los Ejemplos 8 y 9 anteriores. Los ratones se inmunizan con Lm-FOLH1, Lm-PSCA, LmWT1A o PBS, y después se les inyectan PC3M-LN4 o células 22Rv1. Lm-FOLH1 y Lm-PSCA protegen a los ratones contra la formación de tumores.

En experimentos adicionales, a los ratones se les inyectó en primer lugar células de cáncer de próstata PC-3M, como se ha descrito para los Ejemplos 8 y 9 anteriores, se vacunaron con Lm-FOLH1, Lm-PSCA, LmWT1A o PBS 4 días más tarde, y se reforzaron con la misma vacuna. Lm-FOLH1 y Lm-PSCA impiden metástasis prostáticas.

Por lo tanto, las cepas de LM que producen FOLH1 y PSCA y las fusiones Lm-FOLH1 y Lm-PSCA inducen la protección tumoral.

25 **LISTADO DE SECUENCIAS**

<110> Los Directivos de la Universidad de Pensilvania
ADVAXIS

30 <120> COMPOSICIONES Y MÉTODOS QUE COMPRENDEN EL ANTÍGENO KLK3, PSCA O FOLH1

<130> P-7769-PC2

<150> 11/798.177

35 <151> 2007-05-10

<160> 64

<170> PatentIn versión 3.3

40

<210> 1

<211> 32

<212> PRT

<213> *Listeria monocytogenes*

45

<400> 1

Lys Glu Asn Ser Ile Ser Ser Met Ala Pro Pro Ala Ser Pro Pro Ala
1 5 10 15

Ser Pro Lys Thr Pro Ile Glu Lys Lys His Ala Asp Glu Ile Asp Lys
20 25 30

<210> 2

<211> 14

50

<212> PRT

<213> *Listeria monocytogenes*

<400> 2

Lys Thr Glu Glu Gln Pro Ser Glu Val Asn Thr Gly Pro Arg
1 5 10

55

<210> 3

<211> 28

ES 2 531 967 T3

<212> PRT
 <213> *Listeria monocytogenes*

<400> 3
 Lys Ala Ser Val Thr Asp Thr Ser Glu Gly Asp Leu Asp Ser Ser Met
 1 5 10 15

Gln Ser Ala Asp Glu Ser Thr Pro Gln Pro Leu Lys
 20 25

5
 <210> 4
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> *Listeria monocytogenes*

10
 <400> 4
 Lys Asn Glu Glu Val Asn Ala Ser Asp Phe Pro Pro Pro Pro Thr Asp
 1 5 10 15
 Glu Glu Leu Arg
 20

15
 <210> 5
 <211> 33
 <212> PRT
 <213> *Listeria monocytogenes*

<400> 5
 Arg Gly Gly Ile Pro Thr Ser Glu Glu Phe Ser Ser Leu Asn Ser Gly
 1 5 10 15

Asp Phe Thr Asp Asp Glu Asn Ser Glu Thr Thr Glu Glu Glu Ile Asp
 20 25 30

20
 Arg
 <210> 6
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> *Streptococcus pyogenes*

25
 <400> 6
 Lys Gln Asn Thr Ala Ser Thr Glu Thr Thr Thr Thr Asn Glu Gln Pro
 1 5 10 15

Lys
 <210> 7
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> *Streptococcus equisimilis*

30
 <400> 7
 Lys Gln Asn Thr Ala Asn Thr Glu Thr Thr Thr Thr Asn Glu Gln Pro
 1 5 10 15

Lys
 <210> 8
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Artificial

35
 <220>
 <223> sintetizado químicamente

40

ES 2 531 967 T3

<400> 8
 5 ggctcgagca tggagataca cc 22
 <210> 9
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Artificial
 10 <220>
 <223> sintetizado químicamente
 <400> 9
 15 ggggactagt ttatggttc tgagaaca 28
 <210> 10
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Artificial
 20 <220>
 <223> sintetizado químicamente
 <400> 10
 25 gggggctagc cctccttga ttagtatatt c 31
 <210> 11
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Artificial
 30 <220>
 <223> sintetizado químicamente
 <400> 11
 35 ctccctcgag atcataatt actcatc 28
 <210> 12
 <211> 55
 <212> ADN
 <213> Artificial
 40 <220>
 <223> sintetizado químicamente
 <400> 12
 45 gactacaagg acgatgaccg acaagtgata accogggatc taaataaatc cgtt 55
 <210> 13
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Artificial
 50 <220>
 <223> sintetizado químicamente
 <400> 13
 60 cccgtcgacc agctcttctt ggtgaag 27
 <210> 14

ES 2 531 967 T3

<211> 100
<212> PRT
<213> Listeria monocytogenes

5

<400> 14
Met Arg Ala Met Met Val Val Phe Ile Thr Ala Asn Cys Ile Thr Ile
1 5 10 15
Asn Pro Asp Ile Ile Phe Ala Ala Thr Asp Ser Glu Asp Ser Ser Leu
20 25 30

Asn Thr Asp Glu Trp Glu Glu Glu Lys Thr Glu Glu Gln Pro Ser Glu
35 40 45

Val Asn Thr Gly Pro Arg Tyr Glu Thr Ala Arg Glu Val Ser Ser Arg
50 55 60

Asp Ile Lys Glu Leu Glu Lys Ser Asn Lys Val Arg Asn Thr Asn Lys
65 70 75 80

Ala Asp Leu Ile Ala Met Leu Lys Glu Lys Ala Glu Lys Gly Pro Asn
85 90 95

Ile Asn Asn Asn
100

10

<210> 15
<211> 390
<212> PRT
<213> Listeria monocytogenes

<400> 15

ES 2 531 967 T3

Met Arg Ala Met Met Val Val Phe Ile Thr Ala Asn Cys Ile Thr Ile
 1 5 10 15

Asn Pro Asp Ile Ile Phe Ala Ala Thr Asp Ser Glu Asp Ser Ser Leu
 20 25 30

Asn Thr Asp Glu Trp Glu Glu Glu Lys Thr Glu Glu Gln Pro Ser Glu
 35 40 45

Val Asn Thr Gly Pro Arg Tyr Glu Thr Ala Arg Glu Val Ser Ser Arg
 50 55 60

Asp Ile Lys Glu Leu Glu Lys Ser Asn Lys Val Arg Asn Thr Asn Lys
 65 70 75 80

Ala Asp Leu Ile Ala Met Leu Lys Glu Lys Ala Glu Lys Gly Pro Asn
 85 90 95

Ile Asn Asn Asn Asn Ser Glu Gln Thr Glu Asn Ala Ala Ile Asn Glu
 100 105 110

Glu Ala Ser Gly Ala Asp Arg Pro Ala Ile Gln Val Glu Arg Arg His
 115 120 125

Pro Gly Leu Pro Ser Asp Ser Ala Ala Glu Ile Lys Lys Arg Arg Lys
 130 135 140

Ala Ile Ala Ser Ser Asp Ser Glu Leu Glu Ser Leu Thr Tyr Pro Asp

ES 2 531 967 T3

atgCGTgCga tgatggTggt tttcattact gccAattgca ttacgattaa ccccgacata 60
atatttgCag cgacagatag cgaagattct agtctaaaca cagatgaatg ggaagaagaa 120
aaaacagaag agcaaccaag cgaggtaaAt acgggaccaa gatacgaaac tgcacgtgaa 180
gtaagtTcac gtgatattaa agaactagaa aaatcgaata aagtGagaaa tacgaacaaa 240
gcagacctaA tagcaatgTt gaaagaaaaa gcagaaaaag gtccaaatat caataataac 300
aacagtgaac aaactgagaa tgcggctata aatgaagagg cttcaggagc cgaccgacca 360
gctatacaag tggagcGtcg tcatccagga ttgccatcgg atagcgcagc ggaaattaa 420
aaaagaagga aagccatagc atcatcggat agtgagcttg aaagccttac ttatccggat 480
aaaccaacaa aagtaaataa gaaaaaagtG gcgaaagagt cagttGcggg tgcttctgaa 540
agtgacttag attctagcat gcagtcagca gatgagcttT caccacaacc tttaaaagca 600
aaccaacaac ctttttccc taaagtattt aaaaaataa aagatGcggg gaaatgggta 660
cgtgataaaa tgcacgaaaa tcctgaagta aagaaagcga ttgttgataa aagtGcaggg 720
ttaattgacc aattattaac caaaaagaaa agtgaagagg taaatgcttC ggacttcccG 780
ccaccaccta cggatgaaga gttaagactt gctttgccag agacaccaat gcttcttggT 840
tttaatgctc ctgctacatc agaaccgagc tcattcgaat ttccaccacc acctacggat 900
gaagagTtaa gacttgcttT gccagagacg ccaatgcttC ttggttttaa tgctcctgct 960
acatcggaaC cgagctcgtt cgaatttcca cgcctccaA cagaagatga actagaaatc 1020
atccgggaaa cagcatcctc gctagattct agttttacaa gaggggattt agctagtttG 1080
agaaatgcta ttaatcgcca tagtcaaaat ttctctgatt tcccaccaat cccaacagaa 1140
gaagagTtga acgggagagg cggtagacca 1170

<210> 17
<211> 529
<212> PRT
<213> Listeria monocytogenes

5

<400> 17
Met Lys Lys Ile Met Leu Val Phe Ile Thr Leu Ile Leu Val Ser Leu
1 5 10 15
Pro Ile Ala Gln Gln Thr Glu Ala Lys Asp Ala Ser Ala Phe Asn Lys
20 25 30
Glu Asn Ser Ile Ser Ser Met Ala Pro Pro Ala Ser Pro Pro Ala Ser
35 40 45
Pro Lys Thr Pro Ile Glu Lys Lys His Ala Asp Glu Ile Asp Lys Tyr
50 55 60
Ile Gln Gly Leu Asp Tyr Asn Lys Asn Asn Val Leu Val Tyr His Gly
65 70 75 80

ES 2 531 967 T3

Asp Ala Val Thr Asn Val Pro Pro Arg Lys Gly Tyr Lys Asp Gly Asn
 85 90 95
 Glu Tyr Ile Val Val Glu Lys Lys Lys Lys Ser Ile Asn Gln Asn Asn
 100 105 110
 Ala Asp Ile Gln Val Val Asn Ala Ile Ser Ser Leu Thr Tyr Pro Gly
 115 120 125
 Ala Leu Val Lys Ala Asn Ser Glu Leu Val Glu Asn Gln Pro Asp Val
 130 135 140
 Leu Pro Val Lys Arg Asp Ser Leu Thr Leu Ser Ile Asp Leu Pro Gly
 145 150 155 160
 Met Thr Asn Gln Asp Asn Lys Ile Val Val Lys Asn Ala Thr Lys Ser
 165 170 175
 Asn Val Asn Asn Ala Val Asn Thr Leu Val Glu Arg Trp Asn Glu Lys
 180 185 190
 Tyr Ala Gln Ala Tyr Pro Asn Val Ser Ala Lys Ile Asp Tyr Asp Asp
 195 200 205
 Glu Met Ala Tyr Ser Glu Ser Gln Leu Ile Ala Lys Phe Gly Thr Ala
 210 215 220
 Phe Lys Ala Val Asn Asn Ser Leu Asn Val Asn Phe Gly Ala Ile Ser
 225 230 235 240
 Glu Gly Lys Met Gln Glu Glu Val Ile Ser Phe Lys Gln Ile Tyr Tyr
 245 250 255
 Asn Val Asn Val Asn Glu Pro Thr Arg Pro Ser Arg Phe Phe Gly Lys
 260 265 270
 Ala Val Thr Lys Glu Gln Leu Gln Ala Leu Gly Val Asn Ala Glu Asn
 275 280 285
 Pro Pro Ala Tyr Ile Ser Ser Val Ala Tyr Gly Arg Gln Val Tyr Leu
 290 295 300
 Lys Leu Ser Thr Asn Ser His Ser Thr Lys Val Lys Ala Ala Phe Asp
 305 310 315 320
 Ala Ala Val Ser Gly Lys Ser Val Ser Gly Asp Val Glu Leu Thr Asn
 325 330 335
 Ile Ile Lys Asn Ser Ser Phe Lys Ala Val Ile Tyr Gly Gly Ser Ala
 340 345 350

ES 2 531 967 T3

Lys Asp Glu Val Gln Ile Ile Asp Gly Asn Leu Gly Asp Leu Arg Asp
 355 360 365
 Ile Leu Lys Lys Gly Ala Thr Phe Asn Arg Glu Thr Pro Gly Val Pro
 370 375 380
 Ile Ala Tyr Thr Thr Asn Phe Leu Lys Asp Asn Glu Leu Ala Val Ile
 385 390 395 400
 Lys Asn Asn Ser Glu Tyr Ile Glu Thr Thr Ser Lys Ala Tyr Thr Asp
 405 410 415
 Gly Lys Ile Asn Ile Asp His Ser Gly Gly Tyr Val Ala Gln Phe Asn
 420 425 430
 Ile Ser Trp Asp Glu Val Asn Tyr Asp Pro Glu Gly Asn Glu Ile Val
 435 440 445
 Gln His Lys Asn Trp Ser Glu Asn Asn Lys Ser Lys Leu Ala His Phe
 450 455 460
 Thr Ser Ser Ile Tyr Leu Pro Gly Asn Ala Arg Asn Ile Asn Val Tyr
 465 470 475 480
 Ala Lys Glu Cys Thr Gly Leu Ala Trp Glu Trp Trp Arg Thr Val Ile
 485 490 495
 Asp Asp Arg Asn Leu Pro Leu Val Lys Asn Arg Asn Ile Ser Ile Trp
 500 505 510
 Gly Thr Thr Leu Tyr Pro Lys Tyr Ser Asn Lys Val Asp Asn Pro Ile
 515 520 525

Glu

<210> 18

<211> 441

<212> PRT

<213> Listeria monocytogenes

<400> 18

Met Lys Lys Ile Met Leu Val Phe Ile Thr Leu Ile Leu Val Ser Leu
 1 5 10 15

Pro Ile Ala Gln Gln Thr Glu Ala Lys Asp Ala Ser Ala Phe Asn Lys
 20 25 30

Glu Asn Ser Ile Ser Ser Val Ala Pro Pro Ala Ser Pro Pro Ala Ser
 35 40 45

5

ES 2 531 967 T3

Pro Lys Thr Pro Ile Glu Lys Lys His Ala Asp Glu Ile Asp Lys Tyr
 50 55 60
 Ile Gln Gly Leu Asp Tyr Asn Lys Asn Asn Val Leu Val Tyr His Gly
 65 70 75 80
 Asp Ala Val Thr Asn Val Pro Pro Arg Lys Gly Tyr Lys Asp Gly Asn
 85 90 95
 Glu Tyr Ile Val Val Glu Lys Lys Lys Lys Ser Ile Asn Gln Asn Asn
 100 105 110
 Ala Asp Ile Gln Val Val Asn Ala Ile Ser Ser Leu Thr Tyr Pro Gly
 115 120 125
 Ala Leu Val Lys Ala Asn Ser Glu Leu Val Glu Asn Gln Pro Asp Val
 130 135 140
 Leu Pro Val Lys Arg Asp Ser Leu Thr Leu Ser Ile Asp Leu Pro Gly
 145 150 155 160
 Met Thr Asn Gln Asp Asn Lys Ile Val Val Lys Asn Ala Thr Lys Ser
 165 170 175
 Asn Val Asn Asn Ala Val Asn Thr Leu Val Glu Arg Trp Asn Glu Lys
 180 185 190
 Tyr Ala Gln Ala Tyr Ser Asn Val Ser Ala Lys Ile Asp Tyr Asp Asp
 195 200 205
 Glu Met Ala Tyr Ser Glu Ser Gln Leu Ile Ala Lys Phe Gly Thr Ala
 210 215 220
 Phe Lys Ala Val Asn Asn Ser Leu Asn Val Asn Phe Gly Ala Ile Ser
 225 230 235 240
 Glu Gly Lys Met Gln Glu Glu Val Ile Ser Phe Lys Gln Ile Tyr Tyr
 245 250 255
 Asn Val Asn Val Asn Glu Pro Thr Arg Pro Ser Arg Phe Phe Gly Lys
 260 265 270
 Ala Val Thr Lys Glu Gln Leu Gln Ala Leu Gly Val Asn Ala Glu Asn
 275 280 285
 Pro Pro Ala Tyr Ile Ser Ser Val Ala Tyr Gly Arg Gln Val Tyr Leu
 290 295 300
 Lys Leu Ser Thr Asn Ser His Ser Thr Lys Val Lys Ala Ala Phe Asp
 305 310 315 320

ES 2 531 967 T3

Ala Ala Val Ser Gly Lys Ser Val Ser Gly Asp Val Glu Leu Thr Asn
 325 330 335

Ile Ile Lys Asn Ser Ser Phe Lys Ala Val Ile Tyr Gly Gly Ser Ala
 340 345 350

Lys Asp Glu Val Gln Ile Ile Asp Gly Asn Leu Gly Asp Leu Arg Asp
 355 360 365

Ile Leu Lys Lys Gly Ala Thr Phe Asn Arg Glu Thr Pro Gly Val Pro
 370 375 380

Ile Ala Tyr Thr Thr Asn Phe Leu Lys Asp Asn Glu Leu Ala Val Ile
 385 390 400

Lys Asn Asn Ser Glu Tyr Ile Glu Thr Thr Ser Lys Ala Tyr Thr Asp
 405 410 415

Gly Lys Ile Asn Ile Asp His Ser Gly Gly Tyr Val Ala Gln Phe Asn
 420 425 430

Ile Ser Trp Asp Glu Val Asn Tyr Asp
 435 440

<210> 19

<211> 416

<212> PRT

<213> Listeria monocytogenes

5

<400> 19

Met Lys Lys Ile Met Leu Val Phe Ile Thr Leu Ile Leu Val Ser Leu
 1 5 10 15

Pro Ile Ala Gln Gln Thr Glu Ala Lys Asp Ala Ser Ala Phe Asn Lys
 20 25 30

Glu Asn Ser Ile Ser Ser Val Ala Pro Pro Ala Ser Pro Pro Ala Ser
 35 40 45

Pro Lys Thr Pro Ile Glu Lys Lys His Ala Asp Glu Ile Asp Lys Tyr
 50 55 60

Ile Gln Gly Leu Asp Tyr Asn Lys Asn Asn Val Leu Val Tyr His Gly
 65 70 75 80

Asp Ala Val Thr Asn Val Pro Pro Arg Lys Gly Tyr Lys Asp Gly Asn
 85 90 95

Glu Tyr Ile Val Val Glu Lys Lys Lys Lys Ser Ile Asn Gln Asn Asn
 100 105 110

Ala Asp Ile Gln Val Val Asn Ala Ile Ser Ser Leu Thr Tyr Pro Gly

ES 2 531 967 T3

<212> PRT
 <213> Listeria seeligeri

<400> 20
 Arg Ser Glu Val Thr Ile Ser Pro Ala Glu Thr Pro Glu Ser Pro Pro
 1 5 10 15

5 Ala Thr Pro

<210> 21
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Listeria monocytogenes

10

<400> 21
 Lys Glu Asn Ser Ile Ser Ser Met Ala Pro Pro Ala Ser Pro Pro Ala
 1 5 10 15

Ser Pro Lys

<210> 22
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Artificial

15

<220>
 <223> sintetizado químicamente

20

<400> 22
 gcggatccca tggagataca cctac 25

<210> 23
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Artificial

25

<220>
 <223> sintetizado químicamente

30

<400> 23
 gcggatccca tggagataca cctac 25

<210> 24
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Virus del papiloma humano

35

<400> 24
 Arg Ala His Tyr Asn Ile Val Thr Phe
 1 5

40

<210> 25
 <211> 261
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

45

<400> 25

ES 2 531 967 T3

Met Trp Val Pro Val Val Phe Leu Thr Leu Ser Val Thr Trp Ile Gly
 1 5 10 15

Ala Ala Pro Leu Ile Leu Ser Arg Ile Val Gly Gly Trp Glu Cys Glu
 20 25 30

Lys His Ser Gln Pro Trp Gln Val Leu Val Ala Ser Arg Gly Arg Ala
 35 40 45

Val Cys Gly Gly Val Leu Val His Pro Gln Trp Val Leu Thr Ala Ala
 50 55 60

His Cys Ile Arg Asn Lys Ser Val Ile Leu Leu Gly Arg His Ser Leu
 65 70 75 80

Phe His Pro Glu Asp Thr Gly Gln Val Phe Gln Val Ser His Ser Phe
 85 90 95

Pro His Pro Leu Tyr Asp Met Ser Leu Leu Lys Asn Arg Phe Leu Arg
 100 105 110

Pro Gly Asp Asp Ser Ser His Asp Leu Met Leu Leu Arg Leu Ser Glu
 115 120 125

Pro Ala Glu Leu Thr Asp Ala Val Lys Val Met Asp Leu Pro Thr Gln
 130 135 140

Glu Pro Ala Leu Gly Thr Thr Cys Tyr Ala Ser Gly Trp Gly Ser Ile
 145 150 155 160

Glu Pro Glu Glu Phe Leu Thr Pro Lys Lys Leu Gln Cys Val Asp Leu
 165 170 175

His Val Ile Ser Asn Asp Val Cys Ala Gln Val His Pro Gln Lys Val
 180 185 190

Thr Lys Phe Met Leu Cys Ala Gly Arg Trp Thr Gly Gly Lys Ser Thr
 195 200 205

Cys Ser Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Val Cys Asn Gly Val Leu Gln
 210 215 220

Gly Ile Thr Ser Trp Gly Ser Glu Pro Cys Ala Leu Pro Glu Arg Pro
 225 230 235 240

Ser Leu Tyr Thr Lys Val Val His Tyr Arg Lys Trp Ile Lys Asp Thr
 245 250 255

Ile Val Ala Asn Pro
 260

<210> 26

<211> 5873

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 26

ES 2 531 967 T3

ggtgtccttag gcacactggt cttggagtgc aaaggatcta ggcacgtgag gctttgtatg 60
 aagaatcggg gatcgtaccc accccctggt tctgtttcat cctgggcatg tctcctctgc 120
 ctttgtcccc tagatgaagt ctccatgagc tacaagggcc tgggtcatcc agggatgatc 180
 agtaattgca gaacagcaag tgctagctct ccctcccctt ccacagctct ggggtgtggga 240
 gggggttgtc cagcctccag cagcatgggg agggccttgg tcagcctctg ggtgccagca 300
 gggcaggggc ggagtcttgg ggaatgaagg ttttataggg ctctggggg aggctcccca 360
 gccccaaagct taccacctgc acccggagag ctgtgtcacc atgtgggtcc cggttgtctt 420
 cctcacctctg tccgtgacgt ggatttgtga gaggggcatc ggttgggggg atgcaggaga 480
 gggagccagc cctgactgtc aagctgaggc tctttcccc ccaaccagc accccagccc 540
 agacagggag ctgggctctt ttctgtctct cccagcccca cttcaagccc atacccccag 600
 tcccctccat attgcaacag tcctcactcc cacaccaggt ccccgctccc tcccacttac 660
 cccagaactt tcttccatt tgcccagcca gctccctgct cccagctgct ttactaaagg 720
 ggaagttcct gggcatctcc gtgtttctct ttgtggggct caaaacctcc aaggacctct 780
 ctcaatgcca ttggttcctt ggaccgtatc actgggtccat ctctgagcc cctcaatcct 840
 atcacagtct actgactttt cccattcagc tgtgagtgtc caaccctatc ccagagacct 900
 tgatgcttgg cctcccaatc ttgccctagg ataccagat gccaaccaga cacctccttc 960
 tttcctagcc aggctatctg gcctgagaca acaaatgggt ccctcagtct ggcaatggga 1020
 ctctgagaac tcctcattcc ctgactctta gccccagact cttcattcag tggcccacat 1080
 tttccttagg aaaaacatga gcatccccag ccacaactgc cagctctctg agtccccaaa 1140
 tctgcatcct tttcaaaacc taaaaaaca aagaaaaaca aataaaaca aaccaactca 1200
 gaccagaact gttttctcaa cctgggactt cctaaacttt ccaaaacctt cctcttccag 1260
 caactgaacc tcgccataag gcacttatcc ctggttccta gcaccctta tcccctcaga 1320
 atccacaact tgtaccaagt ttcccttctc ccagtccaag accccaaatc accacaaagg 1380
 acccaatccc cagactcaag atatggtctg ggcgctgtct tgtgtctcct accctgatcc 1440
 ctgggttcaa ctctgctccc agagcatgaa gcctctccac cagcaccagc caccaacctg 1500
 caaacctagg gaagattgac agaattccca gcctttccca gctccccctg cccatgtccc 1560

ES 2 531 967 T3

aggactccca gccttggttc tctgccccg tgtcttttca aaccacatc ctaaaccat 1620
 ctccatccg agtccccag tccccctgt caaccctgat tcccctgatc tagcaccccc 1680
 tctgcaggcg ctgcgcccct catcctgtct cggattgtgg gaggctggga gtgcgagaag 1740
 cattcccaac cctggcaggt gcttgtggcc tctcgtggca gggcagtctg cggcgggtgtt 1800
 ctggtgcacc cccagtgggt cctcacagct gccactgca tcaggaagtg agtaggggcc 1860
 tggggtctgg ggagcaggtg tctgtgtccc agaggaataa cagctgggca ttttccccag 1920
 gataacctct aaggccagcc ttgggactgg gggagagagg gaaagtctg gttcaggtca 1980
 catggggagg cagggttggg gctggaccac cctccccatg gctgcctggg tctccatctg 2040
 tgtccctcta tgtctctttg tgtcgtttc attatgtctc ttggtaactg gcttcgggtg 2100
 tgtctctccg tgtgactatt ttgttctctc tctccctctc ttctctgtct tcagtctcca 2160
 tatctcccc tctctctgtc cttctctggt ccctctctag ccagtgtgtc tcaccctgta 2220
 tctctctgcc aggtctgtc tctcggctc tgtctcacct gtgccttctc cctactgaac 2280
 acacgcacgg gatgggcctg ggggaccctg agaaaaggaa gggctttggc tgggcgcggg 2340
 ggctcacacc tgtaatcca gcactttggg aggccaaggc aggtagatca cctgaggtca 2400
 ggagttcgag accagcctgg ccaactggtg aaaccctatc tctactaaa atacaaaaa 2460
 ttagccaggc gtggtggcgc atgcctgtag tcccagctac tcaggagctg agggaggaga 2520
 attgcattga acctggaggt tgaggttgca gtgagccgag accgtgccac tgcactccag 2580
 cctgggtgac agagtgagac tccgcctcaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaga 2640
 aaagaaaaga aaagaaaagg aagtgtttta tccctgatgt gtgtgggtat gagggtatga 2700
 gagggccct ctcactccat tccttctcca ggacatccct ccactcttgg gagacacaga 2760
 gaagggctgg ttccagctgg agctgggagg ggcaattgag ggaggaggaa ggagaagggg 2820
 gaaggaaaac agggatggg ggaaaggacc ctggggagcg aagtggagga tacaacctg 2880
 ggctgcagg caggctacct accacttgg aaaccacgc caaagccga tctacagctg 2940
 agccactctg aggcctcccc tccccggcgg tccccactca gctccaaagt ctctctccct 3000
 tttctctccc acactttatc atccccgga tctctctcta cttggttctc attcttcctt 3060
 tgacttctg cttccctttc tcattcatct gtttctcact ttctgcctgg tttgttctt 3120
 ctctctctct ttctctggcc catgtctgtt tctctatggt tctgtctttt ctttctcatc 3180
 ctgtgtatth tcggctcacc ttgtttgtca ctgttctccc ctctgccctt tcattctctc 3240
 tgcctttta cctcttctt tttcccttgg ttctctcagt tctgtatctg cccttcacc 3300
 tctcacactg ctgtttcca actcgttgtc tgtatthtgg cctgaactgt gtcttccaa 3360
 ccctgtgttt tctcactgtt tcttttctc ttttggagcc tcctccttgc tcctctgtcc 3420
 cttctctctt tccttatcat cctcgtcct cattcctgcg tctgcttct ccccagaaa 3480
 agcgtgatct tgctgggtcg gcacagcctg tttcatctg aagacacagg ccaggtatth 3540
 caggtcagcc acagcttccc acaccgctc tacgatatga gcctcctgaa gaatcgattc 3600

ES 2 531 967 T3

ctcaggccag gtgatgactc cagccacgac ctcatgctgc tccgcctgtc agagcctgcc 3660
 gagctcacgg atgctgtgaa ggcatggac ctgcccaccc aggagccagc actggggacc 3720
 acctgctacg cctcaggctg gggcagcatt gaaccagagg agtgtacgcc tgggcccagat 3780
 ggtgcagccg ggagcccaga tgctgggtc tgagggagga ggggacagga ctctgggtc 3840
 tgagggagga gggccaagga accaggtggg gtccagccca caacagtgtt tttgcctggc 3900
 ccgtagtctt gaccccaaag aaacttcagt gtgtggacct ccatgttatt tccaatgacg 3960
 tgtgtgcgca agttcacctc cagaaggtga ccaagttcat gctgtgtgct ggacgctgga 4020
 cagggggcaa aagcacctgc tcggtgagtc atccctactc ccaagatctt gagggaaagg 4080
 tgagtgggac cttaatcttg ggctgggtc tagaagccaa caaggcgtct gcctcccctg 4140
 ctccccagct gtagccatgc cacctccccg tgtctcatct cattccctcc ttcctcttc 4200
 tttgactccc tcaaggcaat aggttattct tacagcacia ctcatctgtt cctgcgttca 4260
 gcacacggtt actaggcacc tgctatgac ccagcactgc cctagagcct gggacatagc 4320
 agtgaacaga cagagagcag cccctccctt ctgtagcccc caagccagtg aggggacacg 4380
 gcaggaacag ggaccacaac acagaaaagc tggaggggtg caggaggtga tcaggctctc 4440
 ggggagggag aaggggtggg gagtgtgact gggaggagac atcctgcaga aggtgggagt 4500
 gagcaaacac ctgctcaggg gaggggaggg cctgcggcac ctgggggagc agaggaaca 4560
 gcatctggcc aggcctggga ggaggggcct agagggcgtc aggagcagag aggaggtgc 4620
 ctggctggag tgaaggatcg gggcaggggtg cgagagggaa caaaggacc ctctgcagg 4680
 gcctcacctg ggccacagga ggacactgct tttcctctga ggagtcagga actgtggatg 4740
 gtgctggaca gaagcaggac agggcctggc tcaggtgtcc agaggctgcg ctggcctct 4800
 atgggatcag actgcaggga gggagggcag cagggatgtg gagggagtga tgatggggct 4860
 gacctggggg tggctccagg cattgtcccc acctgggcc ttaccagacc tccctcacag 4920
 gctcctggcc ctcatctct cccctccact ccattctcca cctaccaca gtgggtcatt 4980
 ctgatcaccg aactgaccat gccagccctg ccgatggctc tccatggctc cctagtgcc 5040
 tggagaggag gtgtctagtc agagagtagt cctggaagg ggcctctgtg aggagccacg 5100
 gggacagcat cctgcagatg gtcctggccc ttgtcccacc gacctgtcta caaggactgt 5160
 cctcgtggac cctcccctct gcacaggagc tggaccctga agtcccttc taccggccag 5220
 gactggagcc cctaccctc tgttgaatc cctgccacc ttcttctgga agtcggctct 5280
 ggagacattt ctctctctt ccaaagctgg gaactgctat ctgttatctg cctgtccagg 5340
 tctgaaagat aggattgcc aggcagaaac tgggactgac ctatctact ctctccctgc 5400
 ttttacctt agggtgattc tggggccca ctgtctgta atggtgtgct tcaaggtatc 5460
 acgtcatggg gcagtgaacc atgtgccctg cccgaaaggc cttccctgta caccaagggtg 5520
 gtgcattacc ggaagtggat caaggacacc atcgtggcca acccctgagc acccctatca 5580
 agtcctatt gtagtaact tggaaacttg gaaatgacca ggccaagact caagcctccc 5640
 cagttctact gaccttctg cttaggtgtg aggtccaggg ttgctaggaa aagaaatcag 5700
 cagacacagg ttagaccag agtgtttctt aaatggtgta atttgtcct ctctgtgtcc 5760
 tggggaatac tggccatgcc tggagacata tcaactcaatt tctctgagga cacagttagg 5820
 atggggtgtc tgtgttattt gtggatata gagatgaaag aggggtggga tcc 5873

ES 2 531 967 T3

<210> 27
 <211> 238
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

<400> 27
 Met Trp Val Pro Val Val Phe Leu Thr Leu Ser Val Thr Trp Ile Gly
 1 5 10 15
 Ala Ala Pro Leu Ile Leu Ser Arg Ile Val Gly Gly Trp Glu Cys Glu
 20 25 30
 Lys His Ser Gln Pro Trp Gln Val Leu Val Ala Ser Arg Gly Arg Ala
 35 40 45
 Val Cys Gly Gly Val Leu Val His Pro Gln Trp Val Leu Thr Ala Ala
 50 55 60
 His Cys Ile Arg Asn Lys Ser Val Ile Leu Leu Gly Arg His Ser Leu
 65 70 75 80
 Phe His Pro Glu Asp Thr Gly Gln Val Phe Gln Val Ser His Ser Phe
 85 90 95
 Pro His Pro Leu Tyr Asp Met Ser Leu Leu Lys Asn Arg Phe Leu Arg
 100 105 110
 Pro Gly Asp Asp Ser Ser His Asp Leu Met Leu Leu Arg Leu Ser Glu
 115 120 125
 Pro Ala Glu Leu Thr Asp Ala Val Lys Val Met Asp Leu Pro Thr Gln
 130 135 140
 Glu Pro Ala Leu Gly Thr Thr Cys Tyr Ala Ser Gly Trp Gly Ser Ile
 145 150 155 160
 Glu Pro Glu Glu Phe Leu Thr Pro Lys Lys Leu Gln Cys Val Asp Leu
 165 170 175
 His Val Ile Ser Asn Asp Val Cys Ala Gln Val His Pro Gln Lys Val
 180 185 190
 Thr Lys Phe Met Leu Cys Ala Gly Arg Trp Thr Gly Gly Lys Ser Thr
 195 200 205
 Cys Ser Trp Val Ile Leu Ile Thr Glu Leu Thr Met Pro Ala Leu Pro
 210 215 220
 Met Val Leu His Gly Ser Leu Val Pro Trp Arg Gly Gly Val
 225 230 235

<210> 28
 <211> 1906
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

10

<400> 28

ES 2 531 967 T3

agccccaagc ttaccacctg cacccggaga gctgtgtcac catgtgggtc ccggttgtct 60
 tcctcaccct gtccgtgacg tggattggtg ctgcaccctt catcctgtct cggattgtgg 120
 gaggctggga gtgcgagaag cattccaac cctggcagggt gcttgtggcc tctcgtggca 180
 gggcagtctg cggcgggtgt ctggtgcacc cccagtgggt cctcacagct gccactgca 240
 tcaggaacaa aagcgtgatc ttgctgggtc ggcacagcct gtttcatcct gaagacacag 300
 gccaggtatt tcaggtcagc cacagcttcc cacaccgct ctacgatatg agcctcctga 360
 agaatcgatt cctcaggcca ggtgatgact ccagccacga cctcatgctg ctccgcctgt 420
 cagagcctgc cgagctcacg gatgctgtga aggtcatgga cctgcccacc caggagccag 480
 cactggggac cacctgtac gcctcagggt ggggcagcat tgaaccagag gagttcttga 540
 ccccaaagaa acttcagtgt gtggacctc atgttatttc caatgacgtg tgtgcgcaag 600
 ttcacctca gaagtgacc aagttcatgc tgtgtgctgg acgctggaca gggggcaaaa 660
 gcacctgctc gtgggtcatt ctgatcaccg aactgaccat gccagccctg ccgatggtcc 720
 tccatggctc cctagtgcc tggagaggag gtgtctagtc agagagtagt cctggaagggt 780
 ggcctctgtg aggagccacg gggacagcat cctgcagatg gtcctggccc ttgtcccacc 840
 gacctgtcta caaggactgt cctcgtggac cctcccctt gcacaggagc tggacctga 900
 agtcccttcc ccaccggcca ggactggagc ccctaccct ctgttggat ccctgccac 960
 cttcttctgg aagtcggctc tggagacatt tctctcttct tccaaagctg ggaactgcta 1020
 tctgttatct gcctgtccag gtctgaaaga taggattgcc caggcagaaa ctgggactga 1080
 cctatctcac tctctccctg cttttaccct tagggtgatt ctgggggccc acttgtctgt 1140
 aatggtgtgc ttcaaggat cacgtcatgg ggcagtgaac catgtgccct gccgaaagg 1200
 ccttccctgt acaccaagggt ggtgcattac cggaaagtga tcaaggacac catcgtggcc 1260
 aaccctgag caccctatc aaccctat tgtagtaaac ttggaacctt ggaatgacc 1320
 aggccaagac tcaagcctc ccagttctac tgacctttgt ccttaggtgt gaggctcagg 1380
 gttgctagga aaagaaatca gcagacacag gtgtagacca gagtgtttct taaatggtgt 1440
 aatgtgtcc tctctgtgtc ctggggaata ctggccatgc ctggagacat atcactcaat 1500
 ttctctgagg acacagatag gatgggtgt ctgtgttatt tgtgggtac agagatgaaa 1560
 gagggtggtg atccacactg agagagtga gagtgacatg tgctggacac tgtccatgaa 1620
 gcactgagca gaagctggag gcacaacgca ccagacactc acagcaagga tggagctgaa 1680
 aacataacc actctgtcct ggaggcactg ggaagcctag agaaggctgt gagccaagga 1740
 gggaggtct tccttggca tgggatggg atgaagtaag gagagggact ggacccctg 1800
 gaagctgatt cactatggg ggaggtgtat tgaagtcctc cagacaacc tcagatttga 1860
 tgatttctca gtagaactca cagaaataaa gagctgttat actgtg 1906

<210> 29
 <211> 69
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 <400> 29

5

ES 2 531 967 T3

Met Trp Val Pro Val Val Phe Leu Thr Leu Ser Val Thr Trp Ile Gly
 1 5 10 15

Ala Ala Pro Leu Ile Leu Ser Arg Ile Val Gly Gly Trp Glu Cys Glu
 20 25 30

Lys His Ser Gln Pro Trp Gln Val Leu Val Ala Ser Arg Gly Arg Ala
 35 40 45

Val Cys Gly Gly Val Leu Val His Pro Gln Trp Val Leu Thr Ala Ala
 50 55 60

His Cys Ile Arg Lys
 65

<210> 30

<211> 220

<212> PRT

<213> Homo sapiens

5

<400> 30

Met Trp Val Pro Val Val Phe Leu Thr Leu Ser Val Thr Trp Ile Gly
 1 5 10 15

Ala Ala Pro Leu Ile Leu Ser Arg Ile Val Gly Gly Trp Glu Cys Glu
 20 25 30

Lys His Ser Gln Pro Trp Gln Val Leu Val Ala Ser Arg Gly Arg Ala
 35 40 45

Val Cys Gly Gly Val Leu Val His Pro Gln Trp Val Leu Thr Ala Ala
 50 55 60

His Cys Ile Arg Asn Lys Ser Val Ile Leu Leu Gly Arg His Ser Leu
 65 70 75 80

Phe His Pro Glu Asp Thr Gly Gln Val Phe Gln Val Ser His Ser Phe
 85 90 95

ES 2 531 967 T3

Pro His Pro Leu Tyr Asp Met Ser Leu Leu Lys Asn Arg Phe Leu Arg
 100 105 110

Pro Gly Asp Asp Ser Ser Ile Glu Pro Glu Glu Phe Leu Thr Pro Lys
 115 120 125

Lys Leu Gln Cys Val Asp Leu His Val Ile Ser Asn Asp Val Cys Ala
 130 135 140

Gln Val His Pro Gln Lys Val Thr Lys Phe Met Leu Cys Ala Gly Arg
 145 150 155 160

Trp Thr Gly Gly Lys Ser Thr Cys Ser Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu
 165 170 175

Val Cys Asn Gly Val Leu Gln Gly Ile Thr Ser Trp Gly Ser Glu Pro
 180 185 190

Cys Ala Leu Pro Glu Arg Pro Ser Leu Tyr Thr Lys Val Val His Tyr
 195 200 205

Arg Lys Trp Ile Lys Asp Thr Ile Val Ala Asn Pro
 210 215 220

<210> 31

<211> 218

<212> PRT

<213> Homo sapiens

5

<400> 31

Met Trp Val Pro Val Val Phe Leu Thr Leu Ser Val Thr Trp Ile Gly
 1 5 10 15

Ala Ala Pro Leu Ile Leu Ser Arg Ile Val Gly Gly Trp Glu Cys Glu
 20 25 30

Lys His Ser Gln Pro Trp Gln Val Leu Val Ala Ser Arg Gly Arg Ala
 35 40 45

Val Cys Gly Gly Val Leu Val His Pro Gln Trp Val Leu Thr Ala Ala
 50 55 60

His Cys Ile Arg Lys Pro Gly Asp Asp Ser Ser His Asp Leu Met Leu
 65 70 75 80

Leu Arg Leu Ser Glu Pro Ala Glu Leu Thr Asp Ala Val Lys Val Met
 85 90 95

Asp Leu Pro Thr Gln Glu Pro Ala Leu Gly Thr Thr Cys Tyr Ala Ser
 100 105 110

ES 2 531 967 T3

Gly Trp Gly Ser Ile Glu Pro Glu Glu Phe Leu Thr Pro Lys Lys Leu
 115 120 125
 Gln Cys Val Asp Leu His Val Ile Ser Asn Asp Val Cys Ala Gln Val
 130 135 140
 His Pro Gln Lys Val Thr Lys Phe Met Leu Cys Ala Gly Arg Trp Thr
 145 150 155 160
 Gly Gly Lys Ser Thr Cys Ser Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Val Cys
 165 170 175
 Asn Gly Val Leu Gln Gly Ile Thr Ser Trp Gly Ser Glu Pro Cys Ala
 180 185 190
 Leu Pro Glu Arg Pro Ser Leu Tyr Thr Lys Val Val His Tyr Arg Lys
 195 200 205
 Trp Ile Lys Asp Thr Ile Val Ala Asn Pro
 210 215

<210> 32
 <211> 261
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

<400> 32
 Met Trp Val Pro Val Val Phe Leu Thr Leu Ser Val Thr Trp Ile Gly
 1 5 10 15
 Ala Ala Pro Leu Ile Leu Ser Arg Ile Val Gly Gly Trp Glu Cys Glu
 20 25 30
 Lys His Ser Gln Pro Trp Gln Val Leu Val Ala Ser Arg Gly Arg Ala
 35 40 45
 Val Cys Gly Gly Val Leu Val His Pro Gln Trp Val Leu Thr Ala Ala
 50 55 60
 His Cys Ile Arg Asn Lys Ser Val Ile Leu Leu Gly Arg His Ser Leu
 65 70 75 80
 Phe His Pro Glu Asp Thr Gly Gln Val Phe Gln Val Ser His Ser Phe
 85 90 95
 Pro His Pro Leu Tyr Asp Met Ser Leu Leu Lys Asn Arg Phe Leu Arg
 100 105 110
 Pro Gly Asp Asp Ser Ser His Asp Leu Met Leu Leu Arg Leu Ser Glu
 115 120 125

ES 2 531 967 T3

Pro Ala Glu Leu Thr Asp Ala Val Lys Val Met Asp Leu Pro Thr Gln
 130 135 140

Glu Pro Ala Leu Gly Thr Thr Cys Tyr Ala Ser Gly Trp Gly Ser Ile
 145 150 155 160

Glu Pro Glu Glu Phe Leu Thr Pro Lys Lys Leu Gln Cys Val Asp Leu
 165 170 175

His Val Ile Ser Asn Asp Val Cys Ala Gln Val His Pro Gln Lys Val
 180 185 190

Thr Lys Phe Met Leu Cys Ala Gly Arg Trp Thr Gly Gly Lys Ser Thr
 195 200 205

Cys Ser Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Val Cys Asn Gly Val Leu Gln
 210 215 220

Gly Ile Thr Ser Trp Gly Ser Glu Pro Cys Ala Leu Pro Glu Arg Pro
 225 230 235 240

Ser Leu Tyr Thr Lys Val Val His Tyr Arg Lys Trp Ile Lys Asp Thr
 245 250 255

Ile val Ala Asn Pro
 260

<210> 33
 <211> 1464
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

5

<400> 33
 agccccaagc ttaccacctg caccgggaga gctgtgtcac catgtgggtc ccggttgtct 60
 tcctcacct gtccgtgacg tggattggtg ctgcaccct catcctgtct cggattgtgg 120
 gaggctggga gtgcgagaag cattccaac cctggcaggt gcttgtggcc tctcgtggca 180
 gggcagtctg cggcgggtgt ctggtgcacc ccagtggt cctcacagct gcccactgca 240
 tcaggaacaa aagcgtgatc ttgctgggtc ggcacagcct gtttcatcct gaagacacag 300
 gccaggtatt tcaggtcagc cacagcttcc cacaccgct ctacgatatg agcctcctga 360
 agaatcgatt cctcaggcca ggtgatgact ccagccacga cctcatgctg ctccgcctgt 420
 cagagcctgc cgagctcacg gatgctgtga aggtcatgga cctgcccacc caggagccag 480
 cactggggac cacctgtac gcctcaggct ggggcagcat tgaaccagag gagttcttga 540
 ccccaaagaa acttcagtgt gtggacctcc atgttatttc caatgacgtg tgtgcaag 600
 ttcacctca gaaggtgacc aagttcatgc tgtgtgctgg acgctggaca gggggcaaaa 660
 gcacctgctc ggggtattct gggggccac ttgtctgtaa tgggtgtgctt caaggtatca 720
 cgtcatgggg cagtgaacca tgtgccctgc ccgaaaggcc ttcctgtac accaaggtgg 780

ES 2 531 967 T3

tgcattaccg gaagtggatc aaggacacca tcgtg^gccaa cc^{ct}gagca cccctatcaa 840
 ccccctattg tagtaaactt ggaaccttgg aatgaccag gccaagactc aagcctcccc 900
 agttctactg acctttgtcc ttaggtgtga ggtccagggt tgctaggaaa agaaatcagc 960
 agacacaggt gtagaccaga gtgtttctta aatgggtgtaa ttttgcctc tctgtgtcct 1020
 ggggaatact ggccatgcct ggagacatat cactcaattt ctctgaggac acagatagga 1080
 tggggtgtct gtgttatttg tggggtacag agatgaaaga ggggtgggat ccacactgag 1140
 agagtggaga gtgacatgtg ctggacactg tccatgaagc actgagcaga agctggaggc 1200
 acaacgcacc agacactcac agcaaggatg gagctgaaaa cataaccac tctgtcctgg 1260
 aggcactggg aagcctagag aaggctgtga gccaaggagg gagggcttc ctttggcatg 1320
 ggatggggat gaagtaagga gagggactgg accccctgga agctgattca ctatgggggg 1380
 aggtgtattg aagtcctcca gacaaccctc agatttgatg atttcctagt agaactcaca 1440
 gaaataaaga gctgttatac tgtg 1464

<210> 34

<211> 261

<212> PRT

<213> Homo sapiens

5

<400> 34

Met Trp Val Pro Val Val Phe Leu Thr Leu Ser Val Thr Trp Ile Gly
 1 5 10 15

Ala Ala Pro Leu Ile Leu Ser Arg Ile Val Gly Gly Trp Glu Cys Glu
 20 25 30

Lys His Ser Gln Pro Trp Gln Val Leu Val Ala Ser Arg Gly Arg Ala
 35 40 45

Val Cys Gly Gly Val Leu Val His Pro Gln Trp Val Leu Thr Ala Ala
 50 55 60

His Cys Ile Arg Asn Lys Ser Val Ile Leu Leu Gly Arg His Ser Leu
 65 70 75 80

Phe His Pro Glu Asp Thr Gly Gln Val Phe Gln Val Ser His Ser Phe
 85 90 95

Pro His Pro Leu Tyr Asp Met Ser Leu Leu Lys Asn Arg Phe Leu Arg
 100 105 110

Pro Gly Asp Asp Ser Ser His Asp Leu Met Leu Leu Arg Leu Ser Glu
 115 120 125

Pro Ala Glu Leu Thr Asp Ala Val Lys Val Met Asp Leu Pro Thr Gln
 130 135 140

ES 2 531 967 T3

Glu Pro Ala Leu Gly Thr Thr Cys Tyr Ala Ser Gly Trp Gly Ser Ile
 145 150 155 160

Glu Pro Glu Glu Phe Leu Thr Pro Lys Lys Leu Gln Cys Val Asp Leu
 165 170 175

His Val Ile Ser Asn Asp Val Cys Ala Gln Val His Pro Gln Lys Val
 180 185 190

Thr Lys Phe Met Leu Cys Ala Gly Arg Trp Thr Gly Gly Lys Ser Thr
 195 200 205

Cys Ser Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Val Cys Asn Gly Val Leu Gln
 210 215 220

Gly Ile Thr Ser Trp Gly Ser Glu Pro Cys Ala Leu Pro Glu Arg Pro
 225 230 235 240

Ser Leu Tyr Thr Lys Val Val His Tyr Arg Lys Trp Ile Lys Asp Thr
 245 250 255

Ile Val Ala Asn Pro
 260

<210> 35
 <211> 1495
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

5

<400> 35
 gggggagccc caagcttacc acctgcaccc ggagagctgt gtcaccatgt ggggtcccggg 60
 tgtcttctc accctgtccg tgacgtggat tgggtctgca cccctcatcc tgtctcggat 120
 tgtgggaggc tgggagtgcg agaagcattc ccaaccctgg caggtgcttg tggcctctcg 180
 tggcagggca gtctgcggcg gtgttctggt gcaccccag tgggtcctca cagctgccca 240
 ctgcatcagg aacaaaagcg tgatcttgct gggtcggcac agcctgtttc atcctgaaga 300
 cacaggccag gtatttcagg tcagccacag cttcccacac ccgctctacg atatgagcct 360
 cctgaagaat cgattcctca ggccaggatga tgactccagc cacgacctca tgctgctccg 420
 cctgtcagag cctgccgagc tcacggatgc tgtgaaggtc atggacctgc ccaccagga 480
 gccagcactg gggaccacct gctacgcctc aggctggggc agcattgaac cagaggagtt 540
 cttgaccca aagaaacttc agtgtgtgga cctccatggt atttccaatg acgtgtgtgc 600
 gcaagttcac cctcagaagg tgaccaagtt catgctgtgt gctggacgct ggacaggggg 660
 caaaagcacc tgctcgggtg attctggggg cccactgtc tgtaatggtg tgcttcaagg 720
 tatcacgtca tggggcagtg aacctgtgc cctgcccgaaggccttccc tgtacaccaa 780
 ggtggtgcat taccggaagt ggatcaagga cccatcgtg gccaacccct gagcacccct 840
 atcaactccc tattgtagta aacttgaac cttggaaatg accaggccaa gactcaggcc 900

ES 2 531 967 T3

tccccagttc tactgacctt tgtccttagg tgtgaggtcc agggttgcta ggaaaagaaa 960
 tcagcagaca caggtgtaga ccagagtgtt tcttaaattg tgtaattttg tcctctctgt 1020
 gtcctgggga atactggcca tgcctggaga catatcactc aatttctctg aggacacaga 1080
 taggatgggg tgtctgtgtt atttgtgggg tacagagatg aaagaggggt gggatccaca 1140
 ctgagagagt ggagagtgac atgtgctgga cactgtccat gaagcactga gcagaagctg 1200
 gaggcacaac gcaccagaca ctcacagcaa ggatggagct gaaaacataa cccactctgt 1260
 cctggaggca ctgggaagcc tagagaaggc tgtgagccaa ggagggaggg tcttcctttg 1320
 gcatgggatg gggatgaagt agggagaggg actggacccc ctggaagctg attcactatg 1380
 gggggaggtg tattgaagtc ctccagacaa ccctcagatt tgatgatttc ctagtagaac 1440
 tcacagaaat aaagagctgt tatactgcga aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaa 1495

<210> 36

<211> 218

<212> PRT

<213> Homo sapiens

5

<400> 36

Met Trp Val Pro Val Val Phe Leu Thr Leu Ser Val Thr Trp Ile Gly
 1 5 10 15

Ala Ala Pro Leu Ile Leu Ser Arg Ile Val Gly Gly Trp Glu Cys Glu
 20 25 30

Lys His Ser Gln Pro Trp Gln Val Leu Val Ala Ser Arg Gly Arg Ala
 35 40 45

Val Cys Gly Gly Val Leu Val His Pro Gln Trp Val Leu Thr Ala Ala
 50 55 60

His Cys Ile Arg Asn Lys Ser Val Ile Leu Leu Gly Arg His Ser Leu
 65 70 75 80

Phe His Pro Glu Asp Thr Gly Gln Val Phe Gln Val Ser His Ser Phe
 85 90 95

Pro His Pro Leu Tyr Asp Met Ser Leu Leu Lys Asn Arg Phe Leu Arg
 100 105 110

Pro Gly Asp Asp Ser Ser Ile Glu Pro Glu Glu Phe Leu Thr Pro Lys
 115 120 125

Lys Leu Gln Cys Val Asp Leu His Val Ile Ser Asn Asp Val Cys Ala
 130 135 140

Gln Val His Pro Gln Lys Val Thr Lys Phe Met Leu Cys Ala Gly Arg
 145 150 155 160

ES 2 531 967 T3

Trp Thr Gly Gly Lys Ser Thr Cys Ser Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu
 165 170 175

Val Cys Asn Gly Val Leu Gln Gly Ile Thr Ser Trp Gly Ser Glu Pro
 180 185 190

Cys Ala Leu Pro Glu Arg Pro Ser Leu Tyr Thr Lys Val Val His Tyr
 195 200 205

Arg Lys Trp Ile Lys Asp Thr Ile Val Ala
 210 215

<210> 37

<211> 227

<212> PRT

<213> Homo sapiens

5

<400> 37

Met Trp Val Pro Val Val Phe Leu Thr Leu Ser Val Thr Trp Ile Gly
 1 5 10 15

Ala Ala Pro Leu Ile Leu Ser Arg Ile Val Gly Gly Trp Glu Cys Glu
 20 25 30

Lys His Ser Gln Pro Trp Gln Val Leu Val Ala Ser Arg Gly Arg Ala
 35 40 45

Val Cys Gly Gly Val Leu Val His Pro Gln Trp Val Leu Thr Ala Ala
 50 55 60

His Cys Ile Arg Asn Lys Ser Val Ile Leu Leu Gly Arg His Ser Leu
 65 70 75 80

Phe His Pro Glu Asp Thr Gly Gln Val Phe Gln Val Ser His Ser Phe
 85 90 95

Pro His Pro Leu Tyr Asp Met Ser Leu Leu Lys Asn Arg Phe Leu Arg
 100 105 110

Pro Gly Asp Asp Ser Ser His Asp Leu Met Leu Leu Arg Leu Ser Glu
 115 120 125

Pro Ala Glu Leu Thr Asp Ala Val Lys Val Met Asp Leu Pro Thr Gln
 130 135 140

Glu Pro Ala Leu Gly Thr Thr Cys Tyr Ala Ser Gly Trp Gly Ser Ile
 145 150 155 160

Glu Pro Glu Glu Phe Leu Thr Pro Lys Lys Leu Gln Cys Val Asp Leu
 165 170 175

His Val Ile Ser Asn Asp Val Cys Ala Gln Val His Pro Gln Lys Val

ES 2 531 967 T3

180 185 190

Thr Lys Phe Met Leu Cys Ala Gly Arg Trp Thr Gly Gly Lys Ser Thr
 195 200 205

Cys Ser Val Ser His Pro Tyr Ser Gln Asp Leu Glu Gly Lys Gly Glu
 210 215 220

Trp Gly Pro
 225

<210> 38
 <211> 104
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

<400> 38
 Met Trp Val Pro Val Val Phe Leu Thr Leu Ser Val Thr Trp Ile Gly
 1 5 10 15

Glu Arg Gly His Gly Trp Gly Asp Ala Gly Glu Gly Ala Ser Pro Asp
 20 25 30

Cys Gln Ala Glu Ala Leu Ser Pro Pro Thr Gln His Pro Ser Pro Asp
 35 40 45

Arg Glu Leu Gly Ser Phe Leu Ser Leu Pro Ala Pro Leu Gln Ala His
 50 55 60

Thr Pro Ser Pro Ser Ile Leu Gln Gln Ser Ser Leu Pro His Gln Val
 65 70 75 80

Pro Ala Pro Ser His Leu Pro Gln Asn Phe Leu Pro Ile Ala Gln Pro
 85 90 95

Ala Pro Cys Ser Gln Leu Leu Tyr
 100

<210> 39
 <211> 261
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10

<400> 39
 Met Trp Val Pro Val Val Phe Leu Thr Leu Ser Val Thr Trp Ile Gly
 1 5 10 15

Ala Ala Pro Leu Ile Leu Ser Arg Ile Val Gly Gly Trp Glu Cys Glu
 20 25 30

Lys His Ser Gln Pro Trp Gln Val Leu Val Ala Ser Arg Gly Arg Ala
 35 40 45

15

ES 2 531 967 T3

Val Cys Gly Gly Val Leu Val His Pro Gln Trp Val Leu Thr Ala Ala
 50 55 60

His Cys Ile Arg Asn Lys Ser Val Ile Leu Leu Gly Arg His Ser Leu
 65 70 75 80

Phe His Pro Glu Asp Thr Gly Gln Val Phe Gln Val Ser His Ser Phe
 85 90 95

Pro His Pro Leu Tyr Asp Met Ser Leu Leu Lys Asn Arg Phe Leu Arg
 100 105 110

Pro Gly Asp Asp Ser Ser His Asp Leu Met Leu Leu Arg Leu Ser Glu
 115 120 125

Pro Ala Glu Leu Thr Asp Ala Val Lys Val Met Asp Leu Pro Thr Gln
 130 135 140

Glu Pro Ala Leu Gly Thr Thr Cys Tyr Ala Ser Gly Trp Gly Ser Ile
 145 150 155 160

Glu Pro Glu Glu Phe Leu Thr Pro Lys Lys Leu Gln Cys Val Asp Leu
 165 170 175

His Val Ile Ser Asn Asp Val Cys Ala Gln Val His Pro Gln Lys Val
 180 185 190

Thr Lys Phe Met Leu Cys Ala Gly Arg Trp Thr Gly Gly Lys Ser Thr
 195 200 205

Cys Ser Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Val Cys Asn Gly Val Leu Gln
 210 215 220

Gly Ile Thr Ser Trp Gly Ser Glu Pro Cys Ala Leu Pro Glu Arg Pro
 225 230 235 240

Ser Leu Tyr Thr Lys Val Val His Tyr Arg Lys Trp Ile Lys Asp Thr
 245 250 255

Ile Val Ala Asn Pro
 260

<210> 40

<211> 1729

<212> ADN

<213> Homo sapiens

5

<400> 40

aagtttccct tctcccagtc caagacccca aatcaccaca aaggacccaa tccccagact 60

caagatatgg tctgggcgct gtcttgtgct tcctaccctg atccctgggt tcaactctgc 120

tcccagagca tgaagcctct ccaccagcac cagccaccaa cctgcaaacc tagggaagat 180

ES 2 531 967 T3

tgacagaatt cccagccttt cccagctccc cctgcccattg tcccaggact cccagccttg 240
 gttctctgcc cccgtgtcct ttcaaacca catcctaaat ccatctccta tccgagtccc 300
 ccagttcctc ctgtcaacc tgattcccct gatctagcac cccctctgca ggtgctgcac 360
 ccctcatcct gtctcggatt gtgggaggct gggagtgcga gaagcattcc caaccctggc 420
 aggtgcttgt agcctctcgt ggcagggcag tctgcggcgg tgttctggtg cccccagt 480
 gggctctcac agctaccac tgcatacagga acaaaagcgt gatcttgctg ggtcggcaca 540
 gcctgtttca tcctgaagac acaggccagg tatttcaggt cagccacagc ttcccacacc 600
 cgctctacga tatgagcctc ctgaagaatc gattcctcag gccaggatgat gactccagcc 660
 acgacctcat gctgctccgc ctgtcagagc ctgccgagct cacggatgct atgaaggtca 720
 tggacctgcc caccaggag ccagcactgg ggaccacctg ctacgcctca ggctggggca 780
 gcattgaacc agaggagttc ttgaccccaa agaaacttca gtgtgtggac ctccatgtta 840
 tttcaatga cgtgtgtgcg caagttcacc ctgagaagg gaccaagttc atgctgtgtg 900
 ctggacgctg gacagggggc aaaagcacct gctcgggtga ttctgggggc ccacttgtct 960
 gtaatggtgt gcttcaaggt atcacgtcat ggggcagtga accatgtgcc ctgccgaaa 1020
 ggctttccct gtacaccaag gtggtgcatt accggaagtg gatcaaggac accatcgtgg 1080
 ccaaccctg agcaccctta tcaactccct attgtagtaa acttggaaacc ttggaatga 1140
 ccaggccaag actcaggcct cccagttct actgacctt gtccttaggt gtgaggtcca 1200
 gggttgctag gaaaagaaat cagcagacac aggtgtagac cagagtgttt cttaaattgt 1260
 gtaattttgt cctctctgtg tcctggggaa tactggccat gcctggagac atatcactca 1320
 atttctctga ggacacagat aggatgggt gtctgtgtta tttgtgggt acagagatga 1380
 aagaggggtg ggatccacac tgagagagtg gagagtgaca tgtgctggac actgtccatg 1440
 aagcactgag cagaagctgg aggcacaacg caccagacac tcacagcaag gatggagctg 1500
 aaaacataac ccactctgtc ctggaggcac tgggaagcct agagaaggct gtgaaccaag 1560
 gaggagggt cttcctttgg catgggatgg ggatgaagta aggagagga ctgacccct 1620
 ggaagctgat tcactatggg gggagggtga ttgaagtcc cagacaacc ctgagatttg 1680
 atgatttcct agtagaactc acagaaataa agagctgtta tactgtgaa 1729

<210> 41

<211> 719

<212> PRT

<213> Homo sapiens

5

<400> 41

Met Trp Asn Leu Leu His Glu Thr Asp Ser Ala Val Ala Thr Ala Arg
 1 5 10 15

Arg Pro Arg Trp Leu Cys Ala Gly Ala Leu Val Leu Ala Gly Gly Phe
 20 25 30

ES 2 531 967 T3

Phe Leu Leu Gly Phe Leu Phe Gly Trp Phe Ile Lys Ser Ser Asn Glu
 35 40 45
 Ala Thr Asn Ile Thr Pro Lys His Asn Met Lys Ala Phe Leu Asp Glu
 50 55 60
 Leu Lys Ala Glu Asn Ile Lys Lys Phe Leu Tyr Asn Phe Thr Gln Ile
 65 70 75 80
 Pro His Leu Ala Gly Thr Glu Gln Asn Phe Gln Leu Ala Lys Gln Ile
 85 90 95
 Gln Ser Gln Trp Lys Glu Phe Gly Leu Asp Ser Val Glu Leu Ala His
 100 105 110
 Tyr Asp Val Leu Leu Ser Tyr Pro Asn Lys Thr His Pro Asn Tyr Ile
 115 120 125
 Ser Ile Ile Asn Glu Asp Gly Asn Glu Ile Phe Asn Thr Ser Leu Phe
 130 135 140
 Glu Pro Pro Pro Pro Gly Tyr Glu Asn Val Ser Asp Ile Val Pro Pro
 145 150 155 160
 Phe Ser Ala Phe Ser Pro Gln Gly Met Pro Glu Gly Asp Leu Val Tyr
 165 170 175
 Val Asn Tyr Ala Arg Thr Glu Asp Phe Phe Lys Leu Glu Arg Asp Met
 180 185 190
 Lys Ile Asn Cys Ser Gly Lys Ile Val Ile Ala Arg Tyr Gly Lys Val
 195 200 205
 Phe Arg Gly Asn Lys Val Lys Asn Ala Gln Leu Ala Gly Ala Lys Gly
 210 215 220
 Val Ile Leu Tyr Ser Asp Pro Ala Asp Tyr Phe Ala Pro Gly Val Lys
 225 230 235 240
 Ser Tyr Pro Asp Gly Trp Asn Leu Pro Gly Gly Gly Val Gln Arg Gly
 245 250 255
 Asn Ile Leu Asn Leu Asn Gly Ala Gly Asp Pro Leu Thr Pro Gly Tyr
 260 265 270
 Pro Ala Asn Glu Tyr Ala Tyr Arg Arg Gly Ile Ala Glu Ala Val Gly
 275 280 285
 Leu Pro Ser Ile Pro Val His Pro Ile Gly Tyr Tyr Asp Ala Gln Lys
 290 295 300

ES 2 531 967 T3

Leu Leu Glu Lys Met Gly Gly Ser Ala Pro Pro Asp Ser Ser Trp Arg
 305 310 315 320
 Gly Ser Leu Lys Val Pro Tyr Asn Val Gly Pro Gly Phe Thr Gly Asn
 325 330 335
 Phe Ser Thr Gln Lys Val Lys Met His Ile His Ser Thr Asn Glu Val
 340 345 350
 Thr Arg Ile Tyr Asn Val Ile Gly Thr Leu Arg Gly Ala Val Glu Pro
 355 360 365
 Asp Arg Tyr Val Ile Leu Gly Gly His Arg Asp Ser Trp Val Phe Gly
 370 375 380
 Gly Ile Asp Pro Gln Ser Gly Ala Ala Val Val His Glu Ile Val Arg
 385 390 395 400
 Ser Phe Gly Thr Leu Lys Lys Glu Gly Trp Arg Pro Arg Arg Thr Ile
 405 410 415
 Leu Phe Ala Ser Trp Asp Ala Glu Glu Phe Gly Leu Leu Gly Ser Thr
 420 425 430
 Glu Trp Ala Glu Glu Asn Ser Arg Leu Leu Gln Glu Arg Gly Val Ala
 435 440 445
 Tyr Ile Asn Ala Asp Ser Ser Ile Glu Gly Asn Tyr Thr Leu Arg Val
 450 455 460
 Asp Cys Thr Pro Leu Met Tyr Ser Leu Val His Asn Leu Thr Lys Glu
 465 470 475 480
 Leu Lys Ser Pro Asp Glu Gly Phe Glu Gly Lys Ser Leu Tyr Glu Ser
 485 490 495
 Trp Thr Lys Lys Ser Pro Ser Pro Glu Phe Ser Gly Met Pro Arg Ile
 500 505 510
 Ser Lys Leu Gly Ser Gly Asn Asp Phe Glu Val Phe Phe Gln Arg Leu
 515 520 525
 Gly Ile Ala Ser Gly Arg Ala Arg Tyr Thr Lys Asn Trp Glu Thr Asn
 530 535 540
 Lys Phe Ser Gly Tyr Pro Leu Tyr His Ser Val Tyr Glu Thr Tyr Glu
 545 550 555 560
 Leu Val Glu Lys Phe Tyr Asp Pro Met Phe Lys Tyr His Leu Thr Val
 565 570 575

ES 2 531 967 T3

Ala Gln Val Arg Gly Gly Met Val Phe Glu Leu Ala Asn Ser Ile Val
 580 585 590

Leu Pro Phe Asp Cys Arg Asp Tyr Ala Val Val Leu Arg Lys Tyr Ala
 595 600 605

Asp Lys Ile Tyr Ser Ile Ser Met Lys His Pro Gln Glu Met Lys Thr
 610 615 620

Tyr Ser Val Ser Phe Asp Ser Leu Phe Ser Ala Val Lys Asn Phe Thr
 625 630 635 640

Glu Ile Ala Ser Lys Phe Ser Glu Arg Leu Gln Asp Phe Asp Lys Ser
 645 650 655

Lys His Val Ile Tyr Ala Pro Ser Ser His Asn Lys Tyr Ala Gly Glu
 660 665 670

Ser Phe Pro Gly Ile Tyr Asp Ala Leu Phe Asp Ile Glu Ser Lys Val
 675 680 685

Asp Pro Ser Lys Ala Trp Gly Glu Val Lys Arg Gln Ile Tyr Val Ala
 690 695 700

Ala Phe Thr Val Gln Ala Ala Ala Glu Thr Leu Ser Glu Val Ala
 705 710 715

<210> 42
 <211> 2472
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

5

<400> 42
 ctggaccca ggtctggagc gaattccagc ctgcagggct gataagcgag gcattagtga 60
 gattgagaga gactttacc cgccgtggtg gttggagggc ggcagtaga gcagcagcac 120
 aggcgcgggt cccgggaggc cggctctgct cgcgccgaga tgtggaatct ccttcacgaa 180
 accgactcgg ctgtggccac cgcgcgccgc ccgcgctggc tgtgcgctgg ggcgctggtg 240
 ctggcgggtg gcttctttct cctcggcttc ctcttcgggt ggtttataaa atcctccaat 300
 gaagctacta acattactcc aaagcataat atgaaagcat ttttgatga attgaaagct 360
 gagaacatca agaagtctt atataatatt acacagatac cacatttagc aggaacagaa 420
 caaaactttc agcttgcaaa gcaaattcaa tcccagtgga aagaatttgg cctggattct 480
 gttgagctag cacattatga tgtcctggtg tcctaccaa ataagactca tccaactac 540
 atctcaataa ttaatgaaga tggaaatgag attttcaaca catcattatt tgaaccacct 600
 cctccaggat atgaaaatgt ttcggatatt gtaccacctt tcagtgcttt ctctcctcaa 660
 ggaatgccag agggcgatct agtgtatggt aactatgcac gaactgaaga cttctttaa 720
 ttggaacggg acatgaaaat caattgctct gggaaaattg taattgccag atatgggaaa 780

ES 2 531 967 T3

gttttcagag gaaataaggt taaaaatgcc cagctggcag gggccaaagg agtcattctc 840
 tactccgacc ctgctgacta ctttgctcct ggggtgaagt cctatccaga tggttggaat 900
 cttcctggag gtggtgtcca gcgtggaaat atcctaaatc tgaatggtgc aggagaccct 960
 ctcacaccag gttacccagc aatgaatat gcttataggc gtggaattgc agaggtggt 1020
 ggtcttccaa gtattcctgt tcatccaatt ggatactatg atgcacagaa gctcctagaa 1080
 aaaatgggtg gctcagcacc accagatagc agctggagag gaagtctcaa agtgccttac 1140
 aatgttggac ctggctttac tggaaacttt tctacacaaa aagtcaagat gcacatccac 1200
 tctaccaatg aagtgacaag aatttacaat gtgataggta ctctcagagg agcagtgga 1260
 ccagacagat atgtcattct gggaggtcac cgggactcat ggggtgttgg tggattgac 1320
 cctcagagtg gagcagctgt tgttcatgaa attgtgagga gctttggaac actgaaaaag 1380
 gaagggtgga gacctagaag aacaattttg tttgcaagct gggatgcaga agaatttgg 1440
 cttcttggtt ctactgagtg ggcagaggag aattcaagac tccttcaaga gcgtggcgtg 1500
 gcttatatta atgctgactc atctatagaa ggaaactaca ctctgagagt tgattgtaca 1560
 ccgctgatgt acagcttggg acacaaccta acaaaagagc tgaaaagccc tgatgaaggc 1620
 tttgaaggca aatctcttta tgaaagtgg actaaaaaaa gtccttcccc agagttcagt 1680
 ggcatgcccc ggataagcaa attgggatct ggaaatgatt ttgaggtggt cttccaacga 1740
 cttggaattg cttcaggcag agcacggtat actaaaaatt gggaaacaaa caaattcagc 1800
 ggctatccac tgtatcacag tgtctatgaa acatatgagt tgggtgaaaa gttttatgat 1860
 ccaatgttta aatatacact cactgtggcc caggttcgag gagggatggt gtttgagcta 1920
 gccaattcca tagtgctccc ttttgattgt cgagattatg ctgtagtttt aagaaagtat 1980
 gctgacaaaa tctacagtat ttctatgaaa catccacagg aatgaagac atacagtgta 2040
 tcatttgatt cacttttttc tgcagtaaag aattttacag aaattgcttc caagttcagt 2100
 gagagactcc aggactttga caaaagcaag catgtcatct atgctccaag cagccacaac 2160
 aagtatgcag gggagtcatt cccaggaatt tatgatgctc tgtttgatat tgaaagcaaa 2220
 gtggaccctt ccaaggcctg gggagaagtg aagagacaga tttatggtgc agccttcaca 2280
 gtgcaggcag ctgcagagac tttgagtgaa gtagcctaag aggattcttt agagaatccg 2340
 tattgaattt gtgtggtatg tcaactcagaa agaatcgtaa tgggtatatt gataaatttt 2400
 aaaattggtg tatttgaaat aaagttgaat attatatata aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 2460
 aaaaaaaaaa aa 2472
 <210> 43
 <211> 719
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

<400> 43
 Met Trp Asn Leu Leu His Glu Thr Asp Ser Ala Val Ala Thr Ala Arg

ES 2 531 967 T3

Pro His Leu Ala Gly Thr Glu Gln Asn Phe Gln Leu Ala Lys Gln Ile
 85 90 95
 Gln Ser Gln Trp Lys Glu Phe Gly Leu Asp Ser Val Glu Leu Ala His
 100 105 110
 Tyr Asp Val Leu Leu Ser Tyr Pro Asn Lys Thr His Pro Asn Tyr Ile
 115 120 125
 Ser Ile Ile Asn Glu Asp Gly Asn Glu Ile Phe Asn Thr Ser Leu Phe
 130 135 140
 Glu Pro Pro Pro Pro Gly Tyr Glu Asn Val Ser Asp Ile Val Pro Pro
 145 150 155 160
 Phe Ser Ala Phe Ser Pro Gln Gly Met Pro Glu Gly Asp Leu Val Tyr
 165 170 175
 Val Asn Tyr Ala Arg Thr Glu Asp Phe Phe Lys Leu Glu Arg Asp Met
 180 185 190
 Lys Ile Asn Cys Ser Gly Lys Ile Val Ile Ala Arg Tyr Gly Lys Val
 195 200 205
 Phe Arg Gly Asn Lys Val Lys Asn Ala Gln Leu Ala Gly Ala Lys Gly
 210 215 220
 Val Ile Leu Tyr Ser Asp Pro Ala Asp Tyr Phe Ala Pro Gly Val Lys
 225 230 235 240
 Ser Tyr Pro Asp Gly Trp Asn Leu Pro Gly Gly Gly Val Gln Arg Gly
 245 250 255
 Asn Ile Leu Asn Leu Asn Gly Ala Gly Asp Pro Leu Thr Pro Gly Tyr
 260 265 270
 Pro Ala Asn Glu Tyr Ala Tyr Arg Arg Gly Ile Ala Glu Ala Val Gly
 275 280 285
 Leu Pro Ser Ile Pro Val His Pro Ile Gly Tyr Tyr Asp Ala Gln Lys
 290 295 300
 Leu Leu Glu Lys Met Gly Gly Ser Ala Pro Pro Asp Ser Ser Trp Arg
 305 310 315 320
 Gly Ser Leu Lys Val Pro Tyr Asn Val Gly Pro Gly Phe Thr Gly Asn
 325 330 335
 Phe Ser Thr Gln Lys Val Lys Met His Ile His Ser Thr Asn Glu Val
 340 345 350

ES 2 531 967 T3

Thr Arg Ile Tyr Asn Val Ile Gly Thr Leu Arg Gly Ala Val Glu Pro
 355 360 365
 Asp Arg Tyr Val Ile Leu Gly Gly His Arg Asp Ser Trp Val Phe Gly
 370 375 380
 Gly Ile Asp Pro Gln Ser Gly Ala Ala Val Val His Glu Ile Val Arg
 385 390 395 400
 Ser Phe Gly Thr Leu Lys Lys Glu Gly Trp Arg Pro Arg Arg Thr Ile
 405 410 415
 Leu Phe Ala Ser Trp Asp Ala Glu Glu Phe Gly Leu Leu Gly Ser Thr
 420 425 430
 Glu Trp Ala Glu Glu Asn Ser Arg Leu Leu Gln Glu Arg Gly Val Ala
 435 440 445
 Tyr Ile Asn Ala Asp Ser Ser Ile Glu Gly Asn Tyr Thr Leu Arg Val
 450 455 460
 Asp Cys Thr Pro Leu Met Tyr Ser Leu Val His Asn Leu Thr Lys Glu
 465 470 475 480
 Leu Lys Ser Pro Asp Glu Gly Phe Glu Gly Lys Ser Leu Tyr Glu Ser
 485 490 495
 Trp Thr Lys Lys Ser Pro Ser Pro Glu Phe Ser Gly Met Pro Arg Ile
 500 505 510
 Ser Lys Leu Gly Ser Gly Asn Asp Phe Glu Val Phe Phe Gln Arg Leu
 515 520 525
 Gly Ile Ala Ser Gly Arg Ala Arg Tyr Thr Lys Asn Trp Glu Thr Asn
 530 535 540
 Lys Phe Ser Gly Tyr Pro Leu Tyr His Ser Val Tyr Glu Thr Tyr Glu
 545 550 555 560
 Leu Val Glu Lys Phe Tyr Asp Pro Met Phe Lys Tyr His Leu Thr Val
 565 570 575
 Ala Gln Val Arg Gly Gly Met Val Phe Glu Leu Ala Asn Ser Ile Val
 580 585 590
 Leu Pro Phe Asp Cys Arg Asp Tyr Ala Val Val Leu Arg Lys Tyr Ala
 595 600 605
 Asp Lys Ile Tyr Ser Ile Ser Met Lys His Pro Gln Glu Met Lys Thr
 610 615 620

ES 2 531 967 T3

Tyr Ser Val Ser Phe Asp Ser Leu Phe Ser Ala Val Lys Asn Phe Thr
625 630 635 640

Glu Ile Ala Ser Lys Phe Ser Glu Arg Leu Gln Asp Phe Asp Lys Ser
645 650 655

Asn Pro Ile Val Leu Arg Met Met Asn Asp Gln Leu Met Phe Leu Glu
660 665 670

Arg Ala Phe Ile Asp Pro Leu Gly Leu Pro Asp Arg Pro Phe Tyr Arg
675 680 685

His Val Ile Tyr Ala Pro Ser Ser His Asn Lys Tyr Ala Gly Glu Ser
690 695 700

Phe Pro Gly Ile Tyr Asp Ala Leu Phe Asp Ile Glu Ser Lys Val Asp
705 710 715 720

Pro Ser Lys Ala Trp Gly Glu Val Lys Arg Gln Ile Tyr Val Ala Ala
725 730 735

Phe Thr Val Gln Ala Ala Ala Glu Thr Leu Ser Glu Val Ala
740 745 750

<210> 45
<211> 671
<212> PRT
<213> Homo sapiens

5

<400> 45
Ile Pro His Leu Ala Gly Thr Glu Gln Asn Phe Gln Leu Ala Lys Gln
1 5 10 15

Ile Gln Ser Gln Trp Lys Glu Phe Gly Leu Asp Ser Val Glu Leu Ala
20 25 30

His Tyr Asp Val Leu Leu Ser Tyr Pro Asn Lys Thr His Pro Asn Tyr
35 40 45

Ile Ser Ile Ile Asn Glu Asp Gly Asn Glu Ile Phe Asn Thr Ser Leu
50 55 60

Phe Glu Pro Pro Pro Pro Gly Tyr Glu Asn Val Ser Asp Ile Val Pro
65 70 75 80

Pro Phe Ser Ala Phe Ser Pro Gln Gly Met Pro Glu Gly Asp Leu Val
85 90 95

Tyr Val Asn Tyr Ala Arg Thr Glu Asp Phe Phe Lys Leu Glu Arg Asp
100 105 110

ES 2 531 967 T3

Met Lys Ile Asn Cys Ser Gly Lys Ile Val Ile Ala Arg Tyr Gly Lys
115 120 125

Val Phe Arg Gly Asn Lys Val Lys Asn Ala Gln Leu Ala Gly Ala Lys
130 135 140

Gly Val Ile Leu Tyr Ser Asp Pro Ala Asp Tyr Phe Ala Pro Gly Val
145 150 155 160

Lys Ser Tyr Pro Asp Gly Trp Asn Leu Pro Gly Gly Gly Val Gln Arg
165 170 175

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

Tyr Pro Ala Asn Glu Tyr Ala Tyr Arg Arg Gly Ile Ala Glu Ala Val
195 200 205

Gly Leu Pro Ser Ile Pro Val His Pro Ile Gly Tyr Tyr Asp Ala Gln
210 215 220

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

Arg Gly Ser Leu Lys Val Pro Tyr Asn Val Gly Pro Gly Phe Thr Gly
245 250 255

Asn Phe Ser Thr Gln Lys Val Lys Met His Ile His Ser Thr Asn Glu
260 265 270

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

Pro Asp Arg Tyr Val Ile Leu Gly Gly His Arg Asp Ser Trp Val Phe
290 295 300 305

Gly Gly Ile Asp Pro Gln Ser Gly Ala Ala Val Val His Glu Ile Val
305 310 315 320

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

Ile Leu Phe Ala Ser Trp Asp Ala Glu Glu Phe Gly Leu Leu Gly Ser
340 345 350

Thr Glu Trp Ala Glu Glu Asn Ser Arg Leu Leu Gln Glu Arg Gly Val
355 360 365

Ala Tyr Ile Asn Ala Asp Ser Ser Ile Glu Gly Asn Tyr Thr Leu Arg
370 375 380

ES 2 531 967 T3

Val Asp Cys Thr Pro Leu Met Tyr Ser Leu Val His Asn Leu Thr Lys
 385 390 395 400
 Glu Leu Lys Ser Pro Asp Glu Gly Phe Glu Gly Lys Ser Leu Tyr Glu
 405 410 415
 Ser Trp Thr Lys Lys Ser Pro Ser Pro Glu Phe Ser Gly Met Pro Arg
 420 425 430
 Ile Ser Lys Leu Gly Ser Gly Asn Asp Phe Glu Val Phe Phe Gln Arg
 435 440 445
 Leu Gly Ile Ala Ser Gly Arg Ala Arg Tyr Thr Lys Asn Trp Glu Thr
 450 455 460
 Asn Lys Phe Ser Gly Tyr Pro Leu Tyr His Ser Val Tyr Glu Thr Tyr
 465 470 475 480
 Glu Leu Val Glu Lys Phe Tyr Asp Pro Met Phe Lys Tyr His Leu Thr
 485 490 495
 Val Ala Gln Val Arg Gly Gly Met Val Phe Glu Leu Ala Asn Ser Ile
 500 505 510
 Val Leu Pro Phe Asp Cys Arg Asp Tyr Ala Val Val Leu Arg Lys Tyr
 515 520 525
 Ala Asp Lys Ile Tyr Ser Ile Ser Met Lys His Pro Gln Glu Met Lys
 530 535 540
 Thr Tyr Ser Val Ser Phe Asp Ser Leu Phe Ser Ala Val Lys Asn Phe
 545 550 555 560
 Thr Glu Ile Ala Ser Lys Phe Ser Glu Arg Leu Gln Asp Phe Asp Lys
 565 570 575
 Ser Asn Pro Ile Val Leu Arg Met Met Asn Asp Gln Leu Met Phe Leu
 580 585 590
 Glu Arg Ala Phe Ile Asp Pro Leu Gly Leu Pro Asp Arg Pro Phe Tyr
 595 600 605
 Arg His Val Ile Tyr Ala Pro Ser Ser His Asn Lys Tyr Ala Gly Glu
 610 615 620
 Ser Phe Pro Gly Ile Tyr Asp Ala Leu Phe Asp Ile Glu Ser Lys Val
 625 630 635 640
 Asp Pro Ser Lys Ala Trp Gly Glu Val Lys Arg Gln Ile Tyr Val Ala
 645 650 655
 Ala Phe Thr Val Gln Ala Ala Ala Glu Thr Leu Ser Glu Val Ala
 660 665 670

<210> 46
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> sintetizado químicamente
 5 <400> 46
 ggggtctaga cctccttga ttagtatatt c 31
 <210> 47
 <211> 45
 10 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> sintetizado químicamente
 15 <400> 47
 atcttcgcta tctgtcgccg cggcgcgtgc ttcagttgt tgcg45
 <210> 48
 <211> 45
 20 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> sintetizado químicamente
 25 <400> 48
 gcgcaacaaa ctgaagcagc ggccgcggcg acagatagcg aagat 45
 30 <210> 49
 <211> 42
 <212> ADN
 <213> Artificial
 35 <220>
 <223> sintetizado químicamente
 <400> 49
 40 tgtaggtgta tctccatgct cgagagctag gcgatcaatt tc 42
 <210> 50
 <211> 42
 <212> ADN
 <213> Artificial
 45 <220>
 <223> sintetizado químicamente
 <400> 50
 50 ggaattgatc gcctagctct cgagcatgga gatacaccta ca 42
 <210> 51
 <211> 42
 <212> ADN
 55 <213> Artificial
 <220>
 <223> sintetizado químicamente
 60 <400> 51
 aaacggattt atttagatcc cgggttatgg ttctgagaa ca 42

ES 2 531 967 T3

<210> 52
 <211> 42
 <212> ADN
 5 <213> Artificial

 <220>
 <223> sintetizado químicamente

 10 <400> 52
 tgttctcaga aaccataacc cgggatctaa ataaatccgt tt 42

 <210> 53
 <211> 28
 15 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> sintetizado químicamente
 20
 <400> 53
 gggggtcgac cagctctct tggatgaag 28

 <210> 54
 <211> 680
 25 <212> PRT
 <213> Artificial

 <220>
 30 <223> sintetizado químicamente

 <400> 54
 Met Lys Lys Ile Met Leu Val Phe Ile Thr Leu Ile Leu Val Ser Leu
 1 5 10 15
 Pro Ile Ala Gln Gln Thr Glu Ala Lys Asp Ala Ser Ala Phe Asn Lys
 20 25 30
 Glu Asn Ser Ile Ser Ser Met Ala Pro Pro Ala Ser Pro Pro Ala Ser
 35 40 45
 Pro Lys Thr Pro Ile Glu Lys Lys His Ala Asp Glu Ile Asp Lys Tyr
 50 55 60
 Ile Gln Gly Leu Asp Tyr Asn Lys Asn Asn Val Leu Val Tyr His Gly
 65 70 75 80
 Asp Ala Val Thr Asn Val Pro Pro Arg Lys Gly Tyr Lys Asp Gly Asn
 85 90 95
 Glu Tyr Ile Val Val Glu Lys Lys Lys Lys Ser Ile Asn Gln Asn Asn

ES 2 531 967 T3

645

650

655

Glu Arg Pro Ser Leu Tyr Thr Lys Val Val His Tyr Arg Lys Trp Ile
660 665 670

Lys Asp Thr Ile Val Ala Asn Pro
675 680

<210> 55

<211> 13294

<212> ADN

<213> Artificial

5

<220>

<223> sintetizado químicamente

10

<400> 55

aattccggat gagcattcat caggcgggca agaatgtgaa taaaggccgg ataaaacttg 60
 tgcttatttt tctttacggt ctttaaaaaag gccgtaatat ccagctgaac ggtctgggta 120
 taggtacatt gagcaactga ctgaaatgcc tcaaaatggt ctttacgatg ccattgggat 180
 atatcaacgg tggatatcc agtgattttt ttctccattt tagcttcctt agctcctgaa 240
 aatctcgata actcaaaaaa tacgcccggg agtgatctta tttcattatg gtgaaagtgt 300
 gaacctetta cgtgccgatc aacgtctcat tttcgccaaa agttggcca gggcttcccg 360
 gtatcaacag ggacaccagg atttatttat tctgcgaagt gatcttccgt cacaggatt 420
 tattcggcgc aaagtgcgtc ggggtgatgct gccaaactac tgatttagtg tatgatggtg 480
 tttttgagggt gctccagtgg cttctgtttc tatcagctgt ccctcctgtt cagctactga 540
 cggggtggtg cgtaacggca aaagcaccgc cggacatcag cgctagcggg gtgtatactg 600
 gcttactatg ttggcactga tgagggtgtc agtgaagtgc ttcattgtggc aggagaaaaa 660
 aggctgcacc ggtgcgtcag cagaatatgt gatacaggat atattccgct tcctcgtc 720
 ctgactcgct acgctcggtc gttcactgct ggcgagcggg aatggcttac gaacggggcg 780
 gagatttcct ggaagatgcc aggaagatac ttaacagggg agtgagaggg ccgcgggaaa 840
 gccgtttttc cataggctcc gccccctga caagcatcac gaaatctgac gctcaaatca 900
 gtggtggcga aaccgacag gactataaag ataccaggcg tttccccctg gcggtccct 960
 cgtgcgctct cctgttccctg cttttcggtt taccgggtgtc attccgctgt tatggcccg 1020
 tttgtctcat tccacgcctg aactcagtt ccgggtaggc agttcgctcc aagctggact 1080
 gtatgcacga accccccgtt cagtcggacc gctgcgcctt atccggtaac tatcgtcttg 1140
 agtccaacc ggaaagacat gcaaaagcac cactggcagc agccactggt aattgattta 1200
 gaggagttag tcttgaagtc atgcgccggg taaggctaaa ctgaaaggac aagttttggt 1260
 gactgcgctc ctccaagcca gttacctcgg ttcaaagagt tggtagctca gagaacctc 1320
 gaaaaaccgc cctgcaaggc ggttttttcg ttttcagagc aagagattac gcgagacca 1380
 aaacgatctc aagaagatca tcttattaat cagataaaat atttctagcc ctcctttgat 1440

ES 2 531 967 T3

tagtatattc ctatcttaaa gttactttta tgtggaggca ttāacatttg ttaatgacgt 1500
caaaaggata gcaagactag aataaagcta taaagcaagc atataatatt gcgtttcatc 1560
tttagaagcg aatttcgcca atattataat tatcaaaaga gaggggtggc aaacggtatt 1620
tggcattatt aggttaaaaa atgtagaagg agagtgaaac ccatgaaaaa aataatgcta 1680
gtttttatta cacttatatt agttagtcta ccaattgcgc aacaaactga agcaaaggat 1740
gcatctgcat tcaataaaga aaattcaatt tcatccatgg caccaccagc atctccgcct 1800
gcaagtccta agacgccaat cgaaaagaaa cacgcggatg aaatcgataa gtatatacaa 1860
ggattggatt acaataaaaa caatgtatta gtataccacg gagatgcagt gacaaatgtg 1920
ccgccaagaa aaggttacaa agatggaaat gaatatattg ttgtggagaa aaagaagaaa 1980
tccatcaatc aaaataatgc agacattcaa gttgtgaatg caatttcgag cctaacctat 2040
ccagggtgctc tcgtaaaagc gaattcggaa ttagtagaaa atcaaccaga tgttctccct 2100
gtaaaacgtg attcattaac actcagcatt gatttgccag gtatgactaa tcaagacaat 2160
aaaatagttg taaaaaatgc cactaaatca aacgttaaca acgcagtaaa tacattagtg 2220
gaaagatgga atgaaaaata tgctcaagct tatccaaatg taagtgcaaa aattgattat 2280
gatgacgaaa tggcttacag tgaatcacia ttaattgcga aatttggtag agcatttaaa 2340
gctgtaaaata atagcttgaa tgtaaacctc ggcgcaatca gtgaagggaa aatgcaagaa 2400
gaagtcatta gttttaaaca aatttactat aacgtgaatg ttaatgaacc tacaagacct 2460
tccagatfff tcggcaaacg tgttactaaa gagcagttgc aagcgcttgg agtgaatgca 2520
gaaaatctc ctgcatatat ctcaagtgtg gcgtagggcc gtcaagttta ttgaaatta 2580
tcaactaatt cccatagtac taaagtaaaa gctgcttttg atgctgccgt aagcggaaaa 2640
tctgtctcag gtgatgtaga actaacaat atcatcaaaa attcttctt caaagccgta 2700
atftacggag gttccgcaaa agatgaagtt caaatcatcg acggcaacct cggagactta 2760
cgcgatattt tgaaaaaagg cgctactttt aatcgagaaa caccaggagt tcccattgct 2820
tatacaacia acttctctaaa agacaatgaa ttagctgtta ttaaaaaaa ctcagaatat 2880
attgaaacia cttcaaaagc ttatacagat ggaaaaatta acatcgatca ctctggagga 2940
tacgttgctc aattcaacat ttcttgggat gaagtaaatt atgatctcga gattgtggga 3000
ggctgggagt gcgagaagca ttccaaccc tggcaggtgc ttgtggcctc tcgtggcagg 3060
gcagtctgcg gcggtgttct ggtgcacccc cagtgggtcc tcacagctgc cactgcatc 3120
aggaacaaaa gcgtgatctt gctgggtcgg cacagcctgt ttcacctga agacacaggc 3180
caggatattc aggtcagcca cagcttccca caccgctct acgatatgag cctcctgaag 3240
aatcgattcc tcaggccagg tgatgactcc agccacgacc tcatgctgct ccgcctgtca 3300
gagcctgccg agctcacgga tgctgtgaag gtcattggacc tgcccaccca ggagccagca 3360
ctggggacca cctgctacgc ctcaggctgg ggcagcattg aaccagagga gttcttgacc 3420
ccaaagaaac ttcagtgtgt ggacctccat gttatttcca atgacgtgtg tgcgcaagtt 3480

ES 2 531 967 T3

cacccctcaga aggtgaccaa gttcatgctg tgtgctggac gctggacagg gggcaaaagc 3540
 acctgctcgg gtgattctgg gggcccactt gtctgttatg gtgtgcttca aggtatcacg 3600
 tcatggggca gtgaaccatg tgccttgccc gaaaggcctt ccctgtacac caagtggtg 3660
 cattaccgga agtggatcaa ggacaccatc gtggccaacc cctaaactag tgactacaag 3720
 gacgatgacg acaagtgata cccgggatct aaataaatcc gtttttaaat atgtatgcat 3780
 ttcttttgcg aatcaaaaat ttgtataata aaatcctata tgtaaaaaac atcatttagc 3840
 gtgactttct ttcaacagct aacaattggt gttactgcct aatgttttta gggatattta 3900
 aaaaagggcg ataaaaaacg attgggggat gagacatgaa cgctcaagca gaagaattca 3960
 aaaaatattt agaaactaac gggataaaac caaaacaatt tcataaaaaa gaacttattt 4020
 ttaaccaatg ggatccacaa gaatattgta ttttcctata tgatggtatc acaagctca 4080
 cgagtattag cgagaacggg accatcatga atttacaata ctacaaaggg gctttcgta 4140
 taatgtctgg ctttattgat acagaaacat cggttggcta ttataattta gaagtcatta 4200
 gcgagcaggc taccgcatac gttatcaaaa taaacgaact aaaagaacta ctgagcaaaa 4260
 atcttacgca ctttttctat gttttcaaaa ccctacaaaa acaagtttca tacagcctag 4320
 ctaaatttaa tgatttttcg attaacggga agcttggtc tatttgcggt caacttttaa 4380
 tcctgacctg tgtgtatggt aaagaaactc ctgatggcat caagattaca ctggataatt 4440
 taacaatgca ggagttagga tattcaagtg gcatcgaca tagctcagct gttagcagaa 4500
 ttatttcaa attaaagcaa gagaaagtta tcgtgtataa aaattcatgc ttttatgtac 4560
 aaaaatcgtg ttatctcaa agatagccc ctaaattaga tgaatggttt tatttagcat 4620
 gtccctgtac ttggggaaaa ttaaattaa tcaaaaacag tattcctcaa tgaggaatac 4680
 tgttttatat tttattcgaa taaagaactt acagaagcat tttcatgaac gcgtacgatt 4740
 gcttcaccaa gaagagctgg tcgaccgatg cccttgagag cctcaaccc agtcagctcc 4800
 ttccggtggg cgcggggcat gactatcgtc gccgcactta tgactgtctt ctttatcatg 4860
 caactcgtag gacaggtgcc ggcagcgctc tgggtcattt tcggcgagga ccgctttcgc 4920
 tggagcgcga cgatgatcgg cctgtcgctt gcggtattcg gaatcttgca cgccctcgct 4980
 caagccttcg tcaactggtc cgccaccaa cgtttcggcg agaagcaggc cattatcgcc 5040
 ggcatggcgg ccgacgcgct gggctacgtc ttgctggcgt tcgacgacgc aggctggatg 5100
 gccttccccca ttatgattct tctcgcttc ggcggcatcg ggatgcccgc gttgcaggcc 5160
 atgtgtcca ggcaggtaga tgacgacct cagggacagc ttcaaggatc gctcgcggct 5220
 cttaccagcc taacttcgat cattggaccg ctgatcgta cggcgattta tgccgcctcg 5280
 gcgagcacat ggaacgggtt ggcatggatt gtaggcgccg ccctatacct tgtctgcctc 5340
 cccgcgttgc gtcgcggtgc atggagccgg gccacctcga cctgaatgga agccggcggc 5400
 acctcgctaa cggattcacc actccaagaa ttggagccaa tcaattcttg cggagaactg 5460
 tgaatgcgca aaccaaccct tggcagaaca tatccatcgc gtccgccatc tccagcagcc 5520

gcacgcggcg catctcggct ttcgatttgt ttttgaatgg ttatccgat aaagaagttg 5580
aagaacaaac tggaatcaat cgccgaacgt ttagaaggta tcgagcaaga tataacgtga 5640
cagtcgatca aagaaaaaac aatgaaaaga gggatagtta atgagtacgg ttatttttagc 5700
tgaaaaacca agccaggcat tagcctacgc aagtgcctta aaacaaagca ccaaaaaaga 5760
cggttatfff gagatcaaag acccactatt tacagatgaa acgtttatca cctttggttt 5820
tgggcattta gtggaattag cagaaccagg tcattatgac gaaaagtggc aaaattggaa 5880
acttgaatct ttgccgattt ttcctgatcg atacgatttt gaagtggcaa aagataaggg 5940
aaagcagttt aaaattggtg cagaacttct caaaaaggca aatacaatta ttgttgcaac 6000
agatagcgac agagaagggtg aaaatatcgc ctggtcgatt atccataaag caaatgcctt 6060
ttcaaaagat aaaacattta aaagactatg gatcaatagc ttagaaaaag atgtaatccg 6120
aagcggtttt caaaatttgc aacctggaat gaattactat cccttttatc aagaagcgca 6180
aacacgcaa attgccgatt ggttgatcgg catgaacgca agccctttgt atacgttaaa 6240
tttacaacag aagggcgtac aaggtagatt ttcactagga cgtgttcaaa cgcccacctt 6300
ataccttatt tttcagcgcc aggaagccat agagaatttt aaaaaagaac cttttttcga 6360
ggtggaagct agtataaaag taaaccaagg gtcgtttaag ggcgttctaa gccccacaca 6420
gcgttttaaa acccaagagg agcttttagc ttttgtttct tctaacaag ctaaaatagg 6480
caatcaagag gggataattg ctgatgttca aaccaaagag aagaaaacga atagtccgag 6540
tttgttttct ttaagtagtt tgcaatcaaa agtcaatcag ctttataaag cgacagcgag 6600
ccaaacttta aaagctattt cttttttaat aacttaaaaa taaacttaat gtaacagcaa 6660
gcacagtcaa ggtatacacc tttgacaaaa aatagcacat tctctatcga aaatttttgc 6720
ttatttttta aattattttg ggaaattttc ccaatccctt tttctaactc aaaaaatata 6780
atcactcaaa atttaaaagg ggcgacttat acatcatttt aaaaaattga tgtaacgtgc 6840
taagttcaaa acaaagggcg cacttataca cgattttcaa tcttgatatat ttctaacgaa 6900
aagcgtgctc caaaaaacc cttcgtcaa ttttgacagg gggctttttg atgtaaaaaat 6960
ttctatcga aatttaaaaat tcgcttact catgttataa agacttaaaa taaaataact 7020
ctttaaatac ttttgctagt tgttcttcaa tattttttat tcggtgcatc ttccaagtaa 7080
agtataacac actagactta tttactacgt ttcataagtc ataatgctg gtgctctgcg 7140
aggctagttt ttgtgcaagc acaaaaaatg gactgaataa atcagttccat aagttcaaaa 7200
ccaaattcaa aatcaaaacc acaagcaacc aaaaaatgtg gttgttatac gttcataaat 7260
tttatgatca cttacgtgta taaaattaaa ttcactttca aaatctaaaa actaaatcca 7320
atcatctacc ctatgaatta tatcttgaaa ttcattcata aatagtgaag catggttaacc 7380
atcacataca gaatgatgaa gttgcagagc aactggata taaattttat tattctcact 7440
ataaaattta cctatcgtaa taataggcaa taaaagctg ctattgttac caatatttaa 7500
attaaataaa ctaaaatcaa tccaaggaat cattgaaatc ggtatggtgt tttcaggtat 7560

ES 2 531 967 T3

cggtttttta gaaacattt cttctttatc tttatattca agċaagtcac ttttataatt 7620
 attataaaaa gaaatgaagt ttttatcaga ttcagtccaa atgtagtaa atttttcagt 7680
 ttgcttatta aaaactgtat acaaaggatt taacttatcc caataaccta atttattctc 7740
 actattaatt cctgttctaa acactttatt tttatttaca acttccataa ttgcataaat 7800
 taaagagggga taaatttcat atcctttctt ttttatcata tctttaaaca aagtaatatc 7860
 aatttcttta gtaatgctat aagtagtttg ctgattaaaa tagtgttcaa aatattcttt 7920
 tctatcccaa ttttctaatt caataatatt aaaagtcata tataacttcc tcctaaattt 7980
 taaattttta tatttaggag gaataatcct ctgatttttt catacgttat gtcacctcgt 8040
 aatattaat tatactgaat tagcaatttt tatcaaataa aacttatttt acttccaaaa 8100
 cctaaattca cgttgccaaa aatcaatctg cttttgcaat tgtttttcgt tcgcttttaa 8160
 agtcgatttc attaattccg ttaaatacaat tggagatatt tctctaataca attttttaaa 8220
 tttagtctta gtattcttac ttagctttcc ccacatactt tcttcatgca acaaagtata 8280
 aaccatagct tgctcattaa ttttttctaa agtagcccac gcaggtttca agatgtgtaa 8340
 atcattaaaa caatcattcc agtaatcaac catatctctt ttttaattcaa cttctacacg 8400
 ccataaatgt tcagacacaa cttcaacatc tgcgttatct ttacgttctt gttttttatt 8460
 ataaattcta ataaatctat cactatcacg gacaccaaaa tattttgttt ctggcttgcc 8520
 attacgacca taaaaaacag ttttctaac tgctttatca gtcattgcat agtaatcgct 8580
 caatcatct tcaaaatcaa aagctaagtc taatcttgta aaaccgcat cttccatgta 8640
 gtcgataata ttttgtttta accaaatcat ttcttcatgt gtgagtttat tgggattaaa 8700
 ttcaacacgc atattacgtc tatcccaagt atctgctttt actttgtcat attcgatata 8760
 aactttttct tgaagtgctt tagctttaaa ctttgtttga agtatatccc aaagtcgtat 8820
 ttgtggctct aactcataa agtcagatag ctttttagca ttagttttgt tcaaatttcc 8880
 aacgattgtc atggcatcaa aacttaatgc gggttgagat tttcccaaag tttgaccact 8940
 taaccggcta ttacttaacc ggctattaga gacggaacta actcaacgct agtagtggat 9000
 ttaatcccaa atgagccaac agaaccagaa ccagaaacag aacaagtaac attggagtta 9060
 gaaatggaag aagaaaaaag caatgatttc gtgtgaataa tgcacgaaat cattgcttat 9120
 ttttttaaaa agcgatatac tagatataac gaaacaacga actgaataaa gaatacaaaa 9180
 aaagagccac gaccagttaa agcctgagaa actttaactg cgagccttaa ttgattacca 9240
 ccaatcaatt aaagaagtcg agacccaaaa tttggtaaag tatttaatta ctttattaat 9300
 cagatactta aatatctgta aaccattat atcgggtttt tgaggggatt tcaagtcttt 9360
 aagaagatac caggcaatca attaagaaa acttagttga ttgccttttt tgttgtgatt 9420
 caactttgat cgtagcttct aactaattaa ttttcgtaag aaaggagaac agctgaatga 9480
 atatcccttt tgtttagtaa actgtgcttc atgacggctt gttaaagtac aaatttaaaa 9540
 atagtaaaat tcgctcaatc actaccaagc caggtaaaaag taaaggggct atttttcgtt 9600

ES 2 531 967 T3

atcgtcaaa aaaagcatg attggcggac gtggcgttgt tctgacttcc gaagaagcga 9660
 ttcacgaaaa tcaagataca tttacgcatt ggacaccaaa cgtttatcgt tatggtagct 9720
 atgcagacga aaaccgttca tacactaaag gacattctga aaacaattta agacaaatca 9780
 ataccttctt tattgatttt gatattcaca cggaaaaaga aactatttca gcaagcgata 9840
 ttttaacaac agctattgat ttaggtttta tgcctacgtt aattatcaaa tctgataaag 9900
 gttatcaagc atattttggt ttagaaacgc cagtctatgt gacttcaaaa tcagaattta 9960
 aatctgtcaa agcagccaaa ataatctcgc aaaatatccg agaatatttt ggaaagtctt 10020
 tgccagttga tctaacgtgc aatcattttg ggattgctcg tataccaaga acggacaatg 10080
 tagaattttt tgatcccaat taccgttatt ctttcaaga atggcaagat tggcttttca 10140
 aacaaacaga taataagggc tttactcgtt caagtctaac ggttttaagc ggtacagaag 10200
 gcaaaaaaca agtagatgaa ccctggttta atctcttatt gcacgaaacg aaattttcag 10260
 gagaaaaggg ttagtagggg cgcaatagcg ttatgtttac cctctcttta gcctacttta 10320
 gttcaggcta tcaatcgaa acgtgcgaat ataatatgtt tgagttaaat aatcgattag 10380
 atcaaccctt agaagaaaaa gaagtaatca aaattgtag aagtgcctat tcagaaaact 10440
 atcaaggggc taatagggaa tacattacca ttctttgcaa agcttgggta tcaagtgatt 10500
 taaccagtaa agatttattt gtccgtcaag ggtggtttaa attcaagaaa aaaagaagcg 10560
 aacgtcaacg tgttcatttg tcagaatgga aagaagattt aatggcttat attagcgaaa 10620
 aaagcgatgt atacaagcct ttttagcga cgaccaaaaa agagattaga gaagtgctag 10680
 gcattcctga acggacatta gataaattgc tgaaggtagt gaaggcgaat caggaaattt 10740
 tctttaagat taaaccagga agaaatggtg gcattcaact tgctagtgtt aaatcattgt 10800
 tgctatcgat cattaatta aaaaaagaag aacgagaaag ctatataaag gcgctgacag 10860
 cttcgtttaa tttagaacgt acatttattc aagaaactct aaacaaattg gcagaacgcc 10920
 ccaaaacgga cccacaactc gatttgttta gctacgatac aggctgaaaa taaaaccgc 10980
 actatgccat tacatttata tctatgatac gtgtttggtt ttctttgctg tttagtgaat 11040
 gattagcaga aatatacaga gtaagatttt aattaattat tagggggaga aggagagagt 11100
 agcccgaaaa cttttagttg gcttggactg aacgaagtga gggaaaggct actaaaacgt 11160
 cgaggggcag tgagagcgaa gcgaacactt gatcttttaa gttgctatca tttataggtc 11220
 aatagagtat acctatttgt cctaataatga ttttagcagt ataattgact tggatgaatg 11280
 gtcatttaag ttgggcataa taggaggagt aaaatgaaaa aatttattta tcgagtttta 11340
 gaaaatgacg aagtggggc tatttttaat gagcaacaat atgcgcaaga ttttatcgct 11400
 tacgaaaaga caatttctga taagcaattt gaaattgaaa aagtagatat tgctgattgg 11460
 ttattgcaac cgagagaatt ttagaggttg gttgaaaatg gctaaaattg gttatgcacg 11520
 tgcagtagc aaagaacaga acttagatcg gcaattacaa gcgttacagg gcgtttctaa 11580
 ggtcttttca gacaaattaa gcggtcaatc ggtcgaacgc ccacaattac aagctatgct 11640

ES 2 531 967 T3

taactatatt cgtgaagggg atattgttat tgttactgaa ttāgatcgat taggacgaaa 11700
 taataaagaa ttaacagaat tgatgaatca aattcaaatt aagggggcaa ccctggaagt 11760
 cttaaattta ccctcaatga atggattga agatgaaaat ttaaggcggt tgattaatag 11820
 ccttgtcatt gaattgtaca agtatcaagc agaatcagaa cgaaaaaaaa ttaaggaacg 11880
 tcaggcacia ggaatcgaia ttgctaagaa aaaaggcaaa ttcaaaggtc gtcagcataa 11940
 atttaaagaa aatgatccac gtttaaagtc gggcagcggt gggctctggc cacgggtgag 12000
 catgatcgtg ctctgtcgt tgaggaccag gctaggctgg cggggtgccc ttactggtta 12060
 gcagaatgaa tcaccgatac gcgagcgaac gtgaagcagc tgctgctgca aaacgtctgc 12120
 gacctgagca acaacatgaa tggctctcgg tttccgtggt tcgtaaagtc tggaaacgag 12180
 gaagtcccct acgtgctgct gaagtggccc gcaacagaga gtggaaccaa ccgggtgatac 12240
 cacgatacta tgactgagag tcaacgccat gagcggcctc atttcttatt ctgagttaca 12300
 acagtccgca ccgctgccgg tagctcctc cgggtgggagc ggggcatgac tatcgtcgcc 12360
 gcacttatga ctgtcttctt tatcatgcaa ctctaggac aggtgcccgc agcgcaccaac 12420
 agtcccccg ccacggggcc tgccaccata cccacgccga aacaagcggc ctgcaccatt 12480
 atgttccgga tctgcatcgc aggatgctgc tggctaccct gtggaacacc tacatctgta 12540
 ttaacgaagc gctaaccggt tttatcaggc tctgggaggc agaataaatg atcatatcgt 12600
 caattattac ctccacgggg agagcctgag caaactggcc tcaggcattt gagaagcaca 12660
 cggtcacact gcttccggtg gtcaataaac cggtaaacca gcaatagaca taagcggcta 12720
 tttaacgacc ctgccctgaa ccgacgaccg ggtcgaattt gctttcgaat ttctgccatt 12780
 catccgctta ttactactta ttcaggcgta gcaaccaggc gtttaagggc accaataact 12840
 gccttaaaaa aattacgccc cgccctgcca ctcatcgag tactgttgta attcattaag 12900
 cattctgccc acatggaagc catcacaac ggcgatgaga acctgaatcg ccagcggcat 12960
 cagcaccttg tcgccttgag tataatattt gccatggag aaaacggggg cgaagaagtt 13020
 gtccatattg gccacgttta aatcaaaact ggtgaaactc acccagggat tggctgagac 13080
 gaaaaacata ttctcaataa acccttagg gaaataggcc aggttttcac cgtaacagc 13140
 cacatcttgc gaatatatgt gtagaaactg ccggaaatcg tcgtggtatt cactccagag 13200
 cgatgaaaac gtttcagttt gctcatggaa aacgggtgaa caagggtgaa cactatccca 13260
 taccaccagc tcaccgtctt tcattgccat acgg 13294

<210> 56

<211> 368

<212> PRT

<213> Listeria monocytogenes

5

<400> 56

Met Val Thr Gly Trp His Arg Pro Thr Trp Ile Glu Ile Asp Arg Ala

1

5

10

15

ES 2 531 967 T3

Ala Ile Arg Glu Asn Ile Lys Asn Glu Gln Asn Lys Leu Pro Glu Ser
 20 25 30

Val Asp Leu Trp Ala Val Val Lys Ala Asn Ala Tyr Gly His Gly Ile
 35 40 45

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

Val Ala Ile Leu Asp Glu Ala Leu Ala Leu Arg Glu Ala Gly Phe Gln
 65 70 75 80

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

Leu Ala Ala Lys Asn His Ile Ser Leu Thr Val Phe Arg Glu Asp Trp
 100 105 110

Leu Glu Asn Leu Thr Leu Glu Ala Thr Leu Arg Ile His Leu Lys Val
 115 120 125

Asp Ser Gly Met Gly Arg Leu Gly Ile Arg Thr Thr Glu Glu Ala Arg
 130 135 140

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

Ile Tyr Thr His Phe Ala Thr Ala Asp Gln Leu Glu Thr Ser Tyr Phe
 165 170 175

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

Arg Pro Thr Tyr Val His Thr Ala Asn Ser Ala Ala Ser Leu Leu Gln
 195 200 205

Pro Gln Ile Gly Phe Asp Ala Ile Arg Phe Gly Ile Ser Met Tyr Gly
 210 215 220

Leu Thr Pro Ser Thr Glu Ile Lys Thr Ser Leu Pro Phe Glu Leu Lys
 225 230 235 240

Pro Ala Leu Ala Leu Tyr Thr Glu Met Val His Val Lys Glu Leu Ala
 245 250 255

Pro Gly Asp Ser Val Ser Tyr Gly Ala Thr Tyr Thr Ala Thr Glu Arg
 260 265 270

Glu Trp Val Ala Thr Leu Pro Ile Gly Tyr Ala Asp Gly Leu Ile Arg
 275 280 285

ES 2 531 967 T3

His Tyr Ser Gly Phe His Val Leu Val Asp Gly Glu Pro Ala Pro Ile
 290 295 300

Ile Gly Arg Val Cys Met Asp Gln Thr Ile Ile Lys Leu Pro Arg Glu
 305 310 315 320

Phe Gln Thr Gly Ser Lys Val Thr Ile Ile Gly Lys Asp His Gly Asn
 325 330 335

Thr Val Thr Ala Asp Asp Ala Ala Gln Tyr Leu Asp Thr Ile Asn Tyr
 340 345 350

Glu Val Thr Cys Leu Leu Asn Glu Arg Ile Pro Arg Lys Tyr Ile His
 355 360 365

<210> 57

<211> 289

<212> PRT

<213> Listeria monocytogenes

5

<400> 57

Met Lys Val Leu Val Asn Asn His Leu Val Glu Arg Glu Asp Ala Thr
 1 5 10 15

Val Asp Ile Glu Asp Arg Gly Tyr Gln Phe Gly Asp Gly Val Tyr Glu
 20 25 30

Val Val Arg Leu Tyr Asn Gly Lys Phe Phe Thr Tyr Asn Glu His Ile
 35 40 45

Asp Arg Leu Tyr Ala Ser Ala Ala Lys Ile Asp Leu Val Ile Pro Tyr
 50 55 60

Ser Lys Glu Glu Leu Arg Glu Leu Leu Glu Lys Leu Val Ala Glu Asn
 65 70 75 80

Asn Ile Asn Thr Gly Asn Val Tyr Leu Gln Val Thr Arg Gly Val Gln
 85 90 95

Asn Pro Arg Asn His Val Ile Pro Asp Asp Phe Pro Leu Glu Gly Val
 100 105 110

Leu Thr Ala Ala Ala Arg Glu Val Pro Arg Asn Glu Arg Gln Phe Val
 115 120 125

Glu Gly Gly Thr Ala Ile Thr Glu Glu Asp Val Arg Trp Leu Arg Cys
 130 135 140

Asp Ile Lys Ser Leu Asn Leu Leu Gly Asn Ile Leu Ala Lys Asn Lys
 145 150 155 160

Ala His Gln Gln Asn Ala Leu Glu Ala Ile Leu His Arg Gly Glu Gln

ES 2 531 967 T3

165 170 175

Val Thr Glu Cys Ser Ala Ser Asn Val Ser Ile Ile Lys Asp Gly Val
 180 185 190

Leu Trp Thr His Ala Ala Asp Asn Leu Ile Leu Asn Gly Ile Thr Arg
 195 200 205

Gln Val Ile Ile Asp Val Ala Lys Lys Asn Gly Ile Pro Val Lys Glu
 210 215 220

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

Ser Ser Thr Thr Ile Glu Ile Thr Pro Ile Thr His Ile Asp Gly Val
 245 250 255

Gln Val Ala Asp Gly Lys Arg Gly Pro Ile Thr Ala Gln Leu His Gln
 260 265 270

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

Lys

<210> 58
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> sintetizado químicamente

10

<400> 58
 gtgctcgaga ttgtgggagg ctgggagtg 29

<210> 59
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Artificial

15

<220>
 <223> sintetizado químicamente

20

<400> 59
 gatactagtt taggggttgg ccacgatgg 29

<210> 60
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

25

<400> 60

30

His Cys Ile Arg Asn Lys Ser Val Ile Leu
 1 5 10

<210> 61
 <211> 390
 <212> PRT
 <213> Listeria monocytogenes

ES 2 531 967 T3

<400> 61
 Met Arg Ala Met Met Val Val Phe Ile Thr Ala Asn Cys Ile Thr Ile
 1 5 10 15
 Asn Pro Asp Ile Ile Phe Ala Ala Thr Asp Ser Glu Asp Ser Ser Leu
 20 25 30
 Asn Thr Asp Glu Trp Glu Glu Glu Lys Thr Glu Glu Gln Pro Ser Glu
 35 40 45
 Val Asn Thr Gly Pro Arg Tyr Glu Thr Ala Arg Glu Val Ser Ser Arg
 50 55 60
 Asp Ile Glu Glu Leu Glu Lys Ser Asn Lys Val Lys Asn Thr Asn Lys
 65 70 75 80
 Ala Asp Leu Ile Ala Met Leu Lys Ala Lys Ala Glu Lys Gly Pro Asn
 85 90 95
 Asn Asn Asn Asn Asn Gly Glu Gln Thr Gly Asn Val Ala Ile Asn Glu
 100 105 110
 Glu Ala Ser Gly Val Asp Arg Pro Thr Leu Gln Val Glu Arg Arg His
 115 120 125
 Pro Gly Leu Ser Ser Asp Ser Ala Ala Glu Ile Lys Lys Arg Arg Lys
 130 135 140
 Ala Ile Ala Ser Ser Asp Ser Glu Leu Glu Ser Leu Thr Tyr Pro Asp
 145 150 155 160
 Lys Pro Thr Lys Ala Asn Lys Arg Lys Val Ala Lys Glu Ser Val Val
 165 170 175
 Asp Ala Ser Glu Ser Asp Leu Asp Ser Ser Met Gln Ser Ala Asp Glu
 180 185 190
 Ser Thr Pro Gln Pro Leu Lys Ala Asn Gln Lys Pro Phe Phe Pro Lys
 195 200 205
 Val Phe Lys Lys Ile Lys Asp Ala Gly Lys Trp Val Arg Asp Lys Ile
 210 215 220
 Asp Glu Asn Pro Glu Val Lys Lys Ala Ile Val Asp Lys Ser Ala Gly
 225 230 235 240

ES 2 531 967 T3

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

Ser Asp Phe Pro Pro Pro Pro Thr Asp Glu Glu Leu Arg Leu Ala Leu
 260 265 270

Pro Glu Thr Pro Met Leu Leu Gly Phe Asn Ala Pro Thr Pro Ser Glu
 275 280 285

Pro Ser Ser Phe Glu Phe Pro Pro Pro Pro Thr Asp Glu Glu Leu Arg
 290 295 300

Leu Ala Leu Pro Glu Thr Pro Met Leu Leu Gly Phe Asn Ala Pro Ala
 305 310 315 320

Thr Ser Glu Pro Ser Ser Phe Glu Phe Pro Pro Pro Pro Thr Glu Asp
 325 330 335

Glu Leu Glu Ile Met Arg Glu Thr Ala Pro Ser Leu Asp Ser Ser Phe
 340 345 350

Thr Ser Gly Asp Leu Ala Ser Leu Arg Ser Ala Ile Asn Arg His Ser
 355 360 365

Glu Asn Phe Ser Asp Phe Pro Leu Ile Pro Thr Glu Glu Glu Leu Asn
 370 375 380

Gly Arg Gly Gly Arg Pro
 385 390

- <210> 62
- <211> 1170
- <212> ADN
- <213> Listeria monocytogenes

5

<400> 62
 atgCGTgcga tgatggtagt tttcattact gccaactgca ttacgattaa ccccgcacata 60
 atatttgcag cgacagatag cgaagattcc agtctaaca cagatgaatg ggaagaagaa 120
 aaaacagaag agcagccaag cgaggtaaat acgggaccaa gatacgaaac tgcacgtgaa 180
 gtaagttcac gtgatattga ggaactagaa aaatcgaata aagtgaaaaa tacgaacaaa 240
 gcagacctaa tagcaatgtt gaaagcaaaa gcagagaaag gtccgaataa caataataac 300
 aacggtgagc aaacaggaaa tgtggctata aatgaagagg cttcaggagt cgaccgacca 360
 actctgcaag tggagcgtcg tcatccaggt ctgtcatcgg atagcgcagc ggaaattaa 420
 aaaagaagaa aagccatagc gtcgtcggat agtgagcttg aaagccttac ttatccagat 480
 aaaccaacaa aagcaaataa gagaaaagtg gcgaaagagt cagttgtgga tgcttctgaa 540
 agtgacttag attctagcat gcagtcagca gacgagtcta caccacaacc tttaaagca 600
 aatcaaaaac catttttccc taaagtattt aaaaaataa_aagatgcggg gaaatgggta 660

ES 2 531 967 T3

cgtgataaaa tcgacgaaaa tcctgaagta aagaaagcga ttggtgataa aagtgcaggg 720
 ttaattgacc aattattaac caaaaagaaa agtgaagagg taaatgcttc ggacttcccg 780
 ccaccaccta cggatgaaga gttaagactt gctttgccag agacaccgat gcttctcggg 840
 tttaatgctc ctactccatc ggaaccgagc tcattcgaat ttccgccgcc acctacggat 900
 gaagagttaa gacttgcttt gccagagacg ccaatgcttc ttggttttaa tgctcctgct 960
 acatcggaac cgagctcatt cgaatttcca cgcctccaa cagaagatga actagaaatt 1020
 atgcgggaaa cagcaccttc gctagattct agttttacaa gcggggattt agctagtttg 1080
 agaagtgcta ttaatcgcca tagcgaat tctctgatt tcccactaat cccaacagaa 1140
 gaagagttga acgggagagg cggtagacca 1170

<210> 63
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

<400> 63
 Met Lys Ala Val Leu Leu Ala Leu Leu Met Ala Gly Leu Ala Leu Gln
 1 5 10 15
 Pro Gly Thr Ala Leu Leu Cys Tyr Ser Cys Lys Ala Gln Val Ser Asn
 20 25 30
 Glu Asp Cys Leu Gln Val Glu Asn Cys Thr Gln Leu Gly Glu Gln Cys
 35 40 45
 Trp Thr Ala Arg Ile Arg Ala Val Gly Leu Leu Thr Val Ile Ser Lys
 50 55 60
 Gly Cys Ser Leu Asn Cys Val Asp Asp Ser Gln Asp Tyr Tyr Val Gly
 65 70 75 80
 Lys Lys Asn Ile Thr Cys Cys Asp Thr Asp Leu Cys Asn Ala Ser Gly
 85 90 95
 Ala His Ala Leu Gln Pro Ala Ala Ala Ile Leu Ala Leu Leu Pro Ala
 100 105 110
 Leu Gly Leu Leu Leu Trp Gly Pro Gly Gln Leu
 115 120

<210> 64
 <211> 990
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

10

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (543)..(543)
 <223> n e s a, c, g o t

15

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (580)..(580)
 <223> n e s a, c, g o t

20

ES 2 531 967 T3

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (584)..(584)
 <223> n e s a , c , g o t
 5

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (604)..(604)
 <223> n e s a , c , g o t
 10

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (608)..(608)
 <223> n e s a , c , g o t
 15

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (615)..(615)
 <223> n e s a , c , g o t
 20

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (636)..(636)
 <223> n e s a , c , g o t
 25

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (640)..(640)
 <223> n e s a , c , g o t
 30

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (646)..(646)
 <223> n e s a , c , g o t
 35

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (697)..(697)
 <223> n e s a , c , g o t
 40

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (926)..(926)
 <223> n e s a , c , g o t
 45

<400> 64
 agggagaggc agtgaccatg aaggctgtgc tgcttgccct gttgatggca ggcttggccc 60
 tgcagccagg cactgcccctg ctgtgctact cctgcaaagc ccaggtgagc aacgaggact 120
 gcctgcaggt ggagaactgc acccagctgg gggagcagtg ctggaccgcg cgcacccgcg 180
 cagttggcct cctgaccgtc atcagcaaag gctgcagctt gaactgctg gatgactcac 240
 aggactacta cgtgggcaag aagaacatca cgtgctgtga caccgacttg tgcaacgcca 300
 gcggggccca tgccctgcag ccggctgccg ccaccccttc gctgctccct gcaactcggcc 360
 tgctgctctg gggaccgagc cagctatagg ctctgggggg ccccgctgca gcccacactg 420
 ggtgtggtgc cccaggcctt tgtgccactc ctcacagaa_ ctggcccagt gggagcctgt 480

ES 2 531 967 T3

```
cctggttcct gaggcacatc ctaacgcaag tttgaccatg tatgtttgca ccccttttcc 540
ccnaaccctg accttcccat gggccttttc caggattccn accnggcaga tcagttttag 600
tganacanat ccgcntgcag atggcccctc caaccntttn tgttgntggt tccatggccc 660
agcattttcc acccttaacc ctgtgttcag gcacttnttc ccccaggaag ccttccctgc 720
ccacccatt tatgaattga gccaggtttg gtccgtggtg tccccgcac ccagcagggg 780
acaggcaatc aggagggccc agtaaaggct gagatgaagt ggactgagta gaactggagg 840
acaagagttg acgtgagttc ctgggagttt ccagagatgg ggcctggagg cctggaggaa 900
ggggccaggc ctcacatttg tggggntccc gaatggcagc ctgagcacag cgtaggccct 960
taataaacac ctgttgata agccaaaaaa 990
```

REVINDICACIONES

1. Una cepa recombinante de *Listeria* que expresa un péptido de fusión de un péptido peptidasa relacionada con la calicreína 3 (KLK3) que está unido de forma operativa a un péptido listeriolisina (LLO) N-terminal no hemolítico, comprendiendo dicho péptido de fusión la secuencia de SEQ ID NO: 54 o una secuencia homóloga al menos al 99% a la misma, en la que dicho péptido LLO N-terminal potencia la inmunogenicidad del péptido de fusión, y en la que el péptido KLK3 no contiene una secuencia de señal.
2. La cepa recombinante de *Listeria* de la reivindicación 1, en la que la cepa recombinante de *Listeria* es una cepa auxótrofa de *Listeria* o una cepa recombinante de *Listeria monocytogenes*.
3. La cepa recombinante de *Listeria* de la reivindicación 2, en la que la cepa auxótrofa de *Listeria* es un mutante *dal/dat* o comprende adicionalmente una delección en el gen endógeno *ActA*.
4. La cepa recombinante de *Listeria* de la reivindicación 2, en la que la cepa auxótrofa de *Listeria* comprende un vector de expresión episomal que comprende una enzima metabólica que complementa la auxotrofia de la cepa auxótrofa de *Listeria*.
5. La cepa recombinante de *Listeria* de la reivindicación 4, en la que la enzima metabólica es una enzima alanina racemasa o una enzima D-aminoácido transferasa.
6. La cepa recombinante de *Listeria* de la reivindicación 1, en la que la cepa recombinante de *Listeria* se ha pasado a través de un huésped animal.
7. Un polipéptido recombinante que comprende un péptido de fusión de un péptido KLK3 que está unido de forma operativa a un péptido LLO N-terminal, en el que dicho polipéptido recombinante comprende la secuencia de SEQ ID NO: 54 o una secuencia homóloga al menos al 99% a la misma, en el que dicho péptido LLO N-terminal potencia la inmunogenicidad del péptido de fusión, y en el que el péptido KLK3 no contiene una secuencia de señal.
8. Una molécula nucleotídica que codifica el polipéptido recombinante de la reivindicación 7.
9. Una vacuna que comprende la cepa recombinante de *Listeria* de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, el polipéptido recombinante de la reivindicación 7 o la molécula nucleotídica de la reivindicación 8, y un adyuvante.
10. Un vector de vacuna recombinante que codifica el polipéptido recombinante de la reivindicación 7 o que comprende la molécula nucleotídica de la reivindicación 8.
11. La cepa recombinante de *Listeria* de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, una composición inmunogénica que comprende el polipéptido recombinante de la reivindicación 7, o el nucleótido de la reivindicación 8, para su uso en la inducción de una respuesta inmune anti-KLK3 en un sujeto.
12. La cepa recombinante de *Listeria* de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, el polipéptido recombinante de la reivindicación 7, o el nucleótido de la reivindicación 8, para su uso en el tratamiento de un cáncer de próstata que expresa la proteína peptidasa relacionada con la calicreína 3 (KLK3) en un sujeto, por lo que el sujeto acumula una respuesta inmune frente al cáncer de próstata que expresa la proteína KLK3.
13. La cepa recombinante de *Listeria* de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, el polipéptido recombinante de la reivindicación 7, o el nucleótido de la reivindicación 8, para su uso en la inhibición o la supresión de un cáncer de próstata que expresa la proteína KLK3 en un sujeto, por lo que el sujeto acumula una respuesta inmune frente al cáncer de próstata que expresa la proteína KLK3, inhibiendo o suprimiendo de este modo el cáncer de próstata que expresa la proteína KLK3 en un sujeto.
14. El polipéptido recombinante de la reivindicación 7 hecho mediante un proceso que comprende la etapa de conjugar químicamente un polipéptido que comprende el péptido KLK3 en un polipéptido que comprende el péptido LLO N-terminal.
15. La cepa recombinante de *Listeria* de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, una composición inmunogénica que comprende el polipéptido recombinante de la reivindicación 7, o el nucleótido de la reivindicación 8, para su uso como un medicamento.

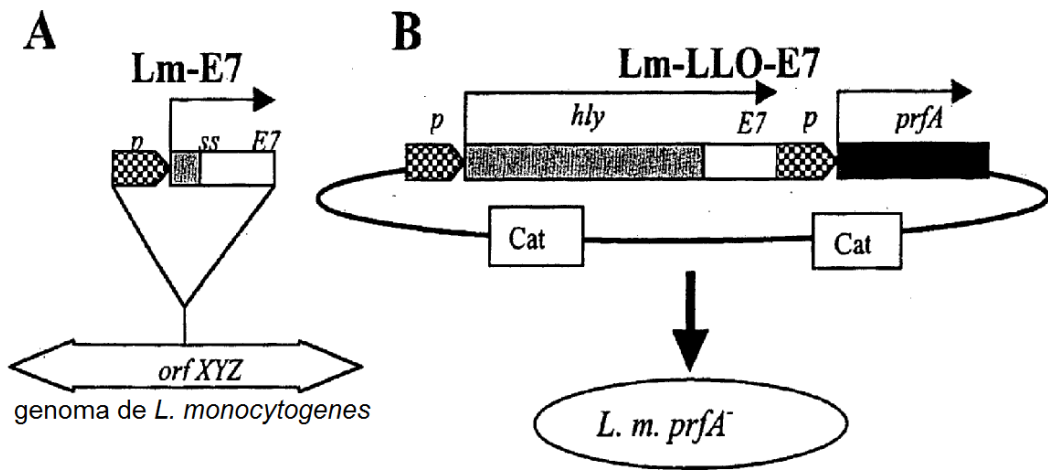


FIGURA 1

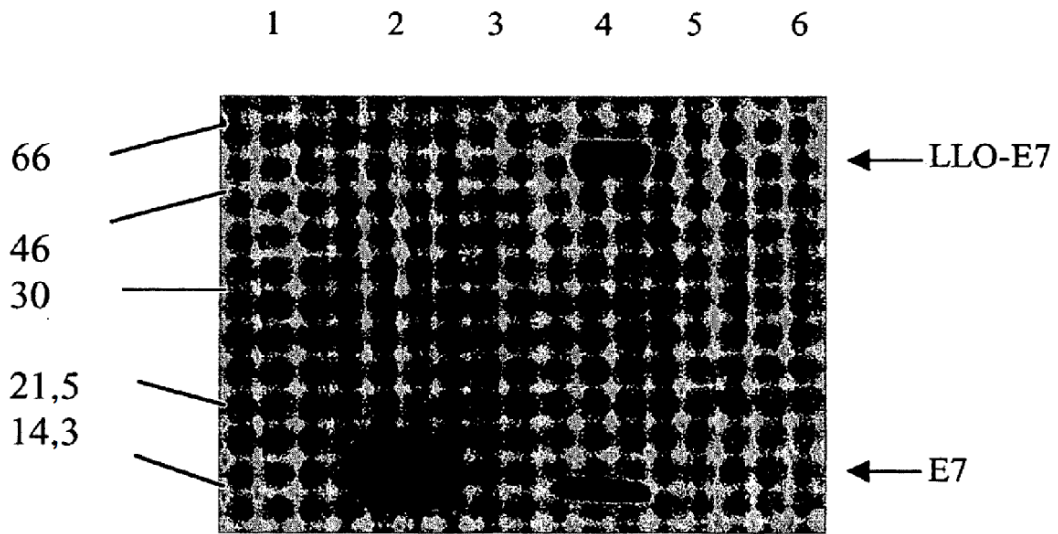


FIGURA 2

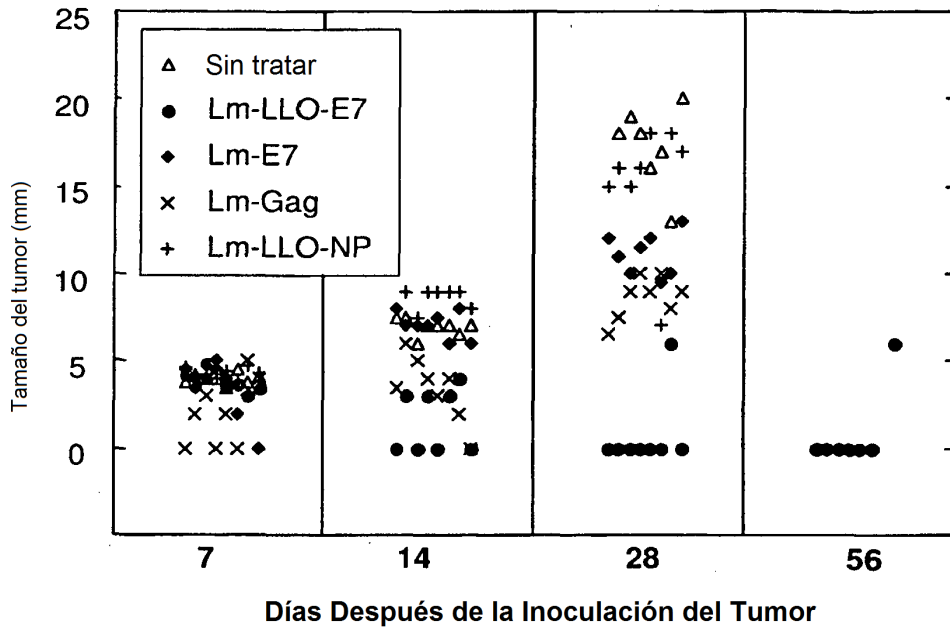


FIGURA 3A

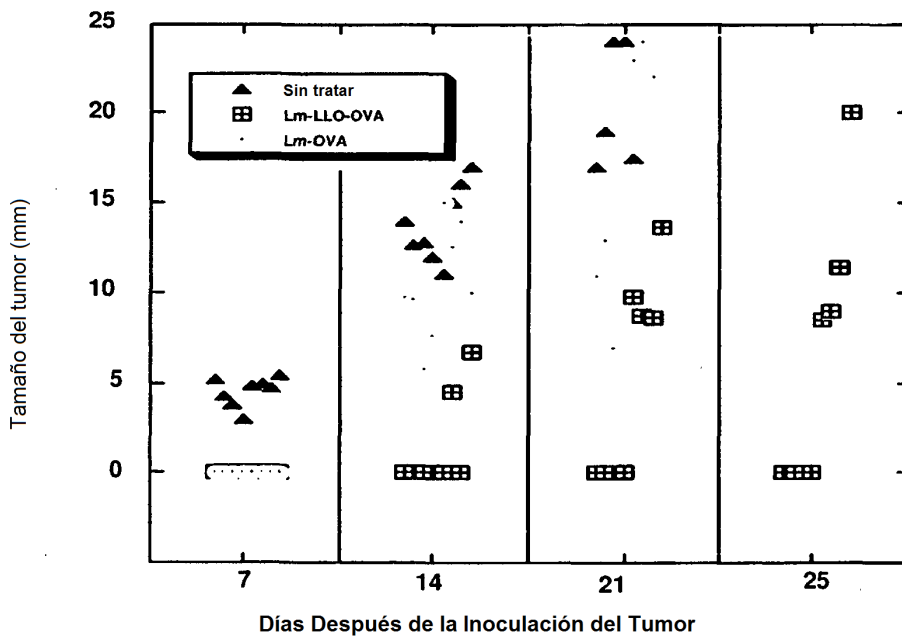


FIGURA 3B

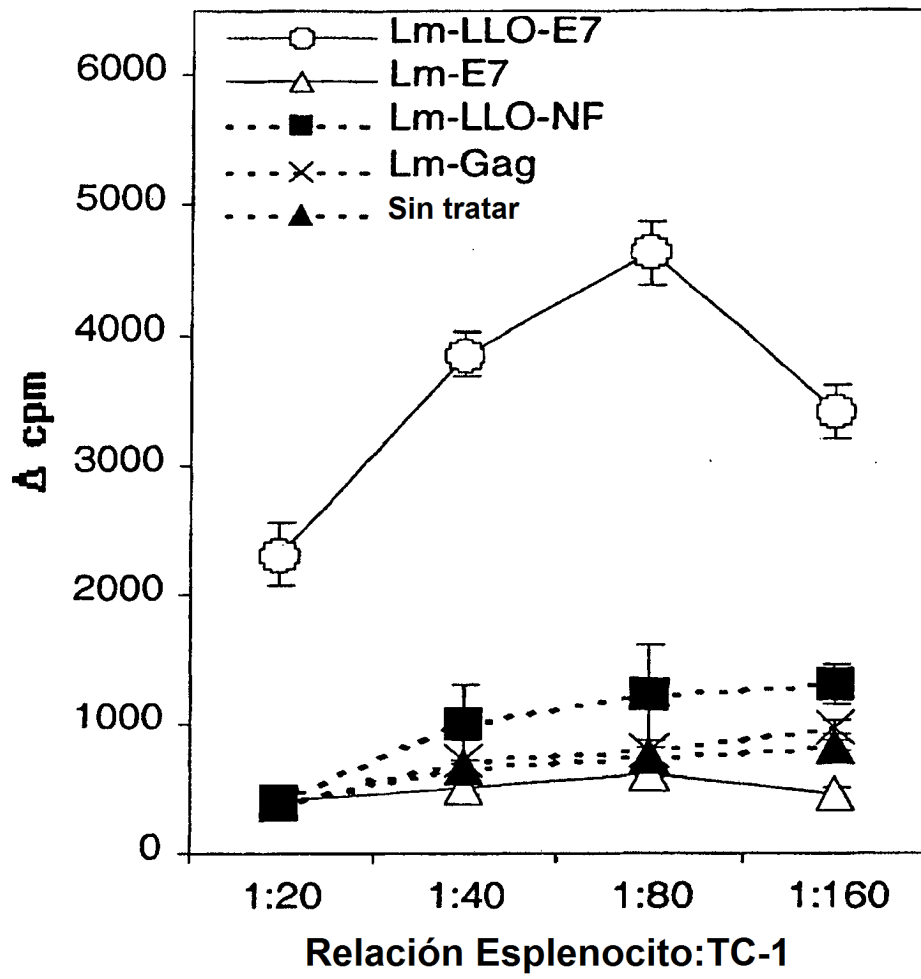


FIGURA 4

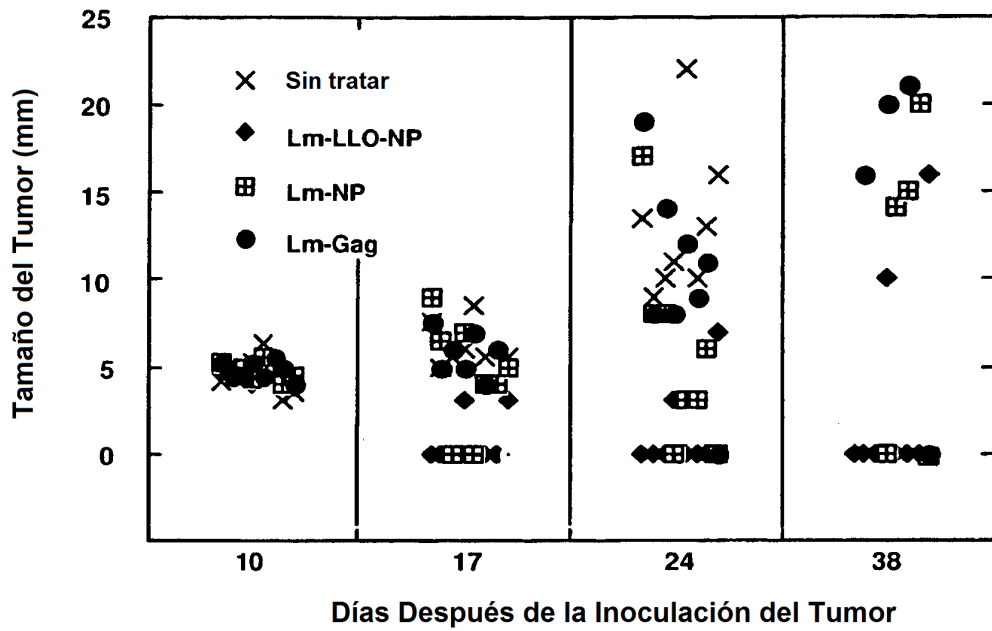


FIGURA 5

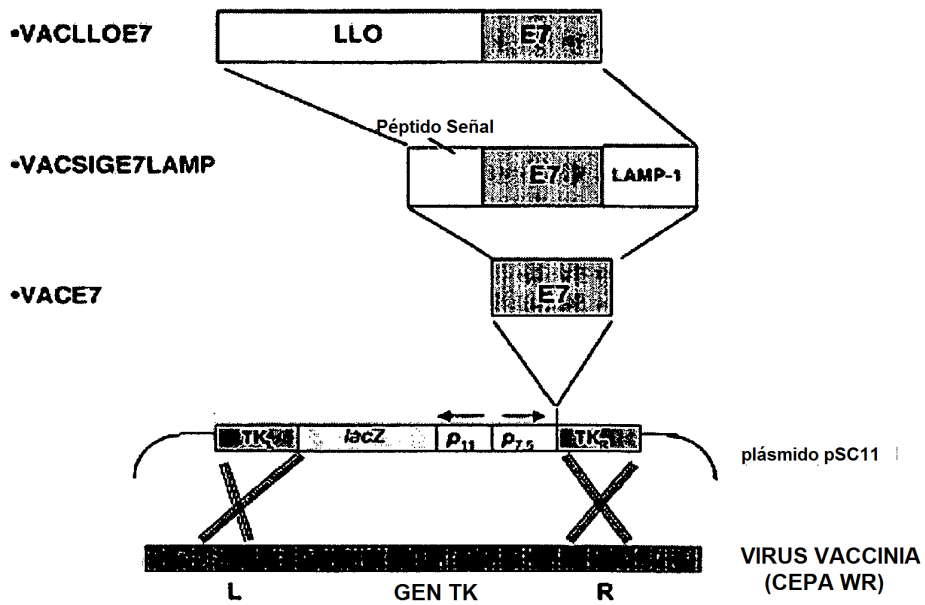


FIGURA 6

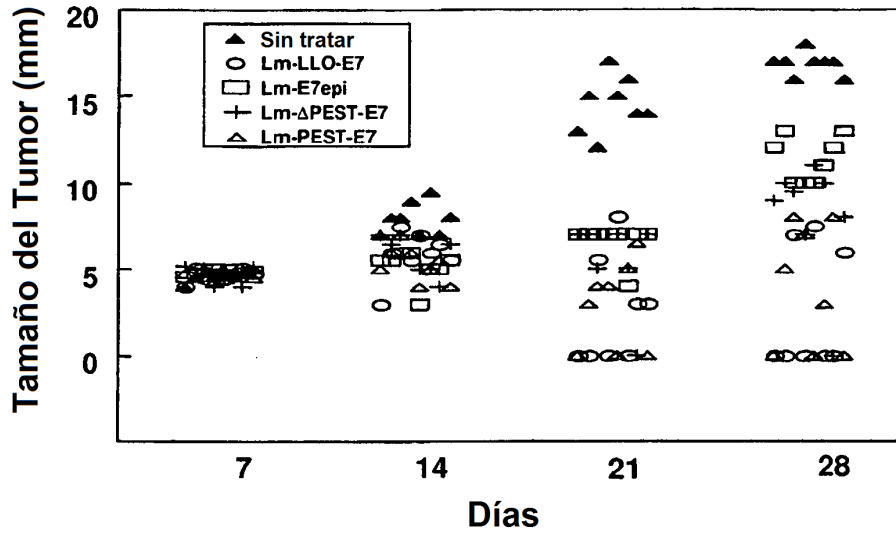


FIGURA 8C

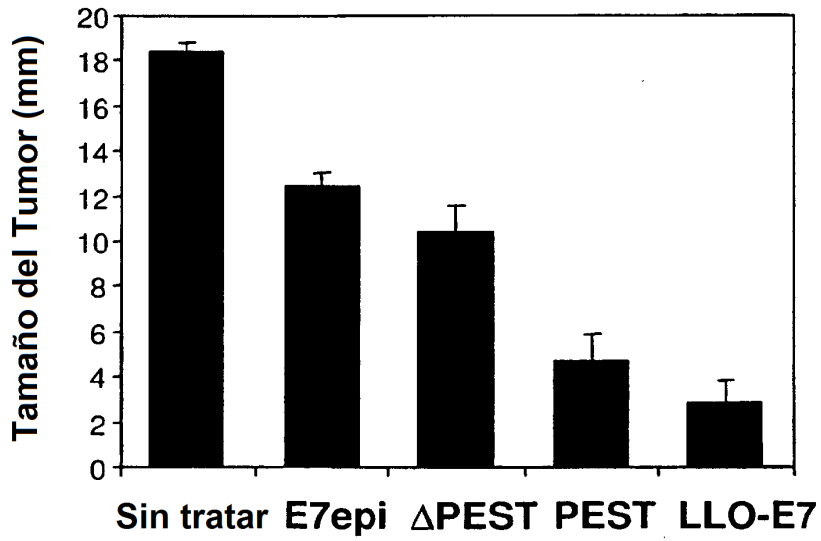


FIGURA 8D

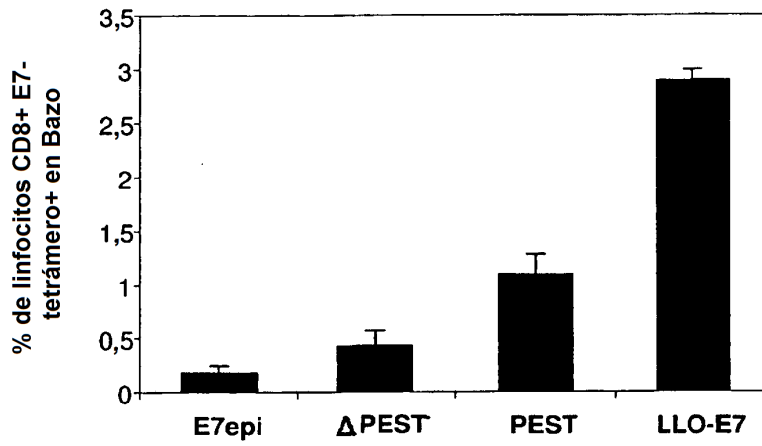


FIGURA 8E

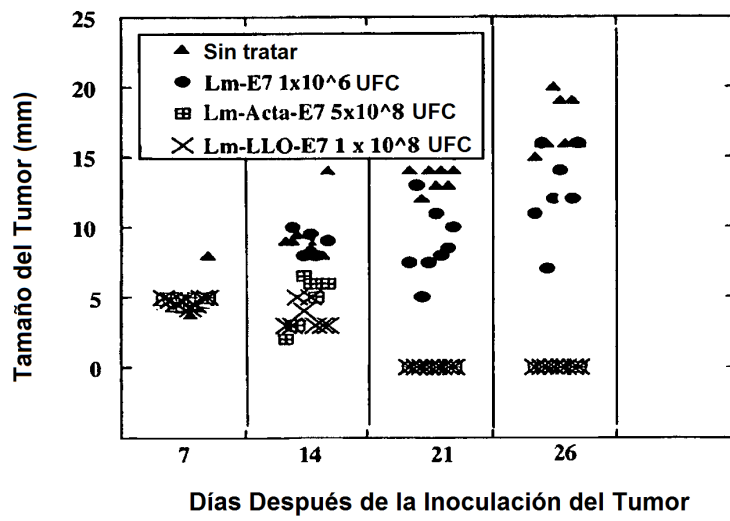


FIGURA 9

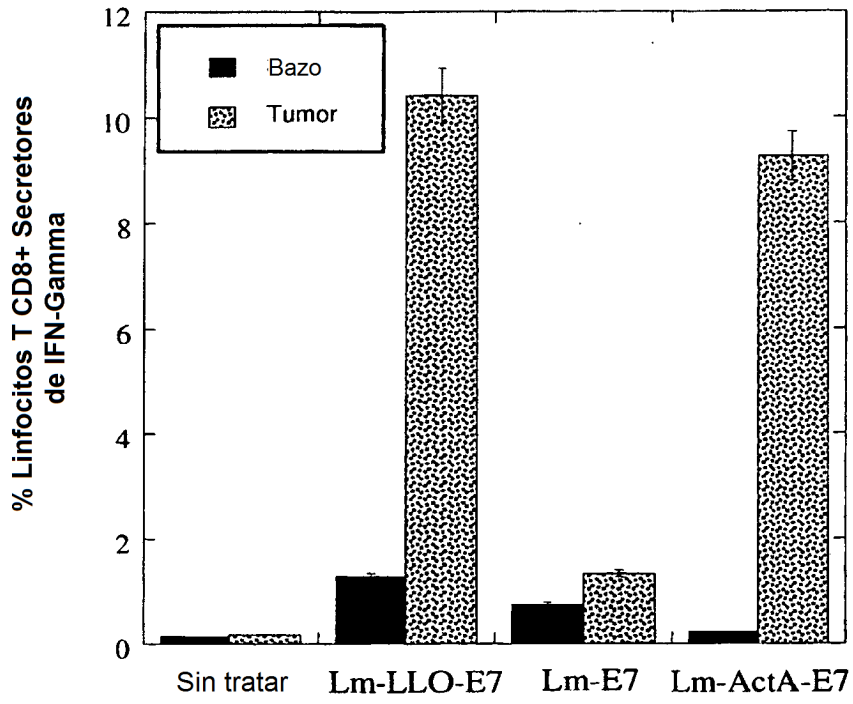


FIGURA 10A

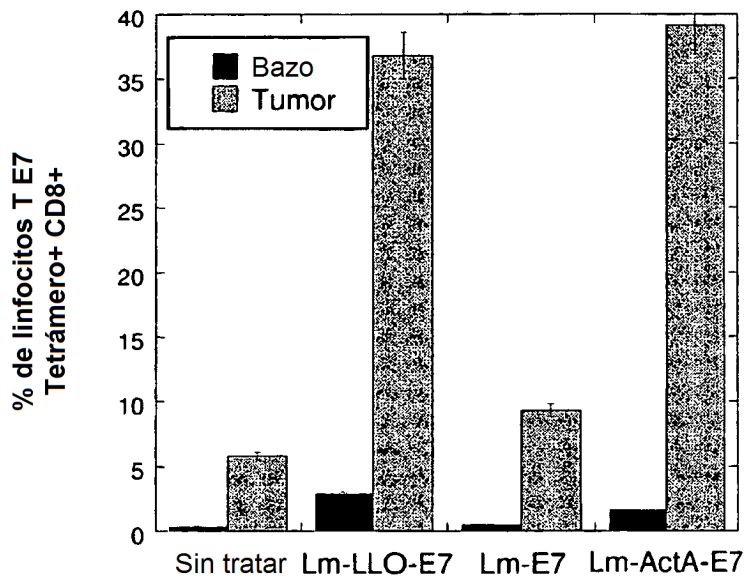


FIGURA 10B

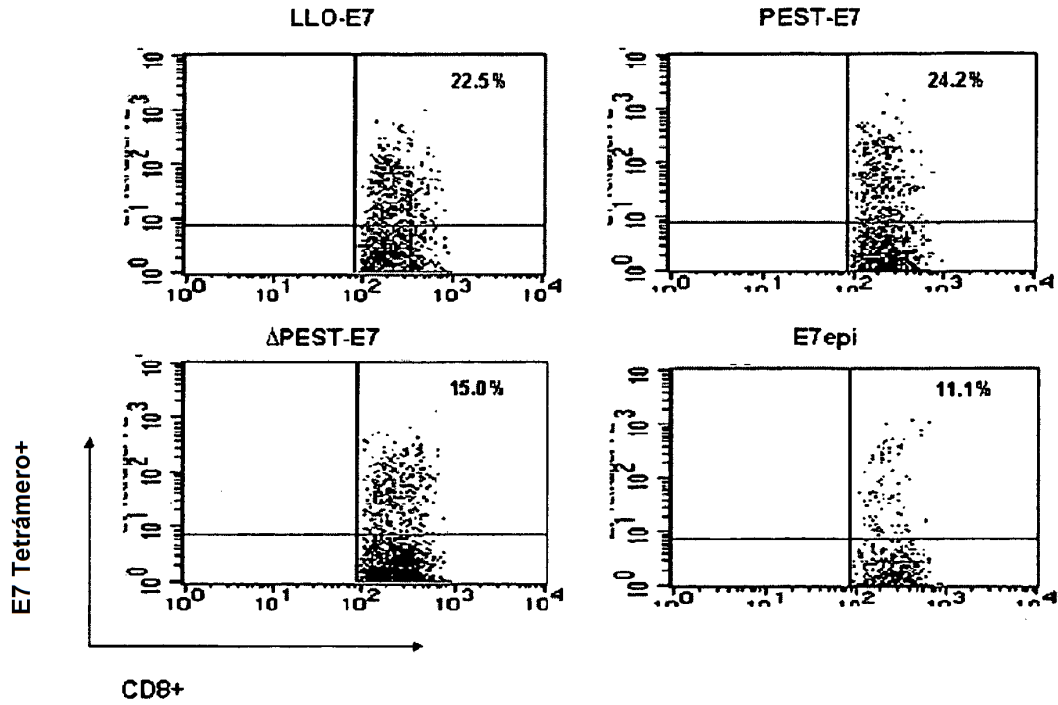


FIGURA 11A

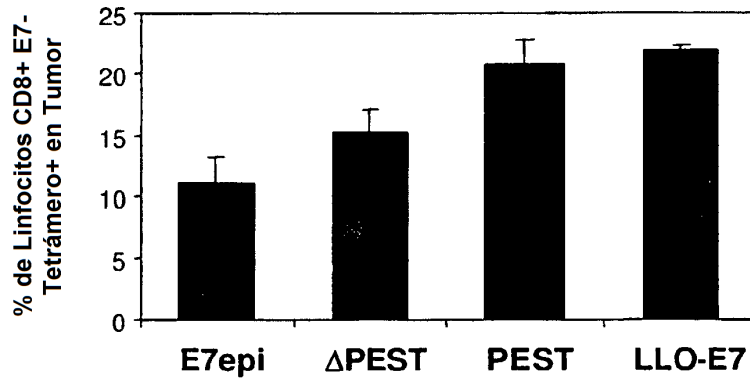


FIGURA 11B

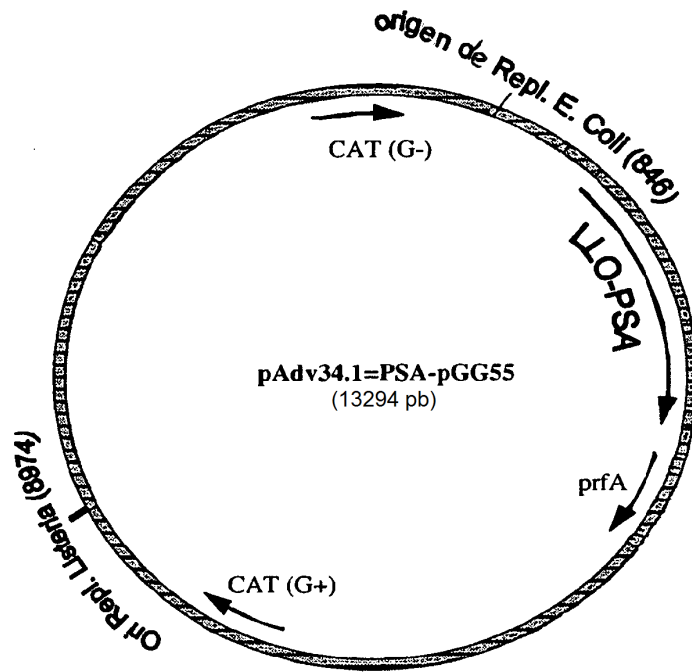


FIGURA 12

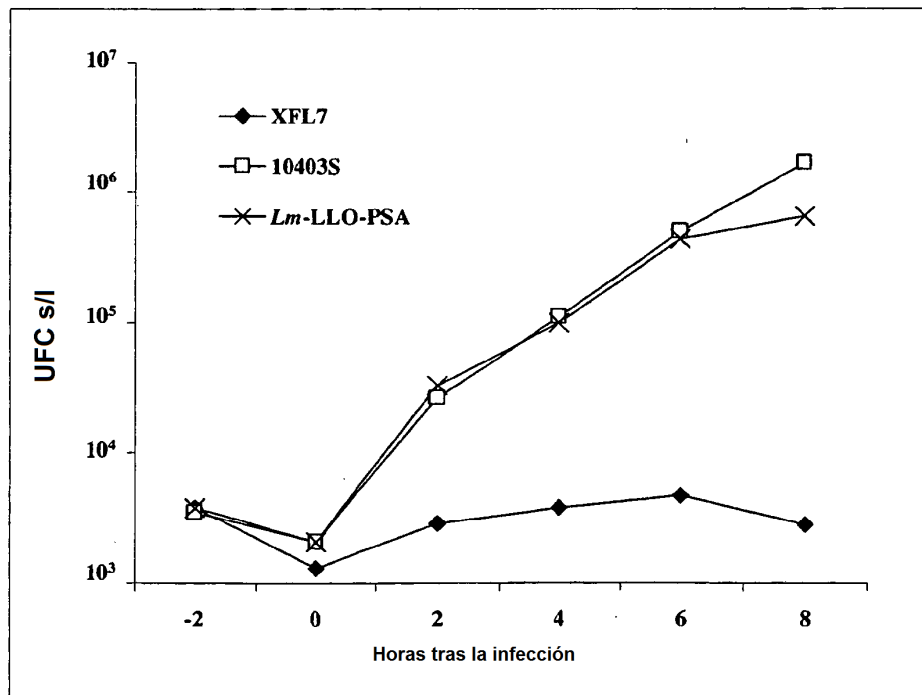
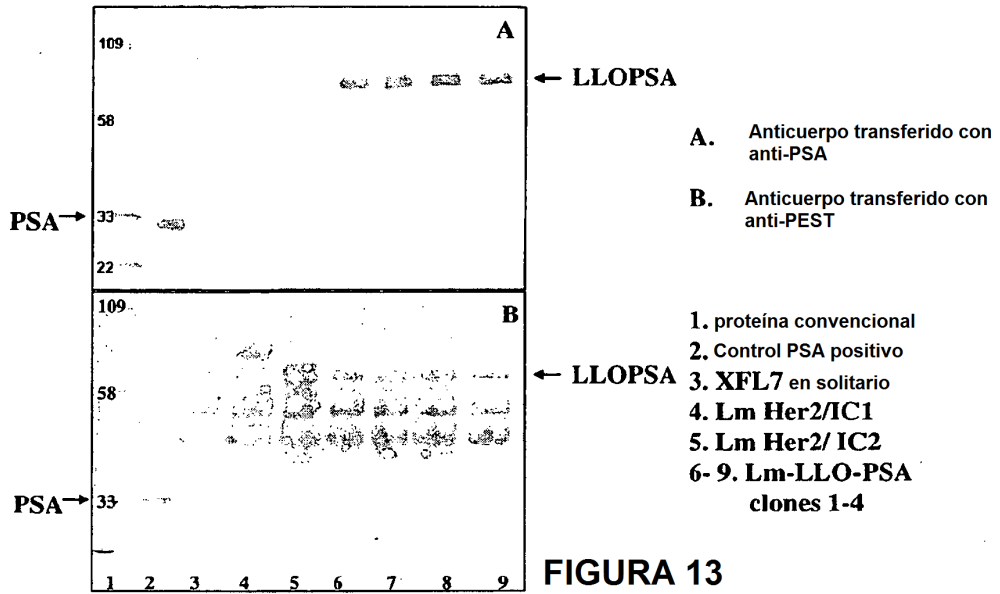


FIGURA 14

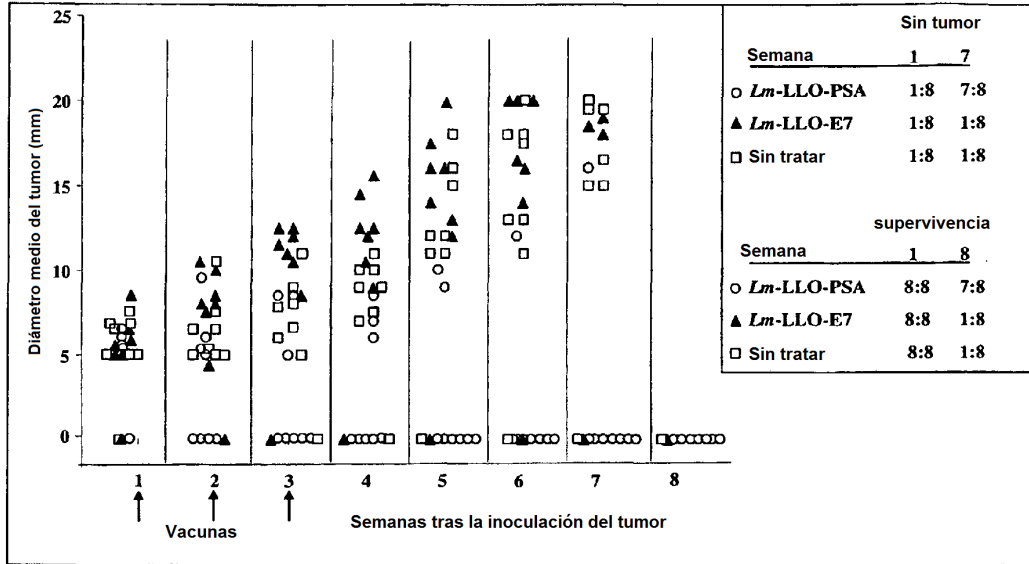


FIGURA 15

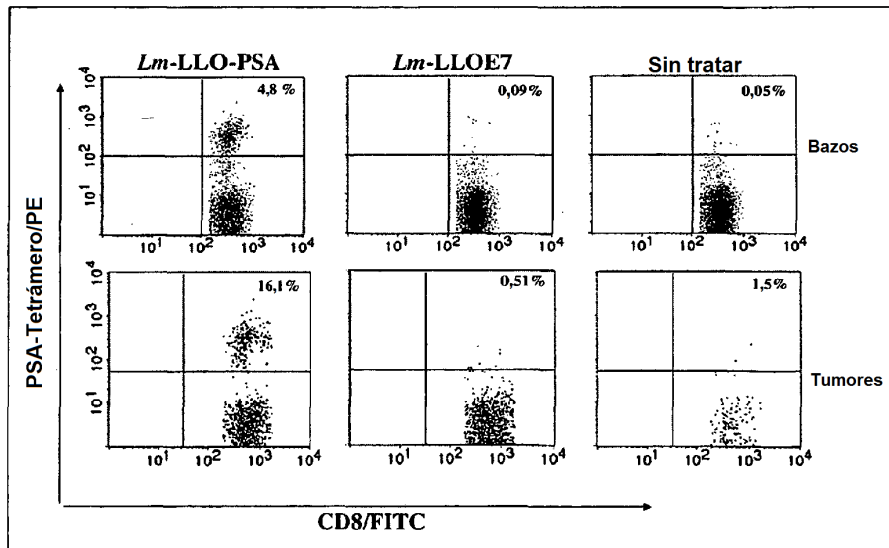


FIGURA 16

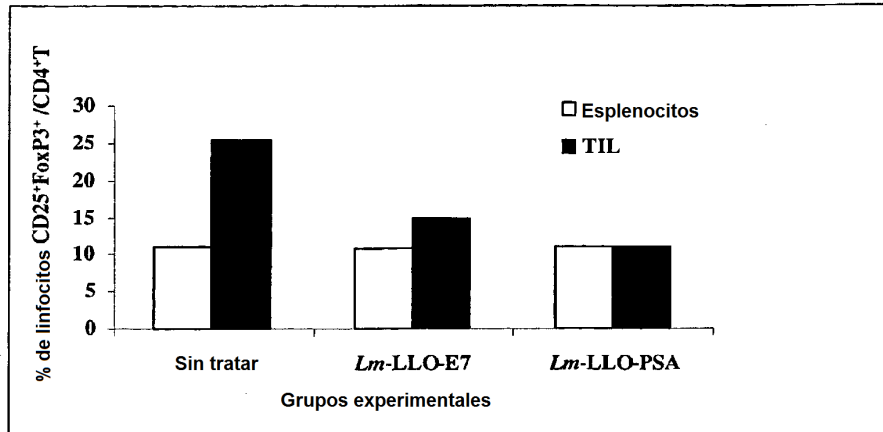


FIGURA 17

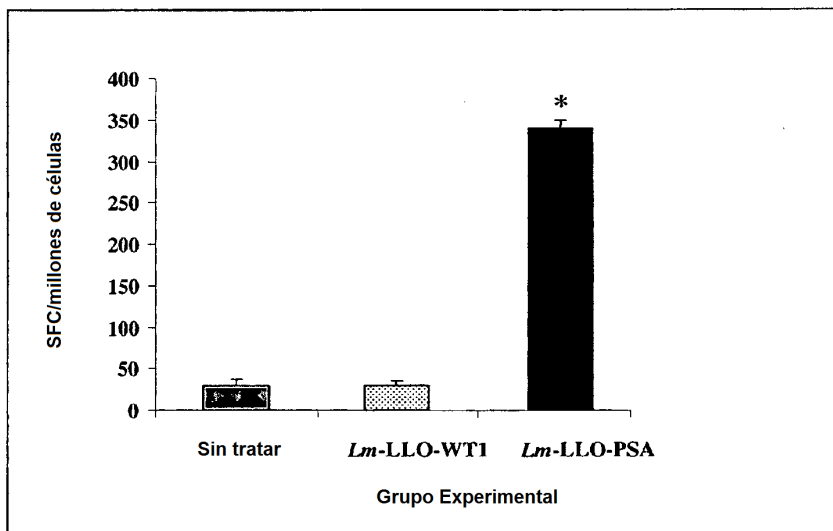


FIGURA 18

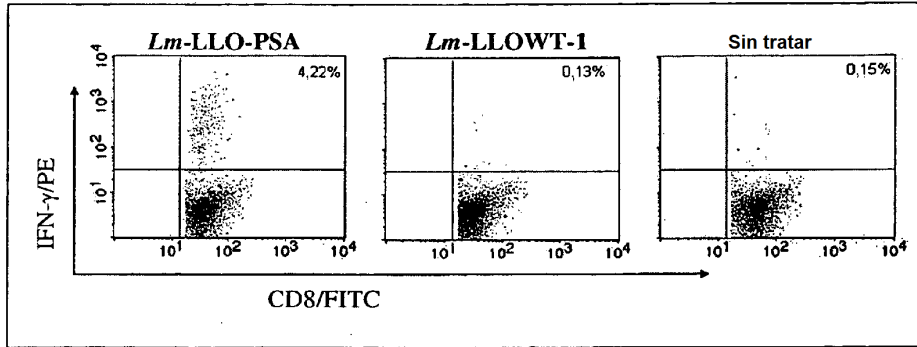
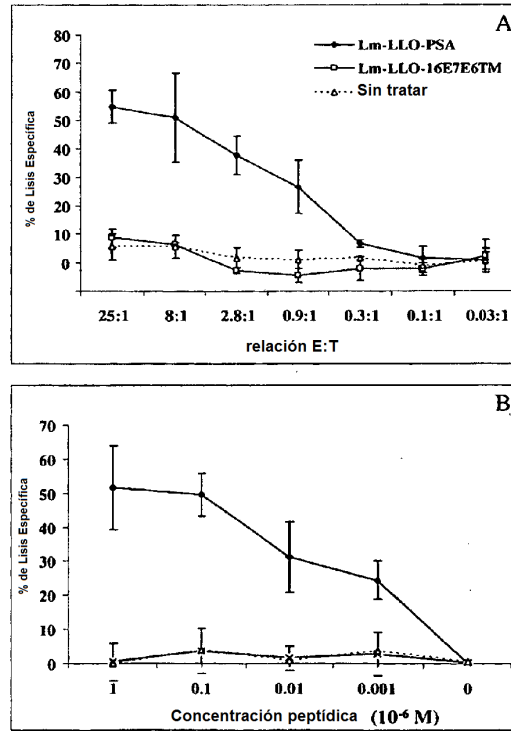


FIGURA 19

FIGURA 20



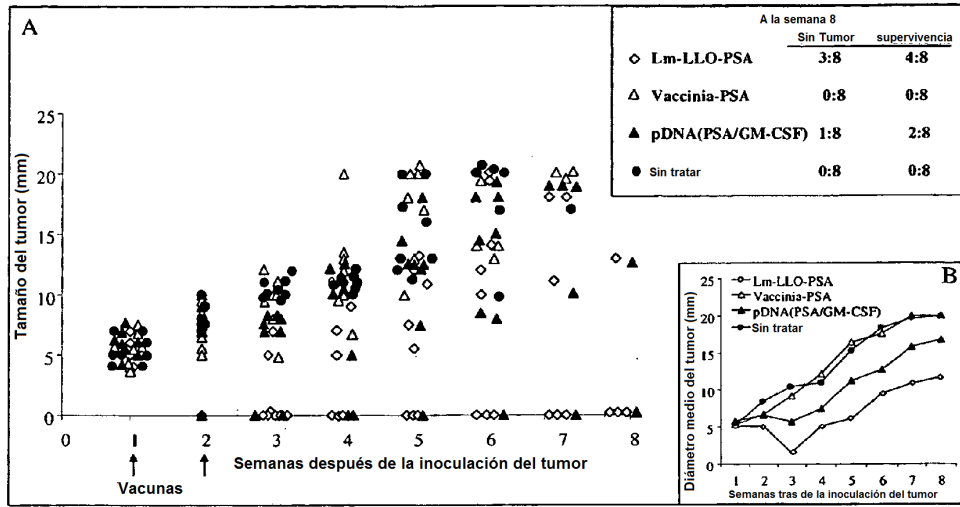


FIGURA 21

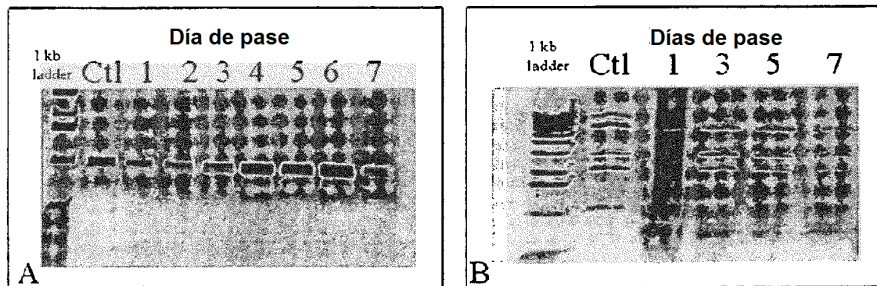


FIGURA 22