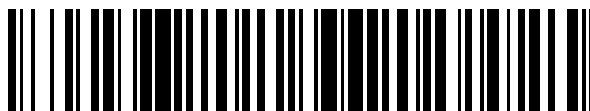


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 532 942**

51 Int. Cl.:

A61K 39/02 (2006.01)

C12N 15/74 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.03.2007** **E 07752174 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.12.2014** **EP 1991263**

54 Título: **Listeria obtenida por ingeniería genética y métodos de uso de la misma**

30 Prioridad:

01.03.2006 US 778471 P

21.03.2006 US 784576 P

30.03.2006 US 396216

30.03.2006 US 395197

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
06.04.2015

73 Titular/es:

ADURO BIOTECH (100.0%)
626 BANKCROFT WAY, SUITE 3C
BERKELEY, CALIFORNIA 94710-2225, US

72 Inventor/es:

DUBENSKY, THOMAS W., JR.;
SKOBLE, JUSTIN;
LAUER, PETER M. y
COOK, DAVID N.

74 Agente/Representante:

CUETO PRIEDE, Sénida Remedios

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 532 942 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

Listeria obtenida por ingeniería genética y métodos de uso de la misma

DECLARACIÓN CON RESPECTO A LA INVESTIGACIÓN O DESARROLLO FEDERALMENTE PATROCINADOS

- 5 Esta invención se hizo, en parte, con apoyo del gobierno de los Estados Unidos bajo el Instituto Nacional de Cáncer NHI 1 K23CA 104160-01. El gobierno puede tener ciertos derechos sobre la invención.

CAMPO DE LA INVENCION

- 10 La invención proporciona bacterias *Listeria* diseñadas, útiles para estimular el sistema inmune y tratar cánceres e infecciones. También se proporcionan polinucleótidos, socios de proteínas de fusión, y vectores de integración útiles para modificar la *Listeria* y otras especies bacterianas.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

- 15 Los cánceres y las infecciones pueden ser tratados al administrar reactivos que modulan el sistema inmune. Estos reactivos incluyen vacunas, citosinas, anticuerpos, y moléculas pequeñas, tales como oligodesoxinucleótidos CpG e imidazoquinolinas (véase, e.g., Becker (2005) Virus Genes 30:251-266; Schetter y Vollmer (2004) Curr. Opin: Drug Devel. 7:204-210; Majewski, *et al.* (2005) Int. J. Dermatol. 44:14-19), Hofmann, *et al.* (2005) J. Clin. Virol. 32:86-91; Huber, *et al.* (2005) Infection 33:25-29; Carter (2001) Nature Revs. Cancer 1:118-129; Dechant y Valaerius (2001) Crit. Revs. Oncol. 39:69-77; O'Connor, *et al.* (2004) Neurology 62:2038-2043). Las vacunas, incluyendo las vacunas clásicas (organismos completos inactivados, extractos, o antígenos), vacunas de célula dendrítica (DC), y vacunas basadas en ácido nucleico, también son útiles para tratar los cánceres y las infecciones (véase, e.g., Robinson y Amara (2005) Nat. Med. Suppl. 11:S25-S32; Plotkin (2005) Nat. Med. Suppl. 11:S5-S11; Pashine, *et al.* (2005) Nat. Med. Suppl. 11:S63-S68; Larche y Wraith (2005) Nat. Med. Suppl. 11:S69-S76). Otro reactivo útil para modular el sistema inmune es *Listeria monocytogenes* (*L. monocytogenes*), y este reactivo ha probado ser útil en el tratamiento de cánceres y tumores (véase, e.g., Brockstedt, *et al.* (2004) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101:13832-13837; Brockstedt, *et al.* (2005) Nat. Med. 11:853-860; Starks, *et al.* (2004) J. Immunol. 173:420-427; Shen, *et al.* (1995) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:3987-3991).

- 20 Las cepas *Listeria* recombinantes se han desarrollado como vacunas contra los virus y tumores (véase, e.g. Starks, *et al.* (2004) J. Immunol. 173:420-427; Gunn, *et al.* (2001) J. Immunol. 167:6471-6479; Ikonomidis, *et al.* (1994) J. Exp. Med. 180:2209-2218; Mata, *et al.* (2001) Vaccine 19:1435-1445; Mata y Paterson (1999) J. Immunol. 163:1449-1456; Mata, *et al.* (1998) J. Immunol. 161:2985-2993; Friedman, *et al.* (2000) J. Virol. 74:9987-9993; Soussi, *et al.* (2002) Vaccine 20:2702-2712; Saklani-Jusforgues, *et al.* (2003) Infect. Immun. 71:1083-1090; Soussi, *et al.* (2000) Infect. Immunity 68:1498-1506; Tvinnereim, *et al.* (2002) Infect. Immunity 70:153-162; Rayevskaya, *et al.* (2002) J. Virol. 76:918-922; Frankel, *et al.* (1995) J. Immunol. 55:4775-4782; Jensen, *et al.* (1997) J. Virol. 71:8467-8474; Jensen, *et al.* (1997) Immunol. Rev. 158:147-157; Lin, *et al.* (2002) Int. J. Cancer 102:629-637; Peters, *et al.* (2003) FEMS Immunol. Med. Microbiol. 35:243-253; Peters, *et al.* (2003) J. Immunol. 170:5176-5187; Paterson (2003) Immunol. Res. 27:451-462; Paterson y Johnson (2004) Expert Rev. Vaccines 3:S119-S134; Ochsenbein, *et al.* (1999) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96:9293-9298; Hess, *et al.* (2000) Adv. Immunol. 75:1-88).

- 30 La *L. monocytogenes* tiene un tropismo natural para el hígado y bazo y, en cierto grado, otros tejidos tales como los intestinos delgados (véase, e.g., Dussurget, *et al.* (2004) Ann. Rev. Microbiol. 58:587-610; Gouin, *et al.* (2005) Curr. Opin. Microbiol. 8:35-45; Cossart (2002) Int. J. Med. Microbiol. 291:401-409; Vazquez-Boland, *et al.* (2001) Clin. Microbiol. Rev. 14:584-640; Schluter, *et al.* (1999) Immunobiol. 201:188-195). Cuando la bacteria reside en los intestinos, el paso al flujo sanguíneo se media por las proteínas listeriales, tales como ActA e internalina A (véase, e.g., Manohar, *et al.* (2001) Infection Immunity 69:3542-3549; Lecuit, *et al.* (2004) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101:6152-6157; Lecuit y Cossart (2002) Trends Mol. Med. 8:537-542). Una vez que la bacteria entra a una célula huésped, el ciclo de vida de *L. monocytogenes* incluye el escape desde el fagolisosoma y hacia el citosol. Este ciclo de vida contrasta con el de *Mycobacterium*, que permanece dentro del fagolisosoma (véase, e.g., Clemens, *et al.* (2002) Infection Immunity 70:5800-5807; Schluter, *et al.* (1998) Infect. Immunity 66:5930-5938; Gutierrez, *et al.* (2004) Cell 119:753-766). El escape de *L. monocytogenes* del fagolisosoma se media por las proteínas listeriales, tales como listeriolisina (LLO), PI-PLC, y PC-PLC (véase Portnoy, *et al.* (2002) J. Cell Biol. 158:409-414). WO 2004/110481 y WO 2005/071088 se refieren a las vacunas contra el cáncer en base a las cepas de *Listeria* atenuadas.

- 50 Las vacunas para tratar los cánceres o las infecciones frecuentemente son ineficaces debido a la falta de reactivos adecuados. La presente invención cumple esta necesidad al proporcionar polinucleótidos, socios de proteína

de fusión, plásmidos y vacunas bacterianas, útiles para mejorar la expresión o procesamiento inmune de antígenos, y para incrementar la supervivencia a los cánceres e infecciones.

SUMARIO DE LA INVENCIÓN

5 La presente invención se basa, en parte, en el reconocimiento de que la administración de *Listeria* atenuada a un mamífero que tiene un tumor da como resultado la supervivencia mejorada, en donde la *Listeria* se diseña para contener un ácido nucleico que codifica una proteína de fusión basada en ActA unida a un antígeno tumoral.

La presente invención de esta manera proporciona un polinucleótido que comprende: (a) un promotor; y (b) un ácido nucleico unido operativamente al promotor, en donde el ácido nucleico codifica una proteína de fusión que comprende: (i) un ActA modificado que comprende al menos los primeros 59 residuos aminoácidos de SEQ ID NO: 38 o SEQ ID NO: 152; y (ii) un antígeno heterólogo. La invención además se define por las reivindicaciones acompañantes. En algunas modalidades, el promotor es un promotor bacteriano (e.g., un promotor *Listerial*). En algunas modalidades, el promotor es un promotor ActA. El ActA modificado comprende más de los primeros 59 aminoácidos de ActA, y menos de los primeros 380 aminoácidos de ActA. Por ejemplo, en algunas modalidades, el ActA modificado comprende al menos aproximadamente los primeros 59 aminoácidos de ActA, pero menos de aproximadamente los primeros 265 aminoácidos de ActA. En algunas modalidades, el ActA modificado comprende más de los primeros 59 aminoácidos de ActA, pero menos de aproximadamente los primeros 265 aminoácidos de ActA. En otras modalidades, el ActA modificado comprende más de los primeros 59 aminoácidos de ActA, y menos de los primeros 380 aminoácidos de ActA. En las modalidades todavía adicionales, el ActA modificado comprende al menos los primeros 85 aminoácidos de ActA y menos de los primeros 125 aminoácidos de ActA. En algunas modalidades, el ActA modificado comprende los aminoácidos 1-100 de ActA. En algunas modalidades, el ActA modificado consiste de aminoácidos 1-100 de ActA. El antígeno heterólogo puede ser no-*Listerial*. En algunas modalidades, el antígeno heterólogo es de, o se deriva de, una célula cancerígena, tumor, o agente infeccioso. En algunas modalidades, el antígeno heterólogo es inmunológicamente de reactividad cruzada con, o comparte al menos un epítopo con, el cáncer, tumor, o agente infeccioso. En algunas modalidades, el antígeno heterólogo es un antígeno tumoral o se deriva de un antígeno tumoral. En algunas modalidades, el antígeno heterólogo es, o se deriva de, mesotelina. Por ejemplo, en algunas modalidades, el antígeno heterólogo es, o se deriva de, mesotelina humana. En algunas modalidades, la *Listeria* es hMeso26 o hMeso38 (véase Tabla 11 del Ejemplo VII, de abajo). En algunas modalidades, el antígeno heterólogo no comprende un péptido antigénico EphA2. En algunas modalidades, la secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína de fusión se optimiza por codón para la expresión en *Listeria*. La invención proporciona plásmidos y células que comprenden el polinucleótido. La invención además proporciona una bacteria *Listeria* (e.g., *Listeria monocytogenes*) que comprende el polinucleótido, así como las vacunas que comprenden la *Listeria*. La bacteria *Listeria* puede atenuarse (e.g., un mutante de supresión actA o un mutante de inserción actA). En ciertas modalidades, la bacteria puede comprender una mutación en atenuación en *actA* y/o en *inlB*. En algunas modalidades, la *Listeria* comprende el polinucleótido en su genoma. En algunas modalidades, el polinucleótido se ha integrado en un gen de virulencia en el genoma *Listerial*. En algunas modalidades, un polinucleótido (o ácido nucleico) se ha integrado en un gen de virulencia en el genoma de la *Listeria*, en donde la integración del polinucleótido (a) interrumpe la expresión del gen de virulencia y/o (b) interrumpe una secuencia codificadora del gen de virulencia. En algunas modalidades, el gen de virulencia es dependiente de prfA. En otras modalidades, el gen de virulencia es independiente de prfA. En algunas modalidades, el ácido nucleico o el polinucleótido se ha integrado en el genoma de la *Listeria* en el sitio *actA* y/o sitio *inlB*. En algunas modalidades, la *Listeria* comprende un plásmido que comprende el polinucleótido. La invención además proporciona composiciones farmacéuticas e inmunogénicas que comprenden la *Listeria*, y su uso en los métodos para estimular las respuestas inmunes al antígeno heterólogo en un mamífero (e.g., un humano), que comprenden administrar una cantidad eficaz de la *Listeria* (o una cantidad eficaz de una composición que comprende la *Listeria*) al mamífero. Por ejemplo, la invención también se refiere a los métodos para estimular las respuestas inmunes al antígeno de, o derivado de, un agente infeccioso o cancerígeno, que comprenden administrar una cantidad eficaz de la *Listeria* (o una composición que comprende la *Listeria*) a un mamífero que tiene el agente infeccioso o cancerígeno, en donde el antígeno heterólogo comparte al menos un epítopo con o es inmunológicamente de reactividad cruzada con el antígeno de, o derivado de, agente infeccioso o cancerígeno. En algunas modalidades, la inclusión de la secuencia de ActA modificado en la proteína de fusión mejora la inmunogenicidad de la *Listeria* que comprende el polinucleótido (e.g., en relación a la inmunogenicidad de *Listeria* que comprende un polinucleótido que codifica una proteína de fusión que comprende el antígeno heterólogo y una secuencia líder y/ secuencia de señal de no ActA, en lugar del ActA modificado). En algunas modalidades, la inclusión de la secuencia de ActA modificado en la proteína de fusión mejora la expresión y/o secreción del antígeno heterólogo en *Listeria* (e.g., en relación a la expresión y/o secreción en *Listeria* del antígeno heterólogo fusionado a una secuencia líder y/o secuencia de señal de no ActA en lugar de ActA modificado).

En otro aspecto, la invención proporciona un polinucleótido que comprende un primer ácido nucleico que codifica un ActA modificado (e.g., actA-N-100), unido operativamente y en estructura con, un segundo ácido nucleico que codifica un antígeno heterólogo. En algunas modalidades, el ActA modificado comprende al menos los primeros 59 aminoácidos de ActA, pero menos de aproximadamente los primeros 265 aminoácidos de ActA. En algunas modalidades, el ActA modificado comprende más de los primeros 59 aminoácidos de ActA, pero menos de aproximadamente los primeros 265 aminoácidos de ActA. En algunas modalidades, el primer ácido nucleico codifica los aminoácidos 1-100 de ActA. En algunas modalidades, el polinucleótido es genómico. Por ejemplo, el polinucleótido puede ser integrado en el gen *actA* o *inlB*. En algunas modalidades alternativas, el polinucleótido se basa en plásmido. En algunas modalidades, el polinucleótido se une operativamente con uno o más de los siguientes:

(a) un promotor actA; o (b) un promotor bacteriano que es un promotor no actA. En algunas modalidades, el antígeno heterólogo es, o se deriva de, una célula cancerígena, tumor, o agente infeccioso. En algunas modalidades, el antígeno heterólogo es inmunológicamente de reactividad cruzada con, o comparte al menos un epítipo con, el cáncer, tumor, o agente infeccioso. En algunas modalidades, el antígeno heterólogo es, o se deriva de, mesotelina (e.g., mesotelina humana). La invención además proporciona una bacteria *Listeria* e.g., *Listeria monocytogenes*) que comprende el polinucleótido, así como las vacunas que comprenden la *Listeria*. En algunas modalidades, la *Listeria* es hMeso26 o hMeso38 (véase Tabla 11 del Ejemplo VII, de abajo). La invención también se refiere a los métodos para estimular las respuestas inmunes a un antígeno de, o derivado de, un agente cancerígeno (e.g., una célula pre-cancerígena o tumoral) o infeccioso (e.g., un virus, bacteria patógena, u organismo parasitario), que comprende administrar la *Listeria* a un mamífero que tiene el agente infeccioso o cancerígeno, en donde el antígeno heterólogo comparte al menos un epítipo o es inmunológicamente de reactividad cruzada con el antígeno de, o derivado de, agente infeccioso o cancerígeno. En algunas modalidades de los métodos, la estimulación es en relación a la respuesta inmune sin administrar la *Listeria*. En algunas modalidades de los métodos, el antígeno heterólogo es de, o se deriva de, la célula cancerígena, tumor, o agente infeccioso.

En otro aspecto, la invención proporciona un polinucleótido que comprende un primer ácido nucleico que codifica un actA modificado, en donde el actA modificado comprende (a) aminoácidos 1-59 de actA, (b) una mutación en inactivación en, supresión de, o truncación previo a, al menos un dominio para la regulación mediada por actA del citoesqueleto de célula huésped, en donde el primer ácido nucleico se une operativamente y en estructura con un segundo ácido nucleico que codifica un antígeno heterólogo. En algunas modalidades, el ActA modificado comprende más de los primeros 59 aminoácidos de ActA. En algunas modalidades, el dominio es la región de homología de cofilina (KKRR (SEQ ID NO:23)). En algunas modalidades, el dominio es el dominio de unión de núcleo de fosfolípido (KVFKKIKDAGKWVRDKI (SEQ ID NO:20)). En algunas modalidades, el al menos un dominio comprende todos los cuatro dominios ricos en prolina (FPPPP (SEQ ID NO:21), FPPPP (SEQ ID NO:21), FPPPP (SEQ ID NO:21), FPPIP (SEQ ID NO:22)) de ActA. En algunas modalidades, el actA modificado es actA-N100. En algunas modalidades, el polinucleótido es genómico. En algunas modalidades, el polinucleótido es no genómico. En algunas modalidades, el polinucleótido se une operativamente con uno o más de los siguientes: (a) un promotor actA; o (b) un promotor bacteriano (e.g., listerial) que es un promotor no actA. La invención además proporciona una bacteria *Listeria* (e.g., *Listeria monocytogenes*) que comprende el polinucleótido, así como las vacunas que comprenden la *Listeria*. En algunas modalidades, la *Listeria* comprende una mutación en atenuación en *actA* y/o *inlB*. En algunas modalidades, la *Listeria* es hMeso26 o hMeso38 (véase Tabla 11 del Ejemplo VII, de abajo). La invención también proporciona estas *Listerias* para su uso en los métodos para estimular las respuestas inmunes a un antígeno de, o derivado de, un agente infeccioso o cancerígeno, que comprende administrar la *Listeria* a un mamífero que tiene el agente infeccioso o cancerígeno, en donde el antígeno heterólogo comparte al menos un epítipo con o es inmunológicamente de reactividad cruzada con el antígeno de, o derivado de, agente infeccioso o cancerígeno. En algunas modalidades, la estimulación es en relación a la respuesta inmune sin administrar la *Listeria*. En algunas modalidades, el cáncer comprende un tumor o célula pre-cancerígena. En algunas modalidades, el agente infeccioso comprende un virus, bacteria patógena, u organismo parasitario. En algunas modalidades, el antígeno heterólogo es, o se deriva de, una célula cancerígena, tumor, o agente infeccioso. En algunas modalidades, el antígeno heterólogo es inmunológicamente de reactividad cruzada con, o comparte al menos un epítipo con, el cáncer, tumor, o agente infeccioso. En algunas modalidades, el antígeno heterólogo es, o se deriva de, mesotelina. Por ejemplo, en algunas modalidades, el antígeno heterólogo es, o se deriva de, mesotelina humana. En algunas modalidades, la inclusión de la secuencia de ActA modificado en el polinucleótido mejora la expresión y/o secreción del antígeno heterólogo en *Listeria*. En algunas modalidades, la inclusión de la secuencia de ActA modificado en el polinucleótido mejora la

En todavía otro aspecto, esta descripción proporciona un plásmido que comprende un primer ácido nucleico que codifica una integrasa fago, un segundo ácido nucleico que codifica un sitio de unión de fago (sitio attPP'), y un tercer ácido nucleico que codifica un antígeno heterólogo o ácido nucleico regulador, en donde el plásmido es útil para mediar la integración específica por sitio del ácido nucleico que codifica el antígeno heterólogo en un sitio de unión

bacteriana (sitio attBB') en un genoma bacteriano que es compatible con el sitio attPP' del plásmido. En algunas modalidades, cada uno de los ácidos nucleicos es derivable de *L. innocua* 0071, cada uno de los ácidos nucleicos es derivable de *L. innocua* 1765, cada uno de los ácidos nucleicos es derivable de *L. innocua* 2601, o cada uno de los ácidos nucleicos es derivable de *L. monocytogenes* f6854_2703. En algunas modalidades, el primer ácido nucleico codifica una integrasa phiC31. En algunas modalidades, el plásmido es la secuencia de polinucleótidos de pINT; o un polinucleótido hibridizable bajo condiciones rigurosas a un polinucleótido que codifica pINT, en donde el polinucleótido que es hibridizable es capaz de mediar la integración específica de sitio en el mismo sitio de unión bacteriana (attBB') en un genoma bacteriano como aquel utilizado por pINT. En algunas modalidades, el genoma bacteriano es de una *Listeria*, *Bacillus anthracis*, o *Francisella tularensis*. En algunas modalidades, el antígeno heterólogo es, o se deriva de, una célula cancerígena, tumor, o agente infeccioso. En algunas modalidades, el ácido nucleico regulador es un sitio de unión bacteriana (attBB'). En algunas modalidades, el plásmido además comprende un cuarto ácido nucleico que codifica un primer sitio lox, un quinto ácido nucleico que codifica un segundo sitio lox, y un sexto ácido nucleico que codifica un marcador de selección, en donde el primer sitio lox y el segundo sitio lox se unen operativamente con el sexto ácido nucleico, y en donde los sitios lox operativamente unidos son útiles para mediar la excisión catalizada por recombinasa Cre del sexto ácido nucleico. En algunas modalidades, el primer sitio lox es un sitio loxP y el segundo sitio lox es un sitio loxP. En algunas modalidades, el plásmido además comprende un sitio de unión bacteriana no compatible (attBB'), en donde el sitio attBB' no compatible no es compatible con el sitio de unión de fago (attPP'). En algunas modalidades, el plásmido además comprende un primer promotor operativamente unido con el primer ácido nucleico, y un segundo promotor operativamente unido con el tercer ácido nucleico. Esta descripción además proporciona un método para modificar un genoma bacteriano, que comprende transfectar la bacteria con el plásmido, y permitir la integración catalizada por integrasa del tercer ácido nucleico en el genoma bacteriano bajo condiciones adecuadas para la integración. En algunas modalidades del método, la bacteria es *Listeria*, *Bacillus anthracis*, o *Francisella tularensis*.

Esta descripción además proporciona un plásmido que comprende: (a) un primer ácido nucleico que codifica una primera región de homología a un genoma bacteriano, (b) un segundo ácido nucleico que codifica una segunda región de homología al genoma bacteriana, y (c) un tercer ácido nucleico que comprende un sitio de unión bacteriana (attBB'), en donde el tercer ácido nucleico se flanquea por los ácidos nucleicos, primero y segundo, en donde el primer ácido nucleico y el segundo ácido nucleico se unen operativamente entre sí y son capaces de mediar la integración homóloga del tercer ácido nucleico en el genoma bacteriano. En algunas modalidades, el sitio de unión bacteriana (attBB') comprende el attBB' de: tARN Arg-attBB' listerial; comK attBB' listerial; *Listeria innocua* 0071; *Listeria innocua* 1231; *Listeria innocua* 1765; *Listeria innocua* 2610; o *Listeria monocytogenes* f6854_2703; o phiC31. En algunas modalidades, el genoma es de un *Listeria*, *Bacillus anthracis*, o *Francisella tularensis*. En algunas modalidades, el tercer ácido nucleico codifica un marcador de selección flanqueado por un primer sitio lox y un segundo sitio lox, en donde los sitios lox se reconocen como sustratos por recombinasa Cre y permiten la excisión catalizada por recombinasa Cre del tercer ácido nucleico, y en donde el marcador de selección es útil para detectar la integración del tercer ácido nucleico en el genoma bacteriano. En algunas modalidades, el primer sitio lox es un sitio loxP, y el segundo sitio lox es un sitio loxP. En algunas modalidades, el tercer ácido nucleico comprende un gen de resistencia antibiótica. En algunas modalidades, el primer ácido nucleico es homólogo a una primera región de un gen de factor de virulencia y el segundo ácido nucleico es homólogo a una segunda región del gen de factor de virulencia, en donde las regiones, primera y segunda, del gen de factor de virulencia son distintas entre sí y no se superponen entre sí. En algunas modalidades, la primera región del gen de factor de virulencia colinda o contacta de manera covalente la segunda región del gen de factor de virulencia. En otras modalidades, la primera región del gen de factor de virulencia no se encuentra en contacto covalente con, y no colinda de manera covalente, la segunda región del gen de factor de virulencia. Esta descripción además proporciona la bacteria modificada por la integración del plásmido. En algunas modalidades, la integración se encuentra en una región del genoma que es necesaria para mediar el crecimiento o dispersión. En otras modalidades, la integración se encuentra en una región del genoma que no es necesaria para mediar el crecimiento o dispersión.

Todavía en otro aspecto, esta descripción proporciona una bacteria en donde el genoma comprende un polinucleótido que contiene dos sitios de unión de recombinasa heteróloga operativamente unidos que flanquean un primer ácido nucleico, en donde los dos sitios son: (a) dos sitios lox; o (b) dos sitios Frt, y en donde el ácido nucleico flanqueado por los dos sitios lox es extraíble por la recombinasa Cre, y en donde el ácido nucleico flanqueado por los dos sitios Frt es extraíble por la recombinasa FLP. En algunas modalidades, los dos sitios lox son ambos sitios loxP. En algunas modalidades, el primer ácido nucleico codifica un marcador de selección o un antígeno heterólogo. En algunas modalidades, el primer ácido nucleico codifica un gen de resistencia antibiótica. En algunas modalidades, la bacteria es *Listeria*, *Bacillus anthracis*, o *Francisella tularensis*. En algunas modalidades, el polinucleótido además comprende un segundo ácido nucleico, en donde el segundo ácido nucleico no se flanquea por, y no se une

operativamente con, el primer y segundo sitio de unión de recombinasa heteróloga. En algunas modalidades, el segundo ácido nucleico codifica uno o ambos de: antígeno heterólogo; o un sitio de unión bacteriana (attBB'). En algunas modalidades, el antígeno heterólogo es, o se deriva de, una célula cancerígena, tumor, o agente infeccioso. Esta descripción además proporciona un método para extraer el primer ácido nucleico del genoma bacteriano, que comprende contactar el genoma con recombinasa Cre o recombinasa FLP, y permitir que la recombinasa catalice la excisión del primer ácido nucleico, bajo condiciones que permiten o facilitan la excisión: (a) en donde el primer ácido nucleico se flanquea por los sitios lox y la recombinasa es recombinasa Cre; o (b) en donde el primer ácido nucleico se flanquea por sitios Frt y la recombinasa es recombinasa FLP. En algunas modalidades, la recombinasa se expresa transitoriamente en la bacteria.

En otro aspecto, esta descripción proporciona *Listeria* (e.g., *Listeria monocytogenes*) en la cual el genoma comprende un polinucleótido que comprende un ácido nucleico que codifica un antígeno heterólogo. En algunas modalidades, el ácido nucleico que codifica el antígeno heterólogo se ha integrado en el genoma mediante recombinación específica por sitio o recombinación heteróloga. En algunas modalidades, el sitio de integración en el genoma es el sitio tARN^{Arg}. En algunas modalidades, la presencia del ácido nucleico en el genoma atenúa la *Listeria*. En algunas modalidades, el ácido nucleico que codifica el antígeno heterólogo se ha integrado en el sitio de un gen de virulencia. En algunas modalidades, el ácido nucleico que codifica el antígeno heterólogo se ha integrado en el sitio *actA*. En algunas modalidades, el ácido nucleico que codifica el antígeno heterólogo se ha integrado en el sitio *inlB*. En algunas modalidades, el genoma de la *Listeria* comprende un primer ácido nucleico que codifica un antígeno heterólogo que se ha integrado en un primer sitio (e.g., el sitio *actA*) y un segundo ácido nucleico que codifica un segundo antígeno heterólogo que se ha integrado en un segundo sitio (e.g., el sitio *inlB*). Los antígenos heterólogos, primero y segundo, pueden ser idénticos entre sí o diferentes. En algunas modalidades, los antígenos heterólogos, primero y segundo, difieren entre sí, pero se derivan del mismo antígeno tumoral o antígeno de agente infeccioso. En algunas modalidades, los antígenos heterólogos, primero y segundo, son cada uno un fragmento diferente de un antígeno derivado de una célula cancerígena, tumor, o agente infeccioso. En algunas modalidades, el ácido nucleico integrado codifica una proteína de fusión que comprende un ActA modificado y el antígeno heterólogo. En algunas modalidades, al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco, al menos seis, o al menos siete secuencias de ácido nucleico que codifican los antígenos heterólogos se han integrado en el genoma *Listeria*.

En otro aspecto, esta descripción proporciona una bacteria *Listeria* que comprende un genoma, en donde el genoma comprende un polinucleótido que comprende un ácido nucleico que codifica un antígeno heterólogo, en donde el ácido nucleico se ha integrado en un gen de virulencia en el genoma. En algunas modalidades, la *Listeria* se atenúa por la interrupción de la expresión del gen de virulencia o la interrupción de una secuencia codificadora del gen de virulencia. En algunas modalidades, la integración del polinucleótido interrumpe la expresión del gen de virulencia o interrumpe una secuencia codificadora del gen de virulencia. En algunas modalidades, todo o parte del gen de virulencia se ha suprimido. En algunas modalidades, nada del gen de virulencia se ha suprimido. En algunas modalidades, la integración atenúa la *Listeria*. En algunas modalidades, el gen de virulencia es dependiente de *prfA*. En otras modalidades, el gen de virulencia es independiente de *prfA*. En algunas modalidades, el gen de virulencia es necesario para la dispersión o crecimiento mediado de la bacteria. En algunas modalidades, el gen de virulencia es *actA* o *inlB*. En algunas modalidades, la bacteria *Listeria* es *Listeria monocytogenes*. En algunas modalidades, el antígeno heterólogo es de, o se deriva de, una célula cancerígena, tumor o agente infeccioso. En algunas modalidades, el antígeno heterólogo es mesotelina (e.g., mesotelina humana), o derivado de mesotelina. En algunas modalidades, el ácido nucleico codifica una proteína de fusión que comprende un ActA modificado y el antígeno heterólogo. En algunas modalidades, la bacteria comprende un segundo ácido nucleico que codifica un segundo antígeno heterólogo que se ha integrado en un segundo gen de virulencia. Esta descripción proporciona vacunas que comprenden la bacteria *Listeria*. Esta descripción además proporciona un método para estimular una respuesta inmune al antígeno heterólogo en un mamífero, que comprende administrar una cantidad eficaz de la bacteria *Listeria*, o una cantidad eficaz de una composición que comprende la bacteria *Listeria*, al mamífero.

En todavía otro aspecto, esta descripción proporciona un método para producir una bacteria *Listeria* (e.g., una bacteria atenuada), que comprende integrar un polinucleótido en un gen de virulencia en el genoma de la bacteria *Listeria*, en donde el polinucleótido comprende un ácido nucleico que codifica un antígeno heterólogo. En algunas modalidades, la *Listeria* se atenúa por la interrupción de expresión del gen de virulencia o la interrupción de la secuencia codificadora del gen de virulencia. En algunas modalidades, la integración del polinucleótido interrumpe la expresión del gen de virulencia o interrumpe una secuencia codificadora del gen de virulencia. En algunas modalidades, la integración del polinucleótido da como resultado tanto (a) como (b). En algunas modalidades, el método produce una bacteria *Listeria* para uso en una vacuna. En algunas modalidades, el polinucleótido se integra en el gen de virulencia mediante recombinación homóloga. En algunas modalidades, el polinucleótido se integra mediante recombinación específica de sitio. En algunas modalidades, todo o parte del gen de virulencia se suprime

durante la integración del polinucleótido. En otras modalidades, nada del gen de virulencia se suprime durante la integración. En algunas modalidades, el gen de virulencia es *actA* o *inlB*. En algunas modalidades, el antígeno heterólogo es de, o se deriva de, una célula cancerígena, tumor, o agente infeccioso. En algunas modalidades, el antígeno heterólogo es mesotelina (e.g., mesotelina humana), o derivado de mesotelina. En algunas modalidades, el ácido nucleico codifica una proteína de fusión que comprende un ActA modificado y el antígeno heterólogo. Esta descripción además proporciona una bacteria *Listeria* producida por el método, y las composiciones de vacuna que comprenden la bacteria. Esta descripción también proporciona una bacteria *Listeria* que tiene las propiedades de una bacteria *Listeria* producida por el método, así como las vacunas que comprenden la bacteria. Los métodos para estimular una respuesta inmune al antígeno heterólogo en un mamífero, que comprenden administrar una cantidad eficaz de la bacteria *Listeria*, o una cantidad eficaz de una composición que comprende la bacteria *Listeria*, también se proporcionan.

En un aspecto adicional, esta descripción proporciona una bacteria *Listeria* que comprende un genoma, en donde el genoma comprende un polinucleótido que comprende un ácido nucleico que codifica un antígeno heterólogo, en donde el ácido nucleico se ha integrado en un gen necesario para mediar el crecimiento o dispersión. En algunas modalidades, la integración del polinucleótido atenúa la *Listeria* para el crecimiento o dispersión. En algunas modalidades, parte o todo el gen se ha suprimido. En algunas modalidades, nada del gen se ha suprimido. En algunas modalidades, el gen es *actA*. En algunas modalidades, la bacteria *Listeria* es *Listeria monocytogenes*. En algunas modalidades, el antígeno heterólogo es de, o se deriva de, una célula cancerígena, tumor, o agente infeccioso. En algunas modalidades, el antígeno heterólogo es mesotelina (e.g., mesotelina humana), o derivado de mesotelina. En algunas modalidades, el ácido nucleico codifica una proteína de fusión que comprende un ActA modificado y el antígeno heterólogo. Esta descripción proporciona vacunas que comprenden la bacteria *Listeria*. Esta descripción además proporciona un método para estimular una respuesta inmune al antígeno heterólogo en un mamífero, que comprende administrar una cantidad eficaz de la bacteria *Listeria*, o una cantidad eficaz de una composición que comprende la bacteria *Listeria*, al mamífero.

En todavía otro aspecto, esta descripción proporciona un método para producir una bacteria *Listeria* (e.g., una bacteria atenuada), que comprende integrar un polinucleótido en un gen en el genoma de la bacteria *Listeria* que es necesario para medir el crecimiento o dispersión, en donde el polinucleótido comprende un ácido nucleico que codifica un antígeno heterólogo. En algunas modalidades, la integración del polinucleótido atenúa la *Listeria* para el crecimiento o dispersión. En algunas modalidades, el método produce una bacteria *Listeria* para uso en una vacuna. En algunas modalidades, el polinucleótido se integra en el gen mediante recombinación homóloga. En algunas modalidades, el polinucleótido se integra mediante recombinación específica de sitio. En algunas modalidades, todo o parte del gen necesario para mediar el crecimiento o dispersión se suprime durante la integración. En algunas modalidades, el gen necesario para mediar el crecimiento o dispersión es *actA*. En algunas modalidades, el antígeno heterólogo es de, o se deriva de, una célula cancerígena, tumor, o agente infeccioso. En algunas modalidades, el antígeno heterólogo es mesotelina (e.g., mesotelina humana), o se deriva de mesotelina. En algunas modalidades, el ácido nucleico codifica una proteína de fusión que comprende un ActA modificado y el antígeno heterólogo. Esta descripción además proporciona una bacteria *Listeria* producida por el método, y las composiciones de vacuna que comprenden la bacteria. Esta descripción también proporciona una bacteria *Listeria* que tiene las propiedades de una bacteria *Listeria* producida por el método, así como las vacunas que comprenden la bacteria. Los métodos para estimular una respuesta inmune al antígeno heterólogo en un mamífero, que comprenden administrar una cantidad eficaz de la bacteria *Listeria*, o una cantidad eficaz de una composición que comprende la bacteria *Listeria*, también se proporcionan.

En un aspecto adicional, esta descripción proporciona una bacteria *Listeria* que comprende un genoma, en donde el genoma comprende un polinucleótido que comprende un ácido nucleico que codifica un antígeno heterólogo, en donde el ácido nucleico se ha integrado en un gen de virulencia en el genoma y la bacteria se atenúa por interrupción de expresión del gen de virulencia o interrupción de una secuencia codificadora del gen de virulencia. En algunas modalidades, todo o parte del gen de virulencia se ha suprimido. En algunas modalidades, nada del gen de virulencia se ha suprimido. En algunas modalidades, el gen de virulencia es *actA* o *inlB*. En algunas modalidades, la *Listeria* es *Listeria monocytogenes*. En algunas modalidades, el antígeno heterólogo es de, o se deriva de, una célula cancerígena, tumor, o agente infeccioso. En algunas modalidades, la bacteria además comprende un segundo ácido nucleico que codifica un segundo antígeno heterólogo que se ha integrado en un segundo gen de virulencia. En algunas modalidades, el ácido nucleico codifica una proteína de fusión que comprende un ActA modificado y el antígeno heterólogo. Las vacunas que comprenden la bacteria *Listeria* además se proporcionan, así como los métodos para estimular una respuesta inmune al antígeno heterólogo en un mamífero, que comprende administrar una cantidad eficaz de la bacteria *Listeria* o una cantidad eficaz de una composición que comprende la bacteria *Listeria*, al mamífero.

En todavía otro aspecto, esta descripción proporciona un método para producir una bacteria *Listeria* para uso en una vacuna, que comprende: integrar un polinucleótido en un gen de virulencia en el genoma de la bacteria *Listeria*, en donde el polinucleótido comprende un ácido nucleico que codifica un antígeno heterólogo y en donde la bacteria se atenúa por interrupción de la expresión del gen de virulencia o la interrupción de una secuencia codificadora del gen de virulencia. En algunas modalidades, el polinucleótido se integra en el gen de virulencia mediante recombinación homóloga. En algunas modalidades, todo o parte del gen de virulencia se suprime durante la integración del polinucleótido en el gen de virulencia. En algunas modalidades, el gen de virulencia es *actA* o *inlB*. Esta descripción además proporciona una bacteria *Listeria* producida por el método.

En otro aspecto, esta descripción proporciona un método para producir una bacteria *Listeria* para uso en una vacuna, que comprende integrar un polinucleótido en un gen de virulencia en el genoma de la bacteria *Listeria*, en donde el polinucleótido comprende un ácido nucleico que codifica un antígeno heterólogo y en donde la bacteria *Listeria* es o se ha atenuado por mutación del gen de virulencia. Esta descripción además proporciona una bacteria *Listeria* producida por este método.

En algunas modalidades de cada uno de los aspectos anteriormente mencionados, así como otros aspectos descritos en la presente, la *Listeria* se atenúa con respecto a la dispersión de célula a célula y/o entrada en las células no fagocíticas. Por ejemplo, en algunas modalidades, la *Listeria* comprende una mutación en atenuación en *actA* y/o *inlB*.

En algunas modalidades de cada uno de los aspectos anteriormente mencionados, así como otros aspectos descritos en la presente, el polinucleótido y/o el ácido nucleico que codifica la proteína de fusión que comprende el antígeno heterólogo se ha integrado en un gen de virulencia en el genoma.

En algunas modalidades de cada uno de los aspectos anteriormente mencionados, así como otros aspectos descritos en la presente, el antígeno heterólogo es antígeno de célula germinal de próstata (PSCA) (e.g., PSCA humano), o un antígeno derivado de PSCA.

En algunas modalidades de cada uno de los aspectos anteriormente mencionados, así como otros aspectos descritos en la presente, el antígeno heterólogo es mesotelina, o un antígeno derivado de mesotelina.

En algunas modalidades de cada uno de los aspectos anteriormente mencionados, así como otros aspectos descritos en la presente, el polinucleótido comprende dos secuencias de ácido nucleico, cada una de las cuales codifica una proteína de fusión que comprende un antígeno heterólogo. En las modalidades adicionales, el polinucleótido comprende tres ácidos nucleicos, cada uno de los cuales codifica una proteína de fusión que comprende un antígeno heterólogo. En algunas modalidades, el polinucleótido comprende cuatro o más ácidos nucleicos, cada uno de los cuales codifica una proteína de fusión que comprende un antígeno heterólogo.

En otro aspecto, esta descripción proporciona una bacteria *Listeria* que comprende un genoma, en donde el genoma comprende: (a) un primer polinucleótido que comprende un primer ácido nucleico que codifica un primer antígeno heterólogo, en donde el primer polinucleótido se ha integrado en un gen de virulencia en el genoma y en donde el polinucleótido comprende un ácido nucleico que codifica un antígeno heterólogo; y (b) un segundo polinucleótido que comprende un segundo ácido nucleico que codifica un segundo antígeno heterólogo, en donde el segundo polinucleótido se ha integrado en el genoma. En algunas modalidades, la bacteria se atenúa por la interrupción de la expresión del gen de virulencia o por la interrupción de una secuencia codificadora del gen de virulencia. En algunas modalidades, la integración del primer polinucleótido interrumpe la expresión del gen de virulencia o interrumpe una secuencia codificadora del gen de virulencia. En algunas modalidades, todo o parte del gen de virulencia se ha suprimido. En algunas modalidades, nada del gen de virulencia se ha suprimido. En algunas modalidades, el gen de virulencia es *actA* o *inlB*. En algunas modalidades, la *Listeria* es *Listeria monocytogenes*. En algunas modalidades, los antígenos heterólogos, primero y segundo, son de o se derivan de, una célula cancerígena, tumor, o agente infeccioso. En algunas modalidades, el primer y/o segundo antígeno heterólogo es mesotelina, y el antígeno derivado de mesotelina, PSCA, o un antígeno derivado de PSCA (e.g., el primer antígeno heterólogo puede ser mesotelina, y el segundo heterólogo puede ser PSCA). En algunas modalidades, el segundo polinucleótido se ha integrado en un gen de virulencia en el genoma y la *Listeria* puede atenuarse por la interrupción de la expresión del gen de virulencia o la interrupción de una secuencia codificadora del gen de virulencia. En algunas modalidades, el segundo polinucleótido se ha integrado en *actA* o *inlB*. En algunas modalidades, el segundo polinucleótido se ha integrado en una región del genoma que no comprende un gen de virulencia. En algunas modalidades, el segundo polinucleótido se ha integrado en un sitio tARN^{Arg}. En algunas modalidades, el primer y/o segundo ácido nucleico codifica una proteína de fusión que comprende un ActA modificado (e.g., ActA-N100) y el primer o segundo antígeno heterólogo. En algunas modalidades, el primer y/o segundo ácido nucleico codifica una proteína de fusión que comprende una secuencia de señal y el primer o segundo antígeno heterólogo, en donde la secuencia de señal es una

secuencia de señal ActA, secuencia de señal p60, una secuencia de señal LLO, una secuencia de señal BaPa, una secuencia de señal Llusp45, o una secuencia de señal PhoD. Las vacunas que comprenden la bacteria *Listeria*, además se proporcionan. Los métodos para estimular una respuesta inmune al antígeno heterólogo en un mamífero, que comprenden administrar una cantidad eficaz de la bacteria *Listeria*, o una cantidad eficaz de una composición que comprende la bacteria *Listeria*, al mamífero, también se proporcionan. En algunas modalidades, el genoma de la *Listeria* además comprende un tercer polinucleótido que comprende un tercer ácido nucleico que codifica un tercer antígeno heterólogo, en donde el tercer polinucleótido también se ha integrado en el genoma.

En algunas modalidades de cada uno de los aspectos anteriormente mencionados, así como otros aspectos descritos en la presente, los polinucleótidos que comprenden el (los) ácido (s) nucleico (s) que codifica (n) un (os) antígeno (s) heterólogo (s) o la (s) proteína (s) de fusión que comprende (n) un antígeno heterólogo que se integran en una región del genoma además comprenden un promotor y/u otras secuencias reguladoras necesarias para la expresión de los ácidos nucleicos una vez integrados. En algunas modalidades alternativas, los polinucleótidos que comprenden los ácidos nucleicos que codifican el antígeno heterólogo o la proteína de fusión que comprende el antígeno heterólogo se integran en una región del genoma de manera que el ácido nucleico se une operativamente a un promotor y/o señal secretora ya presente en el genoma *Listeria*. En algunas modalidades, los polinucleótidos que se insertan en los genes de virulencia se insertan en las regiones codificadoras. En algunas otras modalidades, los polinucleótidos se insertan en regiones no codificadoras de los genes de virulencia.

En algunas modalidades de cada uno de los aspectos anteriormente mencionados, así como otros aspectos descritos en la presente, los polinucleótidos integrados en el genoma *Listeria* se integran por medio de la recombinación homóloga. En algunas modalidades alternativas, los polinucleótidos se integran en el genoma *Listeria* por medio de la integración específica de sitio.

En algunas modalidades, esta descripción proporciona una bacteria *Listeria* que contiene un polinucleótido que comprende un primer ácido nucleico que codifica una pareja de proteína de fusión, unido operativamente y en marco con y un segundo ácido nucleico que codifica mesotelina humana, o un derivado de la misma. El primer ácido nucleico puede codificar, e.g., LLO62 (no codón optimizado); LLO26 (codón optimizado); LLO441 (no codón optimizado); LLO441 (codón optimizado); LLO de longitud completa (no codón optimizado); LLO de longitud completa (codón optimizado); secuencia secretora BaPA; secuencia secretora *B. subtilis* phoD (Bs phoD SS); p60 (no codón optimizado); p60 (codón optimizado); actA (no codón optimizado); actA (codón optimizado); actA-N100 (no codón optimizado); actA-N100 (codón optimizado); actA (A30R). El segundo ácido nucleico puede codificar la mesotelina humana de longitud completa; la mesotelina humana suprimida en su secuencia de señal; la mesotelina humana suprimida en su anclaje GPI; o mesotelina humana suprimida tanto en la secuencia de señal como en el anclaje GPI, en donde se proporcionan las versiones de codón optimizado y no codón optimizado de mesotelina. En otro aspecto, la presente invención proporciona el polinucleótido anterior integrado en la posición del gen *inlB*, gen *actA*, gen *hly*, en donde la integración puede ser mediada por recombinación homóloga, y en donde la integración puede estar opcionalmente con unión operable con el promotor del gen *inlB*, *actA*, o *hly*. En todavía otro aspecto, esta descripción proporciona modalidades listeriales en donde el polinucleótido anterior se integra en el genoma listerial a manera de integración específica de sitio, e.g., en el sitio tARN^{Arg}. Cada una de las modalidades individuales descritas en la presente, opcionalmente, comprende una *Listeria* que comprende un gen *pfrA* constitutivamente activo (*prfA**). Las construcciones listeriales no se limitan a los polinucleótidos unidos operativamente con un promotor *actA* o promotor *hly*. Lo que también se comprende son los enlaces operables con otros promotores bacterianos, promotores sintéticos, promotores bacteriovirus, y combinaciones de dos o más promotores.

En algunas modalidades, el antígeno heterólogo codificado por un ácido nucleico en los polinucleótidos, bacteria *Listeria*, y/o vacunas descritas anteriormente, o en cualquier parte en la presente, no comprende un péptido antigénico EphA2. En algunas modalidades, el antígeno heterólogo codificado por un ácido nucleico en los polinucleótidos, bacteria *Listeria*, y/o vacunas, no comprende el fragmento antigénico o EphA2 de longitud completa, análogo o derivado del mismo.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La Figura 1 describe pINT, un plásmido 6055 bp. Una vez que pINT se integra en un genoma listerial, la *Listeria* puede aislarse por resistencia de eritromicina (ErmC), seguido por el tratamiento con recombinasa Cre para remover una región del plásmido que codifica los genes de resistencia antibiótica (CAT y ErmC).

La Figura 2 muestra pKS7, un plásmido 7096 que media la recombinación homóloga.

La Figura 3 muestra las etapas, o intermediarios, que se originan con la recombinación homóloga mediada por pKSV7 en un genoma bacteriano.

La Figura 4 describe un método para preparar un inserto que lleva brazos homólogos, en donde el inserto que lleva los brazos homólogos se coloca en pKSV7. La región flanqueada por loxP se pone entre paréntesis por los brazos homólogos. Después de la integración en un genoma bacteriano, la exposición transitoria a la recombinasa Cre cataliza la remoción del gen de resistencia antibiótica. La integración ocurre con la supresión de parte del genoma, correspondiente a la región entre las áreas que nivelan los brazos heterólogos.

La Figura 5 muestra un método alternativo para preparar un inserto que lleva los brazos homólogos, en donde el inserto que lleva los brazos homólogos se coloca en pKSV7. La región flanqueada por loxP reside fuera de los brazos homólogos. Después de la integración en un genoma bacteriano, la exposición transitoria a la recombinasa Cre cataliza la remoción del gen de resistencia antibiótica (u otro marcador de selección). La integración ocurre con la supresión de parte el genoma, correspondiente a la región entre las áreas que nivelan los brazos homólogos.

La Figura 6 describe la preparación de un inserto que lleva los brazos homólogos, en donde el inserto que lleva los brazos homólogos se coloca en pKSV7. La región flanqueada por loxP reside entre los brazos heterólogos. En los vectores preparados de acuerdo con esta figura, la integración no se sigue por la supresión de cualquier región correspondiente del genoma.

La Figura 7 es un esquema que describe algunas de las construcciones de mesotelina de la presente invención, incluyendo, e.g., cualquiera de los promotores, secuencias secretoras, socios de proteína de fusión, y así sucesivamente.

La Figura 8 es gel que muestra la expresión de mesotelina de varias construcciones listeriales.

La Figura 9 es un gel que muestra la exposición de mesotelina de un número de construcciones listeriales.

Las Figuras 10-12 muestran la expresión de la interferona gamma (IFN γ) de los ensayos de la célula formadora de manchas (SFC), y comparan las respuestas inmunes en donde los ratones habían sido vacunados con varios números (unidades formadoras de colonia; c.f.u.) de *L. monocytogenes* diseñados.

La Figura 13 describe los números de metástasis tumoral en las superficies de los hígados, después de tratar los ratones que llevan el tumor con diversas preparaciones de *L. monocytogenes* recombinante. La Figura 13 revela los datos puros (fotografías de los hígados fijos).

La Figura 14 también describe los números de metástasis tumoral en las superficies de los hígados, después del tratamiento de ratones que llevan el tumor con varias preparaciones de *L. monocytogenes* recombinante.

Las Figuras 15 A-G además describen los números de metástasis tumoral en las superficies de los hígados, después de tratar los ratones que llevan el tumor con *L. monocytogenes* recombinante.

La Figura 16 demuestra la supervivencia incrementada a los tumores por los ratones que llevan el tumor con el tratamiento con varias preparaciones de *L. monocytogenes* recombinante.

La Figura 17 ilustra las construcciones de mesotelina y secreción de mesotelina por varias preparaciones de *L. monocytogenes* recombinante.

La Figura 18 describe la secreción de mesotelina y respuestas inmunes estimuladas por varias preparaciones de *L. monocytogenes* recombinante.

La Figura 19 muestra la secreción de mesotelina y respuestas inmunes estimuladas por varias preparaciones de *L. monocytogenes* recombinante.

La Figura 20 revela además la expresión de mesotelina y respuestas inmunes estimuladas por varias preparaciones de *L. monocytogenes* recombinante.

La Figura 21 ilustra adicionalmente la secreción de mesotelina y respuestas inmunes estimuladas por varias preparaciones de *L. monocytogenes* recombinante.

La Figura 22 demuestra la expresión de mesotelina y respuestas inmunes estimuladas por varias preparaciones de *L. monocytogenes* recombinante.

La Figura 23 describe las respuestas inmunes estimuladas por vacunación con varias preparaciones de *Listeria* recombinante.

La Figura 24 además describe la secreción de mesotelina y respuestas inmunes estimuladas por varias preparaciones de *L. monocytogenes* recombinante.

La Figura 25 revela las respuestas inmunes estimuladas después de la vacunación con un número de preparaciones de *Listeria* recombinante.

La Figura 26 adicionalmente describe la secreción de mesotelina y las respuestas inmunes estimuladas por varias preparaciones de *L. monocytogenes* recombinante. hMeso6: *L. monocytogenes* Δ actA Δ inlB que codifica el promotor actA; actA-N100-hMeso Δ SS Δ GPI; integrado en sitio actA. hMeso25: *L. monocytogenes* Δ actA Δ inlB que codifica el promotor actA; actA-N100-hMeso Δ SS Δ GPI; integrado en sitio inlB.

La Figura 27 además demuestra la secreción de mesotelina y las respuestas inmunes estimuladas por varias preparaciones de *L. monocytogenes* recombinante.

La Figura 28 muestra las fotografías de los pulmones fijos.

La Figura 29 muestra un histograma de datos de las fotografías de pulmón fijo.

La Figura 30 revela la efectividad de varias preparaciones de *Listeria* recombinante en la mejora de la supervivencia de los ratones que llevan el tumor.

La Figura 31 describe la secreción de mesotelina y las respuestas inmunes estimuladas por varias preparaciones de *L. monocytogenes* recombinante.

La Figura 32 compara la expresión de mesotelina de varias preparaciones de *Listeria* recombinante.

La Figura 33 representa la secreción de mesotelina y las respuestas inmunes estimuladas después de la vacunación con *L. monocytogenes* recombinante.

La Figura 34 demuestra la respuesta inmune estimulada después de la vacunación con las preparaciones y las dosis de *Listeria* recombinante.

Las Figura 35A y 35B describen los números de metástasis tumoral en hígados, después del tratamiento de ratones que llevan el tumor con varias preparaciones de *L. monocytogenes* recombinante. La Figura 35A ilustra los datos puros (fotografías de hígados fijos).

La Figura 36 demuestra la efectividad de varias preparaciones de *Listeria* recombinante en la mejora de la supervivencia de los ratones que llevan el tumor.

La Figura 37 describe la respuesta inmune después de la vacunación con varias preparaciones de *Listeria* recombinante, y compara la célula CD4⁺T y las respuestas de células CD8⁺T.

La Figura 38 revela la supervivencia de los ratones portadores del tumor a los tumores después de la vacunación con varias preparaciones de *Listeria* recombinante.

La Figura 39 además ilustra la supervivencia de los ratones portadores del tumor a los tumores después de la vacunación con varias preparaciones de *Listeria* recombinante.

La Figura 40 describe la alineación de una integrasa de fago de la presente invención con otra integrasa de fago (U153 int: SEQ ID NO: 1; lin 1231: SEQ ID NO:2).

La Figura 41 describe la alineación de todavía otra integrasa de fago de la presente invención otra integrasa de fago (PSA int: SEQ ID NO:3; lin 0071: SEQ ID NO:4).

La Figura 42 muestra la alineación de todavía otra integrasa de fago de la presente invención con una diferente integrasa de fago (PSA int: SEQ ID NO:5; lin 1765: SEQ ID NO:6).

La Figura 43 describe la alineación de una integrasa de fago adicional de la presente invención con otra integrasa de fago (PSA int: SEQ ID NO:7; lin 2601: SEQ ID NO:8).

La Figura 44 proporciona una alineación de una integrasa de fago adicional de la presente invención con un ácido nucleico que codifica otra integrasa de fago (PSA int: SEQ ID NO:119; Imof6854_2703: SEQ ID NO:120).

La Figura 45A y 45B describe pINT-ActAN100-BamHI-SpeI-MfeI-SIINFEKL, un plásmido 6594 bp en pINT (Fig. 1) y que contiene un promotor ActA, actA-N100 y una secuencia SIINFEKL. La Figura 45B muestra la región de clonación de pINT-ActAN100-BamHI-SpeI-MfeI-SIINFEKL. (La secuencia de ácido nucleico es SEQ ID NO:150, la secuencia de péptidos es SEQ ID NO:151).

La Figura 46 describe la configuración esquemática de construcciones moleculares PSCA con una capa Kyte-

Doolittle.

La Figura 47A muestra los resultados de la presentación de célula dendrítica de péptidos a la línea de célula reportera B3Z. La Figura 47B es un análisis Western blot de expresión y secreción de proteínas de fusión ActA-N100-PSCA en células J774.

5 La Figura 48 demuestra la respuesta inmune estimulada después de la vacunación con *Listeria monocytogenes* recombinante que expresa las proteínas de fusión ActA-N100-PSCA.

10 Las Figura 49A y 49B describen las cepas de vacuna bivalente que expresan dos diferentes antígenos tumorales humanos. La Figura 49A describe las moléculas de fusión codificadas por construcciones integradas. La Figura 49B describe la expresión y secreción de proteínas de fusión ActA que siguen a la infección de células J774 con vacunas *Listeria monocytogenes* monovalente o bivalente.

La Figura 50 demuestra la respuesta inmune estimulada después de la vacunación con vacunas *Listeria monocytogenes* recombinante monovalente o bivalente.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

15 Como se utiliza en la presente, incluyendo las reivindicaciones anexas, las formas en singular de las palabras tales como “un”, “una”, y “el”, incluyen sus referencias en plural correspondientes al menos que el contexto lo dicte claramente de otra manera.

I. DEFINICIONES

20 Las abreviaturas utilizadas para indicar una mutación en un gen, o una mutación en una bacteria que comprende el gen, son como sigue. A manera de ejemplo, la abreviatura “*L. monocytogenes* Δ ActA” significa que parte, o todo, del gen ActA se suprimió. El símbolo delta (Δ) significa supresión. Una abreviatura que incluye un signo de menos con superíndice (*Listeria* ActA) significa que el gen ActA se mutó, e.g., a manera de una supresión, mutación por puntos, o mutación por cambio de marco de lectura, pero sin limitarse a estos tipos de mutaciones. Se abrevian los exponenciales, donde, por ejemplo, “3e7” significa 3×10^7 .

25 La “administración” como se aplica a un humano, mamífero, sujeto mamífero, animal, sujeto veterinario, sujeto placebo, sujeto de investigación, sujeto experimental, célula, tejido, órgano, o fluido biológico, se refiere sin limitación al contacto de un ligando exógeno, reactivo, placebo, molécula pequeña, agente farmacéutico, agente terapéutico, agente de diagnóstico, o composición al sujeto, célula, tejido, órgano, o fluido biológico, y lo similar. La “administración” puede referirse, e.g., a métodos terapéuticos, farmacocinéticos, de diagnóstico, de investigación, de placebo y experimentales. El tratamiento de una célula comprende el contacto de un reactivo a la célula, así como el
30 contacto de un reactivo a un fluido, en donde el fluido se encuentra en contacto con la célula. La “administración” también comprende los tratamientos *in vitro* y *ex vivo*, por ejemplo, de una célula, por un reactivo, diagnóstico, composición de unión, o por otra célula.

Un “agonista”, como se refiere a un ligando y receptor, comprende una molécula, combinación de moléculas, un complejo, o una combinación de reactivos, que estimula el receptor. Por ejemplo, un combatiente del factor
35 estimulador de colonia de granulocito-macrófago (GM-CSF) puede comprender un GM-CSF, una muteína o derivado de GM-CSF, un mimético peptídico de GM-CSF, una molécula pequeña que imita la función biológica de GM-CSF, o un anticuerpo que estimula el receptor GM-CSF. Un antagonista, como se refiere a un ligando y receptor, comprende una molécula, combinación de moléculas, o un complejo, que inhibe, contrarresta, disminuye, y/o desensibiliza el receptor. El “antagonista” comprende cualquier reactivo que inhibe una actividad constitutiva del receptor. Una
40 actividad constitutiva es una que se manifiesta en la ausencia de una interacción de ligando/receptor. El “antagonista” también comprende cualquier reactivo que inhibe o previene una actividad estimulada (o regulada) de un receptor. A manera de ejemplo, un antagonista de receptor GM-CSF incluye, sin implicar ninguna limitación, un anticuerpo que se une al ligando (GM-CSF) e impide que se una al receptor, o un anticuerpo que se une al receptor e impide que el ligando se una al receptor, o en donde el anticuerpo bloquea al receptor en una configuración inactiva.

45 Como se utiliza en la presente, un “análogo” en el contexto de un polipéptido EphA2 (o un fragmento de un polipéptido EphA2) se refiere a un reactivo proteínico (e.g. un péptido, polipéptido o proteína) que posee una función similar o idéntica como el polipéptido EphA2 (o fragmento de un polipéptido EphA2), pero no necesariamente comprende una estructura o secuencia de aminoácidos similar o idéntica del polipéptido EphA2 (o fragmento). Un
50 análogo de un polipéptido EphA2 que tiene una secuencia de aminoácidos similar a un polipéptido EphA2, se refiere a un agente proteínico que cumple al menos uno de los siguientes: (a) un agente proteínico que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 30%, al menos 35%, al menos 40%, al menos 45%, al menos 50%, al menos 55%, al

menos 60%, al menos 65%, al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95% o al menos 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de un polipéptido EphA2; (b) un agente proteínico codificado por una secuencia de nucleótidos que se hibridiza bajo condiciones rigurosas a una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido EphA2 de al menos 20 residuos de aminoácidos, al menos 20 residuos de aminoácidos, al menos 30 residuos de aminoácidos, al menos 40 residuos de aminoácidos, al menos 50 residuos de aminoácidos, al menos 60 residuos de aminoácidos, al menos 70 residuos de aminoácidos, al menos 80 residuos de aminoácidos, al menos 90 residuos de aminoácidos, al menos 100 residuos de aminoácidos, al menos 125 residuos de aminoácidos, o al menos 150 residuos de aminoácidos; y (c) un agente proteínico codificado por una secuencia de nucleótidos que es al menos 30%, al menos 35%, al menos 40%, al menos 45%, al menos 50%, al menos 55%, al menos 60%, al menos 65%, al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95% o al menos 99% idéntica a la secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido EphA2. Un agente proteínico con estructura similar a un polipéptido EphA2 se refiere a un agente proteínico que tiene una estructura secundaria, terciaria o cuaternaria similar, del polipéptido EphA2.

Las "células que presentan antígeno" (APCs) son células del sistema inmune utilizado para presentar el antígeno a las células T. Las APCs incluyen las células dendríticas, monocitos, macrófagos, células Kupffer de zona marginal, microglia, células Langerhans, células T y células B (véase, e.g., Rodríguez-Pinto y Moreno (2005) Eur. J. Immunol. 35:1097-1105). Las células dendríticas se originan en al menos dos linajes. El primer linaje comprende pre-C1, mielóide DC1, y DC1 maduro. El segundo linaje comprende células multipotentes progenitoras tempranas CD34⁺CD45RA⁺; células CD34⁺CD45RA⁺, células CD34⁺CD45RA⁺CD4⁺IL-3Ralpha⁺ pro-DC2, células CD4⁺CD11c⁺ plasmacitoide pre-DC2, DC2s derivados por plasmacitoide de DC2 humano linfóide, y DC2s maduros (véase, e.g., Gilliet y Liu (2002) J. Exp. Med. 195:695-704; Bauer, *et al.* (2001) J. Immunol 166:5000-5007; Arpinati, *et al.* (2000) Blood 95:2484-2490; Kadowaki, *et al.* (2001) J. Exp. Med. 194:863-869; Liu (2002) Human Immunology 63:1067-1071; McKenna, *et al.* (2005) J. Virol. 79:17-27; O'Neill, *et al.* (2004) Blood 104:2235-2246; Rossi y Young (2005) J. Immunol. 175:1373-1381; Banchereau y Palucka (2005) Nat. Rev. Immunol. 5:296-306).

La "atenuación" y "atenuado" comprende una bacteria, virus, parásito, organismo infeccioso, prión, célula tumoral, gen en el organismo infeccioso, y lo similar, que se modifica para reducirla toxicidad a un huésped. El huésped puede ser un huésped animal o humano, o un órgano, tejido, o célula. La bacteria, para dar un ejemplo no limitante, puede ser atenuada para reducir el crecimiento extracelular, o para reducir el crecimiento intracelular en una célula huésped. La atenuación puede ser valorada al medir, e.g., un indicio o indicios de toxicidad, el LD₅₀, la tasa de eliminación de un órgano, o el índice competitivo (véase, e.g., Auerbuch, *et al.* (2001) Infect. Immunity 69:5953-5957). En lo general, una atenuación da como resultado un incremento en el LD₅₀ y/o un incremento en la tasa de eliminación por al menos 25%; más generalmente por al menos 50%; más generalmente por al menos 100% (2 veces); normalmente por al menos 5 veces; más normalmente por al menos 10 veces; más normalmente por al menos 50 veces; frecuentemente por al menos 100 veces; más frecuentemente por al menos 500 veces; y más frecuentemente por al menos 1000 veces; normalmente por al menos 5000 veces; más normalmente por al menos 10,000 veces; y más normalmente por al menos 50,000 veces; y más frecuentemente por al menos 100,000 veces.

El "gen atenuado" comprende un gen que media la toxicidad, patología, o virulencia, a un huésped, crecimiento dentro del huésped, o supervivencia dentro del huésped, en donde el gen se muta en una manera que mitiga, reduce, o elimina la toxicidad, patología, o virulencia. La reducción o eliminación puede ser valorada al comparar la virulencia o toxicidad mediada por el gen mutado con aquella mediada por el gen no mutado (o progenitor). El "gen mutado" comprende supresiones, mutaciones por puntos, y mutaciones por cambio de marco de lectura en regiones reguladoras del gen, regiones codificadoras del gen, regiones no codificadoras del gen, o cualquier combinación de las mismas.

La "condición cancerosa" y "trastorno canceroso" comprenden, sin implicar ninguna limitación, un cáncer, un tumor, metástasis, angiogénesis de un tumor, y trastornos pre-cancerosos tales como displasias.

Las "variantes conservativamente modificadas" aplican tanto a secuencias de ácido nucleico como de aminoácidos. Con respecto a las secuencias de ácido nucleico en particular, una variante conservativamente modificada se refiere a ácidos nucleicos que codifican las secuencias de aminoácidos idénticas, o secuencias de aminoácidos que tienen una o más sustituciones conservativas. Un ejemplo de una sustitución conservativa es el intercambio de un aminoácido en uno de los siguientes grupos para otro aminoácido del mismo grupo (Patente de Estados Unidos No. 5,767,063 expedida a Lee, *et al.*; Kyte y Doolittle (1982) J. Mol. Biol. 157:105-132).

(1) Hidrofóbico: Norleucina, Ile, Val, Leu, Phe, Cys, Met;

(2) Hidrofílico neutro: Cys, Ser, Thr;

- (3) Acido: Asp, Glu;
- (4) Básico: Asn, Gln, His, Lys, Arg;
- (5) Residuos que influyen en la orientación de cadena: Gly, Pro;
- (6) Aromático: Trp, Tyr, Phe; y
- 5 (7) Aminoácidos pequeños: Gly, Ala, Ser.

Un “derivado” en el contexto de un polipéptido EphA2 o un fragmento de un polipéptido EphA2 se refiere a un agente proteínico que comprende una secuencia de aminoácidos de un polipéptido EphA2 o un fragmento de un polipéptido EphA2 que se ha alterado por la introducción de sustituciones, supresiones o adiciones de residuo de aminoácido (es decir, mutaciones). El término “derivado” en el contexto de agentes proteínicos EphA2 también se refiere a un polipéptido EphA2 o un fragmento de un polipéptido EphA2 que se ha modificado, es decir, por la unión covalente de cualquier tipo de molécula al polipéptido. Por ejemplo, pero no a manera de limitación, un polipéptido EphA2 o un fragmento de un polipéptido EphA2 puede modificarse, e.g., por glicosilación, acetilación, pegilación, fosforilación, amidación, derivación por grupos bloqueadores/protectores conocidos, desdoblamiento protelítico, enlace a un ligando celular u otra proteína, etc. Un derivado de un polipéptido EphA2 o un fragmento de un polipéptido EphA2 puede modificarse mediante modificaciones químicas que utilizan las técnicas conocidas por aquellos expertos en la materia, incluyendo pero no limitándose a, desdoblamiento químico específico, acetilación, formilación, síntesis metabólica de tunicamicina, etc. Además, un derivado de un polipéptido EphA2 o un fragmento de un polipéptido EphA2 pueden contener uno o más aminoácidos no clásicos. En una modalidad, un derivado de polipéptido posee una función similar o idéntica como un polipéptido EphA2 o un fragmento de un polipéptido EphA2 descrito en la presente. En otra modalidad, un derivado de polipéptido EphA2 o un fragmento de un polipéptido EphA2 tiene una actividad alterada cuando se compara a un polipéptido no alterado. Por ejemplo, un derivado de un polipéptido EphA2 o fragmento del mismo puede diferir en la fosforilación en relación a un polipéptido EphA2 o fragmento del mismo.

La “cantidad eficaz” comprende, sin limitación, una cantidad que puede aminorar, revocar, mitigar, impedir, o diagnosticar un síntoma o signo de un trastorno o condición médica. Al menos que se indique de otra manera, explícitamente o por contexto, una “cantidad eficaz” no se limita a una cantidad mínima suficiente para aminorar una condición.

Los “péptidos antigénicos EphA2” (algunas veces referidos como “polipéptidos antigénicos EphA2”), se definen y describen en la Solicitud de Patente de Estados Unidos No. 2005/0281783 A1. El EphA2 es una cinasa de tirosina de receptor 130 kDa expresada en epitelio adulto (Zantek *et al.* (1999) Cell Growth & Differentiation 10:629; Lindberg *et al.* (1990) Molecular & Cellular Biology 10:6316). Un “péptido antigénico EphA2” o un “polipéptido antigénico EphA2” se refiere a un polipéptido EphA2, o un fragmento, análogo o derivado del mismo que comprende uno o más epítopes de célula B o epítopes de célula T de EphA2. El polipéptido EphA2 puede ser de cualquier especie. Por ejemplo, el polipéptido EphA2 puede ser un polipéptido EphA2 humano. El término “polipéptido EphA2” incluye la forma madura, procesada de EphA2, así como las formas inmaduras de EphA2. En algunas modalidades, el polipéptido EphA2 es la secuencia mostrada como la SEQ ID NO:2 de la Solicitud de Patente de Estados Unidos No. 2005/0281783 A1. Los ejemplos de la secuencia de nucleótidos de EphA2 humano pueden encontrarse en la base de datos del GenBank (véase, e.g., Nos. de Acceso BC037166, M59371 y M36395). Los ejemplos de la secuencia de aminoácidos de EphA2 humano también pueden encontrarse en la base de datos del GenBank (véase, e.g., Nos. de Acceso NP_004422, AAH37166, y AAA53375). Los ejemplos adicionales de las secuencias de aminoácidos de EphA2 incluyen aquellos enlistados en GenBank Nos. de Acceso NP_034269 (ratón), AAH06954 (ratón), XP_345597 (rata), y BAB63910 (pollo).

Un “fluido extracelular” comprende, por ejemplo, suero, plasma, sangre, fluido intersticial, fluido cerebroespinal, fluidos secretados, linfático, bilis, sudoración, materia fecal, y orina. Un “fluido extracelular” puede comprender un coloide o una suspensión, e.g., sangre completa o sangre coagulada.

El término “fragmentos” en el contexto de polipéptidos EphA2 incluyen un polipéptido o péptido antigénico EphA2 que comprende una secuencia de aminoácidos de al menos 5 residuos de aminoácido contiguos, al menos 10 residuos de aminoácido contiguos, al menos 15 residuos de aminoácido contiguos, al menos 20 residuos de aminoácido contiguos, al menos 25 residuos de aminoácido contiguos, al menos 40 residuos de aminoácido contiguos, al menos 50 residuos de aminoácido contiguos, al menos 60 residuos de aminoácido contiguos, al menos 70 residuos de aminoácido contiguos, al menos 80 residuos de aminoácido contiguos, al menos 90 residuos de aminoácido contiguos, al menos 100 residuos de aminoácido contiguos, al menos 125 residuos de aminoácido contiguos, al menos 150 residuos de aminoácido contiguos, al menos 175 residuos de aminoácido contiguos, al menos 200 residuos de

aminoácido contiguos, o al menos 250 residuos de aminoácido contiguos de la secuencia de aminoácidos de un polipéptido EphA2.

El "gen" se refiere a una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido u oligopéptido. El oligopéptido o polipéptido puede ser biológicamente activo, antigénicamente activo, biológicamente inactivo, o antigénicamente inactivo, y lo similar. El término gen comprende, e.g., la suma de las estructuras de lectura abierta (ORFs) que codifica un polipéptido u oligopéptido específico; la suma de las ORFs más los ácidos nucleicos que codifican los intrones; la suma de las ORFs y el (los) promotor (es) operativamente unido (s); la suma de las ORFs y el (los) promotor (es) operativamente unido (s), intron (es), y promotor (es), y otros elementos reguladores, tales como reforzador (es). En ciertas modalidades, el "gen" comprende cualquiera de las secuencias requeridas en cis para regular la expresión del gen. El término gen también puede referirse a un ácido nucleico que codifica un péptido que comprende un antígeno o un fragmento antigénicamente activo de un péptido, oligopéptido, polipéptido, o proteína. El término gen no necesariamente implica que el péptido codificado o la proteína tiene alguna actividad biológica, o incluso que el péptido o la proteína es antigénicamente activa (o). Una secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia no expresable se considera en lo general un pseudogen. El término gen también comprende las secuencias de ácido nucleico que codifica un ácido ribonucleico tal como rARN, tARN, o un ribozima.

El "crecimiento" de una bacteria *Listeria* comprende, sin limitación, las funciones de la fisiología bacteriana y genes que se refieren a la colonización, reproducción, incremento en contenido de proteína listerial, incremento en contenido de lípido listerial. Al menos que se especifique de otra forma explícitamente o por contexto, el crecimiento de *Listeria* comprende el crecimiento de la bacteria fuera de una célula huésped, y también crecimiento dentro de una célula huésped. Los genes relacionados de crecimiento incluyen, sin implicar ninguna limitación, aquellos que median la producción de energía (e.g., glicolisis, ciclo Krebs, citocromas), anabolismo y/o catabolismo de aminoácidos, azúcares, lípidos, minerales, purinas, y pirimidinas, transporte de nutrientes, transcripción, translación, y/o reproducción. En algunas modalidades, el "crecimiento" de una bacteria *Listeria* se refiere a crecimiento intracelular de la bacteria *Listeria*, es decir, el crecimiento dentro de una célula huésped tal como una célula de mamífero. Mientras que el crecimiento intracelular de una bacteria de *Listeria* puede ser medido por microscopía de luz o ensayos de unidad formadora de colonia (CFU), el crecimiento no se limitará por ninguna técnica de medición. Los parámetros bioquímicos tales como la cantidad de un antígeno listerial, la secuencia de ácido nucleico listerial, o específica de lípido a la bacteria *Listeria*, pueden utilizarse para valorar el crecimiento. En algunas modalidades, un gen que media el crecimiento es uno que media específicamente el crecimiento intracelular. En algunas modalidades, un gen que media específicamente el crecimiento intracelular comprende, pero no se limita a, un gen en donde la inactivación del gen reduce la tasa de crecimiento intracelular pero no de manera detectable, sustancialmente, o apreciablemente, reduce la tasa de crecimiento extracelular (e.g., crecimiento en brote), o un gen en donde la inactivación del gen reduce la tasa de crecimiento intracelular a un mayor grado que lo que reduce la tasa de crecimiento extracelular. Para proporcionar un ejemplo no limitante, en algunas modalidades, un gen en donde la inactivación reduce la tasa de crecimiento intracelular a un grado mayor que el crecimiento extracelular comprende la situación en donde la inactivación reduce el crecimiento intracelular a menos del 50% del valor normal o máximo, pero reduce el crecimiento extracelular a sólo 1-5%, 5-10%, o 10-15% del valor máximo. Esta descripción, en ciertos aspectos, comprende una *Listeria* atenuada en crecimiento intracelular pero no atenuada en crecimiento extracelular, una *Listeria* no atenuada en el crecimiento intracelular y no atenuada en crecimiento extracelular, así como una *Listeria* no atenuada en crecimiento intracelular pero atenuada en crecimiento extracelular.

La "condición inmune" o "trastorno inmune" comprende un trastorno, condición, síndrome, o enfermedad que se da como resultado de la respuesta ineficaz, inadecuada, o patológica del sistema inmune, e.g., a una infección persistente o a un cáncer persistente (véase, e.g., Jacobson, *et al.* (1997) Clin. Immunol. Immunopathol. 84:223-243). La "condición inmune" o "trastorno inmune" comprende, e.g., inflamación patológica, un trastorno inflamatorio, y una enfermedad o trastorno autoinmune. La "condición inmune" o "trastorno inmune" también puede referirse a infecciones, infecciones persistentes, cáncer, tumores, trastornos pre-cancerosos, cánceres que resisten la irradiación por el sistema inmune, y angiogénesis de tumores. La "condición inmune" o "trastorno inmune" también comprende cánceres inducidos por un agente infectivo, incluyendo los ejemplos no limitantes de cánceres inducidos por virus de hepatitis B, virus de hepatitis C, virus de simio 40 (SV40), virus Epstein-Barr, papilomavirus, poliomavirus, virus de herpes, sarcoma de Kaposi, virus de leucemia de célula T humana, y *Helicobacter pylori* (véase, e.g., Young y Rickinson (2004) Nat. Rev. Cancer 4:757-768; Pagano *et al.* (2004) Semin. Cancer Biol. 14:453-471; Li, *et al.* (2005) Cell Res. 15:262-271).

Una composición que se "etiqueta" es detectable, ya sea directa o indirectamente, por métodos espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, inmunoquímicos, isotópicos, o químicos. Por ejemplo, las etiquetas

útiles incluyen ^{32}P , ^{33}P , ^{35}S , ^{14}C , ^3H , ^{125}I , isótopos estables, etiquetas de epítipo, tintes fluorescentes, reactivos electrónicos-densos, sustratos, o enzimas, e.g., como se utiliza en los inmunoensayos unidos por enzima, o fluoretos (véase, e.g., Rozinov y Nolan (1998) Chem. Biol. 5:713-728).

El "ligando" se refiere a una molécula pequeña, péptido, polipéptido, o membrana asociada o molécula unida por membrana, que es un combatiente o antagonista de un receptor. El "ligando" también comprende un agente de unión que no es un combatiente o antagonista, y no tiene propiedades antagonistas o combatientes. Por convenio, en donde un ligando se une por membrana en una primera célula, el receptor normalmente se origina en una segunda célula. La segunda célula puede tener la misma identidad (el mismo nombre), o puede tener una identidad diferente (un nombre diferente), como la primera célula. Un ligando o receptor puede ser totalmente intracelular, es decir, puede residir en el citosol, núcleo, o en algún otro compartimiento intracelular. El ligando o receptor puede cambiar su ubicación, e.g., de un compartimiento intracelular al lado externo de la membrana de plasma. El complejo de un ligando y receptor se denomina un "complejo de receptor de ligando". En donde un ligando y receptor se incluyen en una trayectoria de señalización, el ligando ocurre en una posición corriente arriba y el receptor se origina en una posición corriente abajo de la trayectoria de señalización.

El "ácido nucleico" se refiere a desoxiribonucleótidos o ribonucleótidos y polímeros de los mismos ya sea en forma de filamento único, doble filamento, o forma de múltiples filamentos. Los ejemplos no limitantes de un ácido nucleico son, e.g., un cADN, mARN, oligonucleótido, y polinucleótido. Una secuencia de ácido nucleico particular también puede comprender implícitamente "variantes alélicas" y "variantes de empalme".

"Operativamente unido" en el contexto de un promotor y un ácido nucleico que codifica un mARN significa que el promotor puede utilizarse para iniciar la transcripción de aquel ácido nucleico.

Los términos "por ciento de identidad de secuencia" y "% de identidad de secuencia" se refieren al porcentaje de similitud de secuencia encontrada por una comparación o alineación de dos o más de secuencias de ácido nucleico o aminoácidos. El por ciento de identidad puede determinarse por una comparación directa de la información de secuencia entre dos moléculas al alinear las secuencias, contando el número exacto de combinaciones entre las dos secuencias alineadas, dividiendo por la longitud de la secuencia más corta, y multiplicando el resultado por 100. Un algoritmo para calcular el por ciento de identidad es el algoritmo de búsqueda de homología Smith-Waterman (véase, e.g., Kann y Golstein (2002) Proteins 48:367-376; Arslan, *et al.* (2001) Bioinformatics 17:327-337).

La "condición pre-cancerosa" comprende, sin limitación, displasias, nódulos pre-neoplásicos; nódulos macroregenerativos (MRN); nódulos displásicos de bajo grado (LG-DN); nódulos displásicos de grado alto (HG-DN); displasia epitelial biliar; enfoque de hepatocitos alterados (FAH); nódulos de hepatocitos alterados (NAH); desequilibrios cromosómicos; activación aberrante de telomerasa; re-expresión de la subunidad catalítica de telomerasa; expresión de marcadores de célula endotelial tal como CD31, CD34 y BNH9 (véase, e.g., Terracciano y Tornillo (2003) Pathologica 95:71-82; Su y Bannasch (2003) Toxicol. Pathol. 31:126-133; Rocken y Carl-McGrath (2001) Dig. Dis. 19:269-278; Kotoula, *et al.* (2002) Liver 22:57-69; Frachon, *et al.* (2001) J. Hepatol. 34:850-857; Shimonishi, *et al.* (2000) J. Hepatobiliary Pancreat. Surg. 7:542-550; Nakanuma, *et al.* (2003) J. Hepatobiliary Pancreat. Surg. 10:265-281). Los métodos para diagnosticar cáncer y displasia se describen (véase, e.g., Riegler (1996) Semin. Gastrointest. Dis. 7:74-87; Benvegnu, *et al.* (1992) Liver 12:80-83; Giannini, *et al.* (1987) Hepatogastroenterol. 34:95-97; Anthony (1976) Cancer Res. 36:2579-2583).

Por "purificado" e "aislado" se entiende, cuando se refiere a un polipéptido, que el polipéptido se presenta en la ausencia sustancial de las otras macromoléculas biológicas con las cuales se asocia en naturaleza. El término "purificado" como se utiliza en la presente significa que un polipéptido identificado frecuentemente responde por al menos 50%, más frecuentemente responde por al menos 60%, normalmente responde por al menos 70%, más típicamente responde por al menos 75%, más típicamente responde por al menos 80%, normalmente responde por al menos 85%, más normalmente responde por al menos 90%, más normalmente responde por al menos 95%, y convencionalmente responde por al menos 98% en peso, o más, de los polipéptidos presentes. Los pesos de agua, reguladores, sales, detergentes, reductores, inhibidores de proteasa, estabilizadores (incluyendo una proteína agregada tal como albumina), y excipientes, y moléculas que tienen un peso molecular de menos de 1000, no se utilizan en lo general en la determinación de la pureza de polipéptido. Véase, e.g., la discusión de pureza en la Solicitud de Patente de Estados Unidos No. 6,090,611 expedida a Covacci, *et al.*

El "péptido" se refiere a una secuencia corta de aminoácidos, en donde los aminoácidos se conectan entre sí por enlaces de péptido. Un péptido puede ocurrir libre o unido a otra porción, tal como una macromolécula, lípido, oligo- o polisacárido, y/o un polipéptido. En donde un péptido se incorpora en una cadena de polipéptidos, el término "péptido" todavía puede utilizarse para referirse explícitamente a la secuencia corta de aminoácidos. Un "péptido" puede conectarse a otra porción a manera de un enlace de péptido u otro tipo de enlace. Un péptido es al menos dos

aminoácidos en longitud y en lo general menos de aproximadamente 25 aminoácidos en longitud, en donde la longitud máxima es una función de costumbre o contexto. Los términos “péptido” y “oligopéptido” pueden utilizarse intercambiamente.

La “proteína” en lo general se refiere a la secuencia de aminoácidos que comprende una cadena de polipéptido. La proteína también puede referirse a una estructura tridimensional del polipéptido. La “proteína desnaturalizada” se refiere a un polipéptido parcialmente desnaturalizado, que tiene cierta estructura tridimensional residual o, alternativamente, a una estructura tridimensional esencialmente aleatoria, es decir, totalmente desnaturalizada. Esta descripción comprende reactivos de, y métodos que utilizan, variantes de polipéptido, e.g., incluyendo glicosilación, fosforilación, sulfatación, formación de enlace de disulfuro, desamidación, isomerización, puntos de desdoblamiento en procesamiento de secuencia líder o señal, cofactores covalentes y no covalentemente unidos, variantes oxidados, y lo similar. La formación de proteínas unidas por disulfuro se describe (véase, e.g., Woycechowsky y Raines (2000) *Curr. Opin. Chem. Biol.* 4:533-539; Creighton, *et al.* (1995) *Trends Biotechnol.* 13:18-23).

“Recombinante” cuando se utiliza con referencia, e.g., a un ácido nucleico, célula, animal, virus, plásmido, vector, o lo similar, indica la modificación por la introducción de un ácido nucleico no nativo, exógeno, alteración de un ácido nucleico nativo, o por derivación en total o en parte de un ácido nucleico recombinante, célula, virus, plásmido, o vector. La proteína recombinante se refiere a una proteína derivada, e.g., de un ácido nucleico recombinante, virus, plásmido, vector, o lo similar. La “bacteria recombinante” comprende una bacteria en donde el genoma se diseña por métodos recombinantes, e.g., a manera de una mutación, supresión, inserción, y/o un reajuste. La “bacteria recombinante” también comprende una bacteria modificada para incluir un ácido nucleico extra-genómico recombinante, e.g., un plásmido o un segundo cromosoma, o una bacteria donde un ácido nucleico extra-genómico existente se altera.

La “muestra” se refiere a una muestra de un humano, animal, placebo, o muestra de investigación, e.g., una célula, tejido, órgano, fluido, gas, aerosol, mezcla, coloide, o material coagulado. La “muestra” puede probarse *in vivo*, e.g., sin remoción del humano o animal, o puede probarse *in vitro*. La muestra puede probarse después de procesamiento, e.g., mediante métodos histológicos. La “muestra” también se refiere, e.g., a una célula que comprende un fluido o muestra de tejido o una célula separada de un fluido o muestra de tejido. La “muestra” también puede referirse a una célula, tejido, órgano, o fluido que se toma de modo frasco de un humano o animal, o a una célula, tejido, órgano, o fluido que se procesa o almacena.

Un “marcador elegible” comprende un ácido nucleico que permite a uno elegir o combatir una célula que contiene el marcador elegible. Los ejemplos de marcadores elegibles incluyen, sin limitación, e.g.: (1) Un ácido nucleico que codifica un producto que proporciona resistencia a un compuesto de otra manera tóxico (e.g., un antibiótico), o que codifica la susceptibilidad a un compuesto de otra manera inocuo (e.g., sacarosa); (2) Un ácido nucleico que codifica un producto que de otra manera se encuentra faltante en la célula receptora (e.g., genes tARN, marcador (es) auxotrófico (s)); (3) Un ácido nucleico que codifica un producto que suprime una actividad de un producto de gen; (4) Un ácido nucleico que codifica un producto que puede identificarse fácilmente (e.g., marcadores fenotípicos tales como beta-galactosidasa, proteína de verde fluorescente (GFP), proteínas de superficie celular, una etiqueta de epítipo, una etiqueta FLAG); (5) Un ácido nucleico que puede identificarse por técnicas de hibridización, por ejemplo, PCR o modelos moleculares.

Se une “específicamente” o “selectivamente”, cuando se refiere a un ligando/receptor, ácido nucleico/ácido nucleico complementario, anticuerpo/antígeno, u otro par de enlace (e.g., una citosina a un receptor de citosina) indica una reacción de enlace que es determinante de la presencia de la proteína en una población heterógena de proteínas y otras biológicas. De esta manera, bajo condiciones designadas, un ligando específico se une a un receptor particular y no se une en una cantidad significativa a otras proteínas presentes en la muestra. El enlace específico también puede significar, e.g., que el compuesto de enlace, ligando de ácido nucleico, anticuerpo, o composición de unión derivada del sitio de enlace por antígeno de un anticuerpo, del método contemplado se une a su objetivo con una afinidad que frecuentemente es al menos 25% más, más frecuentemente al menos 50% más, más frecuentemente al menos 100% (2 veces) más, normalmente al menos diez veces más, más normalmente al menos 20 veces más, y más normalmente al menos 100 veces más que la afinidad con cualquier compuesto de enlace.

En una modalidad típica, un anticuerpo tendrá una afinidad que es mayor a aproximadamente 10^9 litros/mol, como se determina, e.g., por análisis Scatchard (Munsen, *et al.* (1980) *Analyt. Biochem.* 107:220-239). Se reconoce por el experto que ciertos compuestos de enlace pueden unirse específicamente a más de un objetivo, e.g., un anticuerpo se une específicamente a su antígeno, a lectinas a manera del oligosacárido de anticuerpo, y/o a un receptor Fc a manera de la región Fc del anticuerpo.

La "dispersión" de una bacteria comprende "dispersión de célula a célula", es decir, la transmisión de la bacteria de una primera célula huésped a una segunda célula huésped, como se media, por ejemplo, por una vesícula. Las funciones en relación a la dispersión incluyen, pero no se limitan a, e.g., la formación de una cola de actina, la formación de una extensión tipo pseudopod, y la formación de una vacuola con membrana doble.

5 El "sitio objetivo" de una recombinasa es la región o secuencia de ácido nucleico que se reconoce, une, y/o actúa tras la recombinasa (véase, e.g., Patente de Estados Unidos No. 6,379,943 expedida a Graham, *et al.*; Smith y Thorpe (2002) Mol. Microbiol. 44:299-307; Groth y Calos (2004) J. Mol. Biol. 335:667-678; Nunes-Duby, *et al.* (1998) Nucleic Acids Res.26:391-406).

10 La "cantidad terapéuticamente eficaz" se define como una cantidad de un reactivo o composición farmacéutica que es suficiente para mostrar un beneficio de paciente, es decir, para originar una reducción, prevención, o mejora de los síntomas de la condición que se está tratando. Cuando el agente o composición farmacéutica comprende un agente de diagnóstico, una "cantidad diagnósticamente eficaz" se define como una cantidad que es suficiente para producir una señal, imagen, u otro parámetro de diagnóstico. Las cantidades eficaces de la formulación farmacéutica variará de acuerdo con los factores tales como el grado de susceptibilidad del individuo, 15 la edad, el género, y el peso del individuo, y las respuestas idiosincráticas del individuo (véase, e.g., Patente de Estados Unidos No. 5,888,530 expedida a Netti, *et al.*).

El "tratamiento" o "tratar" (con respecto a una condición o una enfermedad) es un procedimiento para obtener resultados benéficos o deseados incluyendo y preferentemente resultados clínicos. Para propósitos de esta invención, los resultados deseados o benéficos con respecto a una enfermedad incluyen, pero no se limitan a, uno o más de los 20 siguientes: mejorar una condición asociada con una enfermedad, curar una enfermedad, disminución de severidad de una enfermedad, retrasar el avance de una enfermedad, aliviar uno o más síntomas asociados con una enfermedad, incrementando la calidad de vida de uno que padece de una enfermedad, y/o prolongar la supervivencia. De igual forma, para propósitos de esta invención, los resultados benéficos o deseados con respecto a una condición incluyen, pero no se limitan a, uno o más de los siguientes: mejorar una condición, curar una condición, disminuir la severidad 25 de una condición, retrasar el avance de una condición, aliviar uno o más síntomas asociados con una condición, incrementando la calidad de vida de uno que padece de una condición, y/o prolongar la supervivencia. Por ejemplo, en algunas modalidades en donde las composiciones descritas en la presente se utilizan para el tratamiento de cáncer, los resultados benéficos o deseados incluyen, pero no se limitan a, uno o más de los siguientes: reducir la proliferación de (o destruir) las células cancerígenas o neoplásicas, reducir la metástasis de las células neoplásicas 30 encontradas en cánceres, reducir el tamaño de un tumor, reducir los síntomas que se dan como resultado del cáncer, incrementar la calidad de vida de aquellos que padecen del cáncer, reducir la dosis de otros medicamentos requeridos para tratar la enfermedad, retrasar el avance del cáncer, y/o prolongar la supervivencia de pacientes que tienen cáncer. Dependiendo del contexto, el "tratamiento" de un sujeto puede implicar que el sujeto en necesidad de tratamiento, e.g., en la situación donde el sujeto comprende un trastorno que se espera se mejore mediante la 35 administración de un reactivo.

La "vacuna" comprende las vacunas preventivas. La vacuna también comprende vacunas terapéuticas, e.g., una vacuna administrada a un mamífero que comprende una condición o trastorno asociado con el antígeno o epítipo provisto por la vacuna.

II. GENERAL

40 La presente invención proporciona reactivos y métodos útiles para el tratamiento y diagnóstico de cáncer, tumores, trastornos precancerosos, e infecciones. Se proporcionan ácidos nucleicos, bacteria *Listeria*, y vacunas que comprenden una bacteria *Listeria*. Esta descripción comprende las células listeriales que se han modificado *in vitro*, incluyendo durante el almacenamiento, o *in vivo*, incluyendo los productos de división de célula bacteriana y productos de deterioro bacteriano.

45 Se proporcionan ácidos nucleicos que codifican al menos un antígeno heterólogo (heterólogo a la bacteria *Listeria*). El antígeno heterólogo puede derivarse de un tumor, célula cancerígena, o y/o agente infeccioso, e.g., un virus, bacteria, o protozooario. El antígeno heterólogo también puede ser un antígeno listerial, por ejemplo, en donde el antígeno se expresa en cantidades mayores que aquel que ocurre naturalmente dentro de la bacteria *Listeria*, donde el antígeno listerial se une operativamente con una secuencia reguladora no nativa, o donde el antígeno listerial se 50 modifica para ser atenuado o para incrementar su antigenicidad.

Donde una *Listeria* contiene un ácido nucleico que codifica un antígeno heterólogo, el término "heterólogo" comprende, pero no se limita necesariamente a, un antígeno de, o se deriva de: (1) Un organismo no listerial; (2) Un antígeno de origen sintético; (3) Un antígeno de origen listerial donde el ácido nucleico se integra en una posición en el

genoma listerial que es diferente de aquel encontrado en el tipo silvestre; y (4) Un antígeno de origen listerial, pero donde el ácido nucleico se une operativamente con una secuencia reguladora no utilizada normalmente en una *Listeria* tipo silvestre. El comentario precedente también aplica al término "antígeno heterólogo", cuando se utiliza, por ejemplo, en el contexto de un vector viral. Aquí, el antígeno heterólogo comprende antígenos que no son de, y no se derivan de, aquel vector viral, así como, por ejemplo, los antígenos del vector viral que se controlan por una secuencia reguladora de ácido nucleico no nativo.

Se proporcionan reactivos y métodos para estimular el sistema inmune de mamífero, para reducir el número y/o tamaño de tumores, para reducir la metástasis, y para reducir la concentración de un organismo infeccioso. La presente invención también proporciona reactivos y métodos para mejorar la supervivencia de una célula, tejido, órgano, o mamífero, a un cáncer o infección. La presente invención también proporciona reactivos y métodos para mejorar la supervivencia de una célula (*in vivo* o *in vitro*), un tejido (*in vivo* o *in vitro*), un órgano (*in vivo* o *in vitro*), un organismo, un mamífero, un sujeto veterinario, un sujeto de investigación, o un sujeto humano, a un cáncer, tumor, o infección. Lo que se comprende es la administración que es *in vivo* o *in vitro*, supervivencia de la célula, tejido, u órgano *in vitro* o *in vivo*, o cualquier combinación de los mismos. Cualquier combinación incluye, e.g., la administración que es *in vivo* donde la supervivencia es *in vitro*, o la administración que es *in vitro* y donde la supervivencia subsecuente es *in vivo*.

Se proporciona una *Listeria* que comprende un polinucleótido que codifica al menos un antígeno heterólogo en donde el polinucleótido es genómico. También se encuentra comprendida una *Listeria* que comprende un polinucleótido que codifica al menos un antígeno heterólogo, en donde el polinucleótido es genómico y no residente en un plásmido dentro de la *Listeria*. Además, se encuentra comprendida una *Listeria* que comprende un polinucleótido que codifica al menos un antígeno heterólogo, en donde el polinucleótido reside en un plásmido dentro de la *Listeria*. Además, lo que se proporciona es una *Listeria* que comprende un polinucleótido que codifica al menos un antígeno heterólogo, donde el polinucleótido reside en un plásmido y no ocurre integrado en el genoma. En otro aspecto, la presente descripción proporciona una *Listeria* que comprende un polinucleótido que codifica al menos un antígeno heterólogo, donde el polinucleótido se integra en el genoma y también reside por separado en un plásmido.

El ratón es un modelo aceptado para la respuesta inmune humana. A detalle, las células T de ratón son un modelo para las células T humanas, las células dendríticas de ratón (DCs) son un modelo para DCs humanas, las células NK de ratón son un modelo para células NK humanas, las células NKT de ratón son un modelo para las células NKT humanas, la respuesta innata de ratón es un modelo aceptado para la respuesta innata humana, y así sucesivamente. Se describen estudios de modelo, por ejemplo, para las células CD8⁺T, las células T de memoria central, y células T de memoria efectora (véase, e.g., Walzer, *et al.* (2002) *J. Immunol.* 168:2704-2711); los dos subgrupos de células NK (véase, e.g., Chakir, *et al.* (2000) *J. Immunol.* 165:4985-4993; Smith, *et al.* (2000) *J. Exp. Med.* 191:1341-1354; Ehrlich, *et al.* (2005) *J. Immunol.* 174:1922-1931; Peritt, *et al.* (1998) *J. Immunol.* 161:5821-5824); las células NKT (véase, e.g., Couedel, *et al.* (1998) *Eur. J. Immunol.* 28:4391-4397; Sakamoto, *et al.* (1999) *J. Allergy Clin. Immunol.* 103:S445-S451; Saikh, *et al.* (2003) *J. Infect. Dis.* 188:1562-1570; Emoto, *et al.* (1997) *Infection Immunity* 65:5003-5009; Taniguchi, *et al.* (2003) *Annu. Rev. Immunol.* 21:483-513; Sidobre, *et al.* (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 101:12254-12259); monocitos/macrófagos (Sunderkotter, *et al.* (2004) *J. Immunol.* 172:4410-4417); los dos linajes de DCs (Boonstra, *et al.* (2003) *J. Exp. Med.* 197:101-109; Donnenberg, *et al.* (2001) *Transplantation* 72:1946-1951; Becker (2003) *Virus Genes* 26:119-130; Carine, *et al.* (2003) *J. Immunol.* 171:6466-6477; Penna, *et al.* (2002) *J. Immunol.* 169:6673-6676; Alferink, *et al.* (2003) *J. Exp. Med.* 197:585-599).

La respuesta innata de ratón, que incluye los receptores tipo Toll (TLRs), es un modelo para la respuesta inmune innata humana, como se describe (véase, e.g. Janssens y Beyaert (2003) *Clinical Microb. Revs.* 16:637-646). Los neutrófilos de ratón son un modelo aceptado para los neutrófilos humanos (véase, e.g., Kobayashi, *et al.* (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100:10948-10953; Torres, *et al.* (2004) 72:2131-2139; Sibelius, *et al.* (1999) *Infection Immunity* 67:1125-1130; Tvinnereim, *et al.* (2004) *J. Immunol.* 173:1994-2002). La respuesta inmune murino a *Listeria* es un modelo aceptado para la respuesta humana a *Listeria* (véase, e.g., Kolb-Maurer, *et al.* (2000) *Infection Immunity* 68:3680-3688; Brzoza, *et al.* (2004) *J. Immunol.* 173:2641-2651; Esplugues, *et al.* (2005) *Blood* Feb. 3 (pub-e antes de la impresión); Paschen, *et al.* (2000) *Eur. J. Immunol.* 30:3447-3456; Way y Wilson (2004) *J. Immunol.* 173:5918-5922; Ouadhiri, *et al.* (1999) *J. Infectious Diseases* 180:1195-1204; Neighbors, *et al.* (2001) *J. Exp. Med.* 194:343-354; Calorini, *et al.* (2002) *Clin. Exp. Metastasis* 19:259-264; Andersson, *et al.* (1998) *J. Immunol.* 161:5600-5606; Flo, *et al.* (2000) *J. Immunol.* 164:2064-2069; Calorini, *et al.* (2002) *Clin. Exp. Metastasis* 19:259-264; Brzoza, *et al.* (2004) *J. Immunol.* 173:2641-2651; Brzoza, *et al.* (2004) *J. Immunol.* 173:2641-2651; Cleveland, *et al.* (1996) *Infection Immunity* 64: 1906-1912; Andersson, *et al.* (1998) *J. Immunol.* 161:5600-5606).

Las Publicaciones de Patente de Estados Unidos Nos. 2004/0228877 y 2004/0197343, cada una de las cuales se incorpora en la presente mediante la referencia en su totalidad, describen *Listeria* útil en algunas

modalidades de la presente invención. La Publicación de Estados Unidos No. 2005/0249748, incorporada en la presente mediante la referencia en su totalidad, describe además *Listeria* y polinucleótidos útiles en algunas modalidades de la presente invención.

(a). Secuencias de señal o secretoras.

5 La presente invención acepta un ácido nucleico que codifica una secuencia secretora, o que codifica una proteína listerial, o un fragmento de la misma, adecuada para uso como una pareja de proteína de fusión. Lo que se comprende es un ácido nucleico que codifica:

- i. una secuencia secretora,
- ii. una secuencia de señal,
- 10 iii. un polipéptido listerial que contiene su secuencia secretora nativa,
- iv. una proteína listerial con su secuencia secretora nativa reemplazada con aquella de otra proteína listerial,
- v. una proteína listerial con su secuencia secretora nativa reemplazada con la secuencia secretora de una proteína bacteriana no listerial,
- 15 vi. una proteína listerial no secretada, o fragmento de la misma, que no contiene ninguna secuencia secretora; y
- vii. una secuencia secretora bacteriana no listerial fusionada con, y en estructura con, una proteína listerial no secretada, o fragmento de la misma.

20 Estas modalidades pueden comprender las siguientes proteínas listeriales, y fragmentos o dominios de las mismas.

- i. Listeriolisina (LLO). La secuencia de señal secretora de listeriolisina O (gen *hly*) se ha identificado (véase, e.g., Lety, *et al.* (2003) Microbiol. 149:1249-1255).
- ii. ActA. El sitio de enlace ribosómico, promotor, y secuencia de señal se han identificado para ActA listerial. El sitio de enlace ribosómico origina 6 bp corriente arriba del codón de inicio del gen ActA (Vazquez-Roland, *et al.* (1992) Infect. Immunity 60:219-230).
- 25 iii. Internalinas. Todas las proteínas de internalina (*Int*) contienen una secuencia de terminal N de 30-35 aminoácidos con características de péptidos de señal bacteriana (véase, e.g., Dramsi, *et al.* (1997) Infect. Immunity 65:1615-1625).
- iv. p60 (gen *iap*). Una región de 27 aminoácidos entre el codón de inicio y el nucleótido 524 funciona como una secuencia de señal, y dirige el transporte de p60 a través de la membrana de célula *Listeria* (Kohler, *et al.* (1990) Infect. Immunity 58:1943-1950). Kohler, *et al. supra*, también describen un sitio de enlace de ribosoma rico en purina (16S ARN) del p60 mARN de *L. monocytogenes*.
- 30

La Tabla 1 describe un número de ejemplos no limitantes de los péptidos de señal para uso en la fusión con una secuencia de pareja de proteína de fusión tal como un antígeno heterólogo. El algoritmo de SeñalP puede utilizarse para determinar las secuencias de señal en bacterias de Gram positivo. Este programa se encuentra disponible en la red a nivel mundial en: cbs.dtu.dk/services/SignalP/. Los péptidos de señal tienden a contener tres dominios: una terminal N positivamente cargada (1-5 residuos de largo); un dominio hidrofóbico central (7-15 residuos de largo); y un dominio de terminal C neutral pero polar (véase, e.g., Lety, *et al.* (2003) Microbiology 149:1249-1255; Paetzel, *et al.* (2000) Pharmacol. Ther. 87:27-49). Como los péptidos de señal y las secuencias secretoras codificadas por un genoma *Listeria*, o por un genoma o plásmido de otra bacteria, no son optimizadas necesariamente por codón para la expresión óptima en *Listeria*, la presente descripción también proporciona ácidos nucleicos que se originan del genoma *Listeria*, o de un genoma o plásmido de otra bacteria, que se alteran por codón optimizado para expresión por un *L. monocytogenes*. La presente descripción no se limitará a antígenos de péptido y polipéptido que se secretan, pero también abarca polipéptidos y péptidos que no se secretan o no pueden secretarse de una *Listeria* u otra bacteria.

Tabla 1. Trayectoria de señal bacteriana. Los péptidos de señal se identifican por el sitio de peptidasa de señal.

Sitio de peptidasa de señal (sitio de desdoblamiento representado por ')	Gen	Género/Especie
trayectoria secA1		
TEA'KD (SEQ ID NO:126)	<i>hly</i> (LLO)	<i>Listeria monocytogenes</i>
VYA'DT (SEQ ID NO:127)	Usp45	<i>Lactococcus lactis</i> (véase, e.g., Steidler, et al. (2003) Nat. Biotech. 21:785-789; Schotte, et al. (2000) Enzyme Microb. Technol. 27:761-765).
IQA'EV (SEQ ID NO:128)	<i>pag</i> (antígeno protector)	<i>Bacillus anthracis</i>
trayectoria secA2		
ASA'ST (SEQ ID NO:129)	<i>iap</i> (proteína asociada por invasión) p60	<i>Listeria monocytogenes</i>
VGA'FG (SEC ID NO:130)	NamA Imo2691 (autolisina)	<i>Listeria monocytogenes</i>
AFA'ED (SEC ID NO:131)	* BA_0281 (Familia NLP/P60)	<i>Bacillus anthracis</i>
VQA'AE (SEQ ID NO:132)	* <i>atl</i> (autolisina)	<i>Staphylococcus aureus</i>
trayectoria Tat		
DKA'LT (SEQ ID NO: 133)	Imo0367	<i>Listeria monocytogenes</i>
VGA'FG (SEQ ID NO: 134)	PhoD (fosfatasa alcalina)	<i>Bacillus subtilis</i>
* Las autolisinas bacterianas secretadas por la trayectoria sec (no determinada si secA1 o secA2). Las secuencias secretoras se encuentran comprendidas por los ácidos nucleicos indicados codificados por el genoma <i>Listeria</i> EGD (No. de Acceso de GenBank NC_003210) at, e.g., nucleótidos 45434-456936 (inIA); nucleótidos 457021-457125 (inIB); nucleótidos 1860200-1860295 (inIC); nucleótidos 286219-287718 (inIE); nucleótidos 205819-205893 (gen <i>hly</i>; LLO) (véase también No. de Acceso de GenBank PI3128); nucleótidos 209470-209556 (ActA) (véase también No. de Acceso de GenBank S20887).		

5

En algunas modalidades, el polipéptido que comprende el antígeno heterólogo que se expresa por la *Listeria* comprende una secuencia de señal que es una secuencia de señal no listerial. En algunas modalidades, la secuencia de señal es un péptido de señal secA1. En algunas otras modalidades, la secuencia de señal es un péptido de señal Tat o secA2. En algunas modalidades, el péptido de señal es un péptido de señal actA. En algunas modalidades, el péptido de señal utilizado para efectuar la secreción del antígeno heterólogo se selecciona de secuencia de señal p60, una señal de secuencia LLO *Listeria monocytogenes*, una secuencia de señal de Antígeno Protector *Bacillus anthracis*

(BaPa), una secuencia de señal usp45 *Lactococcus lactis*, y una secuencia de señal PhoD *Bacillus subtilis*. Los péptidos de señal que pueden utilizarse para la expresión y secreción de antígenos heterólogos se describen en, e.g., Publicación de Patente de Estados Unidos No. 2005/0249748.

(b). Optimización por codón.

- 5 La presente descripción, en ciertas modalidades, proporciona la optimización por codón de un ácido nucleico heterólogo a *Listeria*, o de un ácido nucleico endógeno a *Listeria*. Los codones óptimos utilizados por *L. monocytogenes* para cada aminoácido se muestran (Tabla 2). Un ácido nucleico se optimiza por codón si al menos un codón en el ácido nucleico se reemplaza con codón que se utiliza más frecuentemente por *L. monocytogenes* para aquel aminoácido que el codón en la secuencia original.
- 10 Normalmente, al menos un por ciento de cualquiera de los codones no óptimos se cambian para proporcionar codones óptimos, normalmente al menos cinco por ciento se cambian, más normalmente al menos diez por ciento se cambian, frecuentemente al menos 20% se cambian, más frecuentemente al menos 30% se cambian, más frecuentemente al menos 40%, normalmente al menos 50% se cambian, más normalmente al menos 60% se cambian, más normalmente al menos 70% se cambian, óptimamente al menos 80% se cambian, más óptimamente al menos 90% se cambian, más óptimamente al menos 95% se cambian, y convencionalmente 100% de cualquiera de los
- 15 codones no óptimos se optimizan por codón para la expresión *Listeria* (Tabla 2).

Tabla 2. Codones óptimos para la expresión en *Listeria*.

Aminoácido	A	R	N	D	C	Q	E	G	H	I
Codón <i>Listeria</i> óptimo	GCA	CGU	AAU	GAU	UGU	CAA	GAA	GGU	CAU	AUU
Aminoácido	L	K	M	F	P	S	T	W	Y	V
Codón <i>Listeria</i> óptimo	UUA	AAA	AUG	UUU	CCA	AGU	ACA	UGG	UAU	GUU

20

En algunas modalidades, el ácido nucleico que codifica el antígeno heterólogo se optimiza por codón para expresión en *Listeria monocytogenes*. En algunas modalidades, el polinucleótido que codifica la proteína de fusión que comprende el ActA modificado o una secuencia de péptido de señal alternativa y el antígeno heterólogo se optimiza por codón.

- 25 La información adicional con respecto a la optimización por codón de las secuencias de nucleótidos para la expresión en *Listeria monocytogenes* puede encontrarse en la Publicación de Patente de Estados Unidos No. 2005/0249748.

(c). Atenuación y factores de virulencia.

- 30 *L. monocytogenes* expresa varios genes y productos de gen que contribuyen a la invasión, crecimiento, o colonización del huésped (Tabla 3). Algunos de estos se clasifican como "factores de virulencia". Estos factores de virulencia incluyen ActA, listeriolisina (LLO), proteína 60 (p60), internalina A (InlA), internalina B (InlB), fosfatidilcolina fosfolipasa C (PC-PLC), fosfolipasa C específica de fosfatidilinositol (PI-PLC; gen *plcA*). Se han caracterizado un número de otras internalinas, e.g., InlC2, InlD, InlE, e InlF (Dramsi, *et al.* (1997) Infect. Immunity 65:1615-1625). Mpl, una metaloproteasa que procesa proPL-PLC para activar PL-PLC, también es un factor de virulencia (Chakraborty, *et al.* (2000) Int. J. Med. Microbiol. 290:167-174; Williams, *et al.* (2000) J. Bact. 182:837-841). En algunas modalidades, un gen de virulencia es un gen que codifica un factor de virulencia. Sin limitarse la presente descripción a los genes
- 35 atenuados descritos en la presente, la presente descripción suministra una *Listeria* que se altera, muta, o atenúa en una o más de las secuencias de la Tabla 3.

En algunas modalidades, el gen de virulencia es un gen dependiente de *prf-A*. En otras modalidades, el gen

de virulencia es gen independiente de *prf-A*.

En algunas modalidades, la *Listeria* comprende una mutación en atenuación en *actA* y/o *inlB*. En algunas modalidades, un polinucleótido que codifica un antígeno heterólogo se ha integrado en el gen *actA* y/o *inlB*.

- 5 Los genes de reparación de ADN también pueden ser el objetivo de una mutación en atenuación. La mutación o supresión de un gen de reparación de ADN puede dar como resultado una bacteria atenuada (véase, e.g., Darwin y Nathan (2005) *Infection Immunity* 73:4581-4587).

Tabla 3. Secuencias de proteínas y ácidos nucleicos *L. monocytogenes*.

Proteína/Gen	Nucleótidos	No. de Acceso de GenBank
Ensamble de actina incluyendo precursor de proteína (gen <i>ActA</i>)	209470-211389 (secuencia codificadora) 209456-211389 (gen)	NC_003210
<i>ActA</i> en varios subtipos de <i>L. monocytogenes</i>	--	AF497169; AF497170; AF497171; AF497172; AF497173; AF497174; AF497175; AF497176; AF497177; AF497178; AF497179; AF497180; AF497181; AF497182; AF497183 (Lasa, <i>et al.</i> (1995) <i>Mol. Microbiol.</i> 18:425-436).
Precursor de listeriolisina O (LLO) (gen <i>hly</i>)	205819-207408	NC_003210
Internalina A (<i>InlA</i>)	454534-456936	NC_003210
Internalina B (<i>InlB</i>)	457021-458913	NC_003210
<i>SvpA</i>	---	Bierne, <i>et al.</i> (2004) <i>J. Bacteriol.</i> 186:1972-1982; Borezee, <i>et al.</i> (2000) <i>Microbiology</i> 147:2913-2923.

10

p104 (a.k.a.LAP)	---	Pandiripally, <i>et al.</i> (1999) <i>J. Med. Microbiol.</i> 48:117-124; Jaradat, <i>et al.</i> (2003) <i>Med. Microbiol. Immunol.</i> 192:85-91.
Fosfolipasa C específica de fosfatidilinositol (PI-PLC) (gen <i>plcA</i>)	204624-205577	NC_003210
Fosfolipasa C específica de fosfatidilcolina (PC-PLC) (gen <i>plcB</i>)	1-3031	X59723

Precursor de metaloproteasa de Zinc (Mpl)	207739-209271	NC_003210
p60 (proteína 60; proteína asociada por invasión (iap)).	618932-620380	NC_003210 (Lenz, <i>et al.</i> (2003) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100:12432-12437).
Sortasa	966245-966913	NC_003210
Proteína reguladora positiva de listeriolisina (gen PrfA)	203607-203642	NC_003210
Proteína reguladora positiva de listeriolisina (gen PrfA)	1-801	AY318750
Gen PrfB	2586114-2587097	NC 003210
Gen FbpA	570 aminoácidos	Dramsi, <i>et al.</i> (2004) Mol. Microbiol. 53:639-649.
Auto gen	--	Cabanes, <i>et al.</i> (2004) Mol. Microbiol. 51:1601-1614
Ami (amidasa que media la adhesión)	--	Dussurget, <i>et al.</i> (2004) Annu. Rev. Microbiol. 58:587-610.
Operona dlt (dltA; dltB; dltC; dltD).	487-2034 (dltA)	No. de Acceso de GenBank: AJ012255 (Abachin, <i>et al.</i> dltD). (2002) Mol. Mic43:1-14.)
Recuadros de prfA	--	Dussurget, <i>et al.</i> (2002) Mol. Microbiol. 45:1095-1106.
Htp (transportador de azúcar P)	1-1386	No. de Acceso de GenBank AJ315765 (véase, e.g., Milohanic, <i>et al.</i> (2003) Mol. Microbiol. 47:1613-1625).

La biología de Listeriolisina (LLO) se describe (véase, e.g., Glomski, *et al.* (2003) Infect. Immun. 71:6754-6765; Gedde, *et al.* (2000) Infect. Immun. 68:999-1003; Glomski, *et al.* (2002) J. Cell Biol. 156:1029-1038; Dubail, *et al.* (2001) Microbiol. 147:2679-2688; Dramsi y Cossart (2002) J. Cell Biol. 156:943-946). La fisiología y bioquímica de ActA se describe (véase, e.g., Machner, *et al.* (2001) J. Biol. Chem. 276:40096-40103; Lauer, *et al.* (2001) Mol. Microbiol. 42: 1163-1177; Portnoy, *et al.* (2002) J. Cell Biol. 158:409-414). La fisiología y bioquímica de internalina se encuentra disponible (véase, e.g., Bierne y Cossart (2000) J. Cell Sci. 115:3357-3367; Schluter, *et al.* (1998) Infect. Immun. 66:5930-5938; Dormann, *et al.* (1997) Infect. Immun. 65:101-109). Las proteínas de sortasa se describen (véase, e.g., Bierne, *et al.* (2002) Mol. Microbiol. 43:869-881). Dos fosfolipasas, PI-PLC (codificada por gen plcA) y

PC-PLC (codificada por gen *plcB*) se describen (véase, e.g., Camilli, *et al.* (1993) *Mol. Microbiol.* 8: 143-157; Schuster, *et al.* (1998) *Infect. Immun.* 66:5930-5938). La proteína p60 se describe (Pilgrim, *et al.* (2003) *Infect. Immun.* 71:3473-3484).

Esta descripción también contempla una *Listeria* atenuada en al menos un factor regulador, e.g., un promotor o un factor de transcripción. Lo siguiente se refiere a promotores. La expresión de ActA se regula por dos diferentes promotores (Lauer, *et al.* (2002) *J. Bacteriol.* 184:4177-4186). Juntas, *inlA* e *inlB* se regulan por cinco promotores (Lingnau, *et al.* (1995) *Infect. Immun.* 63:3896-3903). El factor de transcripción *prfA* se requiere para la transcripción de un número de genes *L. monocytogenes*, e.g., *hly*, *plcA*, *ActA*, *mpl*, *prfA*, e *iap*. Las propiedades reguladoras por *PrfA* se encuentran mediadas por, e.g., el promotor dependiente de *PrfA* (*PinlC*) y el recuadro de *PrfA*. La presente descripción, en ciertas modalidades, proporciona una codificación de ácido nucleico inactivada, mutada, o suprimida en al menos un promotor de *ActA*, promotor de *inlB*, *PrfA*, *PinlC*, recuadro de *PrfA*, y lo similar (véase, e.g., Lalic-Mullthaler, *et al.* (2001) *Mol. Microbiol.* 42: 111-120; Shetron-Rama, *et al.* (2003) *Mol. Microbiol.* 48: 1537-1551; Luo, *et al.* (2004) *Mol. Microbiol.* 52:39-52). La *PrfA* puede hacerse constitutivamente activo por una mutación *Gly145Ser*, mutación *Gly155Ser*, o mutación *Glu77Lys* (véase, e.g., Mueller y Freitag (2005) *Infect. Immun.* 73:1917-1926; Wong y Freitag (2004) *J. Bacteriol.* 186:6265-6276; Ripio, *et al.* (1997) *J. Bacteriol.* 179:1533-1540).

La atenuación puede efectuarse por, e.g., tratamiento térmico o modificación química. La atenuación también puede efectuarse por modificación genética de un ácido nucleico que modula, e.g., el metabolismo, el crecimiento extracelular, o el crecimiento intracelular, la modificación genética de un ácido nucleico que codifica un factor de virulencia, tal como *prfA* *listerial*, *ActA*, listeriolisina (LLO), un factor mediador de adhesión (e.g., una internalina tal como *inlA* o *inlB*), *mpl*, fosfolipasa C de fosfatidilcolina (PC-PLC), fosfolipasa C específica de fosfatidilinositol (PI-PLC; gen *plcA*), cualquier combinación de las anteriores, y lo similar. La atenuación puede ser valorada al comparar una función biológica de una *Listeria* atenuada con la función biológica correspondiente mostrada por una *Listeria* genitora adecuada.

La presente descripción, en otras modalidades, proporciona una *Listeria* que se atenúa al tratarse con un agente que tiene como objetivo el ácido nucleico, tal como un agente reticulante, un psoralen, un nitrógeno mostaza, cis-platina, un aducto voluminoso, luz ultravioleta, irradiación gamma, cualquier combinación de los mismos, y lo similar. Típicamente, la lesión producida por una molécula de agente reticulante incluye la degradación de ambos filamentos de la doble hélice. La *Listeria* de esta descripción también puede atenuarse al mutar al menos un gen de reparación de ácido nucleico, e.g., *uvrA*, *uvrB*, *uvrC*, *uvrD*, *uvrAB*, *phrA*, y/o un gen que media la reparación de recombinación, e.g., *recA*. Además, esta descripción proporciona una *Listeria* atenuada tanto por un agente que tiene como objetivo un ácido nucleico como por mutación de un gen de reparación de ácido nucleico. Adicionalmente, esta descripción comprende el tratamiento con un agente que tiene como objetivo un ácido nucleico sensible a la luz, tal como un psoralen, y/o un agente reticulante de ácido nucleico sensible a la luz, tal como psoralen, seguido por la exposición a luz ultravioleta.

En algunas modalidades, la *Listeria* de esta descripción se atenúan. Las *Listeria* atenuadas útiles en la presente invención se describen en, e.g., las Publicaciones de Patente de Estados Unidos Nos. 2004/022887 y 2004/0197343. Se proporcionan varios ensayos para valorar si una cepa particular de *Listeria* tiene la atenuación deseada, e.g., en las Publicaciones de Patente de Estados Unidos Nos. 2004/022887, 2004/0197343, y 2005/0249748.

(d). Cepas de *Listeria*.

Esta descripción suministra un número de especies listeriales y cepas para elaborar o diseñar una *Listeria* atenuada de la presente invención (Tabla 4). La *Listeria* de la presente invención no se limitará por las especies y las cepas descritas en esta tabla.

Tabla 4. Cepas de *Listeria* adecuadas para uso en la presente invención, e.g., como una vacuna o como una fuente de ácidos nucleicos.

<i>L. monocytogenes</i> 10403S tipo silvestre	Bishop y Hinrichs (1987) <i>J. Immunol.</i> 139:2005-2009; Lauer, <i>et al.</i> (2002) <i>J. Bact.</i> 184:4177-4186.
<i>L. monocytogenes</i> DP-L4056 (fago curado). La cepa 10403S curada por profago se designa DP-L4056.	Lauer, <i>et al.</i> (2002) <i>J. Bact.</i> 184:4177-4186.

<i>L. monocytogenes</i> DP-L4027, que es DP-L2161, fago curado, suprimido en gen hly.	Lauer, <i>et al.</i> (2002) J. Bact. 184:4177-4186; Jones y Portnoy (1994) Infect. Immunity 65:5608-5613.
<i>L. monocytogenes</i> DP-L4029, que es DP-L3078, fago curado, suprimido en ActA.	Lauer, <i>et al.</i> (2002) J. Bact. 184:4177-4186; Skoble, <i>et al.</i> (2000) J. Cell Biol. 150:527-538.
<i>L. monocytogenes</i> DP-L4042 (delta PEST)	Brockstedt, <i>et al.</i> (2004) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101:13832-13837; información de apoyo.
<i>L. monocytogenes</i> DP-L4097 (LLO-S44A).	Brockstedt, <i>et al.</i> (2004) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101:13832-13837; información de apoyo.
<i>L. monocytogenes</i> DP-L4364 (delta lplA; ligasa de roteína de lipoato)	Brockstedt, <i>et al.</i> (2004) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101:13832-13837; información de apoyo.
<i>L. monocytogenes</i> DP-L4405 (delta inlA).	Brockstedt, <i>et al.</i> (2004) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101:13832-13837; información de apoyo.
<i>L. monocytogenes</i> DP-L4406 (delta inlB).	Brockstedt, <i>et al.</i> (2004) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101:13832-13837; información de apoyo.
<i>L. monocytogenes</i> CS-L0001 (delta ActA-delta inlB).	Brockstedt, <i>et al.</i> (2004) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101:13832-13837; información de apoyo.
<i>L. monocytogenes</i> CS-L0002 (delta ActA-delta lplA).	Brockstedt, <i>et al.</i> (2004) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101:13832-13837; información de apoyo.
<i>L. monocytogenes</i> CS-L0003 (L461T-delta lplA).	Brockstedt, <i>et al.</i> (2004) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101:13832-13837; información de apoyo.
<i>L. monocytogenes</i> DP-L4038 (delta ActA-LLO L461T).	Brockstedt, <i>et al.</i> (2004) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101:13832-13837; información de apoyo.
<i>L. monocytogenes</i> DP-L4384 (S44A-LLO L461T).	Brockstedt, <i>et al.</i> (2004) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101:13832-13837; información de apoyo.
<i>L. monocytogenes</i> . Mutación en ligasa de proteína de lipoato (LoIA 1).	O'Riordan, <i>et al.</i> (2003) Science 302:462-464.
<i>L. monocytogenes</i> DP-L4017 (10403S hly (L461T) mutación por puntos en gen de hemolisina.	Solicitud de Patente Provisional de Estados Unidos No. de Serie 60/490,089 presentada el 24 de Julio de 2003.
<i>L. monocytogenes</i> EGD.	No. de Acceso de GenBank AL591824.
<i>L. monocytogenes</i> EGD-e.	No. de Acceso de GenBank NC_003210. ATCC Acc. No. BAA-679.
<i>L. monocytogenes</i> cepa EGD, genoma completo, segmento 3/12	No. de Acceso de GenBank AL591975

<i>L. monocytogenes</i> .	ATCC Nos. 13932; 15313; 19111-19120; 43248-43251; 51772-51782.
<i>L. monocytogenes</i> DP-L4029 suprimida en <i>uvrAB</i> .	Solicitud de Patente Provisional de Estados Unidos No. de Serie 60/541,515 presentada el 2 de Febrero de 2004; Solicitud de Patente Provisional de Estados Unidos No. de Serie 60/490,080 presentada el 24 de Julio de 2003.
<i>L. monocytogenes</i> DP-L4029 suprimida en <i>uvrAB</i> tratada con Psoralen.	Solicitud de Patente Provisional de Estados Unidos No. de Serie 60/541,515 presentada el 2 de Febrero de 2004.
<i>L. monocytogenes</i> ActA-/inIB-doble mutante	Depositado con ATCC el 3 de Octubre de 2003. No. Acceso PTA-5562.
<i>L. monocytogenes</i> mutante <i>lplA</i> o mutante <i>hly</i>	Solicitud de Patente de Estados Unidos No. 20040013690 de Portnoy, <i>et al.</i>
<i>L. monocytogenes</i> DAL/DAT doble mutante	Solicitud de Patente de Estados Unidos No. 20050048081 de Frankel y Portnoy.
<i>L. monocytogenes</i> str. 4b F2365	No. de Acceso de GenBank 002973
<i>Listeria ivanovii</i>	No. ATCC 49954
<i>Listeria innocua</i> Clip11262.	No. de Acceso de GenBank NC_003212; AL592022.
<i>Listeria innocua</i> , una cepa hemolítica que ocurre naturalmente que contiene la aglomeración de gen de virulencia regulada por PrfA	Johnson, <i>et al.</i> (2004) Appl. Environ. Microbiol. 70:4256-4266.
<i>Listeria seeligeri</i> .	Howard <i>et al.</i> (1992) Appl. Environ. Microbiol. 58:709-712.
<i>Listeria innocua</i> con genes de isla de patogenicidad	Johnson, <i>et al.</i> (2004) Appl. Environ. Microbiol. 70:4256-4266.
<i>Listeria innocua</i> con <i>L. monocytogenes</i> gen de internalina A, como un plásmido o como un ácido nucleico genómico	Véase, e.g., Lingnau, <i>et al.</i> (1995) Infection Immunity 63:3896-3903; Gaillard, <i>et al.</i> (1991) Cell 65:1127-1141).
La presente invención comprende reactivos y métodos que comprenden las cepas listeriales anteriores, así como estas cepas que se modifican, e.g., por un plásmido y/o por integración genómica, para contener un ácido nucleico que codifica uno de, o cualquier combinación de, los siguientes genes: <i>hly</i> (LLO; listeriolisina); <i>iap</i> (p60); <i>inlA</i> ; <i>inlB</i> ; <i>inlC</i> ; <i>dal</i> (alanina racemasa); <i>daaA</i> (<i>dat</i> ; aminotransferasa de aminoácido D); <i>plcA</i> ; <i>plcB</i> ; <i>ActA</i> ; o cualquier ácido nucleico que media el crecimiento, dispersión, ruptura de una vesícula con pared única, ruptura de una vesícula con pared doble, uniéndose a una célula huésped, toma por una célula huésped. La presente invención no se limitará por las cepas particulares anteriormente descritas.	

(e). Antígenos

5 La presente descripción, en ciertas modalidades, proporciona un ácido nucleico que codifica al menos un antígeno, un antígeno con uno o más cambios conservadores, uno o más epítopes de un antígeno específico, o un péptido o polipéptido que es inmunológicamente de reactividad cruzada con un antígeno (Tabla 5). Los ácidos nucleicos y antígenos de esta descripción no se limitarán a aquellos descritos en la tabla.

Tabla 5. Antígenos.

Antígeno	Referencia
Antígenos de Tumor	
Mesotelina	No. de Acceso de GenBank NM_005823; 040434; NM_O 13404; BC003512 (véase también, e.g., Hassan, <i>et al.</i> (2004) Clin. Cancer Res. 10:3937-3942; Muminova, <i>et al.</i> (2004) BMC Cancer 4: 19; Iacobuzio-Donahue, <i>et al.</i> (2003) Cancer Res. 63:8614-8622).
Proteína asociada 1 – tumor Wilms (Wt-1) incluyendo isoforma A; isoforma B; isoforma C; isoforma D.	WT-1 isoforma A (Nos. de Acceso de GenBank NM_000378; NP_000369). WT-1 isoforma B (Nos. de Acceso de GenBank. NM_024424; NP_077742). WT-1 isoforma C (Nos. de Acceso de GenBank NM_024425; NP_077743). WT-1; isoforma D (Nos. de Acceso de GenBank NM_024426; NP_077744).
Enzima quimotriptica de del estrato córneo (SCCE), y variantes de la misma.	No. de Acceso de GenBank NM_005046; NM_139277; AF332583. Véase también, e.g., Bondurant, <i>et al.</i> (2005) Clin. Cancer Res. 11:3446-3454; Santin, <i>et al.</i> (2004) Gynecol. Oncol. 94:283-288; Shigemasa, <i>et al.</i> (2001) Int. J. Gynecol. Cancer 11:454-461; Sepehr, <i>et al.</i> (2001) Oncogene 20:7368-7374.
Proteína A relacionada a cadena de clase I MHC (MICA); proteína A relacionada a cadena clase I MHC (MICB).	Véase, e.g., Groh, <i>et al.</i> (2005) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102:6461-6466; Nos. de Acceso de GenBank NM_000247; BC_016929; AY750850; NM_005931.
Gastrina y péptidos derivados de gastrina; receptor de gastrina/CCK-2 (también conocido como CCK-B).	Harris, <i>et al.</i> (2004) Cancer Res. 64:5624-5631; Gilliam, <i>et al.</i> (2004) Eur. J. Surg. Oncol. 30:536-543; Laheru and Jaffee (2005) Nature Reviews Cancer 5:459-467.

Glipican-3 (un antígeno de, e.g., melanoma y carcinoma hepatocelular)	No. de Acceso de GenBank NM_004484. Nakatsura, <i>et al.</i> (2003) Biochem. Biophys. Res. Commun. 306: 16-25; Capurro, <i>et al.</i> (2003) Gastroenterol. 125:89-97; Nakatsura, <i>et al.</i> (2004) Clin. Cancer Res. 10:6612-6621).
Proteína tipo coactosina	Nakatsura, <i>et al.</i> (2002) Eur. J. Immunol. 32:826-836; Laheru y Jaffee (2005) Nature Reviews Cancer 5:459-467.
Antígeno de célula germinal de próstata (PSCA).	No. de Acceso de GenBank AF043498; AR026974; AR302232 (véase también, e.g., Argani, <i>et al.</i> (2001) Cancer Res. 61:4320-4324; Christiansen, <i>et al.</i> (2003) Prostate 55:9-19; Fuessel, <i>et al.</i> (2003) 23:221-228).
Fosfatasa de ácido de próstata (PAP); antígeno específico de próstata (PSA); PSM; PSMA.	Small <i>et al.</i> (2000) J. Clin. Oncol. 18:3894-3903; Altwein y Luboldt (1999) Urol. Int. 63:62-71; Chan <i>et al.</i> , (1999) Prostate 41:99-109; Ito, <i>et al.</i> (2005) Cancer 103:242-250; Schmittgen, <i>et al.</i> (2003) Int. J. Cancer 107:323-329; Millon, <i>et al.</i> (1999) Eur. Urol. 36:278-285.
Antígeno epitelial de seis transmembranas de próstata (STEAP).	Véase, e.g., Machlenkin, <i>et al.</i> (2005) Cancer Res. 65:6435-6442; No. de Acceso de GenBank NM_018234; NM_001008410; NM_182915; NM_024636; NM_012449; BC011802.
Antígeno 1 de tumor de carcinoma de próstata (PCTA-1)	Véase, e.g., Machlenkin, <i>et al.</i> (2005) Cancer Res. 65:6435-6442; No. de Acceso de GenBank L78132.
Gen-1 inductor de tumor de próstata (PTI-1)	Véase, e.g., Machlenkin, <i>et al.</i> (2005) Cancer Res. 65:6435-6442
Gen específico de próstata con homología a receptor acoplado por proteína G	Véase, e.g., Machlenkin, <i>et al.</i> (2005) Cancer Res. 65:6435-6442
Prostasa (una serina proteasa regulada por antrógeno)	Véase, e.g., Machlenkin, <i>et al.</i> (2005) Cancer Res. 65:6435-6442; No. de Acceso de GenBank BC096178; BC096176; BC096175.
Proteinasa 3.	No. de Acceso de GenBank X55668.

Antígenos de testículo con cáncer, e.g., NY-ESO-1; SCP-1; SSX-1;	No. de Acceso de GenBank NM_001327 (NY-ESO-1) (véase también, e.g., Li, <i>et al.</i> (2005) Clin. Cancer Res
SSX-2; SSX-4; GAGE, CT7, CT8; CT10; MAGE-1; MAGE-2; MAGE-3; MAGE-4; MAGE-6; LAGE-1	11:1809-1814; Chen, <i>et al.</i> (2004) Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 101(25):9363-9368; Kubuschok, <i>et al.</i> (2004) Int. J. Cancer. 109:568-575; Scanlan, <i>et al.</i> (2004) Cancer Immun. 4:1; Scanlan, <i>et al.</i> (2002) Cancer Res. 62:4041-4047; Scanlan, <i>et al.</i> (2000) Cancer Lett. 150:155-164; Dalerba, <i>et al.</i> (2001) Int. J. Cancer 93:85-90; Ries, <i>et al.</i> (2005) Int. J. Oncol. 26:817-824.
MAGE-A1, MAGE-A2; MAGE-A3; MAGE-A4; MAGE-A6; MAGE-A9; MAGE-A10; MAGE-A12; GAGE-3/6; NT-SAR-35; BAGE; CA125.	Otte, <i>et al.</i> (2001) Cancer Res 61:6682-6687; Lee, <i>et al.</i> (2003) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100:2651-2656; Sarcevic, <i>et al.</i> (2003) Oncology 64:443-449; Lin, <i>et al.</i> (2004) Clin. Cancer Res. 10:5708-5716.
GAGE-1; GAGE-2; GAGE-3; GAGE-4; GAGE-5; GAGE-6; GAGE-7; GAGE-8; GAGE-65; GAGE-11; GAGE-13; GAGE-7B.	De Backer, <i>et al.</i> (1999) Cancer Res. 59:3157-3165; Scarcella, <i>et al.</i> (1999) Clin. Cancer Res. 5:335-341.
HIP1R; LMNA; K1AA1416; Seb4D; KNSL6; TRIP4; MBD2; HCAC5; MAGEA3.	Scanlan, <i>et al.</i> (2002) Cancer Res. 62:4041-4047.
Familia de genes DAM, e.g., DAM-1; DAM-6.	Fleishhauer, <i>et al.</i> (1998) Cancer Res. 58:2969-2972.
RCAS1.	Enjoji, <i>et al.</i> (2004) Dig. Dis. Sci. 49:1654-1656.
RU2.	Van Den Eynde, <i>et al.</i> (1999) J. Exp. Med. 190:1793-1800.
CAMEL.	Slager <i>et al.</i> (2004) J. Immunol. 172:5095-5102; Slager, <i>et al.</i> (2004) Cancer Gene Ther. 11:227-236.
Antígenos asociados al cáncer de colón, e.g., NY-CO-8; NY-CO-9; NY-CO-13; NY-CO-16; NY-CO-20; NY-CO-38; NY-CO-45; NY-CO-9/HDAC5; NY-CO-41/MBD2; NY-CO-42/TRIP4; NY-CO-95/KIAA1416; KNSL6; seb4D.	Scanlan, <i>et al.</i> (2002) Cancer Res. 62:404 t-4047.
N-Acetilglucosaminil-transferasa V (GnT-V).	Dosaka-Akita, <i>et al.</i> (2004) Clin. Cancer Res. 10:1773-1779.

Factor de alargamiento 2 mutado (ELF2M).	Renkvist, et al. (2001) Cancer Immunol Immunother. 50:3-15.
HOM-MEL-40/SSX2	Neumann, et al. (2004) Int. J. Cancer 112:661-668; Scanlan, et al. (2000) Cancer Lett. 150:155-164.
BRDT.	Scanlan, et al. (2000) Cancer Lett. 150:155-164.
SAGE; HAGE.	Sasaki, et al. (2003) Eur. J. Surg. Oncol. 29:900-903.
RAGE.	Véase, e.g., Li, et al. (2004) Am. J. Pathol. 164:1389-1397; Shirasawa, et al. (2004) Genes to Cells 9:165-174.
MUM-1 (melanoma ubicuo mutado); MUM-2; MUM-2 mutación Arg-Gly; MUM-3.	Gueguen, et al. (1998) J. Immunol. 160:6188-6194; Hirose, et al. (2005) Int. J. Hematol. 81:48-57; Baurain, et al. (2000) J. Immunol. 164:6057-6066; Chiari, et al. (1999) Cancer Res. 59:5785-5792.
Antígeno de proteína de fusión LDLR/FUT de melanoma	Wang, et al. (1999) J. Exp. Med. 189:1659-1667.
Serie NY-REN de antígenos de cáncer renal	Scanlan, et al. (2002) Cancer Res. 62:4041-4047; Scanlan, et al. (1999) Cancer Res. 59:456-464.
Serie NY-BR de antígenos de cáncer de mama, e.g. NY-BR-62; NY-BR-75; NY-BR-85; NY-BR-62; NY-BR-85.	Scanlan, et al. (2002) Cancer Res. 62:4041-4047; Scanlan, et al. (2001) Cancer Immunity 1:4.
BRCA-1; BRCA-2.	Stolier, et al. (2004) Breast J. 10:475-480; Nicoletto, et al. (2001) Cancer Treat Rev. 27:295-304.
Proteína de fusión DEK/CAN	von Lindern, et al. (1992) Mol. Cell. Biol. 12:1687-1697.
Ras, e.g., ras tipo silvestre, ras con mutaciones en codón 12, 13, 59 o 61, e.g., mutaciones G12C; G12D; G12R; G12S; G12V; G13D; A59T; Q61H. K-RAS; H-RAS; N-RAS.	Nos. de Acceso de GenBank P01112; P01116; M54969; M54968; P01111; P01112; K00654. Véase también, e.g., Nos. de Acceso de GenBank M26261; M34904; K01519; K01520; BC006499; NM_006270; NM_002890; NM_004985; NM_033360; NM_176795; NM_005343.

BRAF (una isoforma de RAF).	Tannapfel, et al. (2005) Am. J. Clin. Pathol. 123:256-2601; Tsao and Sober (2005) Dermatol. Clin. 23:323-333.
Antígenos de melanoma, incluyendo antígenos de célula melanoma HST-2.	No. de Acceso de GenBank NM_206956; NM_206955; NM_206954; NM_206953; NM_0061 IS; NM_005367; NM_004988; AY 148486; UI0340; UI0339; M7748I. Véase, e.g., Suzuki, et al. (1999) J. Immunol. 163:2783-2791.
Survivina	GenBank Acc; No. A B028869; U75285 (véase también, e.g., Tsuruma, et al. (2004) J. Translational Med. 2:19 (11 pages); Pisarev, et al. (2003) Clin. Cancer Res. 9:6523-6533; Siegel, et al. (2003) Br. J. Haematol. 122:911- 914; Andersen, et al. (2002) Histol. Histopathol. 17:669-675).
MDM-2	NM_002392; NM_006878 (véase también, e.g., Mayo, et al. (1997) Cancer Res. 57:5013-5016; Demidenko and Blagosklonny (2004) Cancer Res. 64:3653-3660).
Proteínas de enlace Metil-CpG (MeCP2; MBD2).	Muller, et al. (2003) Br. J. Cancer 89:1934-1939; Fang, et al. (2004) World J. Gastroenterol. 10:3394-3398.
NA88-A	Moreau-Aubry, et al. (2000) J. Exp. Med. 191:1617-1624.
Desacetilasas de histona (HDAC), e.g., HDAC5.	Waltregny, et al. (2004) Eur. J. Histochem. 48:273-290; Scanlan, et al. (2002) Cancer Res. 62:4041-4047.
Ciclofilina B (Cyp-B).	Tarnura, et al. (2001) Jpn. J. Cancer Res. 92:762-767.
CA 15-3; CA 27.29.	Clinton, et al.; (2003) Biomed. Sci. Instrum. 39:408-414.
Proteína de choque térmico Hsp70.	Faure, et al. (2004) Int. J. Cancer 108:863-870.
Familia GAGE/PAGE, e.g., PAGE-1; PAGE-2; PAGE-3; PAGE-4; XAGE-1; XAGE-2; XAGE-3.	Brinkmann, et al. (1999) Cancer Res. 59:1445-1448.

Familias MAGE-A, B, C y D. MAGE-B5; MAGE-B6; MAGE-C2; MAGE-C3; MAGE-3; MAGE-6.	Lucas, et al. (2000) Int. J. Cancer 87:55-60; Scanlan, et al. (2001) Cancer Immun. 1:4.
Cinesina 2; factor modulador 1 de elemento TATA; proteína de tumor D53; NY	Scanlan, et al. (2001) Cancer Immun. 30:1-4;
Alfa-fetoproteína (AFP)	Grimm, et al. (2000) Gastroenterol. 119:1104-1112.
SART1; SART2; SART3; ART4.	Kumamuru, et al. (2004) Int. J. Cancer 108:686-695; Sasatomi, et al. (2002) Cancer 94:1636-1641; Matsumoto, et al. (1998) Jpn. J. Cancer Res. 89:1292-1295; Tanaka, et al. (2000) Jpn. J. Cancer Res. 91:1177-1184.
Antígeno preferentemente expresado de melanoma (PRAME).	Matsushita, et al. (2003) Leuk. Lymphoma 44:439-444; Oberthuer, et al. (2004) Clin. Cancer Res. 10:4307-4313.
Antígeno carcinoembrionario (CEA), péptido de combatiente reforzador CAP1-6D	No. de Acceso de GenBank M29540; E03352; X98311; M17303 (véase también, e.g., Zaremba (1997) Cancer Res. 57:4570-4577; Sarobe, et al. (2004) Curr. Cancer Drug Targets 4:443-454; Tsang, et al. (1997) Clin. Cancer Res. 3:2439-2449; Fong, et al. (2001) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98:8809-8814).
HER-2/neu.	Disis, et al. (2004) J. Clin. Immunol. 24:571-578; Disis y Cheever (1997) Adv. Cancer Res. 71:343-371.
cdk4; cdk6; p16 (INK4); proteína Rb	Ghazizadeh, et al. (2005) Respiration 72:68-73; Ericson, et al. (2003) Mol. Cancer Res. 1:654-664.
TEL; AML1; TEL/AML1.	Stams, et al. (2005) Clin. Cancer Res. 11:2974-2980.
Telomerasa (TERT).	Nair, et al. (2000) Nat. Med. 6:1011-1017.
707-AP.	Takahashi, et al. (1997) Clin. Cancer Res. 3:1363-1370.
Anexia, e.g., Anexina II.	Zimmerman, et al. (2004) Virchows Arch. 445:368-374.

BCR/ABL; BCR/ABL-p210; BCR/ABL p190; CML-66; CML-28.	Cobaldda, et al. (2000) Blood 95:1007-1013; Hakansson, et al. (2004) Leukemia 18:538-547; Schwartz, et al. (2003) Semin. Hematol. 40:87-96; Lim, et al. (1999) Int. J. Mol. Med. 4:665-667.
BCL2; BLC6; proteína CD10.	Iqbal, et al. (2004) Am. J. Pathol. 165:159-166.
CDC27 (este es un antígeno de melanoma)	Wang, et al. (1999) Science 284: 1351-1354
Proteína 17 de esperma (SP17); 14-3-3-zeta; MEMD; KIAA0471; TC21	Arora, et al. (2005) Mol. Catcinog. 42:97-108
Proteínas 1 y 2 relacionadas a tirosinasa (TRP-1 y TRP-2)	No. de Acceso de GenBank N_001922. (véase también, e.g., Bronte, et al. (2000) Cancer Res. 60:253-258).
gp100/pmel-17	Nos. de Acceso de GenBank AH003567; U31798; U31799; U31807; U31799 (véase también, e.g., Bronte, et al. (2000) Cancer Res. 60:253-258).
TARP.	Véase, e.g., Clifton, et al. (2004) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101:10166-10171; Virok, et al. (2005) Infection Immunity 73:1939-1946
Proteínas 1 y 2 relacionadas a tirosinasa (TRP-1 y TRP-2)	No. de Acceso de GenBank NM_001922. (véase también, e.g., Bronte, et al. (2000) Cancer Res. 60:253-258).
Receptor de melanocortina 1 (MC1R); MAGE-3; gp100; tirosinasa; dopacromo tautomerasa (TRP-2); MART-1	Salazar-Onfray, et al. (1997) Cancer Res. 57:4348-4355; Reynolds, et al. (1998) J. Immunol. 161:6970-6976; Chang, et al. (2002) Clin. Cancer Res. 8:1021-1032.
MUC-1; MUC-2.	Véase, e.g., Davies, et al. (1994) Cancer Lett. 82:179-184; Gambus, et al. (1995) Int. J. Cancer 60:146-148; McCool, et al. (1999) Biochem. J. 341:593-600.
Spas-1.	Solicitud de Patente Publicada de Estados Unidos No. 20020150588 de Allison, et al.

CASP-8; FLICE; MACH.	Mandruzzato, et al. (1997) J. Exp. Med. 186:785-793.
CEACAM6; CAP-1	Duxbwy, et al. (2004) Biochem. Biophys. Res. Commun. 317:837-843; Morse, et al. (1999) Clin. Cancer Res. 5:1331-1338.
HMGB1 (una proteína de enlace de ADN y citosina).	Brezniceanu, et al. (2003) FASEB J. 17:1295-1297.
ETV6/AML1.	Codrington, et al. (2000) Br. J. Haematol. 111:1071-1079.
Formas mutantes y de tipo silvestre de poliposis adenomatosa coli (APC); beta-catenina; c-met; p53; E-cadherina; ciclooxigenasa-2 (COX-2).	Clements, et al. (2003) Clin. Colorectal Cancer 3:113-120; Gulmann, et al. (2003) Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol. 11:230-237; Jungck, et al. (2004) Int. J. Colorectal. Dis. 19:438-445; Wang, et al. (2004) J. Surg. Res. 120:242-248; Abutally, et al. (2003) J. Pathol. 201:355-362; Liang, et al. (2004) Br. J. Surg. 91:355-361; Shirakawa, et al. (2004) Clin. Cancer Res. 10:4342-4348.
Antígeno de carcinoma de célula renal unida por mAB G250.	Mulders, et al. (2003) Urol. Clin. North Am. 30:455-465; Steffens, et al. (1999) Anticancer Res. 19:1197-1200.
Antígenos <i>Francisella tularensis</i>	
<i>Francisella tularensis</i> A Y B.	Genoma completo de subespecie Schu S4 (No. de Acceso de GenBank AJ749949); de subespecie Schu 4 (No. de Acceso de GenBank NC_006570). Outer membrane protein (43 kDa) Bevanger, et al. (1988) J. Clin. Microbiol. 27:922-926; Porsch-Ozcuremez, et al. (2004) Clin. Diagnostic. Lab. Immunol. 11:1008-1015). Los componentes antigénicos de <i>F. tularensis</i> incluyen, e.g., 80 antígenos, incluyendo 10 kDa and 60 kDa chaperoninas (Havlasova, et al. (2002) Proteomics 2:857-86), cinasa de difosfato de nucleósido, deshidrogenasa de isocitrato, proteína de enlace de
	ARN Hfq, la chaperona C1pB (Havlasova, et al. (2005) Proteomics 5:2090-2103). Véase también, e.g., Oyston y Quarry (2005) Antonie Van Leeuwenhoek 87:277-281; Isherwood, et al. (2005) Adv. Drug Deliv. Rev. 57:1403-1414; Biagini, et al. (2005) Anal. Bioanal. Chem. 382:1027-1034.
Antígenos Malaria	
Proteína circumsporozoito (CSP); SSP2; HEP17; ortólogos Exp-1 encontrados en <i>P. falciparum</i> ; y LSA-1.	Véase, e.g., Haddad, et al. (2004) Infection Immunity 72:1594-1602; Hoffinan, et al. (1997) Vaccine 15:842-845; Oliveira-Ferreira y Daniel-Ribeiro (2001) Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Río de Janeiro 96:221- 227. CSP (véase, e.g., No. de Acceso de GenBank ABI21024). SSP2 (véase, e.g., No. de Acceso de GenBank AF249739). LSA-1 (véase, e.g., No. de Acceso de GenBank Z30319).

Proteína surface de eritrocio infectado anular (RESA); proteína 2 de superficie de merozoito (MSP2); Spf66; proteína 1 de superficie de merozoito (MSP1); 195A; BVp42.	Véase, e.g., Stimadel, et al. (2000) Int. J. Epidemiol. 29:579-586; Krzych, et al. (1995) J. Immunol. 155:4072-4077. Véase también, Good, et al. (2004) Immunol. Rev. 201:254-267; Good, et al. (2004) Ann. Rev. Immunol. 23:69-99. MSP2 (véase, e.g., No. de Acceso de GenBank X96399; X96397). MSPI (véase, e.g., No. de Acceso de GenBank X03371). RESA (véase, e.g., GenBank. Acc. No. X05181; X05182).
Antígeno 1 de membrana apical (AMA1).	Véase, e.g., Gupta, et al. (2005) Protein Expr. Purif. 41: 186-198. AMA1 (véase, e.g., No. de Acceso de GenBank A' 13; AJ494905; AJ490565).
Virus y antígenos virales	
Hepatitis A	GenBank Acc. Nos., e.g., NC_001489; AY644670; X83302; K02990; M14707.
Hepatitis B	Genoma completo (véase, e.g., Nos. de Acceso de GenBank AB214516; NC_003977; AB205192; AB205191; AB205190; AJ748098; AB198079; AB198078; AB198076; AB074756).
Hepatitis C	Genoma completo (véase, e.g., Nos. de Acceso de GenBank NC_004102; AJ238800; AJ238799; AJ132997; AJ132996; AJ000009; D84263).
Hepatitis D	Nos. de Acceso de GenBank, e.g. NC_001653; ABI18847; AY261457.
Virus de papiloma humano incluyendo todos los subtipos 200+ (clasificados en 16 grupos), tales como los subtipos de alto riesgo 16, 18, 30, 31, 33, 45.	Véase, e.g., Trimble, et al. (2003) Vaccine 21:4036-4042; Kim, et al. (2004) Gene Ther. 11:1011-1018; Simon, et al. (2003) Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol. 109:219-223; Jung, et al. (2004) J. Microbio J. 42:255-266; Damasus-Awatai y Freeman-Wang (2003) Curr. Opin. Obstet. Gynecol. 15:473-477; Jansen y Shaw (2004) Annu. Rev. Med. 55:319-331; Roden y Wu (2003) Expert Rev. Vaccines. 2:495-516;
	de Villiers, et al. (2004) Virology 324:17-24; Hussain y Paterson (2005) Cancer Immunol. Immunother. 54:577-586; Molijn, et al. (2005) J. Clin. Virol. 32 (Suppl. 1) S43-SS I. Nos. de Acceso de GenBank AY686584; AY686583; AY686582; NC_006169; NC_006168; NC_006164; NC_001355; NC_001349; NC_005351; NC_001596).
Virus linfotrópico de célula T humana (HTLV) tipos I y II, incluyendo los tipo I HTLV subtipos Cosmpolita, Africa Central, y Austro-Melanesio, y los HTLV tipo II subtipos IIa, IIb, IIc, y IIId.	Véase, e.g., Capdepon, et al. (2005) AIDS Res. Hum. Retrovirus 21:28-42; Bhigjee, et al. (1999) AIDS Res. Hum. Restrovirus 15:1229-1233; Vandamme, et al. (1998) J. Virol. 72:4327-4340; (1996) J. Acquir. Immune Defic. Syndr. Hum. Retrovirol. 13:384-391. HTLV tipo I (véase, e.g., Nos. de acceso de GenBank AY563954; AY563953. HTLV tipo II (véase, e.g., Nos. de Acceso de GenBank L03561; Y13051; AF139382).
Coronaviridae, incluyendo Coronavirus, tales como coronavirus SARS (SARS-CoV), y Torovirus	Véase, e.g., Brian y Baric (2005) Curr. Top. Microbiol. Immunol. 287:1-30; Gonzalez, et al. (2003) Arch. Virol. 148:2207-2235; Smits, et al. (2003) J. Virol. 77:9567-9577; Jamieson, et al. (1998) 1.Infect. Dis. 178:1263-1269 (Nos. de Acceso de GenBank AY348314; NC_004718; AY394850).
Virus de rubeola	Nos. de Acceso de GenBank NC_00154S; AF435866
Virus de paperas, incluyendo los genotipos A, C, D, G, H e I.	Véase, e.g., Orvell, et al. (2002) J. Gen. Virol. 83:2489-2496. Véase, e.g., Nos. de Acceso de GenBank AY681495; NC_002200; AY685921; AF201473.
Virus de Coxsackie A incluyendo los serotipos 1, 11, 13, 15, 17, 18, 19, 20,	Véase, e.g., Brown, et al. (2003) J. Virol. 77:8973-8984. Nos. de Acceso de GenBank AY421768; AY790926; X67706.

21, 22 y 24 (también conocidos como enterovirus humano C; HEV-C).	
Virus de Coxsackie B, incluyendo los subtipos 1-6.	Véase, e.g., Ahn, et al. (2005) J. Med. Virol. 75:290-294; Patel, et al. (2004) J. Virol. Methods 120:167-172; Rezig, et al. (2004) J. Med. Virol. 72:268-274. No. de Acceso de GenBank X05690.
Enterovirus humano incluyendo, e.g., enterovirus humano A (HEV-A, CAV2 a CAV8, CAV10, CAV12, CAV14, CAV16, y EV71) y también incluyendo HEV-B (CAV9, CBV1 a CBV6, E1 a E7, E9, E11 a E21, E24 a E27, E29 a E33 y EV69 y E73), así como HEV.	Véase, e.g., Oberste, et al. (2004) J. Virol. 78:855-867. Enterovirus A humano (Nos. de Acceso de GenBank NC_001612); enterovirus B humano (NC_001472); enterovirus C humano (NC_001428); enterovirus D humano (NC_001430). Enterovirus A de simio (No. de Acceso de GenBank NC_003988).
Poliovirus incluyendo PV1, PV2 y PV3.	Véase, e.g., He, et al. (2003) J. Virol. 77:4827-4835; Hahsido, et al. (1999) Microbiol. Immunol. 43:73-77. No. de Acceso de GenBank AJ132961 (tipo 1); AY278550 (tipo 2); X04468 (tipo 3).
Encefalitis virales, virus, incluyendo encefalitis de equino, encefalitis de equino venezolano (VEE) (incluyendo los subtipos IA, IB, IC, ID, IIIC, IIID), encefalitis de equino oriental (EEE), encefalitis de equino occidental (WEE), encefalitis de San Luis, encefalitis de Valle Murray (Australia), encefalitis japonesa y encefalitis nacido por garrapata	Véase, e.g., Hoke (2005) Mil. Med. 170:92-105; Estrada-Franco, et al. (2004) Emerg. Infect. Dis. 10:2113-2121; Das, et al. (2004) Antiviral Res. 64:85-92; Aguilar, et al. (2004) Emerg. Infect. Dis. 10:880-888; Weaver, et al. (2004) Arch. Virol. Suppl. 18:43-64; Weaver, et al. (2004) Annu. Rev. Entorno. 49:141-174. Encefalitis de equino Oriental (No. de Acceso de GenBank NC_003899; AY722102); Encefalitis de equino Occidental (NC_003908).
Virus de herpes humano, incluyendo citomegalovirus (CMV), virus de Epstein-Barr (EBV), virus de herpes	Véase, e.g., Sttidahl, et al. (2000) Scand. J. Infect. Dis. 32:237-248; Padilla, et al. (2003) J. Med. Virol. 70 (Suppl. 1) 8103-SI 10; Jaikittivong y Langlais
humano 1, (HHV-1), HHV-2, HHV-3, HHV-4, HHV-5, HHV-6, HHV-7, HHV-8, virus de herpes B, virus simple de herpes tipos 1 y 2 (HSV-1, HSV-2), y virus de varicela zoster (VZV).	(1998) Oral Surg. Oral Med. 85:399-403. Nos. de GenBank NC_001806 (virus de herpes 1); NC:001798 (virus de herpes 2); X04370 y NC_001348 (virus de herpes 3); NC_OO 1345 (virus de herpes 4); NC_001347 (virus de herpes 5); X83413 y NC_000898 (virus de herpes 6); NC_001716 (virus de herpes 7). Virus de herpes humano tipos 6 y 7 (HHV-6; HHV-7) se describen por, e.g., Padilla, et al. (2003) J. Med. Virol. 70 (Suppl. 1)S103-S110. Virus de herpes humano 8 (HHV-8), incluyendo los subtipos A-E, se describen en, e.g., Treumicht, et al. (2002) J. Med. Virol. 66:235-240.
VIH-1 incluyendo grupo M (incluyendo subtipos A a J) y grupo O (incluyendo cualquiera	Véase, e.g., Smith, et al. (1998) J. Med. Virol. 56:264-268. Véase también, e.g., Nos. de Acceso de GenBank DQ054367; NC_001802; AY9683
de los subtipos distinguibles) (VIH-2, incluyendo subtipos A-E).	I 2; DQ011180; DQ011179; DQ011178; DQ011177; AY588971; AY588970; AY781127; AY781126; AY970950; AY970949; AY970948; X61240; AJ006287; AJ508597; y AJ508596.
Virus de Epstein-Barr (EBV), incluyendo los subtipos A y B.	Véase, e.g., Peh, et al. (2002) Pathology 34:446-450. Virus de Epstein-Barr cepa B95-8 (No. de Acceso de GenBank V01555).
Reovirus, incluyendo los serotipos y cepas 1, 2, y 3, tipo 1 Lang, tipo 2 Jones, y tipo 3 Dearing.	Véase, e.g., Barthold, et al. (1993) Lab. Anim. Sci. 43:425-430; Roner, et al. (1995) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:12362-12366; Kedl, et al. (1995) J. Virol. 69:552-559. No. de Acceso de GenBank K02739

	(proteína de superficie de gen sigma-3).
Citomegalovirus (CMV) subtipos que incluyen CMV subtipos I-VII.	Véase, e.g., Chern, et al. (1998) J. Infect. Dis. 178:1149-1153; Vilas Boas, et al. (2003) J. Med. Virol. 71:404-407; Trincado, et al. (2000) J. Med. Virol. 61:481-487. No. de Acceso de GenBank X17403.
Rinovirus incluyendo todos los serotipos.	Rinovirus humano 2 (No. de Acceso de GenBank X02316); Rinovirus humano B (No. de Acceso de GenBank NC_OOI490); Rinovirus humano 89 (No. de Acceso de GenBank NC_001617); Rinovirus humano 39 (No. de Acceso de GenBank AY751783).
Adenovirus, incluyendo todos los serotipos	AY803294; NC_004001; AC_000019; AC_000018; AC_000017; AC_OOOOIS; AC_000008; AC_000007; AC_OOOQ06; AC_OOOOOS; AY737798; AY737797; NC_003266; NC_002067; AY594256; AY594254; AY875648; AJ854486; AY163756; AY594255; AY594253; NC_001460 NC_001405; AY598970; AY458656; AY487947; NC_001454; AF534906; AY45969; AY128640; L19443; AY339865; AF532578.
Virus de varicela zoster incluyendo las cepas y genotipos Oka, Dumas, Europea, Japonesa, y Mosaico.	Véase, e.g., Loparev, et al. (2004) J. Virol. 78:8349-8358; Carr, et al. (2004) J. Med. Virol. 73:131-136; Takayama and Takayama (2004) J. Clin. Virol. 29:113-119.
Filovirus, incluyendo virus de Marburg y virus de Ebola, y cepas tales como Ebola-Sudán (EBO-S), Ebola-Zaire (EBO-Z), y Ebola-Reston (EBO-R).	Véase, e.g., Geisbert y Jahrling (1995) Virus Res. 39:129-150; Hutchinson, et al. (2001) J. Med. Virol. 65:561-566. Virus de Marburg (véase, e.g., No. de Acceso de GenBank NC_001608). Virus de Ebola (véase, e.g., Nos. de Acceso de GenBank NC_006432; AY769362; NC_002549; AF272001; AF086833).
Arenavirus, incluyendo virus coriomeningitis linfocítico (LCM), virus de Lassa, virus de Junin, y virus de Machupo	Virus de Jinus, segmento S (No. de Acceso de GenBank NC_005081); virus de Junin virus, segmento L (No. de Acceso de GenBank NC_005080).
Virus de Rabia	Véase, e.g., Nos. de Acceso de GenBank NC_001542; AY956319; AY705373; AF499686; AB_128149; AB085828; AB009663.
Arbovirus, incluyendo virus de Nilo Oeste, Virus de Dengue 1 a 4, virus de fiebre por	Virus de Dengue tipo 1 (véase, e.g., Nos. de Acceso de GenBank AB_195673; AY762084). Virus de Dengue tipo 2 (véase, e.g.,
garrapata de Colorado, virus de Sindbis, Togaviridae, Flaviviridae, Bunyaviridae, Reoviridae, Rhabdoviridae, Orthomyxoviridae, y lo similar.	Nos. de Acceso de GenBank NC_001474; AY702040; AY702039; AY702037). Virus de Dengue tipo 3 (véase, e.g., Nos. de Acceso de GenBank AY923865; AT858043). Virus de Dengue tipo 4 (véase, e.g., Nos. de Acceso de GenBank AY947539; AY947539; AF326573). Virus de Sindbis (véase e.g., Nos. de Acceso de GenBank NC_001547; AF429428; J02363; AF103728). Virus de Nilo Oeste (véase, e.g., Nos. de Acceso de GenBank NC_001563; AY603654).
Poxvirus incluyendo orthopoxvirus (virus de viruela, virus de viruela de los simios, virus de vacuna, virus del ganado), yatapoxvirus (virus tanapox, virus de tumor de mono Yaba), parapoxvirus, y molluscipoxvirus.	Virus de viruela (véase, e.g., Nos. de Acceso de GenBank NC_001611; Y16780; X72086; X69198).
Fiebre amarilla	Véase, e.g., No. de Acceso de GenBank NC_002031; AY640589; X03700.
Hantavirus, incluyendo serotipos Hantaan (HTN), Seul (SEO), Dobrava	Véase, e.g., Elgh, et al. (1997) J. Clin. Microbiol. 35:1122-1130; Sjolander, et al. (2002) Epidemiol. Infect. 128:99-103; Zeier, et al.

(DOB), Sin Nombre (SN), Puumala (PUU) y Saaremaa tipo Dobrava (SAAV).	(2005) Virus Genes 30:157-180. No. de Acceso de GenBank NC_005222 y NC_005219 (Hantavirus). Véase también, e.g., Nos. de Acceso de GenBank NC_005218; NC_005222; NC_005219.
Flavivirus, incluyendo virus de Dengue, virus de encefalitis Japonesa, virus de Nilo Oeste, y virus de Fiebre amarilla.	Véase, e.g., Mukhopadhyay, et al. (2005) Nature Rev. Microbiol. 3:13-22. Nos. de Acceso de GenBank NC_001474 y AY702040 (Dengue). Nos. de Acceso de GenBank NC_001563 y AY603654.
Virus de sarampión	Véase, e.g., Nos. de Acceso de GenBank AB040874 y AY486084.
Virus de parainfluenza humana (HPV), incluyendo HPV tipos 1-56.	Virus de parainfluenza humana 2 (véase, e.g., Nos. de Acceso de GenBank AB 176531; NC003443). Virus de parainfluenza humana 3 (véase, e.g., No. de Acceso de GenBank NC_001796).
Virus de influenza, incluyendo virus de influenza tipos A, B, y C.	Nucleocápsida de influenza (véase, e.g., No. de Acceso de GenBank AY626145). Hemaglutinina de influenza (véase, e.g., Nos. de Acceso de GenBank AY627885; AY555153). Neuraminidasa de influenza (véase, e.g., Nos. de Acceso de GenBank AY555151; AY577316). Proteína de matriz de influenza 2 (véase, e.g., Nos. de Acceso de GenBank AY626144. Proteína básica de influenza 1 (véase, e.g., No. de Acceso de GenBank AY627897). Proteína de ácido de polimerasa de influenza (véase, e.g., No. de Acceso de GenBank AY627896). Nucleoproteína de influenza (véase, e.g., No. de Acceso de GenBank AY627895).
Virus de influenza A, subtipos, e.g., virus de cerdo (SV):	Hemaglutinina de H1N1 (No. de Acceso de GenBank 867220). Proteína de matriz de virus de influenza A (No. de Acceso de
influenza A H1N1 y virus de influenza de cerdo	GenBank AY700216). Nucleoproteína H5H1 de virus de influenza A (No. de Acceso de GenBank AY646426). Hemaglutinina H1N1 (No. de Acceso de GenBank 000837). Véase también, Nos. de Acceso de GenBank BD006058; 80006055; 80006052. Véase también, e.g., Wentworth, et al. (1994) J. Virol. 68:2051-2058; Wells, et al. (1991) J.A.M.A. 265:418-481.
Virus sincitial respiratorio (RSV), incluyendo subgrupo A y subgrupo B.	Virus sincitial respiratorio (RSV) (véase, e.g., Nos. de Acceso de GenBank AY353550; NC 001803; NC001781).
Rotavirus, incluyendo rotavirus humano A a E, rotavirus de bovino, rotavirus de mono Rhesus, y reordenamientos de RVV humano.	Rotavirus humano C segmento 8 (No. de Acceso de GenBank AJ549087); rotavirus humano proteína cápsida exterior cepa G9 (véase, e.g., No. de Acceso de GenBank DQ056300); rotavirus humano proteína no estructural cepa 4 (véase, e.g., No. de
	Acceso de GenBank AY548957); rotavirus humano proteína cápsida interior mayor cepa A (véase, e.g., No. de Acceso de GenBank AY601554).
Poliomavirus, incluyendo virus de simio 40 (SV40), virus JC (JCV) y virus BK (BKV).	Véase, e.g., Engels, et al. (2004) J. Infect. Dis. 190:2065-2069; Vilchez y Butel (2004) Clin. Microbiol. Rev. 17:495-508; Shivapurkar, et al. (2004) Cancer Res. 64:3757-3760; Carbone, et al. (2003) Oncogene 2:5173-5180; Barbanti-Brodano, et al. (2004) Virology 318: 1-9) (SV40 genoma completo en, e.g., Nos. de Acceso de GenBank NC_001669; AF168994; AY271817; AY271816; AY120890; AF3453M; AF332562).

Coltivirus, incluyendo virus de fiebre por garrapata de Colorado, virus Eyach	Attoui, et al. (1998) J. Gen. Virol. 79:2481-2489. Segmentos de virus Eyach (véase, e.g., Nos. de Acceso de GenBank AF282475; AF282472; AF282473; AF282478; AF282476; NC_003707; NC_003702;
	NC_003703; NC_003704; NC_003705; NC_003696; NC_003697; NC_003698; NC_003699; NC_003701; NC_003706; NC_003700; AF282471; AF282477).
Calculus, incluyendo los genogrupos Norovirus, grupo de Montaña Roca (SMA), y Saaporo.	Virus de Montaña Roca (véase, e.g., No. de Acceso de GenBank AY134748).
Parvoviridae, incluyendo dependovirus, parvovirus (incluyendo parvovirus B19) y eritrovirus.	Véase, e.g., Brown (2004) Dev. Biol. (Basel) 118:71-77; Alvarez-Lafuente, et al. (2005) Ann. Rheum. Dis. 64:780-782; Ziyaeyan, et al. (2005) Jpn. J. Infect. Dis. 58:95-97; Kaufman, et al. (2005) Virology 332:189-198.
La presente descripción proporciona, pero no se limita por, una <i>Listeria</i> atenuada que comprende un ácido nucleico que codifica al menos uno de los antígenos anteriormente exhibidos, o al menos un antígeno codificado por uno de los genomas completos anteriormente exhibidos. La presente descripción comprende ácidos nucleicos que codifican los mutantes, las muteínas, variantes de empalme, fragmentos, variantes truncadas,	
variantes solubles, dominios extracelulares, dominios intracelulares, secuencias maduras, y lo similar, de los antígenos exhibidos. Se proporcionan ácidos nucleicos que codifican los epítopes, oligo- y polipéptidos de estos antígenos. También se proporcionan las modalidades optimizadas por codón, es decir, optimizadas para la expresión en <i>Listeria</i> .	

- En algunas modalidades, el antígeno es no Listerial. En algunas modalidades, el antígeno es de una célula cancerígena, tumor, o agente infeccioso. En algunas modalidades, el antígeno se deriva de un antígeno de una célula cancerígena, tumor, o agente infeccioso. En algunas modalidades, un antígeno que se "deriva de" otro antígeno es un fragmento u otro derivado del antígeno. En algunas modalidades, el antígeno derivado comprende un fragmento de al menos 8 aminoácidos, al menos 12 aminoácidos, al menos 20 aminoácidos, al menos 50 aminoácidos, al menos 75 aminoácidos, al menos 100 aminoácidos, o al menos 200 aminoácidos. En algunas modalidades, el derivado del antígeno tiene al menos aproximadamente 80% de identidad de secuencia, al menos aproximadamente 85% de identidad de secuencia, al menos 90% de identidad de secuencia, al menos aproximadamente 95% de identidad de secuencia, o al menos aproximadamente 98% de identidad de secuencia al antígeno del cual se deriva, o un fragmento del mismo. En algunas modalidades, un antígeno derivado comprende un antígeno suprimido de su secuencia de señal y/o membrana sujetadora. En algunas modalidades, un antígeno derivado de otro antígeno comprende al menos un epítipo MHC clase I y/o al menos un epítipo MHC clase II del antígeno original (longitud completa). En algunas modalidades, el antígeno es un antígeno tumoral. Los ensayos para probar la inmunogenicidad de antígenos se describen en la presente y son muy conocidos en la materia.

En algunas modalidades, el antígeno heterólogo es un antígeno tumoral humano o un antígeno derivado de un antígeno tumoral humano. En algunas modalidades, el antígeno derivado de un antígeno tumoral consiste de una secuencia de aminoácidos que describe al menos aproximadamente 65% de identidad de secuencia al antígeno

tumoral, al menos 70% de identidad de secuencia al antígeno tumoral, o al menos aproximadamente 75% de identidad de secuencia al antígeno tumoral. En algunas modalidades, el antígeno derivado consiste de una secuencia de aminoácidos que describe al menos 85% de identidad de secuencia al antígeno tumoral, al menos 90% de identidad de secuencia al antígeno tumoral, o al menos 95% de identidad de secuencia al antígeno tumoral. En algunas modalidades, el antígeno derivado del antígeno tumoral comprende al menos 10, 20, 30, 40, 50, 75, 100 o 200 aminoácidos del antígeno tumoral. En algunas modalidades, el antígeno derivado del antígeno tumoral consiste de al menos 10, 20, 30, 40, 50, 75, 100, o 200 aminoácidos contiguos del antígeno tumoral.

En algunas modalidades, el antígeno es mesotelina, o derivado de mesotelina. En algunas modalidades, la mesotelina es humana. En algunas modalidades, la mesotelina es de longitud completa (e.g., mesotelina humana de longitud completa). En algunas modalidades, el antígeno derivado de mesotelina comprende mesotelina (e.g., mesotelina humana) suprimida en su secuencia de señal, suprimida en su GPI de anclaje o suprimida tanto en la secuencia de señal como GPI de anclaje. El polinucleótido que codifica la mesotelina puede optimizarse por codón u optimizarse por no codón para expresión en *Listeria*.

En algunas modalidades, el antígeno derivado de mesotelina consiste de una secuencia de aminoácidos que describe al menos aproximadamente 65% de identidad de secuencia a mesotelina humana, al menos 70% de identidad de secuencia a mesotelina humana, o al menos aproximadamente 75% de identidad de secuencia a mesotelina humana. En algunas modalidades, la secuencia de polipéptido de mesotelina consiste de una secuencia de aminoácidos que describe al menos 85% de identidad de secuencia a mesotelina humana, al menos 90% de identidad de secuencia a mesotelina humana, o al menos aproximadamente 95% de identidad de secuencia a mesotelina humana. En algunas modalidades, el antígeno derivado de mesotelina comprende al menos 10, 20, 30, 40, 50, 75, 100 o 200 aminoácidos de un polipéptido de mesotelina, tal como mesotelina humana o mesotelina humana suprimida de su secuencia de péptido de señal y/o GPI de anclaje. En algunas modalidades, el antígeno derivado de mesotelina consiste de al menos 10, 20, 30, 40, 50, 75, 100 o 200 aminoácidos contiguos de un polipéptido de mesotelina, tal como mesotelina humana o mesotelina humana suprimida de su secuencia de péptido de señal y/o GPI de anclaje.

En ciertas modalidades, el antígeno es antígeno de célula germinal de próstata (PSCA), o es un antígeno derivado de PSCA. En algunas modalidades, el PSCA es un PSCA humano. En algunas modalidades, el PSCA es de longitud completa (e.g., PSCA humano de longitud completa). En algunas modalidades, el antígeno derivado de PSCA comprende PSCA (e.g., PSCA humano) suprimido de (a) parte o toda su región de péptido de señal, (b) su región de GPI de anclaje, o (c) su región de GPI de anclaje y parte o toda su región de péptido de señal. El polinucleótido que codifica el PSCA puede optimizarse por codón u optimizarse por no codón para la expresión en *Listeria*.

Varios ensayos para valorar si un derivado de antígeno en particular puede estimular la inmunogenicidad deseada cuando se expresa en *Listeria*, se conocen por aquellos expertos en la materia. Los ejemplos específicos se proporcionan en los Ejemplos de abajo. Varios ensayos también se proporcionan, e.g. Publicaciones de Patente de Estados Unidos Nos. 2004/0228877, 2004/0197343, y 2005/0249748.

En algunas modalidades, el antígeno derivado de PSCA consiste de una secuencia de aminoácidos que describe al menos 65% de similitud de secuencia a PSCA humano, al menos 70% de similitud de secuencia a PSCA humano, o al menos aproximadamente 75% de similitud de secuencia a PSCA humano. En algunas modalidades, la secuencia de polipéptido de PSCA consiste de una secuencia de aminoácidos que describe al menos 85% de similitud de secuencia a PSCA humano, al menos 90% de similitud de secuencia a PSCA humano, o al menos aproximadamente 95% de similitud de secuencia a PSCA humano. En algunas modalidades, el antígeno derivado de PSCA comprende al menos 10, 20, 30, 40, 50, 75, 100, o 200 aminoácidos de un polipéptido PSCA, tal como PSCA humano o PSCA humano suprimido de su secuencia de péptido de señal y/o GPI de anclaje. En algunas modalidades, el antígeno derivado de PSCA consiste de al menos 10, 20, 30, 40, 50, 75, 100 o 200 aminoácidos contiguos de un polipéptido PSCA, tal como PSCA humano o PSCA humano suprimido de su secuencia de péptido de señal y/o GPI de anclaje.

En algunas modalidades, el antígeno (e.g., antígeno heterólogo) no comprende un péptido antigénico EphA2 (algunas veces referido como un "polipéptido antigénico EphA2"), como se define y se describe en la Publicación de Patente de Estados Unidos No. 2005/0281783 A1. En algunas modalidades, el péptido antigénico EphA2 excluido del uso en los métodos y composiciones descritas en la presente puede ser cualquier péptido antigénico EphA2 que sea capaz de producir una respuesta inmune contra las células que expresan EphA2 incluidas en un trastorno hiperproliferativo. De esta manera, en algunas modalidades, el péptido antigénico EphA2 excluido puede ser un polipéptido EphA2 (e.g., el polipéptido EphA2 de SEQ ID NO:2 en la Publicación de Patente de Estados Unidos No.

2005/0281783 A1, o un fragmento o derivado de un polipéptido EphA2 que (1) despliega la habilidad para unir o competir con EphA2 para enlace a un anticuerpo anti-EphA2, (2) despliega la habilidad para generar el anticuerpo que se une a EphA2, y/o (3) contiene uno o más epítopes de célula T de EphA2. En algunas modalidades, el péptido antigénico EphA2 es una secuencia codificada por una de las siguientes secuencias de nucleótidos o un fragmento o derivado de las mismas: No. de Acceso de GenBank NM_004431 (Humano); No. de Acceso de GenBank NM_010139 (Ratón); o No. de Acceso de GenBank AB038986 (Chicken, secuencia parcial). En algunas modalidades, el péptido antigénico EphA2 es EphA2 humano de longitud completa (e.g., SEQ ID NO:2 de la Publicación de Patente de Estados Unidos No. 2005/0281783 A1). En algunas modalidades, el péptido antigénico EphA2 comprende el dominio extracelular de EphA2 o el dominio intracelular de EphA2. En algunas modalidades, el péptido antigénico EphA2 consiste de EphA2 de longitud completa o un fragmento del mismo con una sustitución de lisina a metionina en el residuo de aminoácido 646 de EphA2. En algunas modalidades, la secuencia de péptido antigénico EphA2 consiste de una secuencia de aminoácidos que describe al menos aproximadamente 65% de similitud de secuencia a EphA2 humano, al menos 70% de similitud de secuencia a EphA2 humano, o al menos aproximadamente 75% de similitud de secuencia a EphA2 humano. En algunas modalidades, la secuencia de polipéptido EphA2 consiste de una secuencia de aminoácidos que describe al menos 85% de similitud de secuencia a EphA2 humano, al menos 90% de similitud de secuencia a EphA2 humano, o al menos aproximadamente 95% de similitud de secuencia a EphA2 humano. En algunas modalidades, el péptido antigénico EphA2 excluido consiste de al menos 10, 20, 30, 40, 50, 75, 100, o 200 aminoácidos de un polipéptido EphA2. En algunas modalidades, el péptido antigénico EphA2 consiste de al menos 10, 20, 30, 40, 50, 75, 100 o 200 aminoácidos contiguos de un polipéptido EphA2.

Esta descripción suministra los métodos y los reactivos para estimular la respuesta inmune a infecciones, e.g., infecciones del hígado. Estas incluyen las infecciones de virus hepatotrópicos y virus que median la hepatitis, e.g., virus de hepatitis B, virus de hepatitis C, y citomegalovirus. Esta descripción contempla los métodos para tratar otros virus hepatotrópicos, tales como virus simple de herpes, virus de Epstein-Barr, y virus de dengue (véase, e.g., Ahlenstiel y Rehmann (2005) *Hepatology* 41:675-677; Chen, *et al.* (2005) *J. Viral Hepat.* 12:38-45; Sun y Gao (2004) *Gastroenterol.* 127:1525-1539; Li, *et al.* (2004) *J. Leukoc. Biol.* 76: 1171-1179; Ahmad y Alvarez (2004) *J. Leukoc. Biol.* 76:743-759; Cook (1997) *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 9:1239-1247; Williams y Riordan (2000) *J. Gastroenterol. Hepatol.* 15 (Suppl.)G1 7-G25; Varani y Landini (2002) *Clin. Lab.* 48:39-44; Rubín (1997) *Clin. Liver Dis.* 1:439-452; Loh, *et al.* (2005) *J. Virol.* 79:661-667; Shresta, *et al.* (2004) *Virology* 319:262-273; Fjaer, *et al.* (2005) *Pediatr. Transplant* 9:68-73; Li, *et al.* (2004) *World J. Gastroenterol.* 10:3409-3413; Collin, *et al.* (2004) *J. Hepatol.* 41: 174-175; Ohga, *et al.* (2002) *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 44:203-215).

En otro aspecto, la presente invención proporciona métodos y reactivos para el tratamiento y/o prevención de infecciones parasitarias, e.g., infecciones parasitarias del hígado. Estas incluyen, sin limitación, duelas hepáticas (e.g., *Clonorchis*, *Fasciola hepatica*, *Opisthorchis*), *Leishmania*, *Ascaris lumbricoides*, *Schistosoma*, y platelmintos. Los platelmintos incluyen, e.g., nematodos (ascárides), cestodos (solitarias), y trematodos (platelmintos o aletas) (véase, e.g., Tliba, *et al.* (2002) *Vet. Res.* 33:327-332; Keiser y Utzinger (2004) *Expert Opin. Pharmacother.* 5: 1711-1726; Kaewkes (2003) *Acta Trop.* 88: 177-186; Srivatanakul, *et al.* (2004) *Asian Pac. J. Cancer Prev.* 5: 118-125; Stuafter, *et al.* (2004) *J. Travel Med.* 11:157-159; Nylen, *et al.* (2003) *Clin. Exp. Immunol.* 131:457-467; Bukte, *et al.* (2004) *Abdom. Imaging* 29:82-84; Singh y Sivakumar (2003) 49:55-60; Wyler (1992) *Parasitol. Today* 8:277-279; Wynn, *et al.* (2004) *Immunol. Rev.* 201:156-167; Asseman, *et al.* (1996) *Immunol. Lett.* 54:11-20; Becker, *et al.* (2003) *Mol. Biochem. Parasitol.* 130:65-74; Pockros y Capozza (2005) *Curr. Infect. Dis. Rep.* 7:61-70; Hsieh, *et al.* (2004) *J. Immunol.* 173:2699-2704; Korten, *et al.* (2002) *J. Immunol.* 168:5199-5206; Pockros y Capozza (2004) *Curr. Gastroenterol. Rep.* 6:287-296).

Todavía otro aspecto de la presente invención proporciona los métodos y reactivos para el tratamiento y/o prevención de infecciones bacterianas, e.g., por bacteria hepatotrópica. Se proporcionan los métodos y reactivos para tratar, e.g., *Mycobacterium tuberculosis*, *Treponema pallidum*, y *Salmonella spp* (véase, e.g., Cook (1997) *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 9:1239- 1247; Vankayalapati, *et al.* (2004) *J. Immunol.* 172:130-137; Sellati, *et al.* (2001) *J. Immunol.* 166:4131-4140; Jason, *et al.* (2000) *J. Infectious Dis.* 182:474-481; Kirby, *et al.* (2002) *J. Immunol.* 169:4450-4459; Johansson y Wick (2004) *J. Immunol.* 172:2496-2503; Hayashi, *et al.* (2004) *Intern. Med.* 43:521-523; Akcay, *et al.* (2004) *Int. J. Clin. Pract.* 58:625-627; de la Barrera, *et al.* (2004) *Clin. Exp. Immunol.* 135:105-113).

En una modalidad adicional, lo heterólogo de la presente invención se deriva de Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH), e.g., gp120; gp160; gp41; antígenos gag tales como p24gag o p55 gag, así como la proteína derivada de pol, env, tat, vir, rev, nef, vpr, vpu y regiones LTR de VIH. Los antígenos heterólogos contemplados incluyen aquellos de virus simple de herpes (HSV) tipos 1 y 2, de citomegalovirus, de virus Epstein-Barr, o Virus de Varicela Zoster. También se comprenden los antígenos derivados de un virus de hepatitis, e.g., hepatitis A, B, C, delta, E, o G. Además, los antígenos también comprenden los antígenos de *Picornaviridae* (poliovirus; rinovirus); *Caliciviridae*;

Togaviridae (rubeola; dengue); *Flaviviridae*; *Coronaviridae*; *Reoviridae*; *Birnaviridae*; *Rhabdoviridae*; *Orthomyxoviridae*; *Filoviridae*; *Paramyxoviridae* (paperas; sarampión); *Bunyviridae*; *Arenaviridae*; *Retroviridae* (HTLV-1; VIH-1); Papilovirus, virus de encefalitis nacido por garrapata, y lo similar.

Todavía en otro aspecto, la presente invención proporciona reactivos y métodos para la prevención y tratamiento de infecciones parasitarias y bacterianas, e.g., *Salmonella*, *Neisseria*, *Borrelia*, *Chlamydia*, *Bordetella*, plasmodio, *Toxoplasma*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Bacillus anthracis*, *Yersinia pestis*, Difteria, Pertussis, Tétanos, neumonía bacteriana o fúngica, Otitis Media, Gonorrea, Colera, Tifoidea, Meningitis, Mononucleosis, Plag, Shigellosis, Salmonelosis, Enfermedad de Legionario, enfermedad de Lyme, Lepra, Malaria, Helminto, *Onchocerciasis*, *Schistosomiasis*, Trypanosomas, Leshmania, Giardia Amoebiasis, Filariasis, Borelia y Triquinosis (véase, e.g., Despommier, *et al.* (2000) *Parasitic Diseases*, 4ª ed., Apple Trees Productions, New York, NY; Gobierno de Estados Unidos (2002) Centros de Colección Siglo 21 para Control de Enfermedad (CDC) Que Surgen De Las Enfermedades Infecciosas (EID) – Colección Comprensiva de 1995 a 2002 con Información Exacta y Detallada en Docenas de Varias Enfermedades Serias por Bacteria y Virus – Hantavirus, Influenza, SIDA, Malaria, TB, Plaga, Bioterrorismo, Viruela, Antrax, Vacunas, Enfermedad de Lyme, Rabia, Virus de Nilo Oeste, Fiebres Hemorrágicas, Ébola, Encefalitis (Serie de Información de Núcleo Federal).

La presente invención, al menos en algunas modalidades, proporciona reactivos y métodos para tratar un trastorno o condición, o estimular una respuesta inmune a un trastorno o condición, que comprende tanto un cáncer como infección. En algunas infecciones virales, por ejemplo, un antígeno puede ser tanto un antígeno tumoral como un antígeno viral (véase, e.g. Montesano, *et al.* (1990) *Cell* 62:435-445; Ichaso y Dilworth (2001) *Oncogene* 20:7908-7916; Wilson, *et al.* (1999) *J. Immunol.* 162:3933-3941; Daemen, *et al.* (2004) *Antivir. Ther.* 9:733-742; Boudewijn, *et al.* (2004) *J. Natl. Cancer Inst.* 96:998-1006; Liu, *et al.* (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101:14567-14571).

En algunas modalidades, el antígeno heterólogo comparte al menos un péptido con, o es inmunológicamente de reactividad cruzada con, un antígeno de, o derivado de, un cáncer o agente infeccioso.

(f). Mutantes de reparación de ADN y agentes que tienen como objetivo ácido nucleico.

La presente descripción, en otras modalidades, proporciona mutantes *Listeria*, en donde el mutante es defectuoso en reparación del daño de ADN, incluyendo, por ejemplo, la reparación de daño de ADN inducido por luz UV, daño inducido por radiación, degradaciones interfilamentos, degradaciones intrafilamentos, aductos covalentes, ADN modificado por aducto voluminoso, bases desamidadas, aductos de platina cis, combinaciones de los anteriores, y lo similar (Mu y Sanear (1997) *Prog. Nucl. Acid Res. Mol. Biol.* 56:63-81; Sanear (1994) *Science* 266: 1954-1956; Lin y Sanear (1992) *Mol. Microbiol.* 6:2219-2224; Selby y Sanear (1990) 236:203-211; Grossman (1994) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 726:252-265). Se proporciona una *Listeria* mutada en, e.g., *uvrA*, *uvrB*, *uvrAB*, *uvrC*, cualquier combinación de los anteriores, y lo similar.

Además, lo que se proporciona es una *Listeria* que comprende al menos una degradación interfilamento en su ADN genómico, o al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco, al menos diez, al menos 20, al menos 30, al menos 40, al menos 50, al menos 100, o más, degradaciones en su ADN genómico.

Una modalidad de la presente descripción comprende *Listeria uvrAB* diseñada para expresar un antígeno heterólogo, en donde la bacteria diseñada se trata con un agente reticulante de ácido nucleico, un compuesto de psoralen, un compuesto de nitrógeno mostaza, 4'-(4-amino-2-oxa)butil-4,5',8-trimetilpsoralen, o beta-alanina, N-(acridina-9-il),2-[bis(2-cloroetil)amino]etil éster (véase, e.g., Solicitud de Patente de Publicación de Estados Unidos No. 2004/0197343 de Dubensky; Brockstedt, *et al.* (2005) *Nat. Med.* 11:853-860).

(g). Hibridización bajo condiciones rigurosas.

La hibridización de un polinucleótido tal como un plásmido a una variante de aquel polinucleótido que lleva al menos una mutación, puede lograrse bajo las siguientes condiciones rigurosas. El plásmido puede ser entre 2-3 kb, 3-4 kb, 4-5 kb, 5-6 kb, 6-7 kb, y así sucesivamente. La mutación puede consistir de 1-10 nucleótidos (nt), 10-20 nt, 20-30 nt, 30-40 nt, 40-50 nt, 50-60 nt, 60-70 kb, 70-80 kb, 80-90 kb, 90-100 kb, y lo similar.

Las condiciones rigurosas para la hibridización en formamida puede utilizar la siguiente solución de hibridización: 48 ml de formamida; 24 ml 20 veces de SSC; 1.0 ml de 2 M Tris Cl, pH 7.6; 1.0 ml 100 veces de solución de Denhardt; 5.0 ml de agua; 20 ml de 50% de sulfato de dextrano, 1.0 ml de 10% de dodecilsulfato de sodio (volumen total 100 ml). La hibridización puede ser durante la noche a 42°C (véase, e.g., (1993) *Current Protocols in Molecular Biology*, Suppl. 23, páginas 6.3.3-6.3.4). Las condiciones de hibridización más rigurosas comprenden uso del regulador anterior pero a la temperatura de 43°, 44°, 45°, 46°, 47°, 48°, 49°, 50°, 51°, 52°, 53°, 54°, y lo similar.

La hibridización rigurosa bajo condiciones acuosas son 1% de albumina de suero de bovino; 1 mM de EDTA; 0.5 M de NaHPO₄, pH 7.2, 7% de sulfato de dodecilo de sodio), con incubación durante la noche a 65°C. Las condiciones de hibridización acuosa más rigurosas comprenden el uso del regulador anterior, pero a una temperatura de 66°, 67°, 68°, 69°, 70°, 71°, 72°, 73°, 74°, 75°, y así sucesivamente (véase, e.g., (1993) Current Protocols in Molecular Biology, Suppl. 23, páginas 6.3.3-6.3.4).

El incremento de la concentración de formamida incrementa la rigurosidad de hibridización. Las incompatibilidades entre el ADN de sonda y ADN objetivo disminuyen la tasa de hibridización por aproximadamente 2 veces, por cada 10% de incompatibilidad. De igual forma, la temperatura de fusión de dúplex de ADN incompatible se reduce por aproximadamente un grado centígrado por cada 1.7% de incompatibilidad (Anderson (1999) Nucleic Acid Hybridization, Springer-Verlag, New York, N.Y., pp. 70-72; Tijssen (1993) Hybridization with Nucleic Acid Probes, Elsevier Publ. Co., Burlington, MA; Ross (ed.) (1998) Nucleic Acid Hybridization: Essential Techniques, John Wiley y Sons, Hoboken, NJ; No. de Patente de Estados Unidos 6,551,784 expedida a Fodor, *et al.*).

Esta descripción comprende un primer plásmido variante que se hibridiza bajo condiciones rigurosas a un segundo plásmido de la presente descripción, en donde ambos plásmidos son funcionalmente equivalentes, y en donde la hibridización es determinable al hibridizar el primer plásmido directamente al segundo plásmido, o al hibridizar las sondas de oligonucleótido que giran la longitud completa (individualmente o como una colección de sondas) del primer plásmido variante al segundo plásmido, y así sucesivamente.

El experto en la materia será capaz de ajustar, o elevar, la temperatura de hibridización para permitir la distinción entre un ácido nucleico de sonda y un ácido nucleico objetivo donde las secuencias de la sonda y objetivo difieren por 5-10 nucleótidos, 10-15 nucleótidos, 15-20 nucleótidos, 20-25 nucleótidos, 25-30 nucleótidos, 30-35 nucleótidos, 35-40 nucleótidos, 40-45 nucleótidos, 45-50 nucleótidos, 50-55 nucleótidos, 55-60 nucleótidos, 60-65 nucleótidos, 65-70 nucleótidos, 70-80 nucleótidos, y lo similar.

Esta descripción proporciona los polinucleótidos que hibridizan bajo condiciones rigurosas a cada uno de los polinucleótidos descritos en la presente o sus complementos.

III. ALGUNAS MODALIDADES DETALLADAS DE ESTA DESCRIPCIÓN

(a) Integración por recombinación específica de sitio y por recombinación homóloga.

En algunas modalidades, los ácidos nucleicos, polinucleótidos, genomas bacterianos que incluyen genomas listeriales, y bacterias que incluyen *Listeria* y *Bacillus anthracis*, de la presente descripción se modifican por recombinación específica de sitio y/o por recombinación homóloga. Las recombinasas específicas de sitio se describen (Landy (1993) Curr. Op. Biotechnol. 3:699-707; Smith y Thorpe (2002) Mol. Microbiol. 44:299-307; Groth y Calos (2004) J. Mol. Biol. 335:667-678; Nunes-Duby, *et al.* (1998) Nucleic Acids Res. 26:391-406; Sauer (1993) Methods Enzymol. 225:890-900). La transposición se distingue de la recombinación específica de sitio (véase, e.g., Hallett y Sherratt (1997) FEMS Microbiol. Rev. 21: 157-178; Grindley (1997) Curr. Biol. 7:R608-R612).

A. Recombinación específica de sitio

La presente descripción proporciona sistema para mediar la integración específica de sitio en un ácido nucleico, vector, o genoma. Por "sistema" se entiende, un primer ácido nucleico que codifica una integrasa, así como el polipéptido de integrasa expresada, un segundo ácido nucleico que codifica un sitio de unión de fago (attPP'), y un tercer ácido nucleico que codifica un sitio de unión bacteriana correspondiente (attBB'). En lo general, cualquier sitio attPP' corresponde a, o es compatible con, un sitio attBB' particular. La disponibilidad de los sistemas de integración de la presente descripción se permite para la integración de uno o más ácidos nucleicos en cualquier polinucleótido o genoma dado.

El sitio de integración de la presente descripción puede implantarse en una posición pre-determinada en un genoma listerial a manera de integración específica de sitio en un sitio existente (e.g., en el sitio e integración tARN^{Arg} o el sitio de integración comK). Además, o en la alternativa, el sitio de sistema de integración puede implantarse en una ubicación pre-determinada a manera de integración homóloga.

La recombinación homóloga puede dar como resultado la supresión del material del sitio de integración, o la no supresión de material, dependiendo del diseño de las regiones de homología (los "brazos homólogos"). Cualquier supresión que ocurre, durante la recombinación homóloga corresponde a la región del ADN objetivo que reside entre las regiones del ADN objetivo que pueden hibridizarse con los "brazos homólogos". La recombinación homóloga puede utilizarse para implantar un sitio de integración (attBB') dentro de un genoma bacteriano, para uso futuro en recombinación específica de sitio.

La Figura 1 describe una estrategia para preparar el plásmido, pINT, para uso en integración dirigida por sitio en un genoma bacteriano. El pINT contiene un gen de resistencia de cloranfenicol y un gen de resistencia de eritromicina (véase, e.g., Roberts, *et al.* (1996) Appl. Environ. Microbiol. 62:269-270). Cuando pINT media la integración específica de sitio de un ácido nucleico en el genoma listerial, los genes de resistencia antibiótica pueden eliminarse subsecuentemente por exposición transitoria a recombinasa Cre. Como se muestra en la Figura 1, los genes de resistencia antibiótica residen entre un primer sitio loxP y un segundo sitio loxP. La recombinasa Cre puede catalizar la remoción de material que reside entre los dos sitios loxP. La expresión transitoria de recombinasa Cre puede efectuarse por electroporación por un plásmido que codifica la recombinasa Cre, o por cualquier número de otras técnicas.

El genoma *Listeria* o cromosoma de la presente descripción se modifica utilizando los plásmidos pPL1, pPL2, y/o pINT1 (Lauer, *et al.* (2002) J. Bact. 184:4177-4186). El plásmido pPL1 (No. de Acceso de GenBank AJ417488) comprende un ácido nucleico que codifica la integrasa U153, en donde esta integrasa cataliza la integración en la ubicación de comK-attBB' del genoma listerial (Lauer, *et al.* (2002) J. Bact. 184:4177-4186). La estructura de comK se encuentra disponible (nucleótidos 542-1114 de No. de Acceso de GenBank AF174588). pPL1 contiene un número de sitios de restricción adecuados para insertar un casete. Por ejemplo, en algunas modalidades, un casete de la presente descripción codifica al menos un antígeno heterólogo y una región flanqueada por loxP, en donde la región flanqueada por loxP comprende: un primer ácido nucleico que codifica una integrasa y un segundo ácido nucleico que codifica un factor de resistencia antibiótica. Algunos de los sitios de restricción se describen en la Tabla 6. Los sitios de restricción también pueden introducirse *de novo* mediante métodos estándares.

Tabla 6. Sitios de restricción en pPL1 y pPL2.

pPL1		pPL2	
Sitio	Posición de Corte	Sitio	Posición de Corte
<i>HindII</i>	56	<i>HindII</i>	56
<i>SmaI</i>	95	<i>SmaI</i>	95
<i>BamHI</i>	99	<i>BamHI</i>	99
<i>HindIII</i>	69	<i>Clal</i>	64
<i>NotI</i>	118	<i>NotI</i>	118
<i>Sall</i>	54	<i>Sall</i>	54
<i>KpnI</i>	37	<i>SpeI</i>	105
<i>PstI</i>	91	<i>KpnI</i>	37
<i>SacI</i>	139	<i>PstI</i>	91
<i>AatI1</i>	5 y 175	<i>SacI</i>	139
<i>BalI</i>	490 (en gen de resistencia de cloranfenicol)	<i>AatII</i>	5 y 175
<i>Scal</i>	340 (en gen de resistencia de cloranfenicol)	<i>AvaI</i>	48 y 93
<i>BaeI</i>	3942 y 3975 (en gen integrasa U153)	<i>BalI</i>	490 (en gen de resistencia de cloranfenicol)
<i>BseP1</i>	3753 (en gen integrasa U153)	<i>Scal</i>	340 (en gen de resistencia de cloranfenicol)
<i>MluI</i>	4074 (en gen integrasa U153)	<i>AflIII</i>	3259 y 4328 (en gen integrasa PSA)

--	--	<i>SnaBI</i>	4077 y 4177 (en gen integrasa PSA)
--	--	<i>Eam11051</i>	3263 (en gen integrasa PSA)
--	--	<i>BseYI</i>	4357 (en gen integrasa PSA)
--	--	<i>SwaI</i>	3353 (en gen integrasa PSA)
--	--	<i>BglII</i>	-4150 (en gen integrasa PSA)

El experto en la materia apreciará que las técnicas utilizadas para preparar pPL1 y pPL2, y para utilizar pPL1 y pPL2 para mediar la integración específica de sitio, pueden aplicarse a las integrasas, sitios de unión de fago (attPP') y sitios de unión bacteriana (attBB'), de la presente descripción.

pPL2 (No. de Acceso de GenBank AJ417499) comprende un ácido nucleico que codifica la integrasa PSA, en donde esta integrasa cataliza la integración en el gen de tARN^{Arg} del genoma *L. monocytogenes* (Lauer, *et al.* (2002) J. Bact. 184:4177-4186). El gen de tARN^{Arg} de 74 nucleótidos se encuentra en el nucleótido 1,266,675 a 1,266,748 de *L. monocytogenes* cepa EGD (véase, e.g., No. de Acceso de GenBank NC_003210), y en los nucleótidos 1,243,907 a 1,243,980 de *L. monocytogenes* cepa 4bF265 (véase, e.g., No. de Acceso de GenBank NC_002973). pPL2 contiene un número de sitios de restricción adecuados para insertar un casete. La presente descripción proporciona un casete que codifica, e.g., un antígeno heterólogo y región flanqueada por loxP, en donde la región flanqueada por loxP comprende: un primer ácido nucleico que codifica una integrasa y un segundo ácido nucleico que codifica un factor de resistencia antibiótica. Algunos de los sitios de restricción se describen en la Tabla 6. Los métodos estándares pueden utilizarse para introducir otros sitios de restricción *de novo*.

Una primera modalidad de la recombinación específica de sitio incluye la integración específica de sitio catalizada por integrasa de un ácido nucleico en un sitio de integración ubicado en una región de tARN^{Arg} específica del genoma *Listeria*.

Una segunda modalidad utiliza la integración de un ácido nucleico en la región ComK del genoma *Listeria*.

Las modalidades adicionales comprenden los sitios de unión de profago en donde el objetivo se encuentra en, e.g., tARN-Thr4 of *L. monocytogenes* F6854 φ F6854.3 (nucleótidos 277,661-277,710 de *L. monocytogenes* EGD No. de Acceso de GenBank AL591983.I), tARN-Lys4 de *L. innocua* 11262 φ 11262.1 (nucleótidos 115,501-115,548 de No. de Acceso de GenBank AL596163.I); similar a *L. monocytogenes* 1262 de *L. innocua* 11262 phi11262.3; intergénico de *L. innocua* 11262 φ 11262.4 (nucleótidos 162,123-162,143 de No. de Acceso de GenBank AL596169.I); y tARN-Arg4 de *L. innocua* 11262 φ 11262.6 (nucleótidos 15908-15922 de No. de Acceso de GenBank AL596173.I de *L. innocua* o nucleótidos 145,229-145,243 de No. de Acceso de GenBank AL591983.I de *L. monocytogenes* EGD) (véase, e.g., Nelson, *et al.* (2004) Nucleic Acids Res. 32:2386-2395).

Una modalidad adicional de la recombinación específica de sitio comprende la inserción de un sitio loxP (o sitio Frt) por integración específica de sitio en la región tARN^{Arg} o región ComK, en donde la inserción de los sitios loxP se sigue por inserción mediada por recombinasa Cre de un ácido nucleico en el genoma *Listeria*.

pPL1 integra en la ubicación cromosómica comK-attBB' (6,101 bp; No. de Acceso de GenBank AJ417488). Esta integración se cataliza por integrasa U153. El gen comK *L. monocytogenes* se describe (nucleótidos 542-1114 de No. de Acceso de GenBank AF174588). El sitio de integración de pPL1 comprende nucleótidos 2694-2696 de la secuencia de plásmido AJ417488. Los siguientes dos cebadores de PCR encierran en corchete el sitio de unión comK-attBB' del genoma *Listeria*: Cebador PL60 es 5'-TGA AGT AAA CCC GCA CAC GATC-3' (SEQ ID NO:9); Cebador PL61 es 5'-TGT AAC ATG GAG GTT CTG GCA ATC-3' (SEQ ID NO: 10). El cebador par PL60 y PL61 amplifica comK-attBB' que da como resultado un producto 417 bp en cepas no lisogénicas, e.g., DP-L4056.

pPL2 integra en la ubicación cromosómica de tARN^{Arg}-attBB' (6,123 bp; No. de Acceso de GenBank AJ417449). Esta integración se cataliza por integrasa PSA. pPL2 es similar a pPL1, a excepción de que el sitio de unión de fago de PSA e integrasa U153 de pPL1 se suprimió y reemplazaron con integrasa PSA y el sitio de unión de fago de PSA. El sitio de integración pPL2 comprende una región 17 bp que reside en los nucleótidos 2852-2868 del plásmido pPL2 (AJ417449), con la región bacteriana correspondiente que reside en los nucleótidos 1,266,733-1,266,749 de *L. monocytogenes* cepa genoma EGD (No. de Acceso de GenBank NC_003210).

Para listeriofago A118, un fago detenidamente relacionado a listeriofago U153, la posición attB reside en los nucleótidos 187-189 de 573 bp comK ORF (Loessner, *et al.* (2000) Mol. Microbiol. 35:324-340). Este 573 bp ORG (nucleótido 542-1114 de No. de Acceso de GenBank AF 174588) y el sitio attB (nucleótido 701-757 de No. de Acceso de GenBank AF 174588) ambos se describen en No. de Acceso de GenBank AF174588. El sitio attP reside en el listeriofago genoma A118 en los nucleótidos 23500-23444 (No. de Acceso de GenBank AJ242593).

La presente descripción proporciona reactivos y métodos para catalizar la integración de un ácido nucleico, e.g., un plásmido, en un sitio de integración en un genoma *Listeria*. El genoma *L. monocytogenes* se describe (véase, e.g., No. de Acceso de GenBank NC_003210; No. de Acceso de GenBank NC_003198, He y Luchansky (1997) Appl. Environ. Microbiol. 63:3480-3487, Nelson, *et al.* (2004) Nucl. Acids Res. 32:2386-2395; Buchrieser, *et al.* (2003) FEMS Immunol. Med. Microbiol. 35:207-213; Doumith, *et al.* (2004) Infect. Immun. 72:1072-1083; Glaser, *et al.* (2001) Science 294:849-852).

Las enzimas adecuadas para catalizar la integración de un ácido nucleico en un genoma *Listeria* incluyen, e.g., integrasa U153 (véase, e.g., complemento de nucleótidos 2741-4099 de No. de Acceso de GenBank AJ417488; Lauer, *et al.* (2002) J. Bact. 184:4177-4186) e integrasa PSA (véase, e.g., complemento de nucleótidos 19,413-20,567 de genoma de fago PSA (genoma 37,618 bp) (No. de Acceso de GenBank NC_003291)).

Una secuencia de nucleótidos idéntica o similar para gen tARN^{Arg}, y para el sitio de integración central que se encuentra dentro de este gen, se ha descrito para un número de cepas de *L. monocytogenes*. El genoma completo EGD de cepa *L. monocytogenes* (2,944,528 bp total) (No. de Acceso de GenBank NC_003210) contiene un sitio de integración en el gen tARN^{Arg}. El gen tARN^{Arg} de 74 nucleótidos se encuentra en nucleótido 1,266,675 a 1,266,748 de No. de Acceso de GenBank NC_003210. De igual forma, el gen tARN^{Arg} ocurre en cepa *L. monocytogenes* 4bF265 (No. de Acceso de GenBank NC_002973) en nucleótidos 1,243,907 a 1,243,980. La secuencia de gen tARN^{Arg} para la cepa *L. monocytogenes* WSLC 1042 se describe en Lauer, *et al.* (2002) J. Bact. 184:4177-4186. Lauer, *et al.*, *supra*, describen el sitio de integración central bacteriana y el sitio de integración central de fago correspondiente.

La residencia en un grupo funcional establece la fusión de ácidos nucleicos que se dan como resultado de ese grupo. La función de un gen bacteriano, o gen bacteriófago, puede identificarse de acuerdo con su agrupación en un grupo funcional con otros genes de función conocida, su dirección transcripcional como relativa a otros genes de función similar, y ocurrencia en una operona con otros genes de función similar (véase, e.g., Bowers, *et al.* (2004) Genome Biology 5:R35.1-R35.13). Por ejemplo, el gen que codifica la integrasa de fago se ha identificado en los genomas de un número de fagos (o fagos integrados en genomas bacterianos), en donde el gen de integrasa de fago reside en un grupo de control lisogénico, en donde este grupo contiene un número de genes muy limitado (tres genes a nueve genes) (véase, e.g., Loessner, *et al.* (2000) Mol. Microbiol. 35:324-340; Zimmer, *et al.* (2003) Mol. Microbiol. 50:303-317; Zimmer *et al.* (2002) J. Bacteriol. 184:4359-4368).

El sitio de unión de fago (attPP') reside esencialmente de manera inmediata adyacente al gen de integrasa de fago. De acuerdo con Zhao y Williams, el gen de integrasa (int) y attP son típicamente adyacentes, facilitando su co-evolución (Zhao y Williams (2002) J. Bacteriol. 184:859-860). Por ejemplo, en el fago phiC31, la integrasa de fago se codifica por nucleótido (nt): 38,447 a 40,264, mientras que el sitio attP reside cerca en nt 38,346 a 38,429. La integrasa de fago PhiC31 no requiere los co-factores para catalizar la reacción de integración, y puede funcionar en ambientes celulares ajenos, tales como las células de mamífero (véase, e.g., Thorpe y Smith (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:5505-5510; Groth, *et al.* (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:5995-6000; No. de Acceso de GenBank AJ006589). Además, para fago SMI, fago HP1, fago phi3626, para varios bacteriófagos de actinomiceto (gen intM), fago lambda, y para fago Aa phi23, el gen de integrasa y sitio attP se ubican inmediatamente enseguida entre sí. El gen de integrasa y el sitio de attP pueden ocurrir juntos en grupo pequeño de genes conocidos como un "grupo de control lisogénico". Los métodos para determinar la ubicación genómica, el tamaño aproximado, el tamaño máximamente activo, y/o el tamaño mínimo de un sitio attPP' (o sitio attP) se encuentran disponibles (véase, e.g., Zimmer, *et al.* (2002) J. Bacteriol. 184:4359-4368; Siboo, *et al.* (2003) J. Bacteriol. 185:6968-6975; Mayer, *et al.* (1999) Infection Immunity 67:1227-1237; Alexander, *et al.* (2003) Microbiology 149:2443-2453; Hoess y Landy (1978) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75:5437-5441; Resch (2005) *Sequence and analysis of the DNA genome of the temperate bacteriophage Aaphi23*, Inauguraldissertation, Univ. Basel; Campbell (1994) Ann. Rev. Microbiol. 48: 193-222).

La presente descripción proporciona un vector para uso en la modificación de un genoma listerial, en donde el vector codifica la integrasa de fago phiC31, sitio attPP' phiC31, y en donde el genoma listerial se modificó para incluir el sitio attBB' phiC31. Un genoma bacteriano, e.g., de *Listeria* o *B. anthracis*, puede modificarse para incluir un sitio attBB' por recombinación homóloga. El sitio attBB' phiC31 se describe por Thorpe y Smith (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:5505-5510. La secuencia de aminoácidos de integrasa phiC31 se describe abajo (No. de Acceso de GenBank AJ414670):

MTQGVVTGVDTYAGAYDRQSRERENSSAASPATQRSANEDKAADLQREVERDGGRRFRFVGHFSEAPGT
SAFGTAERPEFERILNECRAGRLNMIIVYDVSRFSRLKVMDAIPVSELLALGVTIVSTQEGVFRQGN
VMDLIHLIMRLDASHKESSLKSAKILDTKNLQRELGGYVGGKAPYGFELVSETKEITRNGRMVNVVIN
KLAHSTTPLTGPFEPEDVIRWWWREIKTHKHLFPKPGSQAAIHPSITGLCKRMDADAVPTRGETIG
KKTASSAWDPATVMRILRDPRIAGFAAEVIYKKKPDGTPTTKIEGYRIQRDPITLRPVELDCGPITIEP
5 AEWYELQAWLDGRGRGKGLSRGQAILSAMDKLYCEGAVMTSKRGEESIKDSYRCRRRKVVDPSPAGQ
HEGTCNVSMALDKFVAERI FNKIRHAEGDEETLALLWEAARRFGKLTEAPEKSGERANLVAERADAL
NALEELYEDRAAGAYDGPVGRKHFRKQQAALTLRQQGAEERLAELEAAEAPKLPLDQWFPEDADADPT
GPKSWWGRASVDDKRVFVGLFVDKIVVTKSTTGRGQGTPIEKRASITWAKPPTDDDEDDAQDGTEDVA
A (No. de Acceso de GenBank AJ414670) (SEQ ID NO:11)

La presente descripción proporciona los siguientes sitios de attBB' objetivo phiC31 relevantes y variantes
funcionales de los mismos:

TGACGGTCTCGAAGCCGCGGTGCGGGTGCCAGGGCGTGCCCTTGGGCTCCCCGGGCGCGTAC
TCCACCTCACCATCTGGTCCA (SEQ ID NO:12) (véase, e.g., Thorpe y Smith (1998)

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:5505-5510).

gtcgcagatgtaggtcacggtctcgaagccgcggtgcggtgcccagggcggtgcccttgggct
ccccgggcgcggtactccacctcacccatctggtccatcatgatgaacgggtcgaggtggcg
tagttgatcccgcggaacgcgcggcgccgggaagccctcgccctcgaaaccgctgggcg
gggtggtcacggtgagcacgggacgtgcgacggcggtcgcggtgcggtgacgcggggcagcg
tcagcggttctcgacggtcacggcgggcatgtcgac (SEQ ID NO:13)

(No. de Acceso de GenBank X60952)

Además, esta descripción proporciona los siguientes sitios de attPP' phiC31 relevantes, y variantes
funcionales de los mismos:

AAGGGGTTGTGACCGGGGTGGACACGTACGCGGGTGCTTACGACCGTCAGTCGC
GCGAGCGCGAGAATTC (SEQ ID NO:14) (véase, e.g., Nos. de Acceso de GenBank X57036 y
AJ006589; Thorpe y Smith (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:5505-5510).

La presente descripción comprende un vector que codifica una integrasa de fago y un sitio attPP'
funcionalmente activo, pero no codifica la integrasa de fago y sitio attPP' de pPL1. También se comprende un vector
que codifica una integrasa de fago y un sitio attPP' funcionalmente activo, pero no codifica la integrasa de fago y el
sitio attPP' de pPL2. Además, la presente descripción comprende un vector que codifica una integrasa de fago y un
sitio attPP' funcionalmente activo, pero no codifica la integrasa de fago y sitio attPP' de pPL1 o de pPL2.

La presente descripción comprende un vector útil para integrar un ácido nucleico heterólogo en un genoma
bacteriano que codifica una integrasa de fago y un sitio attPP' funcionalmente activo, pero no codifica la integrasa de
fago y sitio attPP' de fago U153. También se comprende un vector, útil para integrar un ácido nucleico heterólogo en
un genoma bacteriano, que codifica una integrasa de fago y un sitio attPP' funcionalmente activo, pero no codifica la
integrasa de fago y sitio attPP' de fago PSA. Además, la presente descripción comprende un vector, útil para integrar
un ácido nucleico heterólogo en un genoma bacteriano, que codifica una integrasa de fago y un sitio attPP'
funcionalmente activo, pero no codifica la integrasa de fago y sitio attPP' de cualquier fago U153 y fago PSA. En otro
aspecto, la presente descripción comprende un vector, útil para integrar un ácido nucleico heterólogo en un genoma
bacteriano, que codifica una integrasa de fago y un sitio attPP' funcionalmente activo, pero no codifica la integrasa de
fago y sitio attPP' de fago A118. Además esta descripción se encuentra comprendida por un vector, útil para integrar
un ácido nucleico heterólogo en un genoma bacteriano, que codifica una integrasa de fago y un sitio attPP'
funcionalmente activo, pero no codifica la integrasa de fago y sitio attPP' de cualquier fago A118, fago U153, o fago
PSA.

B. Recombinación homóloga.

El sitio objetivo para la recombinación homóloga puede ser una estructura de lectura abierta, un gen de virulencia, un gen de función desconocida, un pseudogen, una región de ADN mostrada por no tener función, un gen que media el crecimiento, un gen que media la dispersión, una región reguladora, una región del genoma que media la supervivencia o crecimiento listerial, un gen en donde la interrupción conduce a la atenuación, una región intergénica, y lo similar.

Para dar un primer ejemplo, una vez que un ácido nucleico que codifica un antígeno (unido operativamente con un promotor) se implanta en un gen de virulencia, el resultado se da dos veces, principalmente la inactivación del gen de virulencia, más la creación de un antígeno expresable.

Esta descripción proporciona una bacteria *Listeria* que comprende un casete de expresión, integrado por medio de recombinación homóloga (o por intercambio alélico, y lo similar), en un gen de virulencia *Listeria*. La integración puede ser con o sin supresión de un ácido nucleico correspondiente del genoma *listerial*.

El casete de expresión puede estar operativamente unido con uno o más promotores del gen de virulencia (promotores ya presentes en la *Listeria* tipo silvestre o genitora). Alternativamente, el casete de expresión puede estar operativamente unido tanto con: (1) Uno o más promotores suministrados por el casete de expresión; como (2) Uno o más promotores suministrados por la *Listeria* tipo silvestre o genitora.

En algunas modalidades, el casete de expresión puede estar operativamente unido con uno o más promotores suministrados por el casete de expresión, y no del todo operativamente unido con cualquier promotor de la *Listeria*.

Sin implicar ninguna limitación, el gen de factor de virulencia puede ser uno o más de *actA*, *inlB*, ambos *actA* e *inlB*, así como uno o más de los genes descritos en la Tabla 3. En otro aspecto, la recombinación homóloga puede ser en el sitio de uno o más genes que median el crecimiento, dispersión, o tanto crecimiento como dispersión.

En otro aspecto, esta descripción proporciona una bacteria *Listeria* que tiene un polinucleótido, en donde el polinucleótido comprende un ácido nucleico (que codifica un antígeno heterólogo) integrado en el sitio de un factor de virulencia. En algunas modalidades, la integración es por recombinación homóloga. En algunas modalidades, esta descripción proporciona la integración en una región reguladora del gen de factor de virulencia, en una estructura de lectura abierta (ORF) del gen de factor de virulencia, o tanto en una región reguladora como la ORF del factor de virulencia. La integración puede ser con supresión o sin supresión de todo o parte del gen de factor de virulencia.

La expresión del ácido nucleico que codifica el antígeno heterólogo puede ser mediada por el promotor del factor de virulencia, en donde este promotor se une operativamente y con el ácido nucleico. Por ejemplo, un ácido nucleico integrado en el gen *actA* puede estar unido operativamente con el promotor *actA*. También, un ácido nucleico integrado en el sitio del gen *inlB* puede estar unido operativamente con el promotor *actA*. También, un ácido nucleico integrado en el sitio del gen *inlB* puede estar operativamente unido y en estructura con el promotor *inlB*. Además, o como una alternativa la regulación de expresión de la estructura de lectura abierta puede mediar completamente por un promotor suministrado por el ácido nucleico.

El casete de expresión y el ácido nucleico anteriormente identificado puede proporcionar uno o más promotores listeriales, uno o más promotores bacterianos que no son listeriales un promotor *actA*, un promotor *inlB*, y cualquier combinación de los mismos. El promotor media la expresión del casete de expresión. También, el promotor media la expresión del ácido nucleico anteriormente identificado. Además, el promotor se une operativamente con la ORF.

En algunas modalidades, la integración en el gen de virulencia, o la integración en el sitio del gen de virulencia, da como resultado la supresión de todo o parte del gen de virulencia, y/o interrupción de regulación del gen de virulencia. En algunas modalidades, la integración da como resultado una atenuación del gen de virulencia o en inactivación del gen de virulencia. Además, esta descripción proporciona un promotor que es dependiente de *prfA*, un promotor que es independiente de *prfA*, un promotor de origen sintético, un promotor de origen parcialmente sintético, y así sucesivamente.

Se proporciona un método para manufacturar la *Listeria* anteriormente descrita. También se proporcionan los métodos para utilizar la *Listeria* anteriormente exhibida para expresar el casete de expresión o para expresar el ácido nucleico anteriormente identificado. Además, en algunas modalidades, lo que se proporciona son métodos para estimular un sistema inmune de mamífero, que comprende administrar la *Listeria* anteriormente exhibida a un mamífero.

Para dar otro ejemplo, una vez que un sitio de unión bacteriana (attBB') se implanta en un gen de virulencia, el resultado se da dos veces, principalmente la inactivación de ese gen, más la creación de una herramienta que permite la eficiente integración de un ácido nucleico en ese sitio attBB'.

En la dirección de la integración homóloga del plásmido pKSV7, u otro plásmido adecuado, en el genoma listerial, la presente descripción proporciona una región de homología que es normalmente al menos 0.01 kb, más normalmente al menos 0.02 kb, más normalmente al menos 0.04 kb, frecuentemente al menos 0.08 kb, más frecuentemente al menos 0.1 kb, más frecuentemente al menos 0.2 kb, normalmente al menos 0.4 kb, más normalmente al menos 0.8 kb, generalmente al menos 1.0 kb, más generalmente al menos 1.5 kb, y más generalmente al menos 2.0 kb.

La Figura 2 demuestra una estructura que utiliza pKSV7 en recombinación homóloga en un genoma bacteriano. En la Etapa 1, el plásmido se intercambia con una región de homología en el genoma. En la Etapa 2, el plásmido se integra en el genoma, produciendo un intermediario merodiploide. WXYZ representa cualquier secuencia en el pKSV7, tal como un gen codificador de resistencia antibiótica. La Etapa 3 describe una segunda transferencia, mientras que la Etapa 4 describe la eliminación del "cuerpo" del plásmido pKSV7 y eliminación de WXYZ. El tratamiento subsecuente con recombinasa Cre, e.g., por expresión transitoria de recombinación Cre, cataliza la remoción de material entre los sitios loxP.

La Figura 3 muestra un método para preparar un inserto en donde el inserto se coloca en pKSV7. El inserto media la recombinación homóloga en un genoma listerial, que da como resultado la integración de varios elementos en el genoma listerial (ácidos nucleicos que codifican un antígeno, sitios loxP, y un gen de resistencia antibiótica). El tratamiento subsecuente con recombinasa Cre cataliza la remoción de material entre los sitios loxP.

La Figura 4 muestra un método para preparar un inserto, en donde el inserto se coloca en pKSV7. El inserto media la recombinación homóloga en un genoma listerial, que da como resultado la integración de varios elementos en el genoma listerial (ácido nucleico que codifica un antígeno). Los ácidos nucleicos que codifican los sitios loxP y un gen de resistencia antibiótica se codifican por un pKSV7 modificado. El tratamiento subsecuente con recombinasa Cre, e.g, por expresión transitoria de recombinación Cre, cataliza la remoción de material entre los sitios loxP.

La Figura 5 describe una modalidad que da como resultado sólo la integración con no supresión. El tratamiento subsecuente con recombinasa Cre, e.g., por expresión transitoria de recombinación Cre, cataliza la remoción de material entre los sitios loxP.

Los reactivos y los métodos de la presente descripción, preparados por recombinación homóloga, no se limitan al uso de pKSV7, o a derivados de los mismos. Otros vectores adecuados para la recombinación homóloga se encuentran disponibles (véase, e.g., Merlin, *et al.* (2002) J. Bacteriol. 184:4573-4581; Yu, *et al.* (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:5978-5983; Smith (1988) Microbiol. Revs. 52:1-28; Biswas, *et al.* (1993) J. Bact. 175:3628-3635; Yu, *et al.* (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:5978-5983; Datsenko y Wanner (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:6640-6645; Zhang, *et al.* (1998) Nature Genetics 20: 123-128).

Para integrar un ácido nucleico a manera de recombinación homóloga, las bacterias se electroporizan con un pKSV7, en donde el pKSV7 codifica una proteína heteróloga o donde el pKSV7 contiene un casete de expresión. Las bacterias se seleccionan al laminarse en medios de agar BHI (o medios no basados en proteínas de animal) que contiene un antibiótico adecuado, e.g., cloranfenicol (0.01 mg/ml), y se incuban a la temperatura permisiva de 30°C. La integración por transferencia única en el cromosoma bacteriano se selecciona al pasar varias colonias individuales para múltiples generaciones a la temperatura no permisiva de 41°C en medio que contiene el antibiótico. Finalmente, la curación y excisión de plásmido (transferencia doble) se logra al pasar varias colonias individuales para múltiples generaciones a la temperatura permisiva de 30°C en medios BHI que no contienen el antibiótico.

La recombinación homóloga puede utilizarse para insertar un ácido nucleico en un ADN objetivo, con o sin supresión de material del ADN objetivo. Un vector que media la recombinación homóloga incluye un primer brazo homólogo (primer ácido nucleico), un segundo brazo homólogo (segundo ácido nucleico), y un tercer ácido nucleico que codifica un antígeno heterólogo que reside entre los dos brazos homólogos. Con respecto a la correspondencia de los brazos homólogos y el ADN genómico objetivo, las regiones objetivo pueden empalmarse entre sí o las regiones objetivo pueden separarse una de la otra. En donde las regiones objetivo se empalman entre sí, el caso de recombinación homóloga meramente da como resultado la inserción del tercer ácido nucleico. Pero en donde las regiones objetivo se separan una de la otra, el evento de recombinación homóloga da como resultado la inserción del tercer ácido nucleico y también la supresión del ADN que reside entre las dos regiones objetivo.

La recombinación homóloga en el gen inIB puede mediar por pKSV7, en donde el pKSV7 contiene la

siguiente estructura central. La siguiente estructura central consiste esencialmente de un primer brazo homólogo (corriente arriba de gen *inlB* en un genoma *L. monocytogenes*), una región que contiene los sitios *KpnI* y *BamHI* (subrayados), y un segundo brazo homólogo (corriente abajo del gen *inlB* en *L. monocytogenes*). La región que contiene los sitios *KpnI* y *BamHI* es adecuada para recibir un inserto, en donde el inserto también contiene los sitios *KpnI* y *BamIII* en el extremo cebador 5' y cebador 3' (o extremo 3' y extremo 5'):

```

CCAAATTAGCGATCTTACACCATTGGCTAATTTAACAAGAATCACCCAACCTAGG
GTTGAATGATCAAGCATGGACAAATGCACCAGTAACTACAAAGCAAATGTATC
CATTCCAAACACGGTGAAAAATGTGACTGGCGCTTTGATTGCACCTGCTACTAT
TAGCGATGGCGGTAGTTACGCAGAACCGGATATAACATGGAACCTACCTAGTTA
TACAAATGAAGTAAGCTATACCTTTAGCCAACCTGTCACTATTGGAAAAGGAAC
GACAACATTTAGTGGAACCGTGACGCAGCCACTTAAGGCAATTTTAAATGCTAA
GTTTCATGTGGACGGCAAAGAAACAACCAAAGAAGTGGAAGCTGGGAATTTATT
GACTGAACCAGCTAAGCCCGTAAAAGAAGGTCACACATTTGTTGGTTGGTTTGA
TGCCCAAACAGGCGGAACCTAAGTGGAATTTTCAGTACGGATAAAATGCCGACAAA
TGACATCAATTTATATGCACAATTTAGTATTAACAGCTACACAGCAACCTTTGA
GAATGACGGTGTAACAACATCTCAAACAGTAGATTATCAAGGCTTGTTACAAGA
ACCTACACCACCAACAAAAGAAGGTTATACTTTCAAAGGCTGGTATGACGCAAA
AACTGGTGGTGACAAGTGCGGATTTTCGCAACTAGCAAAATGCCTGCTAAAAACAT
CACCTTATATGCCCAATATAGCGCCAATAGCTATACAGCAACGTTTGATGTTGA
TGGAAAATCAACGACTCAAGCAGTAGACTATCAAGGACTTCTAAAAGAACCAAA

```

GGCACCAACGAAAGCCGGATATACTTTCAAAGGCTGGTATGACGAAAAACAGA
 TGGGAAAAAATGGGATTTTGCACGGATAAAATGCCAGCAAATGACATTACGCT
 GTACGCTCAATTTACGAAAAATCCTGTGGCACCACCAACAACCTGGAGGGAACAC
 ACCGCCTACAACAAATAACGGCGGGAATACTACACCACCTTCCGCAAATATACC
 5 TGAAGCGACACATCTAACACATCAACTGGGAATTCAGCCAGCACACAAGTAC
 AATGAACGCTTATGACCCTTATAATTCAAAGAAGCTTCACTCCCTACAACCTGG
 CGATAGCGATAATGCGCTCTACCTTTTGTAGGGTTATTAGCAGTAGGAACCTGC
 AATGGCTCTTACTAAAAAGCACGTGCTAGTAAATAGAAGTAGTGTAAGAGCT
 AGATGTGGTTTTTCGGACTATATCTAGCTTTTTTATTTTTTAATAACTAGAAATCA
 AGGAGAGGATAGTGGTACCTTGGTGAGCTCCCTACGAAAAGCTACAACCTTTAAA
 TTCATGAAAAAAGAACTGATTCGCTGAAAACGGATCAGTTCTTTTTCTTTAGA
 10 CTTATTTTTTACAAAACTTTTCGATAATTTCCATATTCTGGGGTCTGTCTTTGC
 TTCAAGTACAGAAATATCACGAACAATGCTATCTAATTTAATTTTTTCCATTT
 CAAATTCTATTTTTTGTGGAGCAGATCGTATTTACTCGTAAGAACCTTGTGGA
 TATTGGCTCCGACAACGCAGTCTGGGTTGGTTTTTGGATCAACGTGAATTAAT
 TCGTATTGCCTTCTATACTCTTATAAACATCAAGCAGTGAAATTTCTTCTGGTG
 GTCTAGCAAGAATCGGATTTGCTTTGCCAGTCTGCGTAGTAATTAATCAGCTT
 TTTTAAATTAATCATGATTTTTCTAATGTTAGCAGGATTTGTTTTTACGCTAC
 15 CAGCAATAATTTCACTCGATAACAAATTCGTATTTTTTAAAAATTTCTATATAAG
 CCAAAATGTGGATAGCATCGCTAAATTTGGATAGAGTATTTCAATTTTTTTCAATC
 CTTTCAAATTTTCTCCTTGACTTATCTTATCATAATGTTTATTATAAAGGTGTÀ
 AATTATAAATGTACAGCTTTAGTGTTAAAAAATTTAAAGGAGTGGTTAAATGA
 CTTATTTAGTAACCTGGTGCAACAGGTGGACTTGGAGGCTACGCATTAAATTATT
 TGAAAGAGCTGGTTCCCATGTCCGATATTTATGCTTTAGTTCTGAGCGAAGAAA
 AAGGTACAGACTTGAAAGCAGCAGGATTTAATATCCGTATTGGTGATTATAGTG
 20 ATGTAGAATCAATGAAGCAAGCATTTCGAGGCATCGACCGCGTATTATTTGTTT
 CAGGAGCACCTGGTAATCGCCAAGTAGAACACGAAAATGTGGTAAATGCGGCAA
 AAGAAGCAGGCGTTTCTTACATCGCTTACACAAGTTTCGCGGGCGCAGATAAAT
 CCACAAGCGCTTTAGCAGAAGATCATTTCTTTACCGAAAAAGTAATCGAAAAAT
 CCGGAATCGCGCACACTTTCTTGCGTAACAACCTGGTACTTCGAAAATGAAATGC
 CGATGATCGGTGGCGCATTGAGTGCTGGAAAATTTGTATACGCTGCTGAAAATG
 25 GAAAAGTTGGCTGGGCATTAAACGCGAATACGCAGAAGTAGCCGCAAAGCTG
 TTGCGGACGCTGACTTCCCAGAAATCCTTGAATTATCTGGCCCACTCATGCAAT
 TCGTAATCATGTATAGCTGTTTCCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAAATC
 CACACAACATACGAGCCGGAAGCATAPAGTGTAAGCCTGGGGTGCCTAATGAG
 TGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTTCCAGTCGGGAA
 ACCTGTCGTGCCAGCTGGACTAAAAGGCATGCAATTCA (SEQ ID NO:15)

La siguiente es la región de la "región central" que contiene los sitios *KpnI* y *BamHI* para insertar un casete de expresión: GGTACCTTGGTGAGCTC (SEQ ID NO:121).

El brazo homólogo corriente arriba se muestra abajo (corriente arriba en gen *inlB*). Las presentes secuencias son de *L. monocytogenes* 10403S. Lo siguiente proporciona la comparación con otra cepa listerial, *L. monocytogenes* 4bF2365. En esta cepa, el gen *inlB* reside en nt 196, 241-198, 133 (GenBank AE017323; segmento 2 de 10 segmentos). El brazo homólogo corriente arriba, aquí descrito para *L. monocytogenes* 10403S, tiene una secuencia correspondiente en *L. monocytogenes* 4bF2365 en nt 194,932 a 196,240 (GenBank AE017323; segmento 2 de 10 segmentos). El brazo homólogo corriente abajo, aquí descrito para *L. monocytogenes* 10403S, tiene una secuencia correspondiente (pero no totalmente idéntica) en *L. monocytogenes* 4bF2365 en nt 198,134 a 199,269 (GenBank AE017323; segmento 2 de 10 segmentos).

(brazo homólogo corriente arriba)

CCAAATTAGCGATCTTACACCATTGGCTAATTTAACAAGAATCACCCAACCTAGG
 GTTGAATGATCAAGCATGGACAAATGCACCAGTAAACTACAAAGCAAATGTATC
 CATTCCAAACACGGTGAAAAATGTGACTGGCGCTTTGATTGCACCTGCTACTAT
 TAGCGATGGCGGTAGTTACGCAGAACCGGATATAACATGGAACCTACCTAGTTA
 TACAAATGAAGTAAGCTATACCTTTAGCCAACCTGTCACCTATTGGAAAAGGAAC
 5 GACAACATTTAGTGGAACCGTGACGCAGCCACTTAAGGCAATTTTAAATGCTAA
 GTTTCATGTGGACGGCAAAGAAACAACCAAAGAAGTGGAAGCTGGGAATTTATT
 GACTGAACCAGCTAAGCCCGTAAAAGAAGGTCACACATTTGTTGGTTGGTTTGA
 TGCCCAAACAGGCGGAACCTAAGTGGAATTTTCAGTACGGATAAAAATGCCGACAAA
 TGACATCAATTTATATGCACAATTTAGTATTAACAGCTACACAGCAACCTTTGA
 GAATGACGGTGTAACAACATCTCAAACAGTAGATTATCAAGGCTTGTTACAAGA
 ACCTACACCACCAACAAAAGAAGGTTATACCTTTCAAAGGCTGGTATGACGCAAA
 10 AACTGGTGGTGACAAGTGGGATTTTCGCAACTAGCAAAATGCCTGCTAAAAACAT
 CACCTTATATGCCCAATATAGCGCCAATAGCTATACAGCAACGTTTGATGTTGA
 TGGAAAATCAACGACTCAAGCAGTAGACTATCAAGGACTTCTAAAAGAACCAAA
 GGCACCAACGAAAGCCGGATATACTTTCAAAGGCTGGTATGACGAAAAAACAGA
 TGGGAAAAAATGGGATTTTTCGACGGATAAAAATGCCAGCAAATGACATTACGCT
 GTACGCTCAATTTACGAAAAATCCTGTGGCACCACCAACAACCTGGAGGGAACAC
 ACCGCCTACAACAAATAACGGCGGGAATACTACACCACCTTCGCAAAATATACC
 15 TGGAAGCGACACATCTAACACATCAACTGGGAATTCAGCCAGCACACAAGTAC
 AATGAACGCTTATGACCCTTATAATTCAAAGAAGCTTCACTCCCTACAACTGG
 CGATAGCGATAATGCGCTCTACCTTTTGTAGGGTTATTAGCAGTAGGAACTGC
 AATGGCTCTTACTAAAAAAGCACGTGCTAGTAAATAGAAGTAGTGTAAGAGCT
 AGATGTGGTTTTTCGGACTATATCTAGCTTTTTTATTTTTTAATACTAGAATCA
 AGGAGAGGATAGT (SEQ ID NO:16)

20 El brazo homólogo corriente abajo se muestra abajo (corriente abajo de gen inIB):
 (brazo homólogo corriente abajo)

25

30

35

CCTACGAAAAGCTACAACCTTTAAATTCATGAAAAAAGAACTGATTTCGCTGAAAA
 CGGATCAGTTCTTTTTCTTTAGACTTATTTTACAAAACTTTTCGATAATTT
 CCATATTCTGGGGTCTGTCCTTTGCTTTCAAAGTACAGAAATATCACGAACAATGC
 TATCTAATTTAATTTTTTCCATTTCAAATTCATTTTTTTGTTGGAGCAGATCGT
 5 ATTTACTCGTAAGAAGCTTGTGGGATATTGGCTCCGACAACGCAGTCTGGGTTGG
 TTTTTGGATCAACGTGAATTAATTCGTATTGCCTTCTATACTCTTATAAACAT
 CAAGCAGTGAAATTTCTTCTGGTGGTCTAGCAAGAATCGGATTTGCTTTGCCAG
 TCTGCGTAGTAATTAATCAGCTTTTTTTAAATTACTCATGATTTTTCTAATGT
 TAGCAGGATTTGTTTTTACGCTACCAGCAATAATTTCACTCGATAACAAATTCG
 TATTTTTAAAAATTTCTATATAAGCCAAAATGTGGATAGCATCGCTAAATTGGA
 TAGAGTATTTCATTTTTTCAATCCTTTCAAATTTTCTCCTTGACTTATCTTAT
 10 CATAATGTTTATTATAAAGGTGTAAATTATAAATGTACAGCTTTAGTGTTAAAA
 AATTTAAAGGAGTGGTTTAAATGACTTATTTAGTAACTGGTGCAACAGGTGGCAG
 TTGGAGGCTACGCATTAATTAATTTGAAAGAGCTGGTTCCCATGTCCGATATTT
 ATGCTTTAGTTTCGTAGCGAAGAAAAGGTACAGACTTGAAAGCAGCAGGATTTA
 ATATCCGTATTGGTGATTATAGTGATGTAGAATCAATGAAGCAAGCATTTCGCAG
 GCATCGACCGCGTATTATTTGTTTCAGGAGCACCTGGTAATCGCCAAGTAGAAC
 ACGAAAATGTGGTAAATGCGGCAAAAGAAGCAGGCGTTTCTTACATCGCTTACA
 15 CAAGTTTCGCGGGCGCAGATAAATCCACAAGCGCTTTAGCAGAAGATCATTTCT
 TTACCGAAAAAGTAATCGAAAAATCCGGAATCGCGCACACTTTCTTGCGTAACA
 ACTGGTACTTCGAAAATGAAATGCCGATGATCGGTGGCGCATTGAGTGCTGGAA
 AATTTGTATACGCTGCTGAAAATGGAAAAGTTGGCTGGGCATTAAAACGCGAAT
 ACGCAGAAGTAGCCGCAAAAGCTGTTGCGGACGCTGACTTCCCAGAAATCCTTG
 AATTATCTGGCCCACTCATGCAATTCGTAATCATGTATAGCTGTTTCTGTGT
 GAAATTGTTATCCGCTCACAATTCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGT
 20 GTAAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCT
 CACTGCCCGCTTTCCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCTGGACTAAAAGGCAT
 GCAATTCA (SEQ ID NO:17)

Con respecto a la inserción del gen ActA en un genoma listerial, lo siguiente describe los brazos homólogos
 corriente arriba y corriente abajo adecuados para mediar la integración por recombinación homóloga en el sitio ActA de
 25 *L. monocytogenes* 10403S:

(brazo homólogo corriente arriba)

AGAATTTAGTTCCGCGAGTGGATGCTCATTTTTACGCAAGTGAAAGTGACGAATACTATAAAAAATGTCC
 ACCAACTAGAGAGTCTAGATGGTAAAGGTGGAGAAATTGATTCGTTTGTCATTATGGCTTGAATTGC
 AATAATGCCTTTTGGGATGGCCAAGAAATTCCTTTATGGAGATGGGGACAAAAAGAATTTCAAACCATT
 30 TTCTATGCGCCAAAACCTATTGTTGGTTCATGAACCTAACGCATGCAGTTATCCAGTATTCGCGCGGATTGG
 AATACGAAGGGCAATCAGGTGCGCTAAACGAGTCGTTCCGCGATGTTTTTGGTTATTTATTGCGCCA
 AATCATTTGGTTGATTGGTGAGGATGCTGTGTGCGTGGGTGCGGAGATGGGCGAATAAGAAGCATTAA
 AGATCCTGACAAATATAATCAAGCGGCTCATATGAAGGATTACGAATCGCTTCCAATCACAGAGGAAG
 GCGACTGGGGCGGAGTTTCATATAATAGTGGTATCCCGAATAAAGCAGCCTATAATACTATCNCATAAA
 CTTGGAAAAGAAAAACAGAACAGCTTTATTTTCGCGCCTTAAAGTACTATTTAACGAAAAAATCCCA
 GTTTACCGATGCGAAAAAAGCGCTTCAACAAGCAGCGAAAGATTATATGGTGAAGATGCTTCTAAAA
 AAGTTGCTGAAGCTTGGGAAGCAGTTGGGGTTAACTGATTAAACAAATGTTAGAGAAAAATTAATTCTC
 CAAGTGATATTCTTAAATAATTCATGAATATTTTTCTTATATTAGCTAATTAAGAAGATAATTAAC
 35 TGCTAATCCAATTTTTAACGGAATAAATTAGTGAAAAATGAAGGCCGAATTTTCCTTGTCTAAAAAGG
 TTGTATTAGCGTATCACGAGGAGGGAGTATAA (SEQ ID NO:18)

Lo siguiente describe un brazo homólogo corriente abajo adecuado, para mediar la inserción del gen ActA
 listerial:

(brazo homólogo corriente abajo)

AAACACAGAACGAAAGAAAAAGTGAGGTGAATGATATGAAATTCAAAAATGT
 GGTCTAGGTATGTGCTTGACCGCAAGTGTTCTAGTCTTTCCGGTAACGATA
 AAAGCAAATGCCTGTTGTGATGAATACTTACAAACACCCGCAGCTCCGCATG
 ATATTGACAGCAAATTACCACATAAACTTAGTTGGTCCGCGGATAACCCGAC
 AAATACTGACGTAAATACGCACATATTGGCTTTTTAAACAAGCGGAAAAAATA
 CTAGCTAAAGATGTAAATCATATGCGAGCTAATTTAATGAATGAACTTAAAA
 AATTCGATAAACAAATAGCTCAAGGAATATATGATGCGGATCATAAAAATCC
 ATATTATGATACTAGTACATTTTTATCTCATTTTTATAATCCTGATAGAGAT
 AATACTTATTTGCCGGGTTTTGCTAATGCGAAAATAACAGGAGCAAAGTATT
 TCAATCAATCGGTGACTGATTACCGAGAAGGGAAATTTGACACAGCGTTTTTA
 TAAATTAGGCCTAGCAATCCATTATTATACGGATATTAGTCAACCTATGCAC
 GCCAATAATTTTACCGCAATATCATACCCTCCAGGCTACCACTGTGCATATG
 AAAATTACGTAGATAACCATTAACACAATTATCAAGCAACGGAAGACATGGT
 AGCAAAAAGATTTTGCTCAGATGACGTGAAAGACTGGCTCTATGAAAATGCG
 AAAAGGGCGAAAGCGGACTACCCGAAAATAGTCAATGCGAAAACATAAAAAAT
 CATATTTAGTAGGAAATTCGGAATGGAAAAAGGATACAGTGGAACCTACTGG
 AGCTAGACTAAGAGATTACAGCAAACCTTGGCAGGTTTTTTAGAAATTTTGG
 TCTAAAAAACAAATGAATAACAATATTTAGGAATACATTCTTATCCACTCG
 TTAGCGGGTGGATATATTTTATGGGGAGGAAGTAAGCCAAATGTATATAAAA
 GGGAGGTTAATCTTTTCTTTGTAATGTTAGTAATCGCGTTATGTTCCGAAG
 GGC (SEQ ID NO:19)

(b). Genes de resistencia antibiótica flanqueada por LoxP.

La presente descripción, en algunas modalidades, proporciona los reactivos y métodos para mediar la rápida o eficiente excisión de un primer ácido nucleico de un genoma bacteriano. El método depende de la excisión mediada por recombinasa, en donde la recombinasa reconoce los sitios de enlace de recombinasa heteróloga que flanquean el primer ácido nucleico. Los sitios de enlace de recombinasa heteróloga pueden ser, por ejemplo, un par de sitios loxP o un par de sitios frt. Para proporcionar un ejemplo no limitante, el primer ácido nucleico puede codificar un marcador de selección tal como un gen de resistencia antibiótica.

Los reactivos de esta modalidad incluyen los plásmidos que comprenden dos sitios de enlace de recombinasa heteróloga que flanquean el primer ácido nucleico; un genoma bacteriano que comprende dos sitios de enlace de recombinasa heteróloga que flanquean el primer ácido nucleico; y una bacteria que contiene un genoma que comprende dos sitios de enlace de recombinasa heteróloga que flanquean el primer ácido nucleico.

El método de esta modalidad se establece en las siguientes etapas:

i. Transfectar una bacteria con un plásmido, en donde el plásmido puede mediar la integración de un primer ácido nucleico (flanqueado por un par de sitios de enlace de recombinasa heteróloga) en el genoma bacteriano;

ii. Permitir la integración del primer ácido nucleico (flanqueado por dos sitios de enlace de recombinasa heteróloga) en el genoma bacteriano. Sin implicar ninguna limitación como el mecanismo, la integración puede ser a manera de recombinación específica de sitio o recombinación homóloga;

iii. Elegir la bacteria que contiene el primer ácido nucleico integrado. En donde el primer ácido nucleico codifica un gen de resistencia antibiótica, la selección puede incluir el cultivo de la bacteria en un medio que contiene el antibiótico. La etapa de selección puede dar como resultado una bacteria genotípicamente pura;

iv. Tratar la bacteria genotípicamente pura con condiciones que facilitan la excisión catalizada por recombinasa del primer ácido nucleico del genoma bacteriano. En donde el par de sitios de enlace de recombinasa heteróloga son los sitios loxP, la recombinasa puede ser recombinasa Cre. La recombinasa Cre puede ser introducida en la bacteria al transfectarse con un plásmido que codifica esta enzima. En una modalidad, la expresión de recombinasa Cre es transitoria. La recombinasa Cre y la recombinasa FLP utilizan el mismo mecanismo de reacción enzimática, y median la excisión específica de sitio precisa entre un par de sus secuencias objetivo específicas;

v. Después de permitirse la excisión catalizada por recombinasa Cre del primer nucleico la bacteria puede cultivarse hasta que el plásmido se pierda por dilución o acción de nucleasa;

vi. La bacteria resultante puede identificarse por la presencia del primer ácido nucleico en el genoma. También, la bacteria resultante puede identificarse por la pérdida de uno de los dos sitios de enlace de recombinasa heteróloga del genoma, es decir, sólo uno de los dos sitios se dejará.

La descripción anterior no se pretenderá que limite el método a las etapas citadas, no se pretenderá que limite el método al orden de las etapas exhibidas, y no se pretenderá para entenderse que todas estas etapas deben ocurrir. Esta descripción no se limita necesariamente a los dos sitios de enlace de recombinasa heteróloga. Los polinucleótidos que contienen dos sitios loxP y dos sitios Frt pueden utilizarse, por ejemplo, en donde los dos sitios loxP flanquean un primer ácido nucleico, y los dos sitios Frt flanquean un segundo ácido nucleico, y en donde la expresión transitoria de la recombinasa Cre permite la excisión del primer ácido nucleico, y en donde la expresión transitoria de la recombinasa FLP (quizás en diferente momento) da como resultado la excisión del segundo ácido nucleico.

El sitio objetivo de ADN canónico para las recombinasas específicas de sitio consiste de dos sitios de enlace de recombinasa, en donde los dos sitios de enlace de recombinasa flanquean una región central (región separadora). La presente descripción proporciona dos sitios objetivo de ADN canónico (un par de sitios objetivo de ADN canónico), en donde los sitios flanquean un primer ácido nucleico. LoxP es un tipo de sitio objetivo de ADN canónico. LoxP tiene dos sitios de enlace de recombinasa de 13bp (repeticiones invertidas de 13bp) que flanquean un separador o región central de 8bp. De esta manera, cada sitio loxP es una secuencia de 34 nucleótidos continuos (34bp).

La recombinasa Cre y la recombinasa FLP son miembros de la familia de integrasa de las recombinasas específicas de sitio. La recombinasa FLP y Cre utilizan un residuo de tirosina para catalizar el desdoblamiento de ADN. La recombinasa Cre reconoce los sitios lox, mientras que la recombinasa FLP reconoce los sitios Frt.

La guía para designar los sitios Frt y sitios Lox variantes y alternativos, se encuentra disponible. En donde se desea una región separadora alternativa, el experto en la materia reconocerá que la excisión mediada por recombinasa Cre probablemente se requiere para las regiones separadoras idénticas en el primer sitio lox y el segundo sitio lox (véase, e.g., Araki, *et al.* (2000) *Nucleic Acids Res.* 30:e103; Nagy (2000) *Genetics* 26:99-109; Gua, *et al.* (1997) *Nature* 389:40-46; Sauer (1993) *Methods Enzymol.* 225:890-900; Langer, *et al.* (2002) *Nucleic Acids Res.* 30:3067-3077; Lath, *et al.* (2002) *Nucleic Acids Res.* 30:e115; Baer y Bode (2001) *Curr. Opin. Biotechnol.* 12:473-480; Nakano, *et al.* (2001) *Microbiol. Immunol.* 45:657-665).

La presente descripción contempla un polinucleótido que comprende un primer sitio lox y un segundo sitio lox, en donde el par de sitios lox flanquea un primer ácido nucleico, y en donde el primer ácido nucleico puede codificar, e.g., un marcador de selección, gen de resistencia antibiótica, región reguladora, o antígeno. También se contempla un polinucleótido que comprende un primer sitio lox y un segundo sitio lox, en donde el par de sitios lox flanquea un primer ácido nucleico, y en donde el primer ácido nucleico puede codificar, e.g., un marcador de selección, gen de resistencia antibiótica, región reguladora, o antígeno.

El experto en la materia apreciará fácilmente que los sitios de Lox variantes en donde el sitio de enlace de recombinasa es bajo 13bp, se encuentran disponibles a la luz de los reportes de que la recombinasa Cre puede funcionar con un sitio de enlace de recombinasa tan corto como 8-10 bp.

Un sitio lox alternativo, loxY se encuentra disponible, para proporcionar un ejemplo no limitante. La presente descripción contempla un polinucleótido que comprende un primer sitio loxY y un segundo sitio loxY, en donde el par de sitios loxY flanquea un primer ácido nucleico, y en donde el primer ácido nucleico puede codificar, e.g., un marcador de selección, un gen de resistencia antibiótica, una región reguladora, o un antígeno, y así sucesivamente. Nótese también, que la región central de loxP tiene bases de pirimidina y purina alternativas. Sin embargo, este modelo alternativo es necesario para el reconocimiento por recombinasa Cre, y la presente descripción comprende variantes de sitio LoxP con regiones centrales mutadas (véase, e.g., Sauer (1996) *Nucleic Acids Res.* 24:4608-4613; Hoess, *et al.* (1986) *Nucleic Acids Res.* 14:2287-2300).

El sitio Frt contiene tres elementos de simetría 13bp y una región central 8bp (48pb juntas). La recombinasa FLP reconoce Frt como un sustrato, así como los sitios Frt variantes, incluyendo los sitios Frt tan cortos como 34bp, y sitio Frt con regiones centrales variantes (véase, e.g., Schweizer (2003) *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 5:67-77; Bode, *et al.* (2000) *Biol. Chem.* 381 :801-813).

La presente descripción proporciona un polinucleótido que contiene un primer sitio loxP y un segundo sitio loxP operativamente unido, en donde los sitios loxP primero y segundo, flanquean un primer ácido nucleico, para proporcionar un ejemplo no limitante. Se apreciará que esta descripción comprende otros sitios de enlace de recombinasa heteróloga, tales como las variantes de loxP, así como los sitios frt y las variantes de sitio frt.

El término “unido operativamente”, como se aplica a un primer sitio loxP y un segundo sitio loxP, en donde los dos sitios loxP flanquean un primer ácido nucleico, comprende lo siguiente. Aquí, “unido operativamente” significa que la recombinasa Cre es capaz de reconocer el primer sitio loxP y el segundo sitio loxP como sustratos, y es capaz de catalizar la excisión del primer ácido nucleico del genoma bacteriano. El término “unido operativamente” no se limitará a los sitios loxP, a medida que comprende cualquiera de los “sitios de enlace de recombinasa heteróloga” tal como otros sitios lox, o sitios frt. También, el término “unido operativamente” no se limitará a la excisión catalizada por recombinasa, el término también comprende la integración catalizada por recombinasa. Además, el término “unido operativamente” no se limitará a ácidos nucleicos en un genoma –también se comprenden los ácidos nucleicos que residen en plásmidos, intermediarios utilizados en diseño genético, y lo similar.

Los ácidos nucleicos que codifican las recombinasas se describen en la Tabla 7A, y los sitios objetivo de ácido nucleico reconocidos por estas recombinaciones aparecen en la Tabla 7B.

Tabla 7A. Recombinasas

Recombinasa	Ubicación y No. de Acceso de GenBank
Recombinasa Cre	Nucleótidos 5347-6195 (exón 1) y 6262-6465 (exón 1) de No. de Acceso de GenBank AJ627603
Recombinasa FLP	Complemento de nucleótidos 4426-5697 de No. de Acceso de GenBank AF048702
Recombinasa FLP	Complemento de nucleótidos 6054-7325 de No. de Acceso de GenBank AY597273
Recombinasa FLP	Nucleótidos 5570-6318, 1-523 de No. de Acceso de GenBank J01347. La región corriente arriba de la secuencia codificadora comienza en el nucleótido 5570, mientras que la región corriente abajo de la secuencia codificadora termina en el nucleótido 523

Tabla 7B. Sitios de Unión para recombinasas.

Sitio objetivo	Ubicación y No. de Acceso de GenBank
Sitios Objetivo de recombinasa FLP	
Frt	Nucleótidos 260-307 de No. de Acceso de GenBank AY562545
Frt	Nucleótidos 464-511 de No. de Acceso de GenBank A6597272
Frt	Nucleótidos 3599-3646 de No. de Acceso de GenBank AY423864
Sitios Objetivo de recombinasa Cre	
LoxP	Nucleótidos 415-448 de No. de Acceso de GenBank AF143506
LoxP	Nucleótidos 118-151 de No. de Acceso de GenBank U51223
LoxP	Nucleótidos 1050-1083 de No. de Acceso de GenBank AY093430
LoxP	Nucleótidos 759-792 de No. de Acceso de GenBank AJ401047

Las secuencias de ácido nucleico que codifican varios factores de resistencia antibiótica se describen (Tabla 8). Las secuencias típicas son aquellas que codifican la resistencia a un antibiótico que es tóxico a *Listeria*, e.g., acetiltransferasa de cloranfenicol (CAT) (Tabla 8).

Un primer ácido nucleico que codifica el factor de resistencia antibiótica se une operativamente a un sitio de enlace de ribosoma, un promotor, y contiene un sitio de inicio de traslación, y/o un sitio de detección de traslación, y se

flanquea por dos sitios de enlace de recombinasa heteróloga.

Esta descripción proporciona un polinucleótido que contiene un par de sitios loxP unidos operativamente que flanquean un primer ácido nucleico, y un segundo ácido nucleico (no flanqueado por los sitios loxP), en donde el polinucleótido consiste de un primer filamento y un segundo filamento, y en donde el primer ácido nucleico tiene una primera estructura de lectura abierta (ORF) y el segundo ácido nucleico tiene una segunda estructura de lectura abierta (ORF). En un aspecto, la primera ORF se encuentra en el primer filamento, y la segunda ORF también se encuentra en el primer filamento. En otro aspecto, la primera ORF se encuentra en el primer filamento y la segunda ORF se encuentra en el segundo filamento. Todavía otro aspecto proporciona una primera ORF en el segundo filamento y la segunda ORF en el primer filamento. Además, ambas ORFs pueden residir en el segundo filamento. La presente descripción, en un aspecto, proporciona un plásmido que comprende el polinucleótido anteriormente exhibido. También se proporciona una *Listeria* que contiene el polinucleótido anteriormente exhibido, en donde el polinucleótido puede encontrarse en un plásmido y/o integrarse en el genoma. Cada una de las modalidades anteriormente exhibidas puede comprender los sitios de enlace de recombinasa heteróloga a diferencia de loxP. Por ejemplo, las variantes lox, los sitios Frt, las variantes Frt, y los sitios de enlace de recombinasa no relacionados a lox o Frt, se encuentran disponibles.

Tabla 8. Genes de resistencia antibiótica.

Gen de resistencia antibiótica	No. de Acceso de GenBank
Cloranfenicol (cloranfenicol acetiltransferasa; CAT)	Complemento de nucleótidos 312-971 de No. de Acceso de GenBank AJ417488 (pPL1 de Lauer, <i>et al.</i>)
Cloranfenicol (CAT)	Complemento de nucleótidos 4898-5548 de No. de Acceso de GenBank AJ417488 (pPL1 de Lauer, <i>et al.</i>)
Cloranfenicol (CAT)	Complemento de nucleótidos 312-971 de No. de Acceso de GenBank AJ417449 (pPL2 de Lauer, <i>et al.</i>)
Cloranfenicol (CAT)	Complemento de nucleótidos 4920-5570 de No. de Acceso de GenBank AJ417449 (pPL2 de Lauer, <i>et al.</i>)
Penicilina (proteína de unión 2 de penicilina)	Nucleótidos 25-1770 de No. de Acceso de GenBank X59629
Eritromicina (determinante de resistencia de eritromicina)	Nucleótidos 864-1601 de No. de Acceso de GenBank AY680862
Ampicilina (penicilina beta-1ActAmasa)	Complemento de nucleótidos 3381-4311 de No. de Acceso de GenBank AJ401049
Tetraciclina (proteína de resistencia de tetraciclina)	Complemento de nucleótidos 4180-5454 de No. de Acceso de GenBank AY608912
Gentamicina (aminoglicosido acetiltransferasa)	Complemento de nucleótidos 1326-1859 de No. de Acceso de GenBank EVE414668

(c). **Socios de proteína de fusión ActA, y derivados de las mismas.**

A. Los socios de proteína de fusión ActA modificada, los polinucleótidos que codifican las proteínas de fusión que comprenden ActA modificada, y *Listeria* que comprende los polinucleótidos.

i. **GENERAL.**

La presente invención, en ciertos aspectos, proporciona un polinucleótido que comprende un primer ácido nucleico que codifica ActA modificado, unido operativamente y en estructura con un segundo ácido nucleico que codifica un antígeno heterólogo como se define además en las reivindicaciones. La invención también proporciona

una *Listeria* que contiene el polinucleótido, en donde la expresión del polinucleótido genera una proteína de fusión que comprende el ActA modificado y el antígeno heterólogo. El ActA modificado puede incluir la secuencia secretora natural de ActA, una secuencia secretora derivada de otra proteína listerial, una secuencia secretora derivada de una proteína bacteriana no listerial, o el ActA modificado puede evitarse de cualquier secuencia secretora.

5 La pareja de proteína de fusión derivada de ActA encuentra uso en la expresión creciente, la estabilidad creciente, secreción creciente, presentación inmune de mejora, respuesta inmune estimuladora, supervivencia de mejora a un tumor, supervivencia de mejora a un cáncer, supervivencia creciente a un agente infeccioso, y lo similar.

En un aspecto, la invención proporciona un polinucleótido que comprende un promotor unido operativamente a una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína de fusión, en donde la proteína de fusión comprende (a) ActA modificado y (b) un antígeno heterólogo como se define además en las reivindicaciones. En algunas modalidades, el promotor es promotor ActA. En algunas modalidades, el ActA modificado comprende más de los primeros 59 aminoácidos de ActA. En algunas modalidades, el ActA modificado es un fragmento de ActA que comprende la secuencia de señal de ActA (o se deriva de un fragmento de ActA que comprende la secuencia de señal de ActA). En algunas modalidades, el ActA modificado comprende al menos los primeros 59 aminoácidos de ActA, pero menos de aproximadamente los primeros 265 aminoácidos de ActA. En algunas modalidades, el ActA modificado comprende más de los primeros 59 aminoácidos de ActA, pero menos de aproximadamente los primeros 265 aminoácidos de ActA. En otras palabras, en algunas modalidades, la secuencia de ActA modificado corresponde a un fragmento de terminal N de ActA (incluyendo la secuencia de señal de ActA) que se trunca de cierta manera entre el aminoácido 59 y aproximadamente el aminoácido 265 de la secuencia de ActA. En algunas modalidades, el ActA modificado comprende los primeros 59 a 200 aminoácidos de ActA, los primeros 59 a 150 aminoácidos de ActA, los primeros 59 a 125 aminoácidos de ActA, o los primeros 59 a 110 aminoácidos de ActA. En algunas modalidades, el ActA modificado consiste de los primeros 59 a 200 aminoácidos de ActA, los primeros 59 a 150 aminoácidos de ActA, los primeros 59 a 125 aminoácidos de ActA, o los primeros 59 a 110 aminoácidos de ActA. En algunas modalidades, el ActA modificado comprende aproximadamente los primeros 65 a 200 aminoácidos de ActA, aproximadamente los primeros 65 a 150 aminoácidos de ActA, aproximadamente los primeros 65 a 125 aminoácidos de ActA, o aproximadamente los primeros 65 a 110 aminoácidos de ActA. En algunas modalidades, el ActA modificado consiste de aproximadamente los primeros 65 a 200 aminoácidos de ActA, aproximadamente los primeros 65 a 150 aminoácidos de ActA, aproximadamente los primeros 65 a 125 aminoácidos de ActA, o aproximadamente los primeros 65 a 110 aminoácidos de ActA. En algunas modalidades, el ActA modificado comprende los primeros 70 a 200 aminoácidos de ActA, los primeros 80 a 150 aminoácidos de ActA, los primeros 85 a 125 aminoácidos de ActA, los primeros 90 a 110 aminoácidos de ActA, los primeros 95 a 105 aminoácidos de ActA, o aproximadamente los primeros 100 aminoácidos de ActA. En algunas modalidades, el ActA modificado consiste de los primeros 70 a 200 aminoácidos de ActA, los primeros 80 a 150 aminoácidos de ActA, los primeros 85 a 125 aminoácidos de ActA, los primeros 90 a 110 aminoácidos de ActA, los primeros 95 a 105 aminoácidos de ActA, o aproximadamente los primeros 100 aminoácidos de ActA. En algunas modalidades, el ActA modificado comprende aminoácidos 1-100 de ActA. En algunas modalidades, el ActA modificado consiste de aminoácidos 1-100 de ActA. En algunas modalidades, el antígeno heterólogo es, o se deriva de, una célula cancerígena, tumor, o agente infeccioso. En algunas modalidades, el antígeno heterólogo es inmunológicamente de reactividad cruzada con, o comparte al menos un epítipo con, el cáncer, tumor, o agente infeccioso. En algunas modalidades, el antígeno heterólogo es un antígeno tumoral o se deriva de un antígeno tumoral. En algunas modalidades, el antígeno heterólogo es, o se deriva de, mesotelina humana. En algunas modalidades, la secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína de fusión se optimiza por codón para la expresión en *Listeria*. La invención proporciona los plásmidos y las células que comprenden el polinucleótido. La invención además proporciona una bacteria *Listeria* e.g., *Listeria monocytogenes* que comprende el polinucleótido, así como las vacunas que comprenden la *Listeria*. En algunas modalidades, el ADN genómico de la *Listeria* comprende el polinucleótido. En algunas modalidades, el polinucleótido se coloca en el ADN genómico en el sitio del gen *actA* o el sitio del gen *inlB*. En algunas modalidades, la *Listeria* comprende un plásmido que comprende el polinucleótido. La invención además proporciona composiciones farmacéuticas e inmunogénicas que comprenden la *Listeria*. La invención también proporciona dicha composición para uso en los métodos para estimular las respuestas inmunes al antígeno heterólogo en un mamífero (e.g., un humano), que comprende administrar una cantidad eficaz de la *Listeria* (o una cantidad eficaz de una composición que comprende la *Listeria*) al mamífero. Por ejemplo, la invención también proporciona dicha composición para uso en los métodos para estimular las respuestas inmunes a un antígeno de, o derivado de, un cáncer o agente infeccioso, que comprende administrar una cantidad eficaz de la *Listeria* (o una composición que comprende la *Listeria*) a un mamífero que tiene el cáncer o agente infeccioso, en donde el antígeno heterólogo comparte al menos un epítipo con o es inmunológicamente de reactividad cruzada con el antígeno de, o derivado de, el cáncer o agente infeccioso.

Las modalidades preferidas de los casetes de expresión de antígeno que utilizan las configuraciones de

pareja de fusión de antígeno heterólogo ActA-N-100 enlazan funcionalmente dicha construcción de fusión de antígeno con el promotor actA nativo y el ARN de la región no trasladada 5' (UTR). La transcripción dependiente de PrfA del promotor actA da como resultado la síntesis de un ARN 5' UTR de 150 nucleótidos antes del sitio de iniciación de traslación GUG de proteína ActA. Los mutantes *L. monocytogenes* suprimidos del promotor actA 5' UTR expresan

5

En algunas modalidades, el promotor utilizado para expresar la proteína de fusión que comprende el ActA modificado y un antígeno heterólogo es un promotor hly. En otras modalidades, el promotor es un promotor actA. Estos promotores listeriales, por ejemplo, pueden derivarse de cualquier cepa de *Listeria monocytogenes*. Por ejemplo, el promotor actA o hly puede derivarse de la cepa EGD *L. monocytogenes*. La secuencia de genoma de cepa EGD se encuentra públicamente disponible en el No. de Acceso de GenBank AL591974 (segmento de genoma completo 2/12) (promotor hly:nts 5581-5818; gen actA:nts 9456-11389). Alternativamente, las secuencias utilizadas pueden ser de otra cepa tal como la cepa 10403S de *L. monocytogenes*.

10

15

En otro aspecto, la invención proporciona un polinucleótido que comprende un primer ácido nucleico que codifica un ActA modificado, unido operativamente y en estructura con, un segundo ácido nucleico que codifica un antígeno heterólogo como se define en las reivindicaciones. En algunas modalidades, el ActA modificado comprende al menos los primeros 59 aminoácidos de ActA, pero menos de aproximadamente los primeros 265 aminoácidos de ActA. En algunas modalidades, el ActA modificado comprende los primeros 59 a 200 aminoácidos de ActA, los primeros 59 a 150 aminoácidos de ActA, los primeros 59 a 125 aminoácidos de ActA, o los primeros 59 a 110 aminoácidos de ActA. En algunas modalidades, el ActA modificado comprende los primeros 70 a 200 aminoácidos de ActA, los primeros 80 a 150 aminoácidos de ActA, los primeros 85 a 125 aminoácidos de ActA, los primeros 90 a 110 aminoácidos de ActA, los primeros 95 a 105 aminoácidos de ActA, o aproximadamente los primeros 100 aminoácidos de ActA. En algunas modalidades, el primer ácido nucleico codifica los aminoácidos 1-100 de ActA. En algunas modalidades, el polinucleótido es genómico. En algunas modalidades alternativas, el polinucleótido se basa en plásmido. En algunas modalidades, el polinucleótido se une operativamente con un promotor. Por ejemplo, el polinucleótido puede unirse operativamente con uno o más de los siguientes: (a) promotor actA; o (b) un promotor bacteriano que no es un promotor actA. En algunas modalidades, el antígeno heterólogo es, o se deriva de, una célula cancerígena, tumor, o agente infeccioso. En algunas modalidades, el antígeno heterólogo es inmunológicamente de reactividad cruzada con, o comparte al menos un epítipo con, el cáncer, tumor, o agente infeccioso. En algunas modalidades, el antígeno heterólogo es, o se deriva de, mesotelina humana. La invención además proporciona una bacteria *Listeria* e.g., *Listeria monocytogenes* que comprende el polinucleótido, así como las vacunas que comprenden la *Listeria*. En algunas modalidades, la *Listeria* es hMeso26 o hMeso38 (véase Tabla 11 del Ejemplo VII, de abajo). La invención también proporciona los métodos para estimular las respuestas inmunes a un antígeno de, o derivado de, un

20

25

30

35

En algunas modalidades, la secuencia nativa *L. monocytogenes* que codifica los primeros 100 aminoácidos de ActA se une funcionalmente en estructura con una secuencia de antígeno heterólogo deseado. En algunas modalidades, la secuencia de antígeno heterólogo se sintetiza de acuerdo con el uso de codón óptimo de *L. monocytogenes*, un organismo de bajo porcentaje en GC. En algunas modalidades, las composiciones que utilizan el promotor actA junto con las secuencias no trasladadas 5', se desean.

40

En algunas modalidades, el actA modificado comprende (a) aminoácidos 1-59 de actA, (b) una mutación en inactivación en, supresión de, o truncación previo a, al menos un dominio para regulación mediada por actA del citoesqueleto de célula huésped, en donde el primer ácido nucleico se une operativamente y en estructura con un segundo ácido nucleico que codifica un antígeno heterólogo. En algunas modalidades, el dominio es la región de homología de cofilina (KKRR (SEQ ID NO:23)). En algunas modalidades, el dominio es el dominio de enlace central de fosfolípido (KVFKKIKDAGKWVRDKI (SEQ ID NO:20)). En algunas modalidades, al menos un dominio comprende todos los cuatro dominios ricos en prolina (FPPPP (SEQ ID NO:21), FPPPP (SEQ ID NO:21), FPPPP (SEQ ID NO:21), FPIIP (SEQ ID NO:22)) de ActA. En algunas modalidades, el actA modificado es actA-N100. En algunas modalidades, el polinucleótido es genómico. En algunas modalidades, el polinucleótido no es genómico. En algunas modalidades, el polinucleótido se une operativamente con uno o más de los siguientes: (a) promotor actA, o (b) un promotor bacteriano (e.g., listerial) que no es un promotor actA. La invención además proporciona una bacteria *Listeria* (e.g., *Listeria monocytogenes*) que comprende el polinucleótido, así como las vacunas que comprenden la *Listeria*. En algunas modalidades, la *Listeria* es hMeso26 o hMeso38 (véase la Tabla 11 del Ejemplo VII, de abajo).

45

50

55

La invención también proporciona métodos para estimular respuestas inmunes a un antígeno de, o derivado de, un cáncer o agente infeccioso, que comprende administrar la *Listeria* a un mamífero que tiene el cáncer o agente infeccioso, en donde el antígeno heterólogo comparte al menos un epítipo con o es inmunológicamente de reactividad cruzada con el antígeno de, o derivado de, cáncer o agente infeccioso. En algunas modalidades, la estimulación es relativa a la respuesta inmune sin administrar la *Listeria*. En algunas modalidades, el cáncer comprende un tumor o célula pre-cancerígena. En algunas modalidades, el agente infeccioso comprende un virus, bacteria patógena, u organismo parasitario. En algunas modalidades, el antígeno heterólogo es, o se deriva de, una célula cancerígena, tumor, o agente infeccioso. En algunas modalidades, el antígeno heterólogo es inmunológicamente de reactividad cruzada con, o comparte al menos un epítipo con, el cáncer, tumor, o agente infeccioso. En algunas modalidades, el antígeno heterólogo es, o se deriva de, mesotelina humana.

En algunas modalidades, lo que se proporciona es un polinucleótido que comprende un primer ácido nucleico que codifica un ActA modificado que comprende al menos aminoácidos 1-59 de ActA, comprendiendo además al menos una modificación en una secuencia de ActA tipo silvestre, en donde la al menos una modificación es una mutación en inactivación en, supresión de, o truncación en o previo a, un dominio específicamente utilizado para la regulación mediada por ActA del citoesqueleto de célula huésped, en donde el primer ácido nucleico se une operativamente y en estructura con un segundo ácido nucleico que codifica un antígeno heterólogo.

También se encuentra comprendido un polinucleótido anterior, en donde la al menos una modificación es una mutación en activación en, supresión de, o terminación en, que comprende la región de homología de cofilina KKRR (SEQ ID NO:23). Además, lo que se encuentra comprendido es el polinucleótido anterior en donde la al menos una modificación es una mutación en inactivación en, supresión de, o terminación en, que comprende el dominio de enlace central de fosfolípido (KVFKIKDAGKWVRDKI (SEQ ID NO:20)).

Todavía en otro aspecto, lo que se contempla es el polinucleótido anterior, en donde la al menos una modificación comprende una mutación en inactivación en, o supresión de, en cada uno del primer dominio rico en prolina (FPPPP (SEQ ID NO:21)), el segundo dominio rico en prolina FPPPP (SEQ ID NO:21)), el tercer dominio rico en prolina FPPPP (SEQ ID NO:21)), y el cuarto dominio rico en prolina FPPIP (SEQ ID NO:22)), o una terminación en el primer dominio rico en prolina. En otro aspecto, lo que se proporciona es el polinucleótido anterior, en donde el actA modificado es ActA-N100.

Todavía otra modalidad proporciona una bacteria *Listeria* que comprende uno o más de los polinucleótidos anteriores. El polinucleótido puede ser genómico, puede ser a base de plásmido, o puede residir tanto en un plásmido como en el genoma listerial. También se proporciona la *Listeria* anterior en donde el polinucleótido no es genómico, así como la *Listeria* anterior en donde polinucleótido no es plasmídico. La *Listeria* puede ser *Listeria monocytogenes*, *L. innocua*, u otra especie listerial.

Además, lo que se suministra por todavía otra modalidad, es un método para estimular la respuesta inmune a un antígeno de, o derivado de, un tumor, una célula cancerígena, o agente infeccioso, que comprende administrar a un mamífero la *Listeria* anteriormente exhibida y en donde el antígeno heterólogo se encuentra compartiendo un epítipo con el antígeno derivado del tumor, célula cancerígena o agente infeccioso. Lo que también se suministra es el método anterior, en donde la estimulación es relativa a la respuesta inmune específica de antígeno en ausencia de la administración de la *Listeria* (específico al antígeno codificado por el segundo ácido nucleico).

Opcionalmente, el antígeno heterólogo puede ser idéntico al antígeno de (o derivado de) el tumor, célula cancerígena, o agente infeccioso.

ActA-N100 comprende un ácido nucleico que codifica aminoácidos 1-100 de ActA, así como el polipéptido expresado de este ácido nucleico. (Esta numeración incluye toda la secuencia secretora de ActA). Lo que se proporciona es un polinucleótido que comprende un primer ácido nucleico que codifica ActA-N100 unido operativamente y en estructura con un segundo ácido nucleico que codifica un antígeno heterólogo.

Todavía otra modalidad proporciona una bacteria *Listeria* que comprende uno o más de los polinucleótidos anteriores. El polinucleótido puede ser genómico, puede ser a base de plásmido, o puede residir tanto en un plásmido como en el genoma listerial. También se proporciona la *Listeria* anterior en donde el polinucleótido no es genómico, así como la *Listeria* anterior en donde polinucleótido no es plasmídico. La *Listeria* puede ser *Listeria monocytogenes*, *L. innocua*, u otra especie listerial.

Los métodos para utilizar ActA-N100, también se encuentran disponibles. Se proporciona un método para estimular la respuesta inmune a un antígeno de, o derivado de, un tumor, célula cancerígena, o agente infeccioso, que comprende administrar a un mamífero la *Listeria* arriba exhibida, y en donde el antígeno heterólogo se encuentra

compartiendo un epítotope con el antígeno derivado del tumor, célula cancerígena, o agente infeccioso. Lo que también se proporciona es el método anterior, en donde la estimulación es relativa a la respuesta inmune específica de antígeno en ausencia de la administración de la *Listeria* (específico al antígeno codificado por el segundo ácido nucleico). Alternativamente, el antígeno heterólogo puede ser idéntico al antígeno de, o derivado de, el tumor, célula cancerígena, o agente infeccioso.

En algunas modalidades, el ActA modificado consiste de un fragmento de ActA u otro derivado de ActA en el cual la secuencia de señal ActA se ha suprimido. En algunas modalidades, los polinucleótidos que comprenden los ácidos nucleicos que codifican una proteína de fusión que comprende tal ActA modificado y el antígeno heterólogo, además comprenden una secuencia de señal que no es la secuencia de señal ActA. La secuencia de señal ActA es MGLNRFMRAMMVVFITANCITINDIIFA (SEQ ID NO:125). En algunas modalidades, el ActA modificado consiste de aminoácidos 31-100 de ActA (es decir, ActA-N100 suprimido de la secuencia de señal).

La presente invención proporciona un polinucleótido que comprende un primer ácido nucleico que codifica un ActA modificado, unido operativamente y en estructura con un segundo ácido nucleico que codifica un antígeno heterólogo como se define en las reivindicaciones. El ActA contiene un número de dominios, cada uno de los cuales participa en parte en el enlace a un componente del citoesqueleto de mamífero, en donde la presente invención contempla la remoción de uno o más de estos dominios.

El ActA contiene un número de dominios, que incluyen un dominio de terminal N (aminoácidos 1-234), dominio rico en prolina (aminoácidos 235-393), y un dominio de terminal C (aminoácidos 394-610). Los primeros dos dominios tienen distintos efectos sobre el citoesqueleto (Cicchetti, *et al.* (1999) J. Biol. Chem. 274:33616-33626). El dominio rico en prolina contiene cuatro motivos ricos en prolina. Los motivos ricos en prolina son sitios de atraque para la familia Ena/VASP de proteínas. La supresión de los dominios ricos en prolina de ActA reduce fuertemente el ensamble de filamento de actina (Cicchetti, *et al.* (1999) J. Biol. Chem. 274:33616-33626). Machner, *et al.*, proporciona la guía para diseñar los motivos ricos en prolina mutada que no pueden atracarse más, en donde esta guía puede colocarse para uso para modalidades de la presente invención (Machner, *et al.* (2001) J. Biol. Chem. 276:40096-40103). Por ejemplo, la fenilalanina de los motivos ricos en prolina, es crítica. La presente invención, en una modalidad alternativa, proporciona un polinucleótido que comprende un primer ácido nucleico que codifica ActA, en donde los codones para la fenilalanina en cada motivo rico en prolina se cambia a un codón de alanina, unido operativamente y en estructura con un segundo ácido nucleico que codifica al menos un antígeno heterólogo. En otro aspecto, el primer ácido nucleico que codifica ActA comprende una mutación de prolina a alanina en sólo el primer motivo rico en prolina, en sólo el segundo motivo rico en prolina, en sólo el tercer motivo rico en prolina en sólo el cuarto motivo rico en prolina, o cualquier combinación de los mismos. En otro aspecto, un ácido nucleico que codifica un ActA alterado puede comprender una mutación en un codón para uno o más motivos ricos en prolina en combinación con una mutación o supresión en, por ejemplo, región de homología de cofilina y/o la secuencia de unión central para interacción de fosfolípidos.

Lo que también se contempla, es una mutación de prolina a otro aminoácido, e.g., serina. La guía anterior en el diseño de mutaciones no se limitará al cambio de los motivos ricos en prolina, sino aplica así también a la región de homología de cofilina, la secuencia de enlace central para la interacción de fosfolípidos, y cualquiera de los otros motivos o dominios que contribuyen a las interacciones de ActA con el citoesqueleto de mamífero.

El ActA contiene un dominio que es una "secuencia de enlace central para interacción de fosfolípidos" en aminoácidos 185-201 de ActA, en donde la función en el enlace de fosfolípidos se demostró por los estudios de enlace (Cicchetti, *et al.* (1999) J. Biol. Chem. 274:33616-33626). De conformidad con Cicchetti, *et al.*, supra, el enlace de fosfolípidos regula las actividades de las proteínas de enlace por actina.

ActA contiene una región de homología de cofilina KKRR (SEQ ID NO:23). Las mutaciones de la región KKRR (SEQ ID NO:23) abole la habilidad de ActA de estimular la polimerización de actina (véase, e.g., Baoujemaa-Paterski, *et al.* (2001) Biochemistry 40:11390-11404; Skoble, *et al.* (2000) J. Cell. Biol. 150:527-537; Pistor, *et al.* (2000) J. Cell Sci. 113:3277-3287).

Lo siguiente se refiere a la expresión, por *L. monocytogenes*, de derivados de ActA truncados por debajo de aminoácido 263 a aminoácido 59. A diferencia de otros derivados truncados, el actA N59 no se expresó mientras que todos los más largos se expresaron (Skoble, J. (sin publicar)). El siguiente derivado más largo probado fue actA-N101. Las construcciones de proteína de fusión expresadas del promotor actA, que consisten en una primera pareja de proteína de fusión que es secuencia secretora actA, y una segunda pareja de proteína de fusión, dieron como resultado mucho menos secreción de proteína que en donde la primera pareja de proteína de fusión era actA-N100. Con respecto a las construcciones de supresión, también se encontró buena expresión en donde la primera pareja de proteína de fusión era actA soluble con aminoácidos 31-59 suprimidos. Además, se encontró buena expresión en

donde la primera pareja de proteína de fusión era actA soluble con aminoácidos 31-165 suprimidos (Skoble, J. (sin publicar)).

La presente descripción, en ciertas modalidades, proporciona un polinucleótido que comprende un primer ácido nucleico que codifica un ActA modificado, que comprende al menos una modificación, en donde la al menos una modificación es una mutación en inactivación en, supresión de, o terminación de la secuencia de polipéptido ActA en o previo a, un dominio requerido para la regulación mediada por ActA del citoesqueleto de célula huésped, y un segundo ácido nucleico que codifica un antígeno heterólogo. El ActA modificado puede ser uno que se da como resultado de la motilidad deteriorada y/ tamaño de placa reducida, e incluye un ácido nucleico que codifica uno de los mutantes 34, 39, 48 y 56 (Lauer, *et al.* (2001) Mol. Microbiol. 42:1163-1177). La presente invención también contempla un ácido nucleico que codifica uno de los mutantes de ActA 49, 50, 51, 52 y 54. También se proporciona un ácido nucleico que codifica uno de los mutantes de ActA 40, 41, 42, 43, 44, 45, y 47. Se proporcionan los mutantes en la región AB de enlace por monómero de actina, es decir, mutantes 41, 42, 43 y 44 (Lauer, *et al.* (2001) Mol. Microbiol. 42:1163-1177).

En otro aspecto, el ActA modificado de la presente invención puede consistir de un mutante de supresión, puede comprender un mutante de supresión, o puede derivarse de un ActA de mutante de supresión que es incapaz de polimerizar la actina en las células e/o incapaz de soportar la formación de plaquetas, o soportar sólo la formación de plaquetas submáxima. Estos mutantes de supresión ActA incluyen los ácidos nucleicos que codifican Δ 31-165; Δ 136-200; Δ 60-165; Δ 136-165; Δ 146-150, Δ 31-58; Δ 60-101; y Δ 202-263 y lo similar (Skoble, *et al.* (2000) J. Cell Biol. 150:527-537). Se encuentran comprendidos los ácidos nucleicos que codifican los mutantes de supresión de ActA que tienen supresiones más estrechas y supresiones más amplias. El siguiente grupo de ejemplos, que describe las supresiones en la región de homología de cofilina, pueden opcionalmente para cada una de las supresiones de ActA establecerse en la presente. La presente invención proporciona los ácidos nucleicos que codifican estas supresiones en la región de homología de cofilina: Δ 146-150; Δ 145-150; Δ 144-150; Δ 143-150; Δ 142-150; Δ 141-150; Δ 140-150; Δ 139-150; Δ 138-150; Δ 137-150; Δ 136-150, y lo similar. También se encuentran comprendidos los ácidos nucleicos que codifican ActA con las supresiones: Δ 146-150; Δ 146-151; Δ 146-152; Δ 146-153; Δ 146-154; Δ 146-155; Δ 146-156; Δ 146-157; Δ 146-158; Δ 146-159; Δ 146-160; y así sucesivamente. Además, también se contemplan los ácidos nucleicos que codifican los mutantes de supresión: Δ 146-150; Δ 145-151; Δ 144-152; Δ 143-153; Δ 142-154; Δ 141-155; Δ 140-156; Δ 139-157; Δ 138-158; Δ 137-159; Δ 136-160, y lo similar. En donde existe una supresión tanto en el extremo de terminal N de la región en cuestión, como en el extremo de terminal C, los tamaños de estas dos supresiones no necesitan ser iguales entre sí.

Las modalidades de supresión también se proporcionan, incluyendo pero no limitándose a lo siguiente. Lo que se proporciona es un ácido nucleico que codifica el actA de longitud completa, un actA faltante de la transmembrana de anclaje, u otra variante de actA, en donde el actA se suprime en un segmento que comprende los aminoácidos (o en la alternativa, que consisten de los aminoácidos): 31-59, 31-60, 31-61, 31-62, 31-63, 31-64, 31-65, 31-66, 31-67, 31-68, 31-69, 31-70, 31-71, 31-72, 31-73, 31-74, 31-75, 31-76, 31-77, 31-78, 31-79, 31-80, 31-81, 31-82, 31-83, 31-84, 31-85, 31-86, 31-87, 31-88, 31-89, 31-90, 31-91, 31-92, 31-93, 31-94, 31-95, 31-96, 31-97, 31-98, 31-99, 31-100, 31-101, 31-102, 31-103, 31-104, 31-105, 31-106, 31-107, 31-108, 31-109, 31-110, 31-111, 31-112, 31-113, 31-114, 31-115, 31-116, 31-117, 31-118, 31-119, 31-120, 31-121, 31-122, 31-123, 31-124, 31-125, 31-126, 31-127, 31-128, 31-129, 31-130, 31-131, 31-132, 31-133, 31-134, 31-135, 31-136, 31-137, 31-138, 31-139, 31-140, 31-141, 31-142, 31-143, 31-144, 31-145, 31-146, 31-147, 31-148, 31-149, 31-150, 31-151, 31-152, 31-153, 31-154, 31-155, 31-156, 31-157, 31-158, 31-159, 31-160, 31-161, 31-162, 31-163, 31-164, 31-165, y lo similar.

Todavía en otro aspecto, lo que se suministra es un polipéptido que contiene un primer ácido nucleico que codifica un derivado actA, y un segundo ácido nucleico que codifica un ácido nucleico heterólogo, en donde el derivado actA es actA soluble que comprende una mutación de aminoácidos conservadora o de supresión, y en donde la mutación de aminoácido conservadora o de supresión comprende (o en otra modalidad, en donde la supresión consiste de) aminoácido: 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169; 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 185, 186, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 193, 194, 195, 196, 197, 198, 199, 200, y así sucesivamente.

Lo que también se proporciona, en otras modalidades, es un polinucleótido que comprende un primer ácido nucleico que codifica un ActA alterado, unido operativamente y en estructura con un segundo ácido nucleico, que

codifica un antígeno heterólogo, en donde el primer ácido nucleico se deriva de, por ejemplo, Δ ActA3 (aminoácidos 129-153 suprimidos); Δ ActA9 (aminoácidos 142-153 suprimidos); Δ ActA6 (aminoácidos 68-153 suprimidos); Δ ActA7 (aminoácidos 90-153 suprimidos); o Δ ActA8 (aminoácidos 110-153 suprimidos), y así sucesivamente (véase, e.g., Pistor, *et al.* (2000) J. Cell Science 113:3277-3287).

Un número de derivados de ActA, que comprenden la metionina de inicio (terminal N) y prematuramente terminada, dan como resultado una nueva terminal C. Algunos de estos derivados se reportan en Skoble, *et al.* (2000) J. Cell Biol. 150:527-537). Los ácidos nucleicos que codifican estos derivados se introdujeron en *L. monocytogenes*, para probar la expresión. El derivado ActA que termina en el aminoácido 59 (ActA-N59) no se expresó por *L. monocytogenes*. En contraste, ActA-N101, y los derivados más largos de ActA, se expresaron. Las proteínas de fusión (expresadas del promotor ActA) que consisten de sólo la secuencia de señal ActA y una pareja de proteína de fusión, mostraron mucho menos secreción que las proteínas de fusión que consisten en ActA-N100 y una pareja de proteína de fusión.

La truncación, la supresión, o mutación en inactivación, puede reducir o eliminar la función de uno o más de los cuatro dominios FP₄ de ActA ((E/D)FPPX(D/E)) (SEQ ID NO:135). Los dominios FP₄ de ActA median el enlace a las siguientes proteínas: mamífero autorizado (Mena); proteína tipo Ena/VASP (Evl); y fosfoproteína estimulada por vasodilatador (VASP) (Machner, *et al.* (2001) J. Biol. Chem. 276:40096-40103). Aquí, el ácido nucleico de la presente invención codifica un ActA truncado, suprimido o mutado en uno o más de sus dominios FP₄, reduciendo o impidiendo de ese modo el enlace a Mena, Evl, y/o VASP. Se proporciona un ácido nucleico que codifica un ActA truncado, parcialmente suprimido o mutado y un antígeno heterólogo, en donde la truncación, la supresión parcial, o mutación, ocurre en los aminoácidos 236-240; aminoácidos 270-274; aminoácidos 306-310; y/o aminoácidos 351-355 de ActA (numeración de Machner, *et al.* (2001) J. Biol. Chem. 276:40096-40103).

La presente invención proporciona un polinucleótido que comprende un primer ácido nucleico que codifica una variante de ActA, y un segundo ácido nucleico que codifica al menos un antígeno heterólogo, en donde la variante de ActA es ActA suprimido en o mutado en una "repetición larga", dos repeticiones largas, o todas las tres repeticiones largas de ActA. Las repeticiones largas de ActA son secuencias de 24 aminoácidos ubicadas entre los dominios FP₄ (véase, e.g., Smith, *et al.* (1996) J. Cell. Biol. 135:647-660). Las repeticiones largas ayudan a transformar la polimerización de actina en un mecanismo generador de fuerza.

Como un ejemplo alternativo, lo que se proporciona es un ácido nucleico que codifica la siguiente pareja de proteína de fusión basada en ActA, que utiliza el lenguaje consistente: Lo que se proporciona es un ácido nucleico que codifica una pareja de proteína de fusión que consiste de aminoácidos 1-50 de actA humano (por ejemplo, No. de Acceso de GenBank AY512476 o su equivalente, en donde la numeración comienza con el aminoácido de inicio), aminoácidos 1-60; 1-61; 1-62; 1-63; 1-64; 1-65; 1-66; 1-67; 1-68; 1-69; 1-70; 1-72; 1-73; 1-74; 1-75; 1-76; 1-77; 1-78; 1-79; 1-80; 1-81; 1-82; 1-83; 1-84; 1-85; 1-86; 1-87; 1-88; 1-89; 1-90; 1-91; 1-92; 1-93; 1-94; 1-95; 1-96; 1-97; 1-98; 1-99; 1-100; 1-101; 1-102; 1-103; 1-104; 1-105; 1-106; 1-107; 1-108; 1-109; 1-110; 1-111; 1-112; 1-113; 1-114; 1-115; 1-116; 1-117; 1-118; 1-119; 1-120; 1-121; 1-122; 1-123; 1-124; 1-125; 1-126; 1-127; 1-128; 1-129; 1-130; 1-131; 1-132; 1-133; 1-134; 1-135; 1-136; 1-137; 1-138; 1-139; 1-140; 1-141; 1-142; 1-143; 1-144; 1-145; 1-146; 1-147; 1-148; 1-149; 1-150; 1-151; 1-152; 1-153; 1-154; 1-155; 1-156; 1-157; 1-158; 1-159; 1-160, y así sucesivamente.

Como todavía otro ejemplo alternativo, lo que se proporciona es un ácido nucleico que codifica la siguiente pareja de proteína de fusión basada en ActA, que utiliza el lenguaje consistente: lo que se proporciona es un ácido nucleico que codifica una pareja de proteína de fusión que comprende aminoácidos 1-50 de actA humano (por ejemplo, No. de Acceso de GenBank AY512476 o su equivalente, en donde la numeración comienza con el aminoácido de inicio), aminoácidos 1-60; 1-61; 1-62; 1-63; 1-64; 1-65; 1-66; 1-67; 1-68; 1-69; 1-70; 1-72; 1-73; 1-74; 1-75; 1-76; 1-77; 1-78; 1-79; 1-80; 1-81; 1-82; 1-83; 1-84; 1-85; 1-86; 1-87; 1-88; 1-89; 1-90; 1-91; 1-92; 1-93; 1-94; 1-95; 1-96; 1-97; 1-98; 1-99; 1-100; 1-101; 1-102; 1-103; 1-104; 1-105; 1-106; 1-107; 1-108; 1-109; 1-110; 1-111; 1-112; 1-113; 1-114; 1-115; 1-116; 1-117; 1-118; 1-119; 1-120; 1-121; 1-122; 1-123; 1-124; 1-125; 1-126; 1-127; 1-128; 1-129; 1-130; 1-131; 1-132; 1-133; 1-134; 1-135; 1-136; 1-137; 1-138; 1-139; 1-140; 1-141; 1-142; 1-143; 1-144; 1-145; 1-146; 1-147; 1-148; 1-149; 1-150; 1-151; 1-152; 1-153; 1-154; 1-155; 1-156; 1-157; 1-158; 1-159; 1-160, y así sucesivamente.

Los ácidos nucleicos contemplados que codifican una pareja de proteína de fusión basada en actA incluyen ácidos nucleicos que codifican la pareja de proteína de fusión basada en actA, en donde uno o más nucleótidos se altera para proporcionar uno o más cambios de aminoácido conservador. Lo que se contempla es un cambio de aminoácido conservador, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, o más, cambios de aminoácido conservador. Además, lo que se contempla es un ácido nucleico que codifica la pareja de proteína de fusión basada

en actA, que comprende al menos una mutación que codifica al menos una supresión corta, o al menos una inserción corta, o cualquier combinación de las mismas.

Con respecto a la identidad del ácido nucleico que codifica ActA, y derivados del mismo, el codón para la metionina de inicio puede ser un codón de inicio de valina. En otras palabras, la *Listeria* utiliza un codón de inicio de valina para codificar la metionina.

La invención contemplada comprende ActA, y ActA suprimido en uno o más dominios de unión de citoesqueleto, socios de proteína de fusión ActA-N100, de todas las especies listeriales, incluyendo *L. monocytogenes* y *L. ivanovii* (Gerstel, *et al.* (1996) Infection Immunity 64:1929-1936; No. de Acceso de GenBank X81135; No. de Acceso de GenBank AY510073).

En algunas modalidades, al menos aproximadamente 85% de identidad de secuencia, al menos aproximadamente 90% de identidad de secuencia, o al menos aproximadamente 95% de identidad de secuencia a un fragmento de ActA que comprende más de los primeros 59 aminoácidos de ActA y menos de los primeros 380 aminoácidos de ActA. Por ejemplo, en algunas modalidades, el ActA modificado consiste de una secuencia que tiene al menos aproximadamente 80% de identidad de secuencia, al menos aproximadamente 85% de identidad de secuencia, al menos aproximadamente 90% de identidad de secuencia, o al menos aproximadamente 95% de identidad de secuencia a ActA-N100. En algunas modalidades, la molécula de ácido nucleico que codifica el ActA modificado hibridiza bajo condiciones rigurosas a una molécula de ácido nucleico que codifica la secuencia ActA-N100, o su complemento.

La presente invención, en algunas modalidades, comprende un polinucleótido que comprende un primer ácido nucleico que codifica actA-N100 unido operativamente y en estructura con un segundo ácido nucleico que codifica un antígeno heterólogo, tal como una mesotelina humana, o un derivado del mismo. La mesotelina humana se expresó de un número de construcciones, donde estas construcciones se crearon mediante integración dirigida por sitio o integración homóloga en el genoma *Listeria*. Algunas de estas construcciones se muestran en la Figura 6. La Figura 6 describe la mesotelina humana que ocurre naturalmente, la cual contiene una secuencia de señal y una secuencia GPI. La secuencia de señal y la secuencia de GPI se suprimió en los siguientes ejemplos, en donde la secuencia de señal que ocurre naturalmente se reemplazó con la secuencia secretora de Antígeno Protector *Bacillus anthracis* (BaPA), con LLO-62, con LLO-60^{codón optimizado} (LLO-60_{opt}), o con ActA-N100 (Figura 6). La secuencia de ActA-N100 incluye la secuencia secretora que ocurre naturalmente de ActA.

ii. FISIOLÓGIA DE CÉLULA ANORMAL PRODUCIDA POR ActA TIPO SILVESTRE.

El ActA modificado, de al menos algunas modalidades de la invención, se cambia para reducir o eliminar su interacción con el citoesqueleto de mamífero. Mientras que la función fisiológica de ActA es unirse al citoesqueleto de mamífero y permitir el movimiento mediado por actina de la bacteria *Listeria* a través del citoplasma, este enlace se reduce o elimina en el componente de ActA de la proteína de fusión.

La expresión de ActA soluble en citoplasma de mamífero, a manera de vectores de expresión eucariótica, da como resultado las anormalidades del citoesqueleto, e.g., "redistribución de actina-F", y secuestro del ActA recombinante en la ubicación de "protrusiones de membrana". En otras palabras, la ubicación normal de F-actina se cambió, en donde su nueva ubicación era en protrusiones de membrana. Además, la "cepa ActA se co-distribuyó con aquella de la F-actina en protrusiones de membrana". Otras anormalidades en las células de mamífero incluyeron "pérdida de fibras de tensión". Se observó que la "parte de terminal amino de ActA se incluye en la nucleación de filamentos de actina mientras que el segmento que incluye la región de repetición rica en prolina promueve o controla la polimerización" (Friederich, *et al.* (1995) EMBO J. 14:2731-2744). Además, de acuerdo con Olazabal y Machesky, la sobreexpresión de una proteína demostró que era similar a ActA, la proteína WASP, origina "defectos en la organización de actina que conducen a los malos funcionamientos de las células" (Olazabal y Machesky (2001) J. Cell Biol. 154:679-682). El título de una publicación ("Proteína *Listeria* ActA imita a las proteínas de la familia WASP") indica esta similitud (Boujerna-Paterski, *et al.* (2001) Biochemistry 40:11390-11404).

La introducción de ciertos dominios de ActA en una célula de mamífero interrumpe el citoplasma de la célula huésped. A detalle, la microinyección de la secuencia de oligoprolina de repetición de Act induce a la "pérdida de fibras de tensión", "retracción dramática de membranas periféricas" y "acumulación de actina filamentosa cerca de la membrana periférica retractora" (Southwick y Purich (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:5168-5172). ActA, una proteína expresada por *Listeria*, secuestra o "piratea" o utiliza varias proteínas relacionadas al citoesqueleto, incluyendo el complejo Arp2/3 y actina (Olazabal, *et al.* (2002) Curr. Biol. 12:1413-1418; Zalevsky, *et al.* (2001) J. Biol. Chem. 276:3468-3475; Briehar, *et al.* (2004) J. Cell Biol. 165:233-242).

La pareja de proteína de fusión basada en ActA de la presente invención, tiene una longitud de polipéptido reducida cuando se compara a ActA que carece del dominio de transmembrana. La pareja de proteína de fusión basada en ActA proporciona interrupción reducida de la actividad dependiente de actina tal como presentación inmune, proliferación de célula huésped, polaridad de célula, migración de célula, endocitosis, sellado de vesículas desunidas, movimiento de vesículas endocitóticas, secreción, polaridad de célula, y respuesta a heridas (cicatrización de heridas) (véase, e.g., Setterblad, *et al.* (2004) J. Immunol., 173:1876-1886; Tskvitaria-Fuller, *et al.* (2003) J. Immunol. 171:2287-2295). Sin implicar ninguna limitación en la invención, la interrupción reducida en este contexto es en relación a aquella encontrada con ActA de longitud completa, con ActA suprimido sólo en el dominio de transmembrana, o con ActA truncado en el dominio de transmembrana. El ActA que carece de la secuencia de membrana de anclaje produce una "redistribución distinguible de actina" en células de mamífero (véase, e.g., Pistor, *et al.* (1994) EMBO J. 13:758-763).

Las actividades dependientes de actina de la célula incluyen las funciones de célula inmunes, cicatrización de heridas, cubierta, internalización de receptor, fagocitosis, agrupación de receptor Fc y fagocitosis mediada por receptor Fc, utilizan actina (véase, e.g., Kwiatkowska, *et al.* (2002) J. Cell Biol. 116:537-550; Ma, *et al.* (2001) J. Immunol. 166:1507-1516; Fukatsu, *et al.* (2004) J. Biol. Chem. 279:48976-48982; Botelho, *et al.* (2002) J. Immunol. 19:4423-4429; Krishnan, *et al.* (2003) J. Immunol. 170:4189-4195; Gomez-Garcia y Komberg (2004) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101:15876-15880; Kusner, *et al.* (2002) J. Biol. Chem. 277:50683-50692; Roonov-Jessen y Peterson (1996) J. Cell Biol. 134:67-80; Choma, *et al.* (2004) J. Cell Science 117:3947-3959; Miki, *et al.* (2000) Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol. 278:L13-L18; Fujimoto, *et al.* (2000) Traffic 1:161-171; Zualmann, *et al.* (2000) J. Cell Biol. 150:F111-F116; Olazabal, *et al.* (2002) Curr. Biol. 12:1413-1418; Magdalena, *et al.* (2003) Molecular Biology of the Cell 14:670-684).

El ActA se degrada (en el citoplasma de mamífero) a manera de la "trayectoria de regla de extremo N" (véase, e.g., Moors, *et al.* (1999) Cellular Microbiol. 1:249-257; Varshavsky (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:12142-12149).

B. Codones raros de ActA; inmunogenicidad de ActA.

El ActA que codifica la región contiene un número de codones que no son óptimos para *L. monocytogenes*. De estos, se origina un número en el genoma listerial a una frecuencia de 25% o menos de aquella del codón más comúnmente utilizado. Lo siguiente proporciona un análisis de codón para *L. monocytogenes* 10403S ActA. En los codones que codifican los aminoácidos 101-400, los codones raros para glutamato (GAG) se originan 12 veces; los codones raros para lisina (AAG) se origina tres veces; los codones raros para isoleucina (ATA) se origina tres veces; los codones raros para arginina (CGG) se origina una vez; los codones raros para glutamina (CAG) se origina una vez; y los codones raros para leucina (CTG; CTC) ocurre tres veces. El siguiente comentario se refiere a codones no óptimos, no sólo codones raros. Además, en los codones que codifican los aminoácidos 101-400 (300 codones), codones no óptimos (esto además de los codones raros) se originan 152 veces (fuera del total de 300 codones).

El ActA es un objetivo principal para la respuesta inmune por los humanos expuestos a *L. monocytogenes* (véase, e.g., Grenningloh, *et al.* (1997) Infect. Immun. 65:3976-3980). En algunas modalidades, la presente invención proporciona una pareja de proteína de fusión basada en ActA, en donde la pareja de proteína de fusión basada en ActA tiene inmunogenicidad reducida, e.g., contiene menos epítopes que el ActA de longitud completa o se modifica para proporcionar epítopes de inmunogenicidad reducida.

Los reactivos y los métodos de la presente invención proporcionan un ácido nucleico que codifica un ActA, un ActA truncado, y/o un ActA mutado (e.g., una mutación por puntos o una supresión), que tiene un número reducido de epítopes antigénicos, o que carece de una o más regiones de antigenicidad incrementada. Las regiones de antigenicidad incrementada, como se determina por un diagrama Welling, incluyen aminoácidos 85-90; 140-150; 160-190; 220-230; 250-260; 270-280; 305-315; 350-370; 435-445; 450-460; 490-520; 545-555; y 595-610, No. de Acceso de GenBank X59723. El ActA se ha identificado como una proteína inmunogénica (véase, e.g., Grenningloh, *et al.* (1997) Infection Immunity 65:3976-3980; Darji, *et al.* (1998) J. Immunol. 161:2414-2420; Niebuhr, *et al.* (1993) Infect. Immun. 61:2793-2802; Lingnau, *et al.* (1995) Infect. Immun. 63:3896-3903). Las propiedades inmunogénicas de ActA incrementan con la expresión de formas solubles de actina, e.g., actina que carece de o parte de su región de terminal C (aminoácidos 394-610 que utilizan la numeración de Mourrain, *et al.* (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:10034-10039) (véase también, e.g., Darji, *et al.* (1998) J. Immunol. 161:2414-2420; Cicchetti, *et al.* (1999) J. Biol. Chem. 274:33616: 33626). Aquí, en donde un ActA truncado, parcialmente suprimido, o mutado de la presente invención carece (o funcionalmente carece) de un dominio utilizado para el enlace por membrana, dando como resultado de ese modo una inmunogenicidad incrementada, la presente invención proporciona mutaciones o truncaciones adicionales a fin de reducir la inmunogenicidad del ActA truncado.

C. Ensayos para medir el enlace de derivados de ActA, a proteínas citoesqueléticas, y movimiento

dependiente de ActA de *Listeria*.

Los ensayos para determinar el reclutamiento de actina, u otras proteínas, a ActA, o a variantes de ActA, se encuentran disponibles. El reclutamiento razonablemente puede valorarse por ensayos de movimiento bacteriano, es decir, ensayos que miden la tasa dependiente de actina del movimiento de *Listeria* en extractos de célula eucariótica o dentro de una célula eucariótica (véase, e.g., Marchand, *et al.* (1995) J. Cell Biol. 130:331- 343). Los ensayos de movimiento bacteriano pueden distinguir entre *Listeria* que expresa ActA tipo silvestre, y *Listeria* que expresa las versiones mutantes de ActA, por ejemplo, ActA mutante que carece de los dominios FP4 (Smith, *et al.* (1996) J. Cell. Biol. 135:647-660).

El reclutamiento también puede valorarse al medir la concentración de actina local en la superficie de perlas revestidas con ActA o en la superficie de las bacterias que expresan ActA. Los ensayos basados en perla, se describen (véase, e.g., Machner, *et al.* (2001) J. Biol. Chem. 276:40096-40103; Fradelizi, *et al.* (2001) Nature Cell Biol. 3:699-707; Theriot, *et al.* (1994) Cell 76:505-517; Smith, *et al.* (1995) Mol. Microbiol. 17:945-951; Cameron, *et al.* (1999) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96:4908-4913). La ultracentrifugación puede valorar el número de proteínas citoesqueléticas unidas a ActA (véase, e.g., Machner, *et al.*, *supra*).

Los ensayos disponibles para el experto en la materia incluyen, e.g., el ensayo de polimerización de actina; el alargamiento del ensayo con extremo de púas; y el alargamiento del extremo con puntos (véase, e.g., Zalevsky, *et al.* (2001) J. Biol. Chem. 276:3468-3475). Los métodos también se encuentran disponibles para valorar la polaridad de polimerización de actina inducida por ActA (véase, e.g., Mogilner y Oster (2003) Biophys. J. 84:1591-1605; Noireauz, *et al.* (2000) Biophys. J. 78: 1643-1654).

(d). Proteínas secretadas con SecA2 para uso como pareja de proteína de fusión.

La presente descripción proporciona una familia de proteínas secretoras listeriales de SecA2 útiles como socios de proteína de fusión con un antígeno heterólogo. La pareja de proteína de fusión derivada por proteína secretora encuentra uso en el incremento de expresión, incremento de estabilidad, incremento de secreción, mejora de presentación inmune, estimulación de respuesta inmune, mejora de supervivencia a un tumor, mejora de supervivencia a un cáncer, incremento de supervivencia a un agente infeccioso, y lo similar.

Las proteínas secretoras listeriales contempladas incluyen autolisina p60; N-acetil-muramidasa (NamA); proteína de enlace por penicilina 2B (PBP-2B) (No. de Acceso de GenBank NC_003210); transportador de feromona (OppA) (complemento a nt 184,539-186,215 de No. de Acceso de GenBank AL591982); maltosa/maltodextrina transportador ABC (complemento a nt 104,857-105,708 de No. de Acceso de GenBank No. AL591982); lipoproteína antigénica (Csa) (nt 3646-4719 de No. de Acceso de GenBank No. AL591982); y lipoproteína conservada, e.g., de *L. monocytogenes* EGD (véase, e.g., Lenz, *et al.* (2003) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100:12432-12437; Lenz y Portnoy (2002) Mol. Microbiol. 45:1043-1056).

p60 se codifica por una estructura de lectura abierta de 1,452 bp, tiene una secuencia de señal de terminal N, un dominio SH3 en la región de terminal N, una región central que contiene repeticiones de treonina-asparagina, y una región de terminal C que comprende el sitio catalítico de autolisina (véase, e.g., Pilgrim, *et al.* (2003) Infect. Immun. 71:3473-3484). p60 también se conoce como la proteína asociada por invasión (iap) (No. de Acceso de GenBank X52268; NC_003210).

La presente descripción proporciona un polinucleótido que comprende un primer ácido nucleico que codifica p60, o un derivado p60, y un segundo ácido nucleico que codifica un antígeno heterólogo. El p60 o los derivados p60 comprenden una proteína p60 de longitud completa (e.g., de *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri*, *L. murrayi*, y/o *L. grayi*), proteínas p60 truncadas que consisten esencialmente de los 70 aminoácidos de terminal N; una proteína p60 truncada suprimida en la región que cataliza la hidrólisis; las secuencias de señal de una proteína p60; o una proteína p60 con su secuencia de señal reemplazada con una secuencia de señal diferente (e.g., la secuencia de señal de ActA, LLO, PFO, o BaPA), y un segundo ácido nucleico que codifica un antígeno heterólogo. La secuencia de señal p60 (27 aminoácidos) es: MNMKKATIAATAGIAVTAFAAPTIAASA (SEQ ID NO:24) (Bubert, *et al.* (1992) J. Bacteriol. 174:8166-8171; Bubert, *et al.* (1992) Appl. Environ. Microbiol. 58:2625-2632; J. Bacteriol. 173:4668-4674). La secuencia de señal de N-acetil-muramidasa (52 aminoácidos) es: MDRKFIKPGIILLIVASINVGAEETGGSRTAQVNLTSQQAFIDEILPA (SEQ ID NO:25) (nt 2679599 a 2681125 de No. de Acceso de GenBank NC_003210; No. de Acceso de GenBank AY542872; nt 2765101 a 2766627 de No. de Acceso de GenBank NC_003212; Lenz, *et al.* (2003) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100:12432-12437).

La presente descripción proporciona una variante p60, por ejemplo, en donde los codones para los aminoácidos 69(L) y 70 (Q) se cambian para proporcionar un sitio de restricción *PstI* único, en donde el sitio *PstI*

encuentra uso en inserción de un ácido nucleico que codifica un antígeno heterólogo.

Se contempla un ácido nucleico que codifica una proteína de fusión que comprende una proteína secretada de trayectoria SecA2 y un antígeno heterólogo. También se contempla un ácido nucleico que codifica una proteína de fusión que comprende una versión truncada o derivada de proteína secretada de trayectoria SecA2 y un antígeno heterólogo. Además, lo que se contempla es una bacteria *Listeria* que comprende un ácido nucleico que codifica una proteína de fusión que comprende una proteína secretada de trayectoria SecA2 y un antígeno heterólogo, o que comprende un ácido nucleico que codifica una proteína de fusión que comprende una versión derivada o truncada de una proteína secretada por trayectoria SecA2 y un antígeno heterólogo.

(e) Mesotelina.

El cADN de mesotelina humana es 2138 bp, contiene una estructura de lectura abierta de 1884 bp, y codifica una proteína 69 kD. La proteína de precursor de mesotelina contiene 628 aminoácidos, y un sitio de desdoblamiento de furina (RPFRR en aminoácidos 288-293). El desdoblamiento de la proteína 69 kD genera una proteína unida por membrana 40 kD (denominada "mesotelina") más una proteína soluble 31 kD llamada factor de potencia de megacariocito (MPF). La mesotelina tiene una secuencia lipofílica en su terminal C, que se remueve y reemplaza por inositol fosfatidilo, que origina que la mesotelina se una por membrana. La mesotelina contiene una secuencia de señal de glicosilfosfatidil inositol de anclaje cerca de la terminal C. Los dominios de mesotelina, la expresión de mesotelina por células tumorales y cancerígenas, y propiedades antigénicas de mesotelina, se describen (véase, e.g., Hassan, *et al.* (2004) Clin. Cancer Res. 10:3937-3942; Ryu, *et al.* (2002) Cancer Res. 62:819-826; Thomas, *et al.* (2003) J. Exp. Med. 200:297-306; Argani, *et al.* (2001) Clin. Cancer Res. 7:3862-3868; Chowdhury, *et al.* (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:669-674; Chang and Pastan (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:136-140; Muminova, *et al.* (2004) BMC Cancer 4:19; GenBank Acc. Nos. NM_005823 y NM_013404; Patente de Estados Unidos No. 5,723,318 expedida a Yamaguchi, *et al.*).

La mesotelina humana, suprimida en secuencia de señal de mesotelina, se muestra abajo:

```

RTLAGETGQEAAPLDGVLTNPPNISSLSPRQLLGFPCEVSGLSSTERV
RELAVALAQKNVKLSTEQLRCLAHRLSEPPEDLDALPLDLLLFLNPDAFS
GPQACTRFFSRITKANVDLLPRGAPERQRLPAALACWGVRSLLSEADV
RALGGLACDLPGRFVAESA EVLLPRLVSCPGPLDQDQQAARAALQGGGP
PYGPPSTWSVSTMDALRGLLPVLGQPIIRSIPQGIVAAWRQRSSRDPSWR
QPRTLPRFRREVEKTACPSGKKAREIDESLIFYKKWELEACVDAALL
ATQMDRVNAIPFTYEQLDVLKHKLDELYPQGYPESVIQHLGYLFLKMSPE
DIRKWNVTSLTLKALLEVNKGHEMSPQVATLIDRFVKGRGQLDKDTLDT
LTAFYPGYLCSLSPEELSSVPPSSIWAVRPQDLDTCDPRQLDVLYPKARL
AFQNMNGSEYFVKIQSFLGGAPTEDLKALSQQNVSMDLATFMKLRTDAVL
PLTVAEVQKLLGPHVEGLKAEERHRPVRDWILRQRQDDDLDTLGLGLQGGI
PNGYLVLDSLVOEALSGTPCLLGPVPVLTVLALLLASTLA (SEQ ID NO:26)

```

La mesotelina humana, suprimida en secuencia de señal de mesotelina y también suprimida en GPI de mesotelina de anclaje, se describe abajo:

```

RTLAGETGQEAAPLDGVLTNPPNISSLSPRQLLGFPCEVSGLSSTERV
RELAVALAQKNVKLSTEQLRCLAHRLSEPPEDLDALPLDLLLFLNPDAFS
GPQACTRFFSRITKANVDLLPRGAPERQRLPAALACWGVRSLLSEADV
RALGGLACDLPGRFVAESA EVLLPRLVSCPGPLDQDQQAARAALQGGGP
PYGPPSTWSVSTMDALRGLLPVLGQPIIRSIPQGIVAAWRQRSSRDPSWR
QPRTLPRFRREVEKTACPSGKKAREIDESLIFYKKWELEACVDAALL
ATQMDRVNAIPFTYEQLDVLKHKLDELYPQGYPESVIQHLGYLFLKMSPE
DIRKWNVTSLTLKALLEVNKGHEMSPQVATLIDRFVKGRGQLDKDTLDT
LTAFYPGYLCSLSPEELSSVPPSSIWAVRPQDLDTCDPRQLDVLYPKARL
AFQNMNGSEYFVKIQSFLGGAPTEDLKALSQQNVSMDLATFMKLRTDAVL
PLTVAEVQKLLGPHVEGLKAEERHRPVRDWILRQRQDDDLDTLGLGLQG (SEQ ID
NO:27)

```

(f) Sitio de Integración

La presente descripción proporciona un polinucleótido que comprende un primer ácido nucleico que media el crecimiento o dispersión en una *Listeria* genitora o tipo silvestre, en donde el primer ácido nucleico se modifica por integración de un segundo ácido nucleico que codifica al menos un antígeno. En un aspecto, la integración da como resultado la atenuación de la *Listeria*. En otro aspecto, la integración no da como resultado la atenuación de la *Listeria*. Todavía en otro aspecto, la *Listeria* genitora se atenúa, y la integración da como resultado una atenuación adicional. Además, como otro ejemplo no limitante, la *Listeria* genitora se atenúa, en donde la integración no da como resultado una atenuación medible adicional.

Las modalidades comprendiendo además la modificación mediante integración en el primer ácido nucleico, un tercer ácido nucleico que codifica al menos un antígeno, un cuarto ácido nucleico que codifica al menos un antígeno, un quinto ácido nucleico que codifica al menos un antígeno, o lo similar, también se proporcionan.

Sin implicar ninguna limitación, el antígeno puede ser un antígeno heterólogo (heterólogo a la *Listeria*), un antígeno tumoral o un antígeno derivado de un antígeno tumoral, un antígeno de agente infeccioso o un antígeno derivado de un antígeno de agente infeccioso, y lo similar.

El primer ácido nucleico puede ser el gen actA o gen inlB. La integración puede ser en un promotor o región reguladora de actA o inlB, y/o en la estructura de lectura abierta de actA o inlB, en donde la integración atenúa la *Listeria*, como determinable bajo condiciones adecuadas. La integración puede acompañarse por supresión de una parte o de todo el promotor o la región reguladora de actA o inlB, o con supresión de parte o toda la estructura de lectura abierta de actA o inlB, o con supresión tanto del promotor como de la región reguladora más parte o toda la estructura de lectura abierta de actA o inlB, en donde la integración atenúa la *Listeria*, como determinable bajo condiciones adecuadas.

Para cada una de las modalidades anteriormente exhibidas, la presente descripción proporciona una bacteria *Listeria* que contiene el polinucleótido. El polinucleótido puede ser genómico.

En algunas modalidades, el primer ácido nucleico que se modifica por integración de un segundo ácido nucleico que codifica al menos un antígeno media el crecimiento o dispersión en una *Listeria* genitora o tipo silvestre. En algunas modalidades, el primer ácido nucleico que se modifica media la célula a la dispersión de célula. En algunas modalidades, el primer ácido nucleico es actA.

En algunas modalidades, el primer ácido nucleico que se modifica por integración de un segundo ácido nucleico que codifica al menos un antígeno, comprende un gen identificado como uno de los siguientes: gen hly (codifica listeriolisina O; LLO); internalina A; internalina B; actA; SvpA; p104 (a.k.a. LAP); IplA; fosfolipasa C específica de fosfatidilinositol (PI-PLC) (gen plcA); fosfolipasa C específica de fosfatidilcolina (PC-PLC) (gen plcB); precursor de metaloproteasa de zinc (gen Mpl); p60 (proteína 60; proteína asociada por invasión (iap); sortasa; proteína reguladora positiva de listeriolisina (gen PrfA); gen PrfB; gen FbpA; gen Auto; Amida (amidasa que media la adhesión); operona dlt (dltA; dltB; dltC; dltD); cualquier recuadro de prfA; o Htp (transportador de azúcar P).

Además, lo que se contempla es una *Listeria* que comprende el polinucleótido anterior. El polinucleótido puede ser genómico. En un aspecto, la *Listeria* puede ser *Listeria monocytogenes*. Se proporciona cada una de las modalidades anteriormente exhibidas, en donde la integración da como resultado la atenuación de la *Listeria*, como determinable bajo condiciones adecuadas. También se proporciona cada una de las modalidades anteriormente exhibidas, en donde la integración no da como resultado la atenuación de la *Listeria*, como determinable bajo condiciones adecuadas. Todavía en otro aspecto, la *Listeria* genitora se atenúa, y la integración da como resultado la atenuación adicional. Además, como otro ejemplo, la *Listeria* genitora se atenúa, en donde la integración no da como resultado una atenuación medible adicional.

En otro aspecto, el primer ácido nucleico puede ser genómico. En otro aspecto, la integración puede mediarse por recombinación homóloga, en donde la integración no da como resultado ninguna supresión del primer ácido nucleico, en donde la integración da como resultado la supresión de todo o parte del primer ácido nucleico, en donde el primer ácido nucleico contiene un promotor u otra región reguladora y en donde el segundo ácido nucleico se une operativamente y/o en estructura con el promotor u otra región reguladora, y en donde el primer ácido nucleico contiene un promotor u otra región reguladora y en donde el segundo ácido nucleico no se encuentra del todo unido operativamente y/o en estructura con el promotor u otra región reguladora.

El término "gen modificado por integración" comprende, pero no se limita a, "un lugar de integración que es el gen."

Lo que también se adopta por la presente descripción es un polinucleótido que comprende un primer ácido nucleico que media el crecimiento o extensión en una *Listeria* de origen o de tipo silvestre, donde el primer ácido nucleico comprende toda o parte de una isla de patogenicidad o grupo de gen de virulencia, en donde toda o parte de la isla de patogenicidad o grupo de gen de virulencia se modifica por integración de un segundo ácido nucleico que codifica al menos un antígeno, en donde la integración resulta en atenuación de la *Listeria*, como se determina bajo condiciones apropiadas. Se describen las islas de patogenicidad y grupos de gen de virulencia (ver, e.g., Chakraborty, *et al.* (2000) Int. J. Med. Microbiol. 290:167-174; Vazquez-Boland, *et al.* (2001) Clin. Microbiol. Revs. 14:584-640). El gen que media el crecimiento y extensión no se limita a un gen que media específicamente la virulencia, pero comprende los genes que median el crecimiento tales como aquellos que median la producción de energía (e.g., glucólisis, ciclo Krebs, citocromos), anabolismo y/o catabolismo de aminoácidos, azúcares, lípidos, minerales, purinas, y pirimidinas, y genes que median el transporte, transcripción, traducción, y/o réplica de nutriente, y lo similar.

En otro aspecto, lo que se proporciona es un polinucleótido que comprende un primer ácido nucleico que media el crecimiento o extensión en una *Listeria* de origen o de tipo silvestre, en donde el ácido nucleico se modifica por integración de una pluralidad de ácidos nucleicos que codifican un antígeno o antígenos.

La integración puede ser dentro del segundo ácido nucleico sin ninguna eliminación correspondiente del segundo ácido nucleico. Alternativamente, la integración puede ser dentro del segundo ácido nucleico con una eliminación correspondiente del segundo ácido nucleico, o una porción del mismo. Donde el primer ácido nucleico se integra en la *Listeria* de origen o de tipo silvestre comprende un promotor y/u otro sitio regulador, la integración puede estar en el promotor y/o sitio regulador.

En donde el primer ácido nucleico comprende un promotor y/u otro sitio regulador, la presente descripción proporciona un segundo ácido nucleico integrado, donde el segundo ácido nucleico comprende una región de codificación que se enlaza operativamente y en estructura con el promotor y/o sitio regulador. Como una alternativa, la presente descripción proporciona un segundo ácido nucleico integrado, donde el segundo ácido nucleico comprende una región de codificación que no se enlaza operativamente y en estructura con el promotor y/o sitio regulador. Se proporciona cada una de las modalidades anteriores, donde el ácido nucleico integrado (segundo ácido nucleico) comprende un promotor y/o sitio regulador, donde el promotor y/o sitio regulador puede tomar el lugar de, o alternativamente puede operar en adición a, un promotor y/u otro sitio regulador presente en el primer ácido nucleico.

En un aspecto, el primer ácido nucleico comprende (o en la alternativa, consiste de) un promotor u otro elemento regulador, y el segundo ácido nucleico se enlaza operativamente con el promotor y/u otro elemento regulador. En otro aspecto, el segundo nucleico que codifica un antígeno comprende además un promotor y/u otro elemento regulador.

El primer ácido nucleico no necesita codificar ningún polipéptido, ya que el primer ácido nucleico puede ser una caja o región reguladora. Lo siguiente se refiere a la integración como se media mediante, por ejemplo, integración homóloga. Esta descripción proporciona el polinucleótido de arriba, en donde el segundo ácido nucleico se integra sin eliminación de cualquiera del primer ácido nucleico.

En una modalidad, el primer ácido nucleico media el crecimiento pero no la extensión. En otra modalidad, el primer ácido nucleico media la extensión pero no el crecimiento. En todavía otra modalidad, el primer ácido nucleico media tanto el crecimiento como la extensión. En un aspecto, la integración reduce o elimina el crecimiento, reduce o elimina la extensión, o reduce o elimina tanto el crecimiento como la extensión.

Además, en una modalidad el primer ácido nucleico tiene la propiedad que su inactivación resulta en al menos 10% de reducción de crecimiento, algunas veces en al menos 20% de reducción de crecimiento, típicamente en al menos 30% de reducción de crecimiento, más típicamente en al menos 40% de reducción de crecimiento, más típicamente en al menos 50% de reducción en crecimiento, con frecuencia en al menos 60% de reducción en crecimiento, con más frecuencia en al menos 70% de reducción en crecimiento, con mayor frecuencia en al menos 80% de reducción en crecimiento, convencionalmente al menos 85% de reducción en crecimiento, más convencionalmente al menos 90% de reducción en crecimiento, y a lo máximo convencionalmente en al menos 95% de reducción en crecimiento, y algunas veces en al menos 99% de reducción en crecimiento. En un aspecto, el crecimiento puede medirse en un medio definido, en un medio de caldo, en agar, dentro de una célula huésped, en el citoplasma de una célula huésped, y lo similar.

Además, en una modalidad el primer ácido nucleico tiene la propiedad que su inactivación resulta en al menos 10% de reducción de extensión de célula a célula, algunas veces en al menos 20% de reducción de extensión, típicamente en al menos 30% de reducción de extensión, más típicamente en al menos 40% de reducción de extensión, a lo máximo típicamente en al menos 50% de reducción en extensión, con frecuencia en al menos 60% de

reducción en extensión, con más frecuencia en al menos 70% de reducción en extensión, con mayor frecuencia en al menos 80% de reducción en extensión, convencionalmente al menos 85% de reducción en extensión, más convencionalmente al menos 90% de reducción en extensión, y a lo máximo convencionalmente en al menos 95% de reducción en extensión, y algunas veces en al menos 99% de reducción en extensión. En un aspecto, el crecimiento puede medirse en un medio definido, en un medio de caldo, en agar, dentro de una célula huésped, en el citoplasma de una célula huésped, y lo similar.

Se proporciona una bacteria *Listeria* que comprende cada uno de los polinucleótidos arriba descritos. En un aspecto, la *Listeria* es *Listeria monocytogenes*. Sin implicar ninguna limitación, la presente descripción contempla cada uno de los polinucleótido de arriba que es genómico, a base de plásmido, o que está presente tanto en forma genómica como a base de plásmido.

En cada una de las modalidades descritas arriba, la integración puede medirse por integración específica de sitio. La integración específica de sitio incluye un sitio attPP' plasmídico, que reconoce un sitio attBB' genómico. En ciertas modalidades, el sitio attBB' puede estar naturalmente presente en un gen que media el crecimiento o extensión. En otras modalidades, el sitio attBB' puede integrarse, e.g., por integración homóloga, en el gen que media el crecimiento o extensión, seguido por integración específica de sitio del segundo ácido nucleico descrito arriba.

La presente descripción proporciona una *Listeria* que contiene un polinucleótido que comprende un primer ácido nucleico que, en la *Listeria* de tipo silvestre o *Listeria* de origen, media el crecimiento o extensión, o tanto el crecimiento como la extensión, en donde el ácido nucleico se modifica por integración de un segundo ácido nucleico que codifica un antígeno. Todavía un ejemplo adicional de cada una de las modalidades descritas en la presente proporciona una integración que reduce o elimina el crecimiento, reduce o elimina la extensión, o reduce o elimina tanto el crecimiento como la extensión.

Lo que también se adopta es un polinucleótido que comprende un primer ácido nucleico que media el crecimiento o extensión de una *Listeria* de origen o de tipo silvestre, y donde el primer ácido nucleico comprende una secuencia de señal o secuencia secretora, en donde el primer ácido nucleico se modifica por integración de un segundo ácido nucleico que codifica al menos un antígeno, y en donde la integración resulta en atenuación de la *Listeria*, y donde la integración enlaza operativamente la secuencia secretora o de señal (codificada por el primer ácido nucleico) con un marco abierto de lectura que se codifica por el segundo ácido nucleico. En un aspecto, la integración anterior resulta en la eliminación de todo el polipéptido codificado por el primer ácido nucleico, excepto por la secuencia secretora o de señal codificada por el primer ácido nucleico (donde la secuencia secretora o de señal permanece intacta).

Se contemplan además los genomas que comprenden cada una de las modalidades de polinucleótido descritas en la presente. Además, lo que se proporciona es un genoma listerial que comprende cada una de las modalidades anteriores. Además, esta descripción suministra una bacteria *Listeria* que comprende cada una de las modalidades de polinucleótido descritas en la presente.

En una modalidad, esta descripción proporciona *Listeria* (e.g., *Listeria monocytogenes*) en la cual el genoma comprende un polinucleótido que comprende un ácido nucleico que codifica un antígeno heterólogo. En algunas modalidades, el ácido nucleico que codifica el antígeno heterólogo se ha integrado en el genoma por recombinación específica de sitio o recombinación homóloga. En algunas modalidades, la presencia del ácido nucleico en el genoma atenúa la *Listeria*. En algunas modalidades, el ácido nucleico que codifica el antígeno heterólogo se ha integrado en el lugar de un gen de virulencia. En algunas modalidades, el ácido nucleico que codifica el antígeno heterólogo se ha integrado en el lugar actA. En algunas modalidades, el ácido nucleico que codifica el antígeno heterólogo se ha integrado en el lugar inlB. En algunas modalidades, el genoma de la *Listeria* comprende un primer ácido nucleico que codifica un antígeno heterólogo que se ha integrado en un primer lugar (e.g., el lugar actA) y un segundo ácido nucleico que codifica un segundo antígeno heterólogo que se ha integrado en un segundo lugar (e.g., el lugar inlB). Los antígenos heterólogos, primero y segundo, pueden ser idénticos entre sí o diferentes. En algunas modalidades, los antígenos heterólogos, primero y segundo, difieren entre sí, pero se derivan del mismo antígeno de tumor o antígeno de agente infeccioso. En algunas modalidades, los antígenos heterólogos, primero y segundo, son cada uno, un fragmento diferente de un antígeno derivado de una célula cancerígena, tumor, o agente infeccioso. En algunas modalidades, el ácido nucleico integrado codifica una proteína de fusión que comprende un ActA modificado y el antígeno heterólogo. En algunas modalidades, al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco, al menos seis, o al menos siete secuencias de ácido nucleico que codifica antígenos heterólogos se han integrado en el genoma listerial.

En algunas modalidades, un polinucleótido (o ácido nucleico) descrito en la presente se ha integrado en un gen de virulencia en el genoma de la *Listeria*, en donde la integración del polinucleótido (a) interrumpe la expresión del

gen de virulencia; y/o (b) interrumpe una secuencia codificadora del gen de virulencia. En algunas modalidades, la *Listeria* se atenúa por la interrupción de la expresión del gen de virulencia y/o la interrupción de la secuencia codificadora del gen de virulencia atenúa la *Listeria*. En algunas modalidades, el gen de virulencia es necesario para mediar crecimiento o extensión. En otras modalidades, el gen de virulencia no es necesario para mediar el crecimiento o extensión. En algunas modalidades, el gen de virulencia es un gen dependiente de *prfA*. En algunas modalidades, el gen de virulencia no es un gen dependiente de *prfA*. En algunas modalidades, el gen de virulencia es *actA* o *inlB*. En algunas modalidades, la expresión del gen de virulencia, en el cual el polinucleótido/ácido nucleico se integra, se interrumpe al menos 10%, al menos 25%, al menos 50%, al menos 75%, al menos 90%, o aproximadamente 100% (relativo a la expresión del gen de virulencia en la ausencia del polinucleótido/ácido nucleico integrado, como se determina al medir los niveles de expresión. La interrupción de la secuencia codificadora del gen de virulencia comprende alteraciones de la secuencia codificadora de cualquier clase incluyendo mutaciones de cambio de marco, truncaciones, inserciones, eliminaciones, o reemplazos/sustituciones. En algunas modalidades, toda o parte del gen de virulencia se elimina durante la integración del polinucleótido en el gen de virulencia. En otras modalidades, ningún gen de virulencia se elimina durante la integración del polinucleótido. En algunas modalidades, parte o toda de la secuencia codificadora del gen de virulencia se reemplaza por el polinucleótido integrado.

En algunas modalidades, múltiples polinucleótidos descritos en la presente se han integrado en el genoma de *Listeria* en uno o más sitios diferentes. Los múltiples polinucleótidos pueden ser los mismos o diferentes. En algunas modalidades, un primer polinucleótido descrito en la presente se ha integrado en el lugar *actA* y/o un segundo polinucleótido descrito en la presente se ha integrado en el lugar *inlB*. En algunas modalidades, un primer polinucleótido descrito en la presente se ha integrado en el lugar *actA* y un segundo polinucleótido descrito en la presente se ha integrado en el lugar *inlB*. El antígeno heterólogo codificado por el primer polinucleótido puede ser el mismo o diferente como aquel codificado por el segundo polinucleótido. En algunas modalidades, los dos antígenos heterólogos codificados por los antígenos integrados difieren, pero se derivan del mismo antígeno.

IV. COMPOSICIONES TERAPÉUTICAS Y USOS.

(a). Composiciones terapéuticas.

La *Listeria* atenuada, vacunas, moléculas pequeñas, reactivos biológicos, y adyuvantes que se proporcionan en la presente pueden administrarse a un huésped, ya sea solos o en combinación con un excipiente farmacéuticamente aceptable, en una cantidad suficiente para inducir una respuesta inmune apropiada a un trastorno inmune, cáncer, tumor, o infección. La respuesta inmune puede comprender, sin limitación, respuesta inmune específica, respuesta inmune no específica, tanto respuesta específica como no específica, respuesta innata, respuesta inmune primaria, inmunidad adaptativa, respuesta inmune secundaria, respuesta inmune de memoria, activación de célula inmune, proliferación de célula inmune, diferenciación de célula inmune, y expresión de citosina.

“Excipiente farmacéuticamente aceptable” o “excipiente aceptable en modo de diagnóstico” incluyen pero no se limita a, agua destilada estéril, salina, solución de tampón de fosfato, tampones a base de aminoácido, o soluciones de tampón de bicarbonato. Un excipiente seleccionado y la cantidad de excipiente utilizado dependerán del modo de administración. La administración puede ser oral, intravenosa, subcutánea, dermal, intradermal, intramuscular, mucosal, parenteral, intraórgano, intralesional, intranasal, inhalación, intraocular, intramuscular, intravascular, intranodal, por escarificación, rectal, intraperitoneal, o cualquiera o combinación de una variedad de vías de administración bien conocidas. La administración puede comprender una inyección, infusión, o una combinación de las mismas. La administración de la *Listeria* de la presente descripción por una vía no oral puede evitar tolerancia (ver, e.g., Lecuit, *et al.* (2001) *Science* 292:1722-1725; Kirk, *et al.* (2005) *Transgenic Res.* 14:449-462; Faria y Weiner (2005) *Immunol. Rev.* 206:232-259; Kraus, *et al.* (2005) *J. Clin. Invest.* 115:2234-2243; Mucida, *et al.* (2005) *J. Clin. Invest.* 115:1923-1933). Los métodos están disponibles para administración de *Listeria*, e.g., intravenosamente, subcutáneamente, intramuscularmente, intraperitonealmente, oralmente, mucosal, por vía del tracto urinario, por vía de un tracto genital, por vía del tracto gastrointestinal, o por inhalación (Dustoor, *et al.* (1977) *Infection Immunity* 15:916-924; Gregory y Wing (2002) *J. Leukoc. Biol.* 72:239-248; Hof, *et al.* (1997) *Clin. Microbiol. Revs.* 10:345-357; Schluter, *et al.* (1999) *Immunobiol.* 201:188-195; Hof (2004) *Expert Opin. Pharmacother.* 5:1727-1735; Heymer, *et al.* (1988) *Infection* 16 (Suppl. 2):S106-S111; Yin, *et al.* (2003) *Environ. Health Perspectives* 111:524-530).

Esta descripción proporciona composiciones inmunogénicas que comprenden cualquier *Listeria* descrita en la presente. La descripción proporciona además composiciones farmacéuticas que comprenden cualquier *Listeria* descrita en la presente y un excipiente farmacéuticamente aceptable. En algunas modalidades, las composiciones inmunogénicas o composiciones farmacéuticas son vacunas. En algunas modalidades, la composición que comprende *Listeria* es una vacuna que comprende además un adyuvante.

Lo siguiente aplica, opcionalmente, a cada una de las modalidades descritas en la presente. Se proporciona

un reactivo administrado que es puro o purificado, por ejemplo donde el reactivo administrado puede administrarse a un mamífero en una forma pura o purificada, es decir, solo, como una composición farmacéuticamente aceptable, o en un excipiente. Además, lo siguiente también puede aplicarse, opcionalmente, a cada una de las modalidades descritas en la presente. Se proporciona un reactivo administrado que es puro o purificado, donde el reactivo administrado puede administrarse en una forma pura o purificada, es decir, solo, como una composición farmacéuticamente aceptable, o en un excipiente, y donde el reactivo no se genera después de la administración (no generado en el mamífero). En una modalidad, que puede aplicarse opcionalmente a cada uno de los reactivos descritos en la presente, se encuentra un reactivo de polipéptido que se administra como un polipéptido puro o purificado (e.g., solo, como una composición farmacéuticamente aceptable, o en un excipiente), donde el reactivo de polipéptido administrado no se administra en la forma de un ácido nucleico que codifica ese polipéptido, y como una consecuencia, no se administra ácido nucleico que puede generar el polipéptido dentro del mamífero.

La *Listeria* de la presente invención puede almacenarse, e.g., congelarse, liofilizarse, como una suspensión, como una pasta celular, o componerse con una matriz sólida o matriz de gel.

Una cantidad efectiva para un paciente particular puede variar dependiendo de factores tales como la condición que se trata, la salud general del paciente, la vía y dosis de administración y la severidad de efectos secundarios. Una cantidad efectiva para un paciente particular puede variar dependiendo de factores tales como la condición que se trata, la salud general del paciente, la vía y dosis de administración y la severidad de los efectos secundarios. La guía para los métodos de tratamiento y diagnóstico está disponible (ver, e.g., Maynard, *et al.* (1996) A Handbook of SOPs for Good Clinical Practice, Interpharm Press, Boca Raton, FL; Dent (2001) Good Laboratory and Good Clinical Practice, Urch Publ., Londres, UK).

La *Listeria* de la presente invención puede administrarse en una dosis, o dosificaciones, donde cada dosis comprende al menos 1000 células *Listeria*/peso corporal en kg; normalmente al menos 10,000 células; más normalmente al menos 100,000 células; a lo máximo normalmente al menos 1 millón de células; con frecuencia al menos 10 millones de células; con más frecuencia al menos 100 millones de células; típicamente al menos 1 billón de células; usualmente al menos 10 billones de células; convencionalmente al menos 100 billones de células; y algunas veces al menos 1 trillón de células *Listeria*/peso corporal en kg. La presente invención proporciona las dosis de arriba donde las unidades de administración de *Listeria* son unidades que forman colonias (CFU), lo equivalente de CFU antes del tratamiento con psoraleno, o donde las unidades son números de células de *Listeria*.

La *Listeria* de la presente invención puede administrarse en una dosis, o dosificaciones, donde cada dosis comprende entre 10^7 y 10^8 *Listeria* por 70 kg de peso corporal (o por área de superficie de 1.7 metros cuadrados; o por 1.5 kg de peso del hígado); 2×10^7 y 2×10^8 *Listeria* por 70 kg de peso corporal (o por área de superficie de 1.7 metros cuadrados; o por 1.5 kg de peso del hígado); 5×10^7 y 5×10^8 *Listeria* por 70 kg de peso corporal (o por área de superficie de 1.7 metros cuadrados; o por 1.5 kg de peso del hígado); 10^8 y 10^9 *Listeria* por 70 kg de peso corporal (o por área de superficie de 1.7 metros cuadrados; o por 1.5 kg de peso del hígado); entre 2.0×10^8 y 2.0×10^9 *Listeria* por 70 kg (o por área de superficie de 1.7 metros cuadrados, o por 1.5 kg de peso del hígado); entre 5.0×10^8 a 5.0×10^9 *Listeria* por 70 kg (o por área de superficie de 1.7 metros cuadrados, o por 1.5 kg de peso del hígado); entre 10^9 y 10^{10} *Listeria* por 70 kg (o por área de superficie de 1.7 metros cuadrados, o por 1.5 kg de peso del hígado); entre 2×10^9 y 2×10^{10} *Listeria* por 70 kg (o por área de superficie de 1.7 metros cuadrados, o por 1.5 kg de peso del hígado); entre 5×10^9 y 5×10^{10} *Listeria* por 70 kg (o por área de superficie de 1.7 metros cuadrados, o por 1.5 kg de peso del hígado); entre 10^{11} y 10^{12} *Listeria* por 70 kg (o por área de superficie de 1.7 metros cuadrados, o por 1.5 kg de peso del hígado); entre 2×10^{11} y 2×10^{12} *Listeria* por 70 kg (o por área de superficie de 1.7 metros cuadrados, o por 1.5 kg de peso del hígado); entre 5×10^{11} y 5×10^{12} *Listeria* por 70 kg (o por área de superficie de 1.7 metros cuadrados, o por 1.5 kg de peso del hígado); entre 10^{12} y 10^{13} *Listeria* por 70 kg (o por área de superficie de 1.7 metros cuadrados); entre 2×10^{12} y 2×10^{13} *Listeria* por 70 kg (o por área de superficie de 1.7 metros cuadrados, o por 1.5 kg de peso del hígado); entre 5×10^{12} y 5×10^{13} *Listeria* por 70 kg (o por área de superficie de 1.7 metros cuadrados, o por 1.5 kg de peso del hígado); entre 10^{13} y 10^{14} *Listeria* por 70 kg (o por área de superficie de 1.7 metros cuadrados, o por 1.5 kg de peso del hígado); entre 2×10^{13} y 2×10^{14} *Listeria* por 70 kg (o por área de superficie de 1.7 metros cuadrados, o por 1.5 kg de peso del hígado); 5×10^{13} y 5×10^{14} *Listeria* por 70 kg (o por área de superficie de 1.7 metros cuadrados, o por 1.5 kg de peso del hígado); entre 10^{14} y 10^{15} *Listeria* por 70 kg (o por área de superficie de 1.7 metros cuadrados, o por 1.5 kg de peso del hígado); entre 2×10^{14} y 2×10^{15} *Listeria* por 70 kg (o por área de superficie de 1.7 metros cuadrados, o por 1.5 kg de peso del hígado); y así sucesivamente, peso en húmedo.

El hígado de ratón, al momento de administrar la *Listeria* de la presente invención, pesa aproximadamente 1.5 gramos. El hígado de humano pesa aproximadamente 1.5 kilogramos.

También se proporciona una o más de las dosis de arriba, donde la dosis se administra por vía de una

inyección cada día, una inyección cada dos días, una inyección cada tres días, una inyección cada cuatro días, una inyección cada cinco días, una inyección cada seis días, o una inyección cada siete días, donde el programa de inyección se mantiene por, e.g., un día solamente, dos días, tres días, cuatro días, cinco días, seis días, siete días, dos semanas, tres semanas, cuatro semanas, cinco semanas, o más tiempo. Esta descripción también abarca combinaciones de las dosis de arriba y programas, e.g., una dosis inicial relativamente grande de *Listeria*, seguida por dosis subsiguientes relativamente pequeñas de *Listeria*, o una dosis inicial relativamente pequeña seguida por una dosis grande.

Un programa de dosificación de, por ejemplo, una vez/semana, dos veces/semana, tres veces/semana, cuatro veces/semana, cinco veces/semana, seis veces/semana, siete veces/semana, una vez cada dos semanas, una vez cada tres semanas, una vez cada cuatro semanas, una vez cada cinco semanas, y lo similar, está disponible para esta descripción. Los programas de dosificación abarcan la dosificación por un periodo total de tiempo de, por ejemplo, una semana, dos semanas, tres semanas, cuatro semanas, cinco semanas, seis semanas, dos meses, tres meses, cuatro meses, cinco meses, seis meses, siete meses, ocho meses, nueve meses, diez meses, once meses, y doce meses.

Se proporcionan ciclos de los programas de dosificación anteriores. El ciclo puede repetirse aproximadamente, e.g., cada siete días; cada 14 días; cada 21 días; cada 28 días; cada 35 días; 42 días; cada 49 días; cada 56 días; cada 63 días; cada 70 días; y lo similar. Un intervalo sin dosificación puede ocurrir entre un ciclo, donde el intervalo puede ser aproximadamente, e.g., siete días; 14 días; 21 días; 28 días; 35 días; 42 días; 49 días; 56 días; 63 días; 70 días; y lo similar. En este contexto, el término "aproximadamente" significa más o menos un día, más o menos dos días, más o menos tres días, más o menos cuatro días, más o menos cinco días, más o menos seis días, por más o menos siete días.

La presente invención comprende un método para administrar *Listeria* que es oral. También se proporciona un método para administrar *Listeria* que es intravenosa. Además, lo que se proporciona es un método para administrar *Listeria* que es intramuscular. Esta descripción suministra una bacteria *Listeria*, o cultivo o suspensión de bacteria *Listeria*, preparada al crecer en un medio a base de carne, o que contiene polipéptidos derivados de un producto animal o carne. También se suministra por la presente invención una bacteria *Listeria*, o cultivo o suspensión de bacteria *Listeria*, preparada al crecer en un medio que no contiene productos animales o carne, preparada al crecer en un medio que contiene polipéptidos vegetales, preparada al crecer en un medio que no se basa en productos de levadura, o preparada al crecer en un medio que contiene polipéptidos de levadura.

La presente invención comprende un método para administrar *Listeria* que no es oral. También se proporciona un método para administrar *Listeria* que no es intravenosa. Además, lo que se proporciona es un método para administrar *Listeria* que no es intramuscular. Esta descripción suministra una bacteria *Listeria*, o cultivo o suspensión de bacteria *Listeria*, preparada al crecer en un medio que no es a base de carne, o que no contiene polipéptidos derivados de un producto animal o carne. También se suministra por la presente invención una bacteria *Listeria*, o cultivo o suspensión de bacteria *Listeria*, preparada al crecer en un medio a base de productos vegetales, que contiene polipéptidos vegetales, que se basa en productos de levadura, o que contiene polipéptidos de levadura.

Los métodos para la co-administración con un agente terapéutico adicional, e.g., una molécula pequeña, antibiótico, agente moduladora de inmunidad innato, agente modulador de la tolerancia, citosina, agente quimioterapéutico, o radiación, se conocen bien en la materia (Hardman, *et al.* (eds.) (2001) Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 10th ed., McGraw-Hill, Nueva York, NY; Poole y Peterson (eds.) (2001) Pharmacotherapeutics for Advanced Practice: A Practical Approach, Lippincott, Williams & Wilkins, Phila., PA; Chabner y Longo (eds.) (2001) Cancer Chemotherapy and Biotherapy, Lippincott, Williams & Wilkins, Phila., PA).

La presente invención proporciona reactivos para administrar junto con una *Listeria* atenuada. Estos reactivos incluyen reactivos biológicos tales como: (1) Citosinas, anticuerpos, células dendríticas, células tumorales atenuadas; (2) Reactivos de molécula pequeña tales como 5-fluorouracil, metotrexato, paclitaxel, docetaxel, cis-platina, gemcitabina; (3) Reactivos que modulan las células T reguladoras, tales como ciclofosfamida, anticuerpo anti-CTLA4, anticuerpo anti-CD25 (ver, e.g., Hawryfar, *et al.* (2005) J. Immunol. 174:344-3351); y (4) Vacunas (que incluyen vacunas de polipéptido, vacunas de ácido nucleico, vacunas de célula tumoral atenuada, y vacunas de célula dendrítica). Los reactivos pueden administrarse con la *Listeria* o independientemente (antes o después) de la *Listeria*. Por ejemplo, el reactivo puede administrarse inmediatamente antes (o después) de *Listeria*, o el mismo día que, un día antes (o después), una semana antes (o después), un mes antes (o después), o dos meses antes (o después) de *Listeria*, y lo similar.

Los reactivos biológicos o macromoléculas de la presente invención abarcan un agonista o antagonista de una citosina, un ácido nucleico que codifica un agonista o antagonista de una citosina, una célula que expresa una

citocina, o un anticuerpo antagonístico o agonístico. Los reactivos biológicos incluyen, sin limitación, una citosina TH-1, una citosina TH-2, IL-2, IL-12, FLT3-ligando, GM-CSF, IFN γ , un receptor de citosina, un receptor de citosina soluble, una quimiocina, factor de necrosis de tumor (TNF), ligando CD40, o un reactivo que estimula el reemplazo de una unidad de proteasoma con una subunidad de inmunoproteasoma.

La presente descripción comprende reactivos biológicos, tales células diseñadas para expresar al menos uno de los siguientes: GM-CSF, IL-2, IL-3, IL-4, IL-12, IL-18, factor de necrosis de tumor- α (TNF- α), o proteína-10 de inducción. Otros reactivos contemplados incluyen agonistas de B7-1, B7-2, CD28, ligando CD40, o ligando OX40 (OX40L), y nuevas formas diseñadas para ser solubles o diseñadas para unirse a membrana (ver, e.g., Karnbach, *et al.* (2001) *J. Immunol.* 167:2569-2576; Greenfield, *et al.* (1998) *Crit. Rev. Immunol.* 18:389-418; Parney y Chang (2003) *J. Biomed. Sci.* 10:37-43; Gri, *et al.* (2003) *J. Immunol.* 170:99-106; Chiodoni, *et al.* (1999) *J. Exp. Med.* 190:125-133; Enzler, *et al.* (2003) *J. Exp. Med.* 197:1213-1219; Soo Hoo, *et al.* (1999) *J. Immunol.* 162:7343-7349; Mihalyo, *et al.* (2004) *J. Immunol.* 172:5338-5345; Chapoval, *et al.* (1998) *J. Immunol.* 161:6977-6984).

Sin implicar ninguna limitación, la presente descripción proporciona los siguientes biológicos. MCP-1, MIP1- α , TNF- α , e interleucina-2, por ejemplo, son efectivos para tratar una variedad de tumores (ver, e.g., Nakamoto, *et al.* (2000) *Anticancer Res.* 20(6A):4087-4096; Kamada, *et al.* (2000) *Cancer Res.* 60:6416-6420; Li, *et al.* (2002) *Cancer Res.* 62:4023-4028; Yang, *et al.* (2002) *Zhonghua Wai Ke Za Zhi* 40:789-791; Hoving, *et al.* (2005) *Cancer Res.* 65:4300-4308; Tsuchiyama, *et al.* (2003) *Cancer Gene Ther.* 10:260-269; Sakai, *et al.* (2001) *Cancer Gene Ther.* 8:695-704).

La presente descripción proporciona reactivos y métodos que comprenden un agonista de ligando Flt3, y un agonista de ligando Flt3 en combinación con *Listeria*. Ligando Flt3 (ligando 3 cinasa de tirosina similar a Fms) es una citosina que puede generar una respuesta inmune antitumor (ver, e.g., Dranoff (2002) *Immunol. Revs.* 188:147-154; Mach, *et al.* (2000) *Cancer Res.* 60:3239-3246; Furumoto, *et al.* (2004) *J. Clin. Invest.* 113:774-783; Freedman, *et al.* (2003) *Clin. Cancer Res.* 9:5228-5237; Mach, *et al.* (2000) *Cancer Res.* 60:3239-3246).

En otra modalidad, la presente descripción contempla la administración de una célula dendrítica (DC) que expresa al menos un antígeno de tumor, o antígeno de enfermedad infecciosa. La expresión por la DC de un antígeno puede mediar por medio de, e.g., carga de péptido, extractos de célula tumoral, fusión con células tumorales, transducción con ARNm, o transfectado por un vector (ver, e.g., Klein, *et al.* (2000) *J. Exp. Med.* 191:1699-1708; Conrad y Nestle (2003) *Curr. Opin. Mol. Ther.* 5:405-412; Gilboa y Vieweg (2004) *Immunol. Rev.* 199:251-263; Paczesny, *et al.* (2003) *Semin. Cancer Biol.* 13:439-447; Westermann, *et al.* (1998) *Gene Ther.* 5:264-271).

Los métodos y reactivos de la presente descripción también abarcan reactivos de molécula pequeña, tales como 5-fluorouracil, metotrexato, irinotecan, doxorubicina, prednisona, dolostatin-10 (D10), combretastatina A-4, mitomicina C (MMC), vincristina, colchicinas, vinblastina, ciclofosfamida, beta-glucanos fúngicos y derivados de los mismos, y lo similar (ver, e.g., Hurwitz, *et al.* (2004) *New Engl. J. Med.* 350:2335-2342; Pelaez, *et al.* (2001) *J. Immunol.* 166:6608-6615; Havas, *et al.* (1990) *J. Biol. Response Modifiers* 9:194-204; Turk, *et al.* (2004) *J. Exp. Med.* 200:771-782; Ghiringhelli, *et al.* (2004) *Eur. J. Immunol.* 34:336-344; Andrade-Mena (1994) *Int. J. Tissue React.* 16:95-103; Chrischilles, *et al.* (2003) *Cancer Control* 10:396-403). También se comprenden composiciones que no son moléculas, e.g., sales e iones.

Se proporcionan análogos de ciclofosfamida (ver, e.g., Jain, *et al.* (2004) *J. Med. Chem.* 47:3843-3852; Andersson, *et al.* (1994) *Cancer Res.* 54:5394-5400; Borch y Canute (1991) *J. Med. Chem.* 34:3044-3052; Ludeman, *et al.* (1979) *J. Med. Chem.* 22:151-158; Zon (1982) *Prog. Med. Chem.* 19:205-246).

También se abarcan por esta descripción los reactivos de molécula pequeña que estimulan la respuesta inmune innata, e.g., oligonucleótidos CpG, imiquimod, y α GalCer. Los oligonucleótidos CpG median la respuesta inmune a través de TLR9 (ver, e.g., Chagnon, *et al.* (2005) *Clin. Cancer Res.* 11:1302-1311; Speiser, *et al.* (2005) *J. Clin. Invest.* Feb.3 (epub adelantada a impresión); Mason, *et al.* (2005) *Clin. Cancer Res.* 11:361-369; Suzuki, *et al.* (2004) *Cancer Res.* 64:8754-8760; Taniguchi, *et al.* (2003) *Annu. Rev. Immunol.* 21:483-513; Takeda, *et al.* (2003) *Annu. Rev. Immunol.* 21:335-376; Metelitsa, *et al.* (2001) *J. Immunol.* 167:3114-3122).

Otros reactivos de molécula pequeña útiles incluyen aquellos derivados de peptidoglicano bacterial, tales como ciertos ligandos NOD2 (McCaffrey, *et al.* (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101:11386-11391).

Esta descripción incluye reactivos y métodos para modular la actividad de células reguladoras T (Tregs; células T supresoras). La atenuación o inhibición de la actividad de célula Treg puede mejorar la muerte del sistema inmune de células tumorales. Se ha identificado un número de reactivos que inhiben la actividad de la célula Treg. Estos reactivos incluyen, e.g., ciclofosfamida (a.k.a. Cytoxan®; CTX), anticuerpo anti-CD25, moduladores de GITR-L o

GITR, un modulador de factor de transcripción de caja de cabeza de Tenedor (Fox), un modulador de LAG-3, anti-IL-2R, y anti-CTLA4 (ver, e.g., Pardoll (2003) *Annu. Rev. Immunol.* 21:807-839; Ercolini, *et al.* (2005) *J. Exp. Med.* 201:1591-1602; Haeryfar, *et al.* (2005) *J. Immunol.* 174:3344-3351; Mihalyo, *et al.* (2004) *J. Immunol.* 172:5338-5345; Stephens, *et al.* (2004) *J. Immunol.* 173:5008-5020; Schiavoni, *et al.* (2000) *Blood* 95:2024-2030; Calmels, *et al.* (2004) *Cancer Gene Ther.* Oct. 08 (epub adelantada a impresión); Mincheff, *et al.* (2004) *Cancer Gene Ther.* Sept.17 [epub adelantada a impresión]; Muriglan, *et al.* (2004) *J. Exp. Med.* 200:149-157; Stephens, *et al.* (2004) *J. Immunol.* 173:5008-5020; Coffey y Burgering (2004) *Nat. Rev. Immunol.* 4:889-899; Kalinichenko, *et al.* (2004) *Genes Dev.* 18:830-850; Cobbold, *et al.* (2004) *J. Immunol.* 172:6003-6010; Huang, *et al.* (2004) *Immunity* 21:503-513). CTX muestra un efecto bimodal en el sistema inmune, donde bajas dosis de CTX inhiben Tregs (ver, e.g., Lutsiak, *et al.* (2005) *Blood* 105:2862-2868).

Los agentes de bloqueo CTLA4, tales como anticuerpos de bloqueo anti-CTLA4, pueden mejorar la respuesta inmune a cánceres, tumores, trastornos pre-cancerosos, infecciones, y lo similar (ver, e.g., Zubairi, *et al.* (2004) *Eur. J. Immunol.* 34:1433-1440; Espenschied, *et al.* (2003) *J. Immunol.* 170:3401-3407; Davila, *et al.* (2003) *Cancer Res.* 63:3281-3288; Hodi, *et al.* (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100:4712-4717). Donde la presente descripción utiliza anticuerpos anti-CTLA4, y lo similar, esta descripción no se limita necesariamente al uso para inhibir Tregs, y también no necesariamente comprende la inhibición de Tregs.

Los agentes de bloqueo del gen-3 de activación de linfocito (LAG-3), tales como anticuerpos anti-LAG-3 anticuerpos o LAG-3 soluble (e.g., LAG-3 Ig), pueden mejorar la respuesta inmune a cánceres o infecciones. Los anticuerpos anti-LAG-3 reducen la actividad de Tregs (ver, e.g., Huang, *et al.* (2004) *Immunity* 21:503-513; Triebel (2003) *Trends Immunol.* 24:619-622; Workman y Vignali (2003) *Eur. J. Immunol.* 33:970-979; Cappello, *et al.* (2003) *Cancer Res.* 63:2518-2525; Workman, *et al.* (2004) *J. Immunol.* 172:5450-5455; Macon-Lemaître y Triebel (2005) *Immunology* 115:170-178).

Las vacunas que comprenden un antígeno de tumor, un ácido nucleico que codifica un antígeno de tumor, un vector que comprende un ácido nucleico que codifica un antígeno de tumor, una célula que comprende un antígeno de tumor, una célula de tumor, o una célula de tumor atenuada, se comprenden por esta descripción. Se proporcionan los reactivos derivados de un ácido nucleico que codifica un antígeno de tumor, e.g., un ácido nucleico optimizado de codón, o un ácido nucleico que codifica dos o más antígenos de tumor diferentes, o un ácido nucleico que expresa epítopes reordenados de un antígeno de tumor, e.g., donde el orden natural de epítopes es ABCD y el orden diseñado es ADBC, o un ácido nucleico que codifica una proteína de fusión que comprende al menos dos antígenos de tumor diferentes.

En donde un anticuerpo administrado, compuesto de unión derivado de un anticuerpo, citosina, u otro agente terapéutico produce toxicidad, una dosis apropiada puede ser una donde el efecto terapéutico sopesa el efecto tóxico. Generalmente, una dosificación óptica de la presente invención es una que maximiza el efecto terapéutico, mientras limita cualquier efecto tóxico a un nivel que no amenaza la vida del paciente o reduce la eficacia del agente terapéutico. Las señales de efecto tóxico, o efecto anti-terapéutico incluyen, sin limitación, e.g., respuesta anti-idiotípica, respuesta inmune a un anticuerpo terapéutico, reacción alérgica, toxicidad de plaqueta y hematológica, elevaciones de aminotransferasas, fosfatasa alcalina, creatina quinasa, neurotoxicidad, náusea, y vómito (ver, e.g., Huang, *et al.* (1990) *Clin. Chem.* 36:431-434).

Una cantidad efectiva de un agente terapéutico es una que disminuirá o mejorará los síntomas normalmente por al menos 10%, más normalmente por al menos 20%, a lo máximo normalmente por al menos 30%, típicamente por al menos 40%, more típicamente por al menos 50%, a lo máximo típicamente por al menos 60%, con frecuencia por al menos 70%, con más frecuencia por al menos 80%, y a lo máximo con frecuencia por al menos 90%, convencionalmente por al menos 95%, más convencionalmente por al menos 99%, y a lo máximo convencionalmente por al menos 99.9%.

Los reactivos y métodos de la presente invención proporcionan una vacuna que comprende solamente una vacunación, o que comprende una primer vacunación; o que comprende al menos una revacunación; al menos dos revacunaciones; o al menos tres revacunaciones. Está disponible la guía en parámetros para revacunaciones (ver, e.g., Marth (1997) *Biologicals* 25:199-203; Ramsay, *et al.* (1997) *Immunol. Cell Biol.* 75:382-388; Gherardi, *et al.* (2001) *Histol. Histopathol.* 16:655-667; Leroux-Roels, *et al.* (2001) *Acta Clin. Belg.* 56:209-219; Greiner, *et al.* (2002) *Cancer Res.* 62:6944-6951; Smith, *et al.* (2003) *J. Med. Virol.* 70:SuppU:S38-S41; Sepulveda-Amor, *et al.* (2002) *Vaccine* 20:2790-2795).

Se proporciona un primer reactivo que comprende una bacteria *Listeria* (o vacuna *Listeria*), y un segundo reactivo que comprende, e.g., una citosina, una molécula pequeña tal como ciclofosfamida o metotrexato, o una vacuna, tal como una célula de tumor atenuada o célula de tumor atenuada que expresa una citosina. Se

proporcionan los siguientes métodos de administración del primer reactivo y el segundo reactivo.

La *Listeria* y el segundo reactivo pueden administrarse de manera concurrente, es decir, donde la administración para cada uno de estos reactivos puede ocurrir en intervalos de tiempo que se superponen parcial o completamente entre sí. La *Listeria* y el segundo reactivo pueden administrarse durante intervalos de tiempo que no se superponen entre sí. Por ejemplo, el primer reactivo puede administrarse dentro del margen de tiempo de $t = 0$ a 1 hora, mientras el segundo reactivo puede administrarse dentro del margen de tiempo de $t = 1$ a 2 horas. También, el primer reactivo puede administrarse dentro del margen de tiempo de $t = 0$ a 1 hora, mientras el segundo reactivo puede administrarse en algún lugar dentro del margen de tiempo de $t = 2-3$ horas, $t = 3-4$ horas, $t = 4-5$ horas, $t = 5-6$ horas, $t = 6-7$ horas, $t = 7-8$ horas, $t = 8-9$ horas, $t = 9-10$ horas, y lo similar. Además, el segundo reactivo puede administrarse en algún lugar en el margen de tiempo de $t =$ menos 2-3 horas, $t =$ menos 3-4 horas, $t =$ menos 4-5 horas, $t =$ menos 5-6 horas, $t =$ menos 6-7 horas, $t =$ menos 7-8 horas, $t =$ menos 8-9 horas, $t =$ menos 9-10 horas, y lo similar.

Para proporcionar otro ejemplo, el primer reactivo puede administrarse dentro del margen de tiempo de $t = 0$ a 1 día, mientras el segundo reactivo puede administrarse dentro del margen de tiempo de $t = 1$ a 2 días. También, el primer reactivo puede administrarse dentro del margen de tiempo de $t = 0$ a 1 día, mientras el segundo reactivo puede administrarse en algún lugar dentro del margen de tiempo de $t = 2-3$ días, $t = 3-4$ días, $t = 4-5$ días, $t = 5-6$ días, $t = 6-7$ días, $t = 7-8$ días, $t = 8-9$ días, $t = 9-10$ días, y lo similar. Además, el segundo reactivo puede administrarse en algún lugar en el tiempo de $t =$ menos 2-3 días, $t =$ menos 3-4 días, $t =$ menos 4-5 días, $t =$ menos 5-6 días, $t =$ menos 6-7 días, $t =$ menos 7-8 días, $t =$ menos 8-9 días, $t =$ menos 9-10 días, y lo similar.

En otro aspecto, la administración de la *Listeria* puede comenzar en $t = 0$ horas, donde la administración resulta en un valor máximo (o nivel máximo) en concentración de plasma de la *Listeria*, y donde la administración del segundo reactivo se inicia a aproximadamente el tiempo que la concentración de *Listeria* en plasma alcanza dicha concentración máxima, a aproximadamente el tiempo que la concentración de *Listeria* en plasma es 95% dicha concentración máxima, a aproximadamente el tiempo que la concentración de *Listeria* en plasma es 90% dicha concentración máxima, a aproximadamente el tiempo que la concentración de *Listeria* en plasma es 85% dicha concentración máxima, a aproximadamente el tiempo que la concentración de *Listeria* en plasma es 80% dicha concentración máxima, a aproximadamente el tiempo que la concentración de *Listeria* en plasma es 75% dicha concentración máxima, a aproximadamente el tiempo que la concentración de *Listeria* en plasma es 70% dicha concentración máxima, a aproximadamente el tiempo que la concentración de *Listeria* en plasma es 65% dicha concentración máxima, a aproximadamente el tiempo que la concentración de *Listeria* en plasma es 60% dicha concentración máxima, a aproximadamente el tiempo que la concentración de *Listeria* en plasma es 55% dicha concentración máxima, a aproximadamente el tiempo que la concentración de *Listeria* en plasma es 50% dicha concentración máxima, a aproximadamente el tiempo que la concentración de *Listeria* en plasma es 45% dicha concentración máxima, a aproximadamente el tiempo que la concentración de *Listeria* en plasma es 40% dicha concentración máxima, a aproximadamente el tiempo que la concentración de *Listeria* en plasma es 35% dicha concentración máxima, a aproximadamente el tiempo que la concentración de *Listeria* en plasma es 30% dicha concentración máxima, a aproximadamente el tiempo que la concentración de *Listeria* en plasma es 25% dicha concentración máxima, a aproximadamente el tiempo que la concentración de *Listeria* en plasma es 20% dicha concentración máxima, a aproximadamente el tiempo que la concentración de *Listeria* en plasma es 15% dicha concentración máxima, a aproximadamente el tiempo que la concentración de *Listeria* en plasma es 10% dicha concentración máxima, a aproximadamente el tiempo que la concentración de *Listeria* en plasma es 5% dicha concentración máxima, a aproximadamente el tiempo que la concentración de *Listeria* en plasma es 2.0% dicha concentración máxima, a aproximadamente el tiempo que la concentración de *Listeria* en plasma es 0.5% dicha concentración máxima, a aproximadamente el tiempo que la concentración de *Listeria* en plasma es 0.2% dicha concentración máxima, por a aproximadamente el tiempo que la concentración de *Listeria* en plasma es 0.1%, o menos de, dicha concentración máxima.

En otro aspecto, la administración del segundo reactivo puede comenzar en $t = 0$ horas, donde la administración resulta en un valor máximo (o nivel máximo) en concentración de plasma del segundo reactivo y donde la administración de la *Listeria* se inicia a aproximadamente el tiempo que la concentración de nivel de plasma del segundo reactivo alcanza dicha concentración máxima, a aproximadamente el tiempo que la concentración del segundo reactivo en plasma es 95% dicha concentración máxima, a aproximadamente el tiempo que la concentración del segundo reactivo en plasma es 90% dicha concentración máxima, a aproximadamente el tiempo que la concentración del segundo reactivo en plasma es 85% dicha concentración máxima, a aproximadamente el tiempo que la concentración del segundo reactivo en plasma es 80% dicha concentración máxima, a aproximadamente el tiempo que la concentración del segundo reactivo en plasma es 75% dicha concentración máxima, a aproximadamente el

tiempo que la concentración del segundo reactivo en plasma es 70% dicha concentración máxima, a aproximadamente el tiempo que la concentración del segundo reactivo en plasma es 65% dicha concentración máxima, a aproximadamente el tiempo que la concentración del segundo reactivo en plasma es 60% dicha concentración máxima, a aproximadamente el tiempo que la concentración del segundo reactivo en plasma es 55% dicha concentración máxima, a aproximadamente el tiempo que la concentración del segundo reactivo en plasma es 50% dicha concentración máxima, a aproximadamente el tiempo que la concentración del segundo reactivo en plasma es 45% dicha concentración máxima, a aproximadamente el tiempo que la concentración del segundo reactivo en plasma es 40% dicha concentración máxima, a aproximadamente el tiempo que la concentración del segundo reactivo en plasma es 35% dicha concentración máxima, a aproximadamente el tiempo que la concentración del segundo reactivo en plasma es 30% dicha concentración máxima, a aproximadamente el tiempo que la concentración del segundo reactivo en plasma es 25% dicha concentración máxima, a aproximadamente el tiempo que la concentración del segundo reactivo en plasma es 20% dicha concentración máxima, a aproximadamente el tiempo que la concentración del segundo reactivo en plasma es 15% dicha concentración máxima, a aproximadamente el tiempo que la concentración del segundo reactivo en plasma es 10% dicha concentración máxima, a aproximadamente el tiempo que la concentración del segundo reactivo en plasma es 5% dicha concentración máxima, a aproximadamente el tiempo que la concentración de reactivo en plasma es 2.0% dicha concentración máxima, a aproximadamente el tiempo que la concentración del segundo reactivo en plasma es 0.5% dicha concentración máxima, a aproximadamente el tiempo que la concentración del segundo reactivo en plasma es 0.2% dicha concentración máxima, o a aproximadamente el tiempo que la concentración del segundo reactivo en plasma es 0.1%, o menos de, dicha concentración máxima. Ya que se reconoce que la alteración de la *Listeria* o segundo reactivo puede ocurrir *in vivo*, las concentraciones anteriores pueden valorarse después de la medición del reactivo intacto, o después de la medición de un producto de degradación identificable del reactivo intacto.

Las formulaciones de los agentes terapéuticos y de diagnóstico pueden prepararse para almacenamiento al mezclar con portadores, excipientes, o estabilizadores fisiológicamente aceptables en la forma de, e.g., polvos liofilizados, pastas, soluciones acuosas o suspensiones (ver, e.g., Hardman, *et al.* (2001) Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, McGraw-Hill, Nueva York, NY; Gennaro (2000) Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Lippincott, Williams, y Wilkins, Nueva York, NY; Avis, *et al.* (eds.) (1993) Pharmaceutical Dosage Forms: Parenteral Medications, Marcel Dekker, NY; Lieberman, *et al.* (eds.) (1990) Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets, Marcel Dekker, NY; Lieberman, *et al.* (eds.) (1990) Pharmaceutical Dosage Forms: Disperse Systems, Marcel Dekker, NY; Weiner y Kotkoskie (2000) Excipient Toxicity and Safety, Marcel Dekker, Inc., New York, NY).

Esta descripción también proporciona un kit que comprende una célula *Listeria*, un cultivo celular listerial, o una preparación de célula liofilizada, y un compartimiento. Además, la presente invención proporciona un kit que comprende una célula *Listeria*, cultivo celular listerial, o una preparación de célula liofilizada y un reactivo. También se proporciona un kit que comprende una célula *Listeria*, un cultivo celular listerial, o una preparación de célula liofilizada e instrucciones para uso o desecho. Además, la presente invención proporciona un kit que comprende una célula *Listeria*, un cultivo celular listerial, o preparación de célula liofilizada, y compartimiento y un reactivo. Se proporciona un kit que comprende bacteria *Listeria*, e instrucciones para utilizar la bacteria *Listeria* con un agente anti-cáncer de molécula pequeña, y/o agente de inmunomodulación de molécula pequeña (e.g., ciclofosfamida), y/o un agente anti-infección de molécula pequeña, y lo similar. También se proporciona un kit que comprende bacteria *Listeria*, y/o instrucciones para administrar la *Listeria*, y/o instrucciones para monitorear la respuesta inmune a la *Listeria* administrada, y/o instrucciones para monitorear la respuesta inmune a un antígeno heterólogo codificado por la *Listeria* administrada.

(b). Usos.

Esta descripción proporciona, en ciertas modalidades, una bacteria *Listeria* modificada, e.g., *L. monocytogenes*, diseñada para expresar al menos un antígeno heterólogo. Esta descripción es útil para mejorar la respuesta inmune, estimular la respuesta inmune, mejorar la presentación inmune, incrementar la estabilidad de un ARNm expresado o polipéptido, incrementar el procesamiento proteolítico de un polipéptido expresado, incrementar la respuesta inmune a un autoantígeno mutado, incrementar la supervivencia a un cáncer o infección, y/o para tratar un cáncer o infección. Esta descripción también es útil para expresión mejorada de un antígeno heterólogo, e.g., para industria, agricultura, o medicina.

Para métodos para estimular, mejorar, o incrementar la respuesta inmune a un cáncer, tumor, o agente infeccioso; y para métodos para estimular, mejorar, o incrementar la supervivencia a un cáncer, tumor, o agente infeccioso; puede ocurrir un incremento con administración de una *Listeria* que contiene un ácido nucleico que codifica un antígeno heterólogo. Para propósitos de proporcionar un control experimental, el incremento puede ser relativo una respuesta con administración de una *Listeria* que no contiene un ácido nucleico que codifica ese antígeno heterólogo

particular. Como otra alternativa, el incremento puede ser relativo a una respuesta con la administración de una *Listeria* que no contiene ningún ácido nucleico que codifica un antígeno heterólogo, e.g., una *Listeria* tipo silvestre o genitora. Como aún otra alternativa, el incremento puede ser relativo a una respuesta sin administrar ninguna *Listeria*.

Para métodos para estimular, mejorar, o incrementar la respuesta inmune a un cáncer, tumor, o agente infeccioso; y para métodos para estimular, mejorar, o incrementar la supervivencia a un cáncer, tumor, o agente infeccioso; puede ocurrir un incremento con administración de una *Listeria* (que contiene o que no contiene un ácido nucleico que codifica un antígeno heterólogo) con un modulador inmune, tal como un anticuerpo agonista, una citosina, o un anticuerpo que se une específicamente a un antígeno del cáncer, tumor, o agente infeccioso. Para propósitos de proporcionar un control experimental, el incremento puede ser relativo a una respuesta con administración de una *Listeria* pero sin administrar el modulador inmune. Como una alternativa, el incremento puede ser relativo a cualquier respuesta con la administración del modulador inmune, pero sin administrar ninguna *Listeria*. Como aún otra alternativa, el incremento puede ser relativo a una respuesta sin administrar ninguna *Listeria* y sin administrar el modulador inmune.

En algunas modalidades, esta descripción proporciona métodos para estimular una respuesta inmune a un antígeno en un mamífero, que comprende administrar una cantidad efectiva de una bacteria *Listeria* descrita en la presente, o una cantidad efectiva de una composición que comprende la *Listeria*, al mamífero. En algunas modalidades, esta descripción proporciona métodos para estimular una respuesta inmune a un antígeno de, o derivado de, un cáncer o agente infeccioso, que comprende administrar una cantidad efectiva de una bacteria *Listeria* descrita en la presente, o una cantidad efectiva de una composición que comprende la *Listeria*, al mamífero. En algunas modalidades, el antígeno heterólogo expresado por la *Listeria* comparte al menos un epítipo con, o inmunológicamente se reactiva de manera cruzada con, el antígeno de, o derivado de, cáncer o agente infeccioso. En algunas modalidades, la respuesta inmune es una respuesta inmune de la célula T CD8+. En algunas modalidades, la respuesta inmune es una respuesta inmune de la célula T CD4+.

Esta descripción proporciona una bacteria *Listeria*, o una cepa *Listeria*, que está muerta pero es metabólicamente activa (KBMA) (ver, e.g., Brockstedt, *et al* (2005) Nat. Med. 11:853-860). Una bacteria *Listeria* KBMA es metabólicamente activa, pero no puede formar una colonia, e.g., en agar. Una mutación de inactivación en al menos un gen de reparación del ADN, e.g., Δ uvrAB, permite la muerte de *Listeria* utilizando concentraciones de un agente reticulante de ácido nucleico (e.g., psoraleno) a bajas concentraciones, donde estas concentraciones son suficientes para prevenir la formación de colonia pero no suficientes para afectar sustancialmente el metabolismo, o afectar de manera detectable el metabolismo. El resultado de tratamiento limitado con psoraleno/luz UVA, y/o de tratamiento con un agente reticulante de ácido nucleico que es altamente específico para hacer enlaces transversales genómicos interfilamento, es que las células bacteriales se matan pero permanecen metabólicamente activas.

En algunas modalidades, la presente invención resulta en la reducción del número de células que se proliferan anormalmente, la reducción en el número de células cancerígenas, la reducción en el número de células tumorales, la reducción en el volumen de tumor, la reducción del número de patógenos u organismos infecciosos por unidad de tejido o fluido biológico (e.g., suero), la reducción en concentración viral (e.g., suero), donde normalmente se reduce por al menos 5%, más normalmente se reduce por al menos 10%, a lo máximo normalmente se reduce por al menos 15%, típicamente se reduce por al menos 20%, more típicamente se reduce por al menos 25%, a lo máximo típicamente se reduce por al menos 30%, usualmente se reduce por al menos 40%, más usualmente se reduce por al menos 50%, a lo máximo usualmente se reduce por al menos 60%, convencionalmente se reduce por al menos 70%, más convencionalmente se reduce por al menos 80%, a lo máximo convencionalmente se reduce por al menos 90%, y aún a lo máximo convencionalmente se reduce por al menos 99%. La unidad de reducción puede ser, sin limitación, el número de células tumorales/sujeto mamífero; número de células tumorales/hígado; número de células tumorales/bazo; masa de células tumorales/sujeto mamífero; masa de células tumorales/hígado; masa de células tumorales/bazo; número de partículas virales o virus o concentración por gramo de hígado; número de partículas virales o virus o concentración por célula; número de partículas virales o virus o concentración per ml de sangre; y lo similar.

El medio de crecimiento utilizado para preparar una *Listeria* puede caracterizarse por análisis químico, cromatografía líquida de alta presión (HPLC), espectroscopia de masa, cromatografía de gas, métodos espectroscópicos, y lo similar. El medio de crecimiento también puede caracterizarse por medio de anticuerpos específicos para componentes de ese medio, donde el componente ocurre como un contaminante con la *Listeria*, e.g., un contaminante en el polvo listerial, preparación congelada, o pasta celular. Los anticuerpos, específicos para los antígenos de proteína o péptido, o glicolípido, glicopéptido, o antígenos de lipopéptido, pueden utilizarse en ensayos ELISA formulados para detectar contaminantes de origen animal. Los anticuerpos para utilizarse en la detección de antígenos, o fragmentos antigénicos, de origen animal están disponibles (ver, e.g., Fukuta, *et al.* (1977) Jpn. Heart J.

18:696-704; DeVay y Adler (1976) Ann. Rev. Microbiol. 30:147-168; Cunningham, *et al.* (1984) Infection Immunity 46:34-41; Kawakita, *et al.* (1979) Jpn. Cir. J. 43:452-457; Hanly, *et al.* (1994) Lupus 3:193-199; Huppi, *et al.* (1987) Neurochem. Res. 12:659-665; Quackenbush, *et al.* (1985) Biochem. J. 225:291-299). Esta descripción suministra kits y métodos de diagnóstico que facilita la prueba de la influencia de la *Listeria* en el sistema inmune. La prueba puede incluir comparar una cepa de *Listeria* con otra cepa de *Listeria*, una cepa de *Listeria* de origen con una cepa de *Listeria* mutada. Los métodos de prueba comprenden, e.g., fagocitosis, difusión, presentación de antígeno, estimulación de la célula T, respuesta de citosina, toxicidad de huésped, LD₅₀, y eficacia para mejorar una condición patológica.

La presente descripción proporciona métodos para incrementar la supervivencia de un sujeto, huésped, paciente, sujeto prueba, sujeto experimental, sujeto veterinario, y lo similar, a un cáncer, un tumor, un trastorno precanceroso, un trastorno inmune, y/o un agente infeccioso. El agente infeccioso puede ser un virus, bacteria, o parásito, o cualquier combinación de los mismos. El método comprende administrar una *Listeria* atenuada, por ejemplo, como una suspensión, bolo, gel, matriz, inyección, o infusión, y lo similar. La *Listeria* administrada aumenta la supervivencia, en comparación con un control apropiado (e.g., nada administrado o un placebo administrado, y lo similar) por usualmente al menos un día; más usualmente al menos cuatro días; a lo máximo usualmente al menos ocho días, normalmente al menos 12 días; más normalmente al menos 16 días; a lo máximo normalmente al menos 20 días, con frecuencia al menos 24 días; con más frecuencia al menos 28 días; a lo máximo con frecuencia al menos 32 días, convencionalmente al menos 40 días, más convencionalmente al menos 48 días; a lo máximo convencionalmente al menos 56 días; típicamente por al menos 64 días; más típicamente por al menos 72 días; a lo máximo típicamente al menos 80 días; generalmente al menos seis meses; más generalmente al menos ocho meses; a lo máximo generalmente al menos diez meses; comúnmente al menos 12 meses; más comúnmente al menos 16 meses; y a lo máximo comúnmente al menos 20 meses, o más.

En algunas modalidades, el sujeto/huésped/paciente al cual se administra *Listeria* es un mamífero. En algunas modalidades, el mamífero es un primate. En algunas modalidades, el primate es un humano.

Cada uno de los métodos descritos arriba contempla administrar una composición que comprende una *Listeria* y un excipiente, una *Listeria* y un vehículo, una *Listeria* y tampón, una *Listeria* y un reactivo, una *Listeria* y un vehículo farmacéuticamente aceptable, una *Listeria* y un vehículo agrícolamente aceptable, una *Listeria* y un vehículo veterinariamente aceptable, una *Listeria* y un estabilizador, una *Listeria* y un conservador, y lo similar.

La presente invención proporciona reactivos y métodos para tratar condiciones que son tanto cancerosas (neoplasmas, malignidades, cánceres, tumores, y/o trastornos precancerosos, displasias, y lo similar) como infecciosas (infecciones). Se proporcionan reactivos y métodos para tratar trastornos que son tanto cancerosos (neoplasmas, malignidades, cánceres, tumores, y/o trastornos precancerosos, displasias, y lo similar) como infecciosos. Con infección con ciertos virus, tales como virus de papiloma y virus polio, el resultado puede ser una condición cancerosa, y aquí la condición es tanto cancerosa como infecciosa. Puede detectarse una condición que es tanto cancerosa como infecciosa, como un ejemplo no limitante, donde una infección viral resulta en una célula cancerosa, y donde la célula cancerosa expresa un antígeno codificado viral. Como otro ejemplo no limitante, una condición que es tanto cancerosa como infecciosa es una donde la respuesta inmune contra una célula de tumor incluye reconocimiento específico contra un antígeno codificado viral (Ver, e.g., Montesano, *et al.* (1990) Cell 62:435-445; Ichaso y Dilworth (2001) Oncogene 20:7908-7916; Wilson, *et al.* (1999) J. Immunol. 162:3933-3941; Daemen, *et al.* (2004) Antivir. Ther. 9:733-742; Boudewijn, *et al.* (2004) J. Natl. Cancer Inst. 96:998-1006; Liu, *et al.* (2004) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101:14567-14571).

En algunas modalidades, las *Listeria* descritas en la presente que expresan un antígeno heterólogo (o composiciones que comprenden la *Listeria*) se utilizan para inducir las respuestas inmunes contra células en un sujeto que expresan el antígeno. En algunas modalidades, la *Listeria*, vacunas, y otras composiciones descritas en la presente se utilizan para tratar trastornos cancerosos, trastornos precancerosos, tumores, infecciones, y/o angiogénesis de tumores y cánceres. En algunas modalidades, *Listeria*, vacunas, y otras composiciones descritas en la presente se utilizan para tratar cáncer en un sujeto.

Las siguientes modalidades se refieren a las modalidades individuales descritas en la presente.

La presente invención, en ciertas modalidades, comprende un método para estimular el sistema inmune contra un trastorno infeccioso, donde el trastorno infeccioso es una infección por *Listeria*. También se comprende un método para estimular el sistema inmune contra un trastorno infeccioso, donde el trastorno infeccioso no es una infección por *Listeria*, es decir, excluye las infecciones por *Listeria*.

Cada una de las modalidades comprende, como un reactivo adicional o alternativo, una *Listeria* que no se atenúa. También, cada una de las modalidades comprende, como un reactivo adicional o alternativo, una *Listeria* que se

atenúa. Cada una de las modalidades comprende, como un método adicional o alternativo, utilizando una *Listeria* que no se atenúa. También, cada una de las modalidades comprende, como un método adicional o alternativo, utilizando una *Listeria* que se atenúa.

5 Cada una de las modalidades descritas en la presente comprende métodos y reactivos que utilizan una *Listeria* que comprende un ácido nucleico que codifica al menos un antígeno de tumor, una *Listeria* que comprende un ácido nucleico que codifica al menos un antígeno de cáncer, una *Listeria* que comprende un ácido nucleico que codifica al menos un antígeno heterólogo, así como una *Listeria* que expresa al menos un antígeno de tumor, antígeno de cáncer, y/o antígeno heterólogo.

10 Cada una de las modalidades descritas en la presente comprende métodos y reactivos que utilizan una *Listeria* que no comprende un ácido nucleico que codifica un antígeno de tumor, una *Listeria* que no comprende un ácido nucleico que codifica un antígeno de cáncer, una *Listeria* que no comprende un ácido nucleico que codifica un antígeno heterólogo, así como una *Listeria* que no expresa un antígeno de tumor, antígeno de cáncer, y/o un antígeno heterólogo.

15 Cada una de las modalidades descritas en la presente comprende métodos y reactivos que utilizan una *Listeria* que comprende un ácido nucleico que codifica un antígeno de un organismo infeccioso no listerial. Cada una de las modalidades descritas arriba comprende métodos y reactivos que utilizan una *Listeria* que comprende un ácido nucleico que codifica al menos un antígeno de un virus, parásito, bacteria, tumor, autoantígeno derivado de un tumor, no autoantígeno derivado de un tumor.

20 Cada una de las modalidades descritas en la presente comprende métodos y reactivos que utilizan una *Listeria* que no comprende un ácido nucleico que codifica un antígeno de un organismo infeccioso no listerial. Cada una de las modalidades descritas arriba comprende métodos y reactivos que utilizan una *Listeria* que no comprende un ácido nucleico que codifica al menos un antígeno de un virus, parásito, bacteria, tumor, autoantígeno derivado de un tumor, no autoantígeno derivado de un tumor.

25 Cada una de las modalidades descritas en la presente también comprende una *Listeria* que no se prepara al crecer en un medio a base de proteína animal, pero se prepara al desarrollar en un tipo diferente de medio. Cada una de las modalidades descritas arriba también comprende una *Listeria* que no se prepara al crecer en un medio que contiene péptidos derivados de proteína animal, pero se prepara al desarrollar en un tipo diferente de medio. Además, cada una de las modalidades descritas arriba comprende la administración de una *Listeria* por una vía que no es oral y que no es entérica. Adicionalmente, cada una de las modalidades descritas arriba incluye la administración de una *Listeria* por una vía que no requiere movimiento del lumen del intestino a los linfáticos o torrente sanguíneo.

30 Cada una de las modalidades descritas en la presente comprende además un método en donde las *Listeria* no se inyectan directamente en el tumor o no se inyectan directamente en un sitio que se afecta por el cáncer, trastorno precanceroso, tumor, o infección.

35 Adicionalmente, cada una de las modalidades descritas en la presente comprende administrar la *Listeria* por inyección directa en un tumor, por inyección directa en una lesión cancerosa, y/o por inyección directa en una lesión de infección. También, esta descripción incluye cada una de las modalidades anteriores, donde la administración no es por inyección directa en un tumor, ni por inyección directa en una lesión cancerosa, y/o ni por inyección directa en una lesión de infección.

40 Se proporciona una vacuna donde el antígeno heterólogo, como en cualquiera de las modalidades descritas en la presente, es un antígeno de tumor o se deriva de un antígeno de tumor. También se proporciona una vacuna donde el antígeno heterólogo, como en cualquiera de las modalidades descritas en la presente, es un antígeno de cáncer, o se deriva de un antígeno de cáncer. Además, lo que se proporciona es una vacuna donde el antígeno heterólogo, como en cualquiera de las modalidades descritas en la presente, es un antígeno de un organismo infeccioso, o se deriva de un antígeno de un organismo infeccioso, e.g., un virus, bacteria, u organismo multicelular.

45 Una modalidad adicional proporciona un ácido nucleico donde el antígeno heterólogo, como en cualquiera de las modalidades descritas en la presente, es un antígeno de tumor o derivado de un antígeno de tumor. También se proporciona un ácido nucleico donde el antígeno heterólogo, como en cualquiera de las modalidades descritas en la presente, es un antígeno de cáncer, o se deriva de un antígeno de cáncer. Además, lo que se proporciona es un ácido nucleico, donde el antígeno heterólogo, como en cualquiera de las modalidades descritas en la presente, es un antígeno de un organismo infeccioso, o se deriva de un antígeno de un organismo infeccioso, e.g., un virus, bacteria, u organismo multicelular.

50 En otra modalidad, lo que se proporciona es una *Listeria* donde el antígeno heterólogo, como en cualquiera

de las modalidades descritas en la presente, es un antígeno de tumor o derivado de un antígeno de tumor. También se proporciona una *Listeria* donde el antígeno heterólogo, como en cualquiera de los ejemplos descritos en la presente, es un antígeno de cáncer, o se deriva de un antígeno de cáncer. Además, lo que se proporciona es una *Listeria*, donde el antígeno heterólogo, como en cualquiera de las modalidades descritas en la presente, es un antígeno de un organismo infeccioso o derivado de un antígeno de un organismo infeccioso, e.g., un virus, bacteria, parásito, u organismo multicelular.

Cada una de las modalidades descritas arriba también comprende una *Listeria* atenuada que no se prepara al crecer en un medio a base de proteína de carne o animal, pero se prepara al desarrollar en un tipo diferente de medio. Se proporciona una *Listeria* atenuada no preparada al crecer en un medio a base de proteína animal o carne, pero se prepara al crecer en un medio a base de proteína derivada de vegetal y/o levadura.

Al menos que se especifique de otra manera, cada una de las modalidades descritas en la presente comprende una bacteria que no contiene un ácido nucleico que codifica un antígeno heterólogo. También, al menos que se especifique de otra manera, cada una de las modalidades descritas en la presente comprende una bacteria que no contiene un ácido nucleico que codifica una secuencia reguladora heteróloga. Opcionalmente, cada una de las modalidades descritas en la presente comprende una bacteria que contiene un ácido nucleico que codifica un antígeno heterólogo y/o que codifica una secuencia reguladora heteróloga.

Lo siguiente concierne a modalidades bacteriales, e.g., de *Listeria*, *Bacillus anthracis*, u otras bacterias, que codifican los antígenos secretados, antígenos no secretados, antígenos secretados que se liberan de las bacterias por un mecanismo diferente a secreción, y antígenos no secretados que se liberan por un mecanismo diferente a secreción. Lo que se incluye es una bacteria que contiene un polinucleótido que comprende un ácido nucleico, donde el ácido nucleico codifica un polipéptido que contiene una secuencia secretora y se secreta bajo condiciones apropiadas; donde el ácido nucleico codifica un polipéptido que no contiene una secuencia secretora; donde el ácido nucleico contiene una secuencia secretora y donde el polipéptido se libera por algún otro mecanismo tal como perforación o daño enzimático a la membrana celular o pared celular; y donde el ácido nucleico codifica un polipéptido que no contiene ninguna secuencia secretora pero donde el polipéptido se libera por algún otro mecanismo, tal como perforación o daño enzimático a la membrana celular y/o pared celular.

Sin implicar ninguna limitación, en cuanto a estrechez o amplitud, de la presente invención, esta descripción puede modificarse por el experto para comprender cualquiera de las siguientes modalidades, o consistir de cualquiera de las siguientes modalidades (Tabla 10).

Tabla 10. Dispersión de la bacteria de la presente invención, es decir, la transmisión de una bacteria de una primera célula huésped a una segunda célula huésped		
Sin implicar ninguna limitación a la bacteria de la presente invención, e.g., con respecto a su habilidad para dispersarse de célula a célula, la dispersión de la bacteria de la presente invención puede comprender uno o más de los siguientes. Sin implicar alguna falta de limitación a la bacteria de la presente invención, e.g., con respecto a su habilidad para dispersarse de célula a célula, la dispersión de la bacteria de la presente invención puede comprender uno o más de los siguientes.		
La dispersión de la bacteria de la presente invención puede ser	como máximo 1%; como máximo 5%; como máximo 10%; como máximo 20%;	como se compara a la dispersión de un control adecuado o bacteria genitora.
	como máximo 30%; como máximo 40%; como máximo 50%; como máximo 60%; como máximo 70%; como máximo 80%; como máximo 90%; como máximo 95%; como máximo 100%;	

	como máximo 200%; como máximo 300%; como máximo 400%; como máximo 500%	
La dispersión de la bacteria de la presente invención puede ser	como máximo 1%; como máximo 5%; como máximo 10%; como máximo 20%; como máximo 30%; como máximo 40%; como máximo 50%; como máximo 60%; como máximo 70%; como máximo 80%; como máximo 90%; como máximo 95%;	como se compara a la dispersión de un control adecuado o bacteria genitora.
	como máximo 100%; como máximo 200%; como máximo 300%; como máximo 400%; como máximo 500%	
La dispersión de la bacteria de la presente invención puede ser	0 a 1% a 5%; 5% a 10%; 10% a 20%; 20% a 30%; 30% a 40%; 40% a 50%; 50% a 60%; 60% a 70%; 70% a 80%; 80% a 90%; 90% a 95%; 90% a 100%; 100% a 200%; 200% a 300%; 300% a 400%; 400% a 500%, o más de 500%,	como se compara a la dispersión de un control adecuado o bacteria genitora.

Tabla 10. (Continuación). Crecimiento de la cepa *Listeria* de la presente invención. Sin implicar alguna limitación a la presente invención, e.g., en cuanto a estrechez y amplitud, la presente invención puede comprender cualquiera,

o cualquier combinación, de las siguientes modalidades. Sin implicar alguna limitación a la presente invención, la presente invención puede comprender cualquiera, o cualquier combinación, de las siguientes modalidades.		
Crecimiento de la cepa <i>Listeria</i> de la presente invención es al menos	0.1%; 0.5%; 1.0%; 5%; 10%; 15%; 20%; 25%; 30%; 35%; 40%; 45%; 50%; 55%; 60%; 65%; 10%; 75%; 80%; 85%; 90%; 95%; 99%; 99.5%; 99.5%, 2-veces; 5-veces; 10-veces; o más de 10-veces,	como se compara con la <i>Listeria</i> genitora o con una <i>Listeria</i> de control adecuado.
Crecimiento de la cepa <i>Listeria</i> de la presente invención es al menos	no detectable, 0.1%; 0.5%; 1.0%; 5%; 10%; 15%; 20%; 25%; 30%; 35%; 40%; 45%; 50%;	como se compara con la <i>Listeria</i> genitora o con una <i>Listeria</i> de control adecuado.
	55%; 60%; 65%; 70%; 75%; 80%; 85%; 90%; 95%; 99%; 99.5%; 99.5%, 2-veces; 5-veces; 10-veces; o más de 10-veces,	
Crecimiento de la cepa <i>Listeria</i> de la presente invención es al menos	0.1%; 0.5%; 1.0%; 5%; 10%; 15%; 20%; 25%; 30%; 35%; 40%; 45%; 50%; 55%; 60%; 65%; 10%; 75%; 80%; 85%; 90%; 95%; 99%; 99.5%; o 99.5%, 2-veces; 5-veces; 10-veces; o más de 10-veces,	como se compara con la <i>Listeria</i> genitora o con una <i>Listeria</i> de control adecuado.
Crecimiento de la cepa <i>Listeria</i> de la presente invención es al menos	0.1%; 0.5%; 1.0%; 5%; 10%; 15%; 20%; 25%; 30%; 35%; 40%; 45%; 50%; 55%; 60%;	como se compara con la <i>Listeria</i> genitora o con una <i>Listeria</i> de control adecuado.
	65%; 10%; 75%; 80%; 85%; 90%; 95%; 99%; 99.5%; 99.5%, 2-veces; 5-veces; 10-veces; o más de 10-veces,	
Crecimiento de la cepa <i>Listeria</i> de la presente invención es al menos	0-0.1%; 0.1-0.5%; 0.5-1.0%; L0-5%; 5-10%; 10-15%; 15-20%; 20-25%; 25-30%; 30-35%; 35-40%; 40-45%; 45-50%; 50-55%; 55-60%; 60-65%; 65-70%; 70-75%; 75-80%; 80-85%; 85-90%; 90-95%; 95-99%; 99-99.5%; 99.5-99.5%, 99.5%-más, 100% a 2-veces; 2-veces a 10-veces; 10-veces a más de 10-veces,	como se compara con la <i>Listeria</i> genitora o con una <i>Listeria</i> de control adecuado.
Tabla 10. (Continuación). Crecimiento de la cepa <i>Listeria</i> de la presente invención.		
Crecimiento extracelular de la cepa <i>Listeria</i> de la presente	0.1%; 0.5%; 1.0%; 5%; 10%; 15%; 20%; 25%; 30%; 35%;	como se compara con el crecimiento intracelular de la misma cepa <i>Listeria</i>

invención es al menos	40%; 45%; 50%; 55%; 60%; 65%; 70%; 75%; 80%; 85%; 90%; 95%; 99%; 99.5%; o más de 99.5%, 100%, 2-veces más; 5-veces más; o 10-veces más,	
Crecimiento extracelular de la cepa <i>Listeria</i> de la presente invención es al menos	0-0.1%; 0.1-0.5%; 0.5-1.0%; 1.0-5%; 5-10%; 10-15%; 15-20%; 20-25%; 25-30%; 30-35%; 35-40%; 40-45%; 45-50%; 50-55%; 55-60%; 60-65%; 65-70%; 70-75%; 75-80%; 80-85%;	como se compara con el crecimiento intracelular de la misma cepa <i>Listeria</i>
	85-90%; 90-95%; 95-99%; 99-99.5%; 99.5-100%, 100-200%; 200-500%; 500-1000%; o más de 1000%,	
Genes relacionados al crecimiento. Un gen relacionado al crecimiento de la presente invención puede incluir, pero no se limita necesariamente en estrechez y amplitud, por los siguientes.		
Un crecimiento relacionado al gen contempla uno que estimula la tasa de crecimiento intracelular por	La misma cantidad, por al menos 10% más; por al menos 20% más; por al menos 30% más; por al menos 40% más; por al menos 50% más; por al menos 60% más; por al menos 70% más; por al menos 80% más; por al menos 90% más; por al	que la tasa del gen que estimula el crecimiento extracelular
	menos 100% (2-veces) más; por al menos 3-veces más; por al menos 4-veces más; por al menos 10-veces más; por al menos 20-veces más; por al menos 40-veces más,	
El crecimiento de la cepa <i>Listeria</i> de la presente invención puede compararse con una cepa <i>Listeria</i> de control, adecuada o genitora, en donde sólo se compara el crecimiento intracelular. El crecimiento de una cepa <i>Listeria</i> de la presente invención puede compararse con una cepa <i>Listeria</i> de control, adecuada o genitora, en donde sólo se compara el crecimiento extracelular. El crecimiento de una cepa <i>Listeria</i> de la presente invención puede compararse con una cepa <i>Listeria</i> de control, adecuada o genitora, en donde el crecimiento intracelular de la cepa de la presente invención se compara con el crecimiento extracelular de una cepa de control adecuado o genitora.		
El crecimiento de una cepa <i>Listeria</i> de la presente invención puede compararse con una cepa <i>Listeria</i> de control, adecuada o genitora, en donde el crecimiento extracelular de la cepa de la presente invención se compara con el crecimiento intracelular de una cepa de control adecuado o genitora.		
Tabla 10. (Continuación). Bacteria Metabólicamente activa. Sin implicar alguna limitación a la presente invención,		

e.g., en cuanto a estrechez y amplitud, la presente invención puede comprender cualquiera, o cualquier combinación, de las siguientes modalidades. Sin implicar alguna carencia de limitación a la presente invención, e.g., en cuanto a estrechez y amplitud, la presente invención puede comprender cualquiera, o cualquier combinación, de las siguientes modalidades.		
Una bacteria <i>Listeria</i> metabólicamente activa pero formación de colonia deteriorada (y/o división celular o	y en donde el metabolismo es mayor a 10-veces; 10-veces a 5-veces; 5-veces a 4-veces; 4-veces a 2-veces; 2-veces a 100%;	que de la bacteria <i>Listeria</i> genitora o de control.
duplicación deteriorada) de la presente invención comprende una bacteria <i>Listeria</i> en donde la tasa de formación de colonia, división celular, y/o duplicación se encuentra bajo el 40% que de una bacteria <i>Listeria</i> de control o genitora,	esencialmente 100%; 100% a 95%; 95% a 90%; 90% a 80%; 80% a 70%; 70% a 60%, 60% a 50%; 50% a 40%,	
Una bacteria <i>Listeria</i> metabólicamente activa pero formación de colonia deteriorada (y/o división celular o	y en donde el metabolismo es mayor a 10-veces, 10-veces a 5-veces; 5-veces a 4-veces; 4-veces a 2-veces; 2-veces a 100%;	que de la bacteria <i>Listeria</i> genitora o de control.
duplicación deteriorada) de la presente invención comprende una bacteria <i>Listeria</i> en donde la tasa de formación de colonia, división celular, y/o duplicación se encuentra bajo el 30% que de una bacteria <i>Listeria</i> de control o genitora,	esencialmente 100%; 100% a 95%; 95% a 90%; 90% a 80%; 80% a 70%; 70% a 60%, 60% a 50%, 50% a 40%; o 40% a 30,	
Una bacteria <i>Listeria</i> metabólicamente activa pero formación de colonia deteriorada (y/o división celular o	y en donde el metabolismo es mayor a 10-veces; 10-veces a 5-veces; 5-veces a 4-veces; 4-veces a 2-veces; 2-veces a 100%;	que de la bacteria <i>Listeria</i> genitora o de control.
duplicación deteriorada) de la presente invención comprende una bacteria <i>Listeria</i> en donde la tasa de formación de colonia, división celular, y/o duplicación se encuentra bajo el 20% que de una bacteria <i>Listeria</i> de control o genitora,	esencialmente 100%; 100% a 95%; 95% a 90%; 90% a 80%; 80% a 70%; 70% a 60%; 60% a 50%; 50% a 40%; 40% a 30; o 30 a 20%,	
Una bacteria <i>Listeria</i> metabólicamente activa pero	y en donde el metabolismo es mayor a 10-veces; 10-veces a	que de la bacteria <i>Listeria</i> genitora o de control.

formación de colonia deteriorada (y/o división celular o	5-veces; 5-veces a 4-veces; 4-veces a 2-veces; 2-veces a 100%;	
duplicación deteriorada) de la presente invención comprende una bacteria <i>Listeria</i> en donde la tasa de formación de colonia, división celular, y/o duplicación se encuentra bajo el 10% que de una bacteria <i>Listeria</i> de control o genitora,	esencialmente 100%; 100% a 95%; 95% a 90%; 90% a 80%; 80% a 70%; 70% a 60%; 60% a 50%; 50% a 40%; 40% a 30; 30 a 20%; o 20 a 10%.	
Una bacteria <i>Listeria</i> metabólicamente activa pero formación de colonia deteriorada (y/o división celular o	y en donde el metabolismo es mayor a 10-veces; 10-veces a 50-veces; 5-veces a 4-veces; 4-veces a 2-veces; 2-veces a 100%;	que de la bacteria <i>Listeria</i> genitora o de control.
duplicación deteriorada) de la presente invención comprende una bacteria <i>Listeria</i> en donde la tasa de formación de colonia, división celular, y/o duplicación se encuentra bajo el 5% que de una bacteria <i>Listeria</i> de control o genitora,	esencialmente 100%; 100% a 95%; 95% a 90%; 90% a 80%; 80% a 70%; 70% a 60%; 60% a 50%; 50% a 40%; 40% a 30; 30 a 20%; 20 a 10%; o 10 a 5%,	
Tabla 10 (continuación). Bacteria metabólicamente activa		
Una bacteria <i>Listeria</i> metabólicamente activa pero formación de colonia deteriorada (y/o división celular o	y en donde el metabolismo es mayor a 10-veces; 10-veces a 5-veces; 5-veces a 4-veces; 4-veces a 2-veces; 2-veces a 100%;	que de la bacteria <i>Listeria</i> genitora o de control.
duplicación deteriorada) de la presente invención comprende una bacteria <i>Listeria</i> en donde la tasa de formación de colonia, división celular, y/o duplicación se encuentra bajo el 5% que de una bacteria <i>Listeria</i> de control o genitora,	esencialmente 100%; 100% a 95%; 95% a 90%; 90% a 80%; 80% a 70%; 70% a 60%; 60% a 50%; 50% a 40%; 40% a 30; 30 a 20%; 20-10%; 10-5%; o 5% a 1%,	
Una bacteria "muerta pero metabólicamente activa" (KMBA), es una bacteria <i>Listeria</i> que es incapaz de formar colonias y en donde el metabolismo es, e.g., 10-veces a 5-veces (un indicador de metabolismo que ocurre a un nivel más alto que el normalmente encontrado); 5-veces a 4-veces; 4-veces a 2-veces; 2-veces a 100%; esencialmente 100%; 100% a 95%; 95% a 90%; 90% a 80%; 80% a 70%; 70% a 60%; 60% a 50%; 50% a 40%; 40% a 30; 30 a 20%; 20-10%; o 10-5%; que de una bacteria <i>Listeria</i> genitora o de control. En otro aspecto,		
la bacteria KBMA es una bacteria <i>Listeria</i> en donde la tasa de formación de colonias se encuentra por debajo del 1% que de una bacteria <i>Listeria</i> genitora o de control, y en donde el metabolismo es, e.g., 10-veces a 5-veces; 5-		

veces a 4-veces; 4-veces a 2-veces; 2-veces a 100%; esencialmente 100%; 100% a 95%; 95% a 90%; 90% a 80%; 80% a 70%; 70% a 60%; 60% a 50%; 50% a 40%; 40% a 30; 30 a 20%; 20-10%; o 10-5%; que de una bacteria *Listeria* genitora o de control. Todavía en otro aspecto, la bacteria KBMA es una bacteria *Listeria* en donde la tasa de formación de colonias se encuentra por debajo del 2% que de una bacteria *Listeria* genitora o de control, y en donde el metabolismo es, e.g., 10-veces a 5-veces; 5-veces a 4-veces; 4-veces a 2-veces; 2-veces a 100%; esencialmente 100%; 100% a 95%; 95% a 90%; 90% a 80%; 80% a 70%; 70% a 60%; 60% a 50%; 50% a 40%; 40% a 30; 30 a 20%; 20-10%; o 10-5%; que de una bacteria *Listeria* genitora o de control. En otra modalidad, una bacteria KBMA es una bacteria *Listeria* en donde la tasa de formación de colonias se encuentra por debajo del 5% que de una bacteria *Listeria* genitora o de control, y en donde el metabolismo es, e.g., 10-veces a 5-veces; 5-veces a 4-veces; 4-veces a 2-veces; 2-veces a 100%; esencialmente 100%; 100% a 95%; 95% a 90%; 90% a 80%; 80% a 70%; 70% a 60%; 60% a 50%; 50% a 40%; 40% a 30; 30 a 20%; 20-10%; o 10-5%; que de una bacteria *Listeria* genitora o de control.

La tasa de metabolismo puede medirse por varios indicios, e.g., traducción, respiración, secreción, transporte, fermentación, glucolisis, metabolismo de aminoácido, o el ciclo Krebs. Se describen varios indicios de metabolismo para *L. monocytogenes* (ver, e.g., Karlin, *et al.* (2004) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101:6182-6187; Gilbreth, *et al.* (2004) Curr. Microbiol. 49:95-98). Con frecuencia, el metabolismo se valora con bacterias intactas por medio de metabolitos marcados fluorescentes, de isótopo pesado o radioactivos. El experto puede elegir un gen adecuado para medir la traducción, o una enzima adecuada para medir la glucolisis, metabolismo de aminoácido, o el ciclo Krebs. Una batería que muere por calor generalmente es esencial o totalmente inactiva metabólicamente. La actividad metabólica aparente residual de una bacteria esencial o totalmente inactiva metabólicamente puede deberse, e.g., a oxidación de lípidos, oxidación de sulfhidrilos, reacciones catalizadas por metales pesados, o a enzimas que son estables a tratamiento con calor.

(c) Métodos para valorar la respuesta inmune; métodos de diagnóstico.

Están disponibles los reactivos y métodos útiles para determinar, valorar, monitorear, y/o diagnosticar la respuesta inmune. La presente invención, en algunas situaciones, proporciona los siguientes métodos para diagnosticar a un sujeto mamífero a quien se le administran las composiciones de la presente invención. En otros aspectos, lo que se proporciona son los siguientes métodos para valorar la respuesta inmune a una o más de las composiciones administradas de la presente invención. Estos métodos, que pueden aplicarse, e.g., *in vivo*, *in vitro*, *ex vivo*, *in utero*; a animales muertos o vivos; a células; a células recombinantes, quiméricas, o híbridas; a fluidos biológicos, a ácidos nucleicos aislados, y lo similar, incluyen:

i. Métodos para medir parámetros celulares. Lo que puede medirse incluye células T efectoras; células T de memoria central (T_{CM}); células T de memoria efectora (T_{EM}), y constituyentes de las mismas. Lo que puede medirse son funciones biológicas de estas células que incluyen función citotóxica, expresión de marcadores, afinidad para antígeno, número de células en un compartimiento biológico tal como suero, ubicación preferida en el cuerpo tal como un nodo linfático o bazo, y tasa de respuesta cuando se expone a vuelve a exponer al antígeno.

ii. Métodos para medir anticuerpos. Lo que puede medirse es maduración de afinidad de anticuerpos (ver, e.g., McHeyzer-Williams y McHeyzer-Williams (2005) Ann. Rev. Immunol. 23:487-513), isotipo o concentración de anticuerpo, que incluye IgG (IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄); IgA (IgA₁, IgA₂); IgM; IgD; IgE; cambio de isotipo de anticuerpos, por ejemplo, disminuciones en IgM e incrementos en IgG (ver, e.g., Hasbold, *et al.* (2004) Nature Immunol. 5:55-63; Ryffel, *et al.* (1997) J. Immunol. 158:2126-2133; Lund, *et al.* (2002) J. Immunol. 169:5236-5243; Palladino, *et al.* (1995) J. Virol. 69:2075-2081; Karrer, *et al.* (2000) J. Immunol. 164:768-778); cambio de isotipo que es una función de la respuesta de tipo Th2 o tipo Th1 (Delale, *et al.* (2005) J. Immunol. 175:6723-6732; McKenzie, *et al.* (1999) J. Exp. Med. 189:1565-1572; Fayette, *et al.* (1997) J. Exp. Med. 185:1909-1918).

iii. Parámetros de células B. Lo que puede medirse incluye células B simples (ricas en IgD de membrana y bajas en CD27), células B de memoria (bajas en IgD y ricas en CD27), y constituyentes de estas células (ver, e.g., Fecteau y Neron (2003) J. Immunol. 171:4621-4629). Lo que puede medirse es la formación de células B de memoria dentro de centros germinales (ver, e.g., Ohkubo, *et al.* (2005) J. Immunol. 174:7703-7710). Lo que puede medirse incluye células B terminantemente diferenciadas, por ejemplo, la habilidad de la célula para responder a CXCL12 (ver, e.g., Roy, *et al.*

(2002) J. Immunol. 169:1676-1682). Lo que puede medirse incluye células que secretan el anticuerpo de compromiso (ASCs) (ver, e.g., Hasbold, *et al.* (2004) Nature Immunol. 5:55-63).

iv. Parámetros de células T. Lo que puede medirse es afinidad de un péptido para receptor de célula T, maduración por afinidad de un péptido para el receptor de célula T, maduración por afinidad del receptor de célula T (ver, e.g., Rees, *et al.* (1999) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96:9781-9786; McKinney, *et al.* (2004) J. Immunol. 173:1941-1950). Lo que puede medirse es afinidad de una célula T citotóxica para una célula dirigida (ver, e.g., Montoya y Del Val (1999) J. Immunol. 163:1914-1922). Lo que puede medirse incluye marcadores, por ejemplo, las células T de memoria efectora (T_{EM}) pueden identificarse como CD62L^{BAJA} y CCR7^{BAJA}, donde estas células muestran función efectora inmediata con re-encontrador de antígeno. Las células T de memoria central (T_{CM}) pueden identificarse por expresión relativamente alta de CD62L y CCR7, donde las células muestran una cinética de activación relativamente lenta. Otros marcadores disponibles incluyen, e.g., CCL4, CCL5, XCL1, granulicina, granzima A, granzima B, y así sucesivamente (ver, e.g., Chtanova, *et al.* (2005) J. Immunol. 175:7837-7847; Kondrack, *et al.* (2003) J. Exp. Med. 198:1797-1806; Huster, *et al.* (2004) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101:5610-5615; Ahmadzadeh, *et al.* (2001) J. Immunol. 166:926-935; Goldrath, *et al.* (2004) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101:16885-16890; Wherry, *et al.* (2003) Nature Immunol. 4:225-234; Sallusto, *et al.* (2004) Ann. Rev. Immunol. 22:745-763). Diferentes tipos de células inmunes, así como diferentes etapas de maduración de una célula particular, o diferentes etapas de activación de una célula, pueden distinguirse al concentrar con un reactivo específico para cualquier marcador dado (ver, e.g., Ahmadzadeh, *et al.* (2001) J. Immunol. 166:926-935).

v. Parámetros de células que presentan antígeno (APCs), que incluyen células dendríticas (DCs). Lo que puede medirse es mmoles de péptido presentado (o unido) por mmoles MHC Clase I. Además, lo que puede medirse es péptido en mmoles presentados o unidos por mmol de MHC Clase II. También, lo que puede medirse es la secuencia de aminoácidos de los péptidos unidos (ver, e.g., Velazquez, *et al.* (2001) J. Immunol. 166:5488-5494). Además, lo que puede medirse es la habilidad relativa a la APC para presentar epítopes derivados de péptidos contra epítopes derivados de proteínas, así como la habilidad para presentar epítopes adquiridos de bajos niveles de péptidos contra altos niveles de péptidos y, en otros aspectos, la identidad de la APC adecuada para presentación (ver, e.g., Constant, *et al.* (1995) J. Immunol. 154:4915-4923).

Un número de ejemplos específicos de métodos generalmente aplicables para valorar la expresión, secreción, presentación, inmunogenicidad, y/o eficacia terapéutica de construcción de expresión candidato y vacunas a base de *Listeria* candidato se ejemplifican en los Ejemplos de abajo. Ver, e.g., Ejemplo IX, abajo. Se proporcionan además ensayos para valorar inmunogenicidad de una vacuna a base de *Listeria* candidato particular, e.g., en Publicaciones de Patente de EE.UU. Nos. 2005/0249748, 2005/0281783, y 2004/0228877.

La guía está disponible para el experto para diseñar controles apropiados de diagnóstico (ver, e.g., Wilson (1991) An Introduction to Scientific Research, Dover Publications, Mineola, NY).

El alcance amplio de esta invención se entiende mejor con referencia a los siguientes ejemplos, que no se proponen limitar la invención a ninguna modalidad específica.

EJEMPLOS

I. Métodos Generales.

Se describen los métodos estándar de bioquímica y biología molecular (ver, e.g., Maniatis, *et al.* (1982) Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY; Sambrook y Russell (2001) Molecular Cloning, 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; Wu (1993) Recombinant DNA, Vol. 217, Academic Press, San Diego, CA; Innis, *et al.* (eds.) (1990) PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Academic Press, N.Y. Los métodos estándar también se encuentran en Ausbel, *et al.* (2001) Curr. Protocols in Mol. Biol., Vols.1-4, John Wiley y Sons, Inc. Nueva York, NY, que describe la clonación en células bacteriales y mutagénesis de ADN (Vol. 1), clonación en células de mamífero y levadura (Vol. 2), glicoconjugados y expresión de proteína (Vol. 3), y bioinformáticas (Vol. 4)). Se describen los métodos para producir proteínas de fusión (ver, e.g., Invitrogen (2005) Catalogue, Carlsbad, CA; Amersham Pharmacia Biotech. (2005) Catalogue, Piscataway, NJ; Liu, *et al.* (2001) Curr. Protein Pept. Sci. 2:107-121; Graddis, *et al.* (2002) Curr. Pharm. Biotechnol. 3:285-297).

Se describen PCR de extensión de superposición por unión, y otros métodos, para crear mutaciones, sitios de restricción, sitios loxP, y lo similar (ver, e.g., Horton, *et al.* (1990) Biotechniques 8:528-535; Horton, *et al.* (1989) Gene 77:61-68; Horton (1995) Mol Biotechnol. 3:93-99; Cutrone y Langer (2001) J. Biol. Chem. 276:17140-17148; Cox, *et al.* (2002) Nucleic Acids Res. 30:e108; Warrens, *et al.* (1997) Gene 186:29-35; Guo y Bi (2002) Methods Mol. Biol. 192:

111-119; Johnson (2000) J. Microbiol. Methods 41:201-209; Lantz, *et al.* (2000) Biotechnol. Annu. Rev. 5:87-130; Gustin y Burk (2000) Methods Mol. Biol. 130:85-90; QuikChange® Mutagenesis Kit, Stratagene, La Jolla, CA). Se describen las preferencias de codón de diseño de péptidos de señal, proteínas secretoras, y antígenos heterólogos, para ajustar los codones óptimos de un huésped (Sharp, *et al.* (1987) Nucl. Acids Res. 15:1281-1295; Uchijima, *et al.* (1998) J. Immunol. 161:5594-5599). Se describen las preferencias de codón de diseño de péptidos de señal, proteínas secretoras, y antígenos heterólogos, para ajustar los codones óptimos de un huésped (Sharp, *et al.* (1987) Nucl. Acids Res. 15:1281-1295; Uchijima, *et al.* (1998) J. Immunol. 161:5594-5599). Los polinucleótidos y ácidos nucleicos están disponibles, e.g., de Blue Heron Biotechnology, Bothell, WA).

Están disponibles los métodos para efectuar recombinación homóloga en, e.g., bacterias, fagos, y plásmidos, (ver, e.g., Kuzminov (1999) Microb. Mol. Biol. Rev. 63:751-813; Camerini-Otero y Hsieh (1995) Annu. Rev. Genet. 29:509-552; Amundsen y Smith (2003) Cell 112:741-744; Cox (2001) Annu. Rev. Genet. 35:53-82; Quiberoni, *et al.* (2001) Res. Microbiol. 152:131-139; Fernandez, *et al.* (2000) Res. Microbiol. 151:481-486; Wedland (2003) Curr. Genet. 44:115-123; Muttucumaru y Parish (2004) Curr. Issues Mol. Biol. 6:145-157; Bhattacharyya, *et al.* (2004) Infect. Genet. Evol. 4:91-98).

Está disponible un número de listeriófagos de transducción, así como técnicas para infectar *L. monocytogenes* con listeriófagos. Estos listeriófagos incluyen, e.g., P35, U153, y derivados de los mismos (ver, e.g., Lauer, *et al.* (2002) J. Bact. 184:4177-4186; Hodgson (2000) Mol. Microbiol. 35:312-323; Mee-Marquet, *et al.* (1997) Appl. Environ. Microbiol. 63:3374-3377; Zink y Loessner (1992) Appl. Environ. Microbiol. 58:296-302; Loessner, *et al.* (1994) Intervirology 37:31-35; Loessner, *et al.* (1994) J. Gen. Virol. 75:701-710; Loessner, *et al.* (2000) Mol. Microbiol. 35:324-340).

Se describen los métodos para utilizar electroporación y configuración mediada por *E. coli* para introducir ácidos nucleicos en *Listeria*. Los plásmidos adecuados para introducir un ácido nucleico en una bacteria incluyen, e.g., pPLI (no. de valoración de GenBank:AJ417488), pPL2 (Ace. No. AJ417449), pLUCH80, pLUCH88, y derivados de los mismos (ver, e.g., Lauer, *et al.* (2002) J. Bact. 184:4177-4186; Wilson, *et al.* (2001) Infect. Immunity 69:5016-5024; Chesneau, *et al.* (1999) FEMS Microbiol. Lett. 177:93-100; Park y Stewart (1990) Gene 94:129-132; Luchansky, *et al.* (1988) Mol. Microbiol. 2:537-646; He y Luchansky (1997) Appl. Environ. Microbiol. 63:3480-3487).

Se describen los métodos para purificación de proteína tales como inmunoprecipitación, cromatografía en columna, electroforesis, enfoque isoelectrico, centrifugación, y cristalización, (Coligan, *et al.* (2000) Current Protocols in Protein Science, Vol. 1, John Wiley and Sons, Inc., New York). Se describen los análisis químicos, modificación química, modificación post-translacional, y glucosilación de proteínas. Ver, e.g., Coligan, *et al.* (2000) Current Protocols in Protein Science, Vol. 2, John Wiley and Sons, Inc., New York; Walker (ed.) (2002) Protein Protocols Handbook, Humana Press, Towota, NJ; Lundblad (1995) Techniques in Protein Modification, CRC Press, Boca Raton, FL. Se describen técnicas para caracterizar las interacciones de unión (Coligan, *et al.* (2001) Current Protocols in Immunology, Vol. 4, John Wiley and Sons, Inc., New York; Parker, *et al.* (2000) J. Biomol. Screen. 5: 77-88; Karlsson, *et al.* (1991) J. Immunol. Methods 145:229-240; Neri, *et al.* (1997) Nat. Biotechnol. 15:1271-1275; Jonsson, *et al.* (1991) Biotechniques 11:620-627; Friguet, *et al.* (1985) J. Immunol. Methods 77: 305-319; Hubble (1997) Immunol. Today 18:305-306; Shen, *et al.* (2001) J. Biol. Chem. 276:47311-47319).

Están disponibles los paquetes de software para determinar, e.g., fragmentos antigénicos, secuencias líder, doblado de proteína, dominios funcionales, sitios de glicosilación, y alineaciones de secuencia (ver, e.g., Vector NTI® Suite (Informax, Inc, Bethesda, MD); GCG Wisconsin Package (Accelrys, Inc., San Diego, CA); DeCypher® (TimeLogic Corp., Crystal Bay, Nevada); Menne, *et al.* (2000) Bioinformatics 16: 741-742; Menne, *et al.* (2000) Bioinformatics Applications Note 16:741-742; Wren, *et al.* (2002) Comput. Methods Programs Biomed. 68:177-181; von Heijne (1983) Eur. J. Biochem. 133:17-21; von Heijne (1986) Nucleic Acids Res. 14:4683-4690). Están disponibles métodos para determinar las secuencias de codificación (CDS) (Furono, *et al.* (2003) Genome Res. 13:1478-1487).

Están disponibles los algoritmos de computadora (e.g., BIMAS; SYFPEITHI) para identificar péptidos que se unen a MHC Clase I y/o MHC Clase II (Thomas, *et al.* (2004) J. Exp. Med. 200:297-306). Estos algoritmos pueden proporcionar ácidos nucleicos de la presente invención que codifican proteínas que comprenden los péptidos identificados.

Las secuencias de proteínas listeriales y ácidos nucleicos pueden encontrarse en la red en: (1) ncbi.nlm.nih.gov; (2) genolist.pasteur.fr (con sonido en "listilist"); y (3) tigr.org (con click en "databases," (base de datos) después en "comprehensive microbial resource" (recurso microbiano comprensivo)).

Están disponibles métodos para valorar la internalización de una *Listeria* por APC, y para valorar la presentación de antígenos codificados listeriales por APC. También están disponibles los métodos para la

presentación de estos antígenos a la célula T, y para valorar el cebado dependiente de antígeno de la célula T. Una APC adecuada es línea celular DC 2.4 de murino, mientras la célula T adecuada es el hibridoma de célula T B3Z (ver, e.g., Sol. De Pat. Provisional de EE.UU. No. 60/490,089 presentada el 4 de Julio de 2003; Shen, *et al.* (1997) J. Immunol. 158:2723-2730; Kawamura, *et al.* (2002) J. Immunol. 168:5709-5715; Geginat, *et al.* (2001) J. Immunol. 166:1877-1884; Skoberne, *et al.* (2001) J. Immunol. 167:2209-2218; Wang, *et al.* (1998) J. Immunol. 160:1091-1097; Bullock, *et al.* (2000) J. Immunol. 164:2354-2361; Lippolis, *et al.* (2002) J. Immunol. 169:5089-5097). Están disponibles los métodos para preparar células dendríticas (DCs), modificación *ex vivo* de DCs, y la administración de las DCs modificadas, e.g., para el tratamiento de un cáncer, patógeno, o agente infeccioso (ver, e.g., Ribas, *et al.* (2004) J. Immunother. 27:354-367; Gilboa y Vieweg (2004) Immunol. Rev. 199:251-263; Dees, *et al.* (2004) Cancer Immunol. Immunother. 53:777-785; Eriksson, *et al.* (2004) Eur. J. Immunol. 34:1272-1281; Goldszmid, *et al.* (2003) J. Immunol. 171:5940-5947; Coughlin y Vonderheide (2003) Cancer Biol. Ther. 2:466-470; Colino y Snapper (2003) Microbes Infect. 5:311-319).

Se describen los ensayos para tamaño de placa *Listeria*, LD₅₀, y motilidad. El diámetro de placa es una función de una habilidad de la bacteria para desarrollarse, para moverse de célula a célula, y escapar de una vesícula secundaria formada en una célula adyacente (ver, e.g., Lauer, *et al.* (2001) Mol. Microbiol. 42:1163-1177; Theriot, *et al.* (1994) Cell 76:505-517; Theriot, *et al.* (1998) Meth. Enzymol. 298:114-122; Portnoy, *et al.* (1988) J. Exp. Med. 167:1459-1471).

Están disponibles los ensayos Elispot y coloración de citosina intracelular (ICS) para caracterizar las células inmunes (ver, e.g., Lalvani, *et al.* (1997) J. Exp. Med. 186:859-865; Waldrop, *et al.* (1997) J. Clin. Invest. 99:1739-1750; Hudgens, *et al.* (2004) J. Immunol. Methods 288:19-34; Goulder, *et al.* (2001) J. Virol. 75:1339-1347; Goulder, *et al.* (2000) J. Exp. Med. 192:1819-1831; Anthony y Lehman (2003) Methods 29:260-269; Badovinac y Hatty (2000) J. Immunol. Methods 238:107-117). El método de "coloración de tetrámero" también está disponible (ver, e.g., Serbina y Pamer (2003) Curr. Opin. Immunol. 15:436-442; Skinner y Haase (2002) J. Immunol. Methods 268:29-34; Pittet, *et al.* (2001) Int. Immunopharmacol. 1:1235-1237).

Están disponibles los métodos para determinar si un antígeno o epítopo se presenta a través de presentación directa o por presentación cruzada. Estos métodos incluyen el uso de ratones deficientes en TAP con administración de células (de otra fuente) que contienen un antígeno de interés. Otro método incluye preparar un ratón genéticamente deficiente en una molécula MHC Clase I o Clase II que se requiere para presentar un epítopo específico, e.g., MHC Clase I H-2^b, y administrar células que presentan el antígeno que expresa H-2^b (APCs) (de otra fuente) que contienen el antígeno de interés (o que se impulsarían con un epítopo de interés) (ver, e.g., van Mierlo, *et al.* (2004) J. Immunol. 173:6753-6759; Pozzi, *et al.* (2005) J. Immunol. 175:2071-2081).

Están disponibles métodos para determinar afinidades de unión, especificidades de unión, y maduración por afinidad. La presente descripción proporciona métodos para estimular y/o diagnosticar la maduración por afinidad, como se aplica a, e.g., maduración de anticuerpos y/o de células T (ver, e.g., Chen, *et al.* (2004) J. Immunol. 173:5021-5027; Rees, *et al.* (1999) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96:9781-9786; Busch y Pamer (1999) J. Exp. Med. 189:701-709; Ploss, *et al.* (2005) J. Immunol. 175:5998-6005; Brams, *et al.* (1998) J. Immunol. 160:2051-2058; Choi, *et al.* (2003) J. Immunol. 171:5116-5123).

Están disponibles los métodos para utilizar animales en el estudio de cáncer, metástasis, y angiogénesis, y para utilizar datos de tumor animal para extrapolar los tratamientos de humano (ver, e.g., Hirst y Balmain (2004) Eur J Cancer 40:1974-1980; Griswold, *et al.* (1991) Cancer Metastasis Rev. 10:255-261; Hoffman (1999) Invest. New Drugs 17:343-359; Boone, *et al.* (1990) Cancer Res. 50:2-9; Moulder, *et al.* (1988) Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 14:913-927; Tuveson y Jacks (2002) Curr. Opin. Genet. Dev. 12: 105-110; Jackson-Grusby (2002) Oncogene 21:5504-5514; Teicher, B.A. (2001) Tumor Models in Cancer Research, Humana Press, Totowa, NJ; Hasan, *et al.* (2004) Angiogenesis 7:1-16; Radovanovic, *et al.* (2004) Cancer Treat. Res. 117:97-114; Khanna y Hunter (2004) Carcinogenesis Sept.9 [epub adelantada a impresión]; Crnic y Christofori (2004) Int. J. Dev. Biol. 48:573-581).

La metástasis hepática de cáncer colorectal puede generarse utilizando inyección hepática primaria, inyección de vena portal, o inyección del bazo completo de células tumorales (ver, e.g., Suh, *et al.* (1999) J. Surgical Oncology 72:218-224; Dent y Finley- Jones (1985) Br. J. Cancer 51:533- 541; Young, *et al.* (1986) J. Natl. Cancer Inst. 76:745-750; Watson, *et al.* (1991) J. Leukoc. Biol. 49:126-138).

50 EJEMPLO II. Vectores para utilizar en mediar la recombinación específica del sitio y recombinación homóloga

Se describen las cepas de *Listeria monocytogenes* utilizadas en el presente trabajo (ver, Brockstedt, *et al.* (2004) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101:13832-13837). *L. monocytogenes* ΔActAΔinlB (también conocido como DP-L4029inlB) se depositó con la Colección de Cultivo Tipo Americano (ATCC), 10801 University Blvd., Manassas,

Virginia 20110-2209, Estados Unidos de América, el 3 de Octubre de 2003, bajo las provisiones del Tratado de Budapest en el Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos para los Propósitos de Procedimiento de Patente, y designada con el número de acceso PTA-5562. *L. monocytogenes* Δ ActA Δ uvrAB (también conocido como DP-L4029uvrAB) se depositó con la Colección de Cultivo Tipo Americano (ATCC), 10801 University Blvd., Manassas, Virginia 20110-2209, Estados Unidos de América, el 3 de Octubre de 2003, bajo las provisiones del Tratado de Budapest en el Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos para los Propósitos de Procedimiento de Patente, y designada con el número de acceso PTA-5563. El medio de lavadura sin glucosa contuvo 25 gramos/L de extracto de levadura (extracto de levadura Bacto®) (BD Biosciences, Sparks, MD); 9 gramos/L de fosfato de potasio monobásico, pH 7.2.

La recombinación homóloga puede medirse por pKSV7 (SEQ ID NO:3) (ver también, Smith y Youngman (1992) *Biochimie* 74:705-711; Camilli, *et al.* (1993) *Mol. Microbiol.* 8:143-157; Camilli (1992) *Genetic analysis of Listeria monocytogenes Determinants of Pathogenesis*, Univ. of Pennsylvania, Tesis Doctoral).

(SEQ ID NO:28, pKSV7)

```

15      CTCGCGGATTGTTGATGATTACGAAAATATTAAGAGCACAGACTATTACACAGA
      AAATCAAGAATTAAAAAACGTAGAGAGAGTTTGAAAGAAGTAGTGAATACATG
      GAAAGAGGGGTATCACGAAAAAGTAAAGAGGTTAATAAATTAAGCGAGAGA
      ATGATAGTTTGAATGAGCAGTTGAATGTATCAGAGAAATTTCAAGATAGTACAGT
      GACTTTATATCGTGCTGCGAGGGCGAATTTCCCTGGGTTTGAGAAAGGGTTTAAT
20      AGGCTTAAAGAGAAATTCCTTAATGATTCCAAATTCGAGCGTGTGGGACAGTTTA
      TGGATGTTGTACAGGATAATGTCCAGAAGGTCGATAGAAAGCGTGAGAAACAGC
      GTACAGACGATTTAGAGATGTAGAGGTACTTTTATGCCGAGAAAACTTTTTCGCT
      GTGACAGTCCTTAAAAATATACTTAGAGCGTAAGCGAAAGTAGTAGCGACAGCTA
      TTAACTTTCGGTTGCAAAGCTCTAGGATTTTAAATGGACGCAGCGCATCACACGC
      AAAAAGGAAATTGGAATAAATGCGAAATTTGAGATGTTAATTAAGACCTTTT
25      GAGGTCTTTTTTCTTAGATTTTTGGGGTTATTTAGGGGAGAAAACATAGGGGGG
      TACTACGACCTCCCCCTAGGTGTCCATTGTCCATTGTCCAAACAAATAAATAAA
      TATTGGGTTTTTAATGTTAAAGGTTGTTTTTATGTTAAAGTGAAAAAACAGA
      TGTTGGGAGGTACAGTGATGGTTGTAGATAGAAAAGAAGAGAAAAAAGTTGCTG
      TTACTTTAAGACTTACACAGAAGAAAATGAGATATTAATAGAATCCAAGAAAA
      ATATAATATTAGCAAATCAGATGCACCGGTATTCTAATAAAAAATATGYRMAGG

```

AGGAATACSGTGCATTTTAAACAAAAAAGATAGACAGCACTGGCATGCTGCCTA
 TCTATGACTAAATTTTGTAAATGTATTAGCACCGTTATTATATCATGAGCGAAA
 ATGTAATAAAAGAACTGAAAACAAGAAAAATTCAAGAGGACGTAATTCGACAT
 TTGTTTTATATCCAGAATCAGCAAAAGCCGAGTGGTTAGAGTATTTAAAAGAGTT
 ACACATTCAATTTGTAGTGTCTCCATTACATGATAGGGATACTGATACAGAAGAT
 AGGATGAAAAAAGAGCATTATCATATTCTAGTGATGTATGAGGGTAATAAATCTT
 ATGAACAGATAAAAAATAATTACAGAAGAATTGAATGCCACTATTCCGCAGATTG
 CAGGAAGTGTGAAAGGTCTTGTGAGATATATGCTTCACATGGACGATCCTAATAA
 ATTTAAATATCAAAAAGAAGATATGATAGTTTATGGCGGTGTAGATGTTGATGAA
 TTATTAAGAAAACAACAACAGATAGATATAAATTAATTAAAGAAATGATTGAG
 TTTATTGATGAACAAGGAATCGTAGAATTTAAGAGTTTAATGGATTATGCAATGA
 AGTTTAAATTTGATGATTGGTTCCCGCTTTTATGTGATAACTCGGCGTATGTTATT
 CAAGAATATATAAAATCAAATCGGTATAAATCTGACCGATAGATTTTGAATTTAA
 GAGTGTCAACAAGACACTCTTTTTTCGCACCAACGAAAACCTGGTTTAAGCCGACTG
 CGCAAAAGACATAATCGATTACAAAAAATAGGCACACGAAAAACAAGTTAAG
 GGATGCAGTTTATGCATCCCTTANCTTACTTATTAATAATTTATAGCTATTGAAA
 AGAGATAAGAATTGTTCAAGCTAATATTGTTTAAATCGTCCATTCCCTGCATGTTTT
 ANGGAAWTGTTAANTTGATTTTTTGTAAATTTTTCTKGTATYCTTTGTTAMCCCA
 TTTTCATAACGAAATAATTATACTTTTGTTTATCTTTGTGTGATATTCTTGATTTTTT
 TCTACTTAATCTGATAAGTGAGCTATTCACTTTAGGTTTAGGATGAAAAATATTCTC
 TTGGAACCATACTTAATATAGAAATATCAACTTCTGCCATTAAAAGTAATGCCAA
 TGAGCGTTTTGTATTTAATAATCTTTTAGCAAACCCGTATTCCACGATTAAATAAA
 TCTCATTAGCTATACTATCAAAAACAATTTTGGCTATTATATCCGTACTTATGTTA
 TAAGGTATATTACCATATATTTTATAGGATTGGTTTTTAGGAAATTTAAACTGCA
 ATATATCCTTGTTTAAAACTTGGAAATATCGTGATCTTCCTTCAGGTTATGACCA
 TCTGTGCCAGTTCGTAATGTCTGGTCAACTTTCCGACTCTGAGAACTTCTGGAAT
 CGCTAGAGAAATTTCTGGAATGGGATTTCAGGAGTGGACAGAACGACACGGATATA
 TAGTGGATGTGTCAAAACGCATACCATTITGAACGATGACCTCTAATAATTGTTA
 ATCATGTTGGTTACGTATTTATTAACCTTCTCCTAGTATTAGTAATTATCATGGCTG
 TCATGGCGCATTAAACGGAATAAAGGGTGTGCTTAAATCGGGCCATTTTGCCTAAT
 AAGAAAAAGGATTAATTATGAGCGAATTGAATTAATAATAAGGTAATAGATTTA
 CATTAGAAAAATGAAAGGGGATTTTATGCGTGAGAATGTTACAGTCTATCCCGGCA
 ATAGTTACCTTATTATYWSGATAAGAANGAAAGGATTTTTCGCTACGCTCAATC
 CTTTAAAAAAACAAAAAGACCACATTTTTTAATGTGGTCTTTTATTCTTCAACTA
 AAGCACCCATTAGTTCAACAAACGAAAAATGGATAARGTGGGATATTTTWAAWA
 TAATWTATKTATGTTACAGTAATATTGACTTTTAAAAAAGGATTGATTCTAATGA
 AGAAAGCAGACAAGTAAGCCTCCTAAATTCACTTTAGATAAAAAATTTAGGAGGC
 ATATCAAATGAACTTTAATAAAATTGATTTAGACAATTGGAAGAGAAAAGAGAT

ATTTAATCATTATTTGAACCAACAAACGACTTTTAGTATAACCACAGAAATTGAT
 ATTAGTGTTTTATACCGAAACATAAAACAAGAAGGATATAAATTTTACCCTGCAT
 TTATTTTCTTAGTGACAAGGGTGATAAACTCAAATACAGCTTTTAGAACTGGTTA
 CAATAGCGACGGAGAGTTAGGTTATTGGGATAAGTTAGAGCCACTTTATACAATT
 5 TTTGATGGTGTATCTAAAACATTCTCTGGTATTGGACTCCTGTAAAGAATGACTT
 CAAAGAGTTTTATGATTTATACCTTTCTGATGTAGAGAAATATAATGGTTCGGGG
 AAATTGTTTCCCAAAACACCTATACCTGAAAATGCTTTTTCTCTTTCTATTATTCC
 ATGGACTTCATTTACTGGGTTTAACTTAAATATCAATAATAATAGTAATTACCTTC
 TACCCATTATTACNGCAGGAAANTTCATTAATAANGGTAATTCAATATATTTACC
 10 GCTATCTTTACAGGTACATCATTCTGTTTGTGATGGTTATCATGCNGGATTGTTTA
 TGAACCTCTATTCAGGAATTGTCAGATAGGCCTAATGACTGGCTTTTATATATGAG
 ATAATGCCGACTGTACTTTTTACRGTCGGTTTTCTAACGATMCATTAATAGGTMC
 GAAAAAGCMACTTTTTKSCGCTTAAAACCAGTCATACCAATAACTTAAGGGTAA
 CTAGCCTCGCCGAAAGAGCGAAAATGCCTCACATTTGTGCCACCTAAAAAGGA
 15 GCGATTTACATATGAGTTATGCAGTTTGTAGAATGCAAAAAGTGAAATCAGCTGC
 ATTAATGAATCGGCCAACCGCGCGGGGAGAGGCGGTTTGCGTATTGGGCGCTCTTC
 CGCTTCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTCGTTTCGGCTGCGGCGAGCGGTA
 TCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCA
 GGAAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGC
 20 CGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAAAT
 CGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCG
 TTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGG
 ATACCTGTCCGCCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCATAGCTCACGCT
 GTAGGTATCTCAGTTCGGTGATAGGTCGTTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGA
 25 ACCCCCCGTTACGCCCAGCGCTGCGCCTTATCCGGTAATCTCGTCTTGAGTCC
 AACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATT
 AGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTRSSY
 ACKSSKMYCCTAGAAGAACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTAC
 CTTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAAMAAACCACCGCTGGTAG
 30 CGGTGGTTTTTTTGTGTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAA
 GAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAAACTCAC
 GTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCACCTAGATCCTTTT
 AAATTAATAAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAACTTGGTCT
 GACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTT
 35 GTTCATCCATAGTTGCCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGG
 CTTACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCACC GGCT
 CCAGATTTATCAGCAATAAACCAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGT

CCTGCAACTTTATCCGCCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGAAGCTAGAG
 TAAGTAGTTCGCCAGTTAATAGTTTGCGCAACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCAT
 CGTGGTGTACGCTCGTCGTTTGGTATGGCTTCATTACAGCTCCGGTCCCAACGAT
 5 CAAGGCGAGTTACATGATCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGG
 TCCTCCGATCGTTGTCAGAAGTAAGTTGGCCGCAGTGTTATCACTCATGGTTATG
 GCAGCACTGCATAATTCTCTTACTGTCATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGAC
 TGGTGRKKASTCWCMCMAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTG
 CTCTTGCCCNNGSGTCAATACGGGATAATACCGCSCCACAATAGCARAACTTTAAA
 10 AGTGCTCATCATTGGAAAACGTTCTTCGGGGCGAAAACTCTCAAGGATCTTACCG
 CTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGACCCCACTGATCTTCAGCAT
 CTTTACTTTACCCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGC
 AAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAAATGTTGAATACTCATACTCTTCCTTTTT
 CAATATTATTGAAGCATTATATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTG
 15 AATGTATTTAGAAAAATAAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCGCCGAAAAAG
 TGCCACCTGACGTCTAAGAAACCATATTATCATGACATTAACTATAAAAAATAG
 GCGTATCACGAGGCCCTTTCGTCTCGCGCTTTCGGTGATGACGGTGAAAACCTC
 TGACACATGCAGCTCCCGGAGACGGTCACAGCTTGTCTGTAAGCGGATGCCGGG
 AGCAGACAAGCCCGTCAGGGCGCGTCAGCGGGTGTTGGCGGGTGTCGGGGCTGG
 CTTAACTATGCCGCATCAGAGCAGATTGTACTGAGAGTGCACMATATGCCGTGT
 20 GAAATACCGCACAGATGCGTAAGGAGAAAAATACCGCATCAGGCGCCATTCCGCCA
 TTCAGGCTGCGCAACTGTTGGGAAGGGCGATCGGTGCGGGCCTCTTCGCTATTAC
 GCCAGCTGGCGAAAGGGGGATGTGCTGCAAGGCGATTAAGTTGGGTAAACGCCAG
 GGTTTTYCCAGTCACGACGTTGTAAAACGACGGCCAGTGCCAAGCTTGATGCCT
 GCAGGTGCACTCTAGAGGATCCCNNGGTACCGAGCTCGAATTCGTAATCATGTC
 25 ATAGCTGTTTCCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATTCCACACAACATACGA
 GCCGGAAGCATAAAGTGTAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACA
 TTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTTCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGC
 TGGACTAAAAGGCATGCAATTTTATAATCAAAGAGAGCGAAAAAGTAGAACGAA
 TGATGATATTGACCATGAGCGAACACGTGAAAATTATGATTTGAAAAATGATAA
 30 AAATATTGATTACAACGAACGTGTCAAAGAAATTATTGAATCACAAAAACAGG
 TACAAGAAAAACGAGGAAAGATGCTGTTCTTGTAATGAGTTGCTAGTAACATC
 TGACCGAGATTTTTTTGAGCAACTGGATCAGTACAAGAAAGATACTGTATTTTAT
 AAACAGGAACTGCAAGAAGTTAAGGATGAGTTACAGAAGGCAAATAAGCAGTT
 ACAGAGTGGAATAGAGCATATGAGGTCTACGAAACCCCTTGATTATGAAAAATGA
 GCGTACAGGTTTGTCTCTGACGTGAAGAGACTGGTAGAAAGATATTAAGTCT
 35 GATGAATTTGAACGCCTGCAAGAAACAATCTCTTCGAACGGATTGTTGATGATTA
 CGAAATATAAGAGCCCGACTATTCCAGAAATCAGAATTAACAAACGTTAGAGAGA
 G (SEQ ID NO:28, pKSV7).

La integración específica de sitio puede medirse por pPLI, pPL2, pHMT, o variantes de los mismos (ver, e.g., Lauer, *et al.* (2002) J. Bacteriol. 184:4177-4186; Sol. Int. No. PCT/US03/13492 (Sol. Int. No. WO 03/092600) de Portnoy, Calendar, y Lauer).

- 5 El plásmido pTNT tiene sitios loxP que permiten el retiro específico de la mayoría del plásmido del cromosoma listerial, dejando atrás attP y MCS (sitio de clonación múltiple), y los contenidos del sitio multi-clonación (MCS) (e.g., un casete de antígeno). pINT puede trabajar de manera diferente de pPL2 como sigue. Hasta una alícuota de 100 microlitros de una dilución 10:1 de una conjugación puede colocarse en placas de selección dobles.
- 10 La colocación en las placas de hasta una alícuota de 100 microlitros de una dilución 10:1 de una conjugación pPL2 generalmente resulta en 50-100 colonias. La colocación en placa de más de 100 microlitros de una dilución 10:1 de conjugación pPL2 da poco o nada de las colonias debido a un crecimiento antecedente del donador de *E. coli*. pINT, por el otro lado, puede colocarse en placa sin diluir y aún concentrar la mezcla de conjugación debido a que eritromicina (Erm) es más selectiva que cloranfenicol contra *E. coli*. El uso de pINT amplía el rango dinámico para integración exitosa por aproximadamente 2 logs.
- 15 vector pINT

20

25

30

35

40

AGATCTCCAAAAATAAACAGGTGGTGGTATTAATGAAGATAAAAAAATTAGCA
 AACGGTAAATATTGTGTTTCGCCTACGTATAAAAGTCGATGGTGAATGGAAAGA
 AAAGCGTTTGACAGATACAAGTGAACAACTTAATGTATAAAGCATCTAAAT
 5 TATTAACAAGTTCAGCATGATAGTAGTTCTCTGAAAGAATGGAACCTCAA
 GAATTTTATACGCTATTCATGAAAACATTTAAAGATGGGAAAAGTAGTCAATC
 TACTATTAATTTATACGATCTTGCTTATAATCAATTCGTTGATTATTTTCGATG
 AAAAAATTAATTTAATTCGATTGATGCGGTTCAATATCAACAATTTATTAAT
 CATTTATCTGTAGACTATGCAATATCCACTGTAGACACCAGACACCGCAAAAT
 TAGAGCGATTTTAAACAAGGCTGTTCAATTTAGGTTACATGAAGAAAAACCCCA
 CTATAGGGGCTCATATAAGCGGACAGGACGTAGCGAAAAATAAAGCACAAATTT
 10 ATGGAACAGACAAAGTTCATTTACTATTAGAAGAACTTGCAAAATTTTCATTC
 TATATCACGACAGTTATCTTTCTAGCTGTCCAGACAGGCATGAGGTTCTGAAG
 AAATTTTGCACCTAACAAAGAAGGATATTAATTTCACTAAACGTTCAATAACT
 GTGAATAAAGCTTGGGATTACAAGTACACTAATACATTCATTGATACCAAAAC
 AAAAAATCACGAGTGATCTATATTGATAACTCTACCGCTCAATATTTACATT
 CGTATTTAAATTGGCATACTGAATATATGAAGGAACATGCTATTAAGAATCCA
 TTGATGTTATTATTCATCACTTACCACAATAAGCCAGTAGACAACGCGTCTTG
 15 TAATAAAGCTTTGAAGAAGATATGTAGTACAATCAATTCTGAACCAGTGACAT
 TACACAAGCTACGACATACGCATACAGGCTTATGTGTAGAAGCGGGTATGGAT
 ATTATTTATGTAGCTGATAGGCTTGGTCATGATGACATTAATACAACATTAAA
 ATACTATAGTCATCTAAGCTCTAATTTAAGACAACATAATCAGTCCAAAGTAG
 ATGCTTTTTTTCACACTAAAAACAGATGAAAATACCACAAATTTTACCACAAAT
 GCCACAAAACAACGGAATAACCTAGGATAACTTCGTATAATGTATGCTATAC
 GAAGTTATATGCATGGGTATTATACGATATAAAAAAACTCCAAAACATTCAT
 20 CCGCCCTTAAATATCAAGGCTTTTCAACGTTTTAGAGATTTCTTTACATTACT
 ATTTAACGTCCTGAGAGGGATTAACACACACTGATATAAAGCCATTTAGGATA
 TATATACCACAAATAATACCACAAACATTTTATGTAATAATAAATATTATTTA
 TTATACATTGAATAAATATTTCGTTATAAATAGTTTTTATATCAAGATGTTT
 TTTCTCAGGTTTTTATAAAATGACTTTAATTCCTTTGTTTCAAGTAGTCCAG
 AGAAGATTTTTTCAACAGCGTTCTTCTTCCCTCCACGCATGCGACGTCAATA
 CGACTCACTATAGGGCGAATTGGGTACCGGGCCCCCCTCGAGGTCGACGGTA
 25 TCGATAAGCTTGATATCGAATTCTTGCAGCCCGGGGGATCCACTAGTTCTAGA
 GCGGCCGCCACCGCGGTGGAGCTCCAGCTTTTGTTCCTTTAGTGAGGGTTAA
 TTAATAAATTCGTATAATGTATGCTATACGAAGTTATGCGATCGCCTCTCGC
 CTGTCCCTCAGTTCAGTAATTTCTGCTTTTGCCTGTTTCCAGTCGGTAGAT
 ATTCCACAAAACAGCAGGGAAGCAGCGCTTTTCCGCTGCATAACCCTGCTTCG
 GGGTCATTATAGCGATTTTTTTCGGTATATCCATCCTTTTTTCGCACGATATACA
 GGATTTTGCCAAAGGGTTCGTGTAGACTTTCCTTGGTGTATCCAACGGCGTCA
 GCCGGGCAGGATAGGTGAAGTAGGCCACCCGCGAGCGGGTGTTCCTTCTTCA
 30 CTGTCCTTTATTCGCACCTGGCGGTGCTCAACGGGAATCCTGCTCTGCGAGGC
 TGGCCGGCTACCGCCGGCGTAACAGATGAGGGCAAGCGGCGGAGAATTACAAC
 TTATATCGTATGGGGCTGACTTCAGGTGCTACATTTGAAGAGATAAATTGCAC
 TGAAATCTAGAAATATTTTATCTGATTAATAAGATGATCTTCTTGAGATCGTT
 TTGGTCTGCGCGTAATCTTGTCTGTGAAAACGAAAAAACCGCCTTGCAGGGC
 GGTTTTTTCGAAGGTTCTCTGAGCTACCAACTCTTTGAACCGAGGTAAGTGGCT
 TGGAGGAGCGCAGTACCAAACTTGTCTTTTCAGTTTAGCCTTAACCGGCGC
 35 ATGACTTCAAGACTAACTCCTCTAAATCAATTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGG
 TGCTTTTGCATGTCTTTCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGG

CGCAGCGGTTCGGACTGAACGGGGGGTTCGTGCATACAGTCCAGCTTGGAGCGA
 ACTGCCTACCCGGAACAGTGTGAGGCGTGGAATGAGACAAACGCGGCCATA
 5 ACAGCGGAATGACACCGGTAAACCGAAAGGCAGGAACAGGAGAGCGCACGAGG
 GAGCCGCCAGGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCCTGTCGGGTTTCGCCA
 CCACTGATTTGAGCGTCAGATTTCTGTATGCTTGTGAGGGGGCGGAGCCTAT
 GGAAAAACGGCTTTGCCGCGGCCCTCTCACTTCCCTGTAAAGTATCTTCCTGG
 CATCTTCCAGGAAATCTCCGCCCCGTTTCGTAAGCCATTTCCGCTCGCCGCAGT
 CGAACGACCGAGCGTAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAATATATCCTGTA
 10 TCACATATTCTGCTGACGCACCGGTGCAGCCTTTTTTCTCCTGCCACATGAAG
 CACTTCACTGACACCTCATCAGTGCCAACATAGTAAGCCAGTATACACTCCG
 CTAGCGCTGATGTCCGGCGGTGCTTTTGCCGTTACGCACCACCCCGTCAGTAG
 CTGAACAGGAGGGACAGCTGATAGAAACAGAAGCCACTGGAGCACCTCAAAAA
 CACCATCATACACTAAATCAGTAAGTTGGCAGCATCACCCGACGCACTTTGCG
 CCGAATAAATACCTGTGACGGAAGATCACTTCGCAGAATAAATAAATCCTGGT
 GTCCCTGTTGATACCGGGAAGCCCTGGGCCAACTTTTGGCGAAAATGAGACGT
 TGATCGGCACGTAAGAGGTTCCAACCTTACCATAATGAAATAAGATCACTAC
 15 CGGGCGTATTTTTTGTAGTTATCGAGATTTTCAGGAGCTAAGGAAGCTAAAAATG
 GAGAAAAAATCACTGGATATACCACCGTTGATATATCCCAATGGCATCGTAA
 AGAACATTTTGTAGGCATTTTCAGTCAGTTGCTCAATGTACCTATAACCAGACCG
 TTCAGCTGGATATTACGGCCTTTTAAAGACCGTAAAGAAAAATAAGCACAAG
 TTTTATCCGGCCTTTATTCACATTCTTGCCCGCCTGATGAATGCTCATCCGGA
 ATTCCGTATGGCAATGAAAGACGGTGAGCTGGTGATATGGGATAGTGTTTACC
 20 CTTGTTACACCGTTTTTCCATGAGCAAACCTGAAACGTTTTTCATCGCTCTGGAGT
 GAATACCACGACGATTTCCGGCGAGTTTCTACACATATATTCGCAAGATGTGGC
 GTGTTACGGTGAAAACCTGGCCTATTTCCCTAAAGGGTTTATTGAGAATATGT
 TTTTCGTCTCAGCCAATCCCTGGGTGAGTTTACCAGTTTTGATTTAAACGTG
 GCCAATATGGACAACCTTCTCGCCCCCGTTTTTACCATGGGCAAATATTATAC
 GCAAGGCGACAAGGTGCTGATGCCGCTGGCGATTCAAGGTCATCATGCCGTTT
 GTGATGGCTTCCATGTCCGGCAGAATGCTTAATGAATTACAACAGTACTGCGAT
 25 GAGTGGCAGGGCGGGGCGTAATTTTAAAGSCAGTTATTGGTGCCCTTAAAC
 GCCTGTTGCTACGCCTGAATAAGTGATAATAAGCGGATGAATGGCAGAAATT
 CGAAAGCAAATTCGACCCGGTCGTGCGTTTCAGGGCAGGGTCGTTAAATAGC
 CGTCTAAGAAACCATTTATTATCATGACATTAACCTATAAAAAATAGGCGTATCA
 CGAGGCCCTTTCTGCTCGCGCGTTTCGGTGATGACGGTGAAAACCTCTGACAC
 ATGACAGCTCCCGGAGACGGTCAACAGCTTGTCTGTAAGCGGATGCCGGGAGCAG
 ACAAGCCCGTCAGGGCGCGTCAGCGGGTGTTGGCGGGTGTCGGGGCTGGCTTA
 30 ACTATGCGGCATCAGAGCAGATTGTACTGAGAGTGACACAATCGCATCCGATTG
 CAGTATAAATTTAACGATCACTCATCATGTTTATATTTATCAGAGCTCGTGCT
 ATAATTATACTAATTTTATAAGGAGGAAAAAATATGGGCATTTTTAGTATTTT
 TGTAATCAGCACAGTTCATTATCAACCAAAACAAAAATAAGTGGTTATAATGA
 ATCGTTAATAAGCAAATTCATATAACCAAATTAAGAGGGTTATAATGAACG
 AGAAAAATATAAAACACAGTCAAACTTTATTACTTCAAAACATAATATAGAT
 35 AAAATAATGACAAATATAAGATTAAATGAACATGATAATATCTTTGAAATCGG
 CTGAGGAAAAGGCCATTTTACCTTGAATTAGTAAAGAGGTGTAATTTCTGTA
 CTGCCATTGAAATAGACCATAAATTATGCAAACTACAGAAAATAAACTTGTT
 GATCACGATAATTTCCAAGTTTTAAACAAGGATATATTGCAGTTTAAATTTCC

TAAAAACCAATCCTATAAAATATATGGTAATATACCTTATAACATAAGTACGG
 ATATAATACGCAAAATTGTTTTTGATAGTATAGCTAATGAGATTTATTTAATC
 GTGGAATACGGGTTTGCTAAAAGATTATTAATAACAAAACGCTCATTGGCATT
 ACTTTTAATGGCAGAAGTTGATATTTCTATATTAAGTATGGTTCCAAGAGAAT
 ATTTTCATCCTAAACCTAAAGTGAATAGCTCACTTATCAGATTAAGTAGAAAA
 AAATCAAGAATATCACACAAAGATAAACAAAAGTATAATTATTTTCGTTATGAA
 ATGGGTTAACAAAGAATACAAGAAAATATTTACAAAAAATCAATTTAACAAATT
 CCTTAAACATGCAGGAATTGACGATTTAAACAATATTAGCTTTGAACAATTC
 TTATCTCTTTTCAATAGCTATAAATTATTTAATAAGTAAGTTAAGGGATGCAT
 AAACCTGCATCCCTTAACTTGTTTTTCGTGTGCCCGATCGGTGCGGGCCTCTTC
 GCTATTACGCCAGCTGGCGAAAGGGGGATGTGCTGCAAGGCGATTAAAGTTGGG
 TAACGCCAGGGTTTCCCAGTCACGACGTTGTAAAACGACGGCCAGTGCCAAG
 CTAGCTTTTCGATCATCATAATTCTGTCTCATTATATAACATCCTCCATACCTT
 CTATTATAGAATACCATAAACTCATCTGGCAATTCATTTTCGAGTCACGAAGAA
 CGGAAAACTGCCGGTTTTTATATTACAAATGTATTAAAGTTTTTCTATTAAACA
 AAAACAATAGGTTTCCCATAGCGAAAGTTGTTGATTAAACGTTACATCCCAC
 TTACACTATAAAGGTTTACCCAGCAATACATCTCAAGCCCTAAGAATACACGT
 TCGCTTTTCAACTGTTACAGAATTATTACAAATAGTTGGTATAGTCCTCTTTA
 GCCTTTGGAGCTATTATCTCATCATTTGTTTTTTAGGTGAAAACCTGGGTAAAC
 TTAGTATTAATCAATATAAAATTAATTCTCAAATACTTAATTACGTACTGGGA
 TTTTCTGAAAAAA
 (SEQ ID NO:29)

EJEMPLO III. Socios de proteína de fusión a base de ActA, que incluyen derivados de ActA que se truncan o eliminan en uno o más motivos.

La presente invención, en algunas modalidades, proporciona reactivos y métodos que comprenden un primer ácido nucleico que codifica una pareja de proteína de fusión a base de ActA operativamente avanzado a y en estructura con un segundo ácido nucleico que codifica al menos un antígeno heterólogo. Se proporciona un ácido nucleico que puede hibridarse bajo condiciones severas a cualquiera de los ácidos nucleicos descritos.

Lo que se comprende es un primer ácido nucleico y segundo ácido nucleico que se enlazan operativamente entre sí, y en estructura entre sí. En este contexto, "operativamente enlazados entre sí" significa que cualquier construcción que comprende los ácidos nucleicos, primero y segundo, codifican una proteína de fusión. En otra modalidad, el segundo ácido nucleico puede incluirse en el primer ácido nucleico.

La pareja de proteína de fusión a base de ActA puede comprender uno o más de los siguientes. También están disponibles las modalidades "que consisten de", y aquí la pareja de proteína de fusión a base de ActA puede consistir de una o más de las siguientes modalidades:

(1) ActA-N100 (aminoácidos 1-100 del No. de Acceso de GenBank X59723, o de una secuencia ActA homóloga o similar).

(2) ActA de longitud completa, donde un ácido nucleico que codifica al menos un antígeno heterólogo se conecta a (y en estructura con) el término C de ActA de longitud completa, que reside en una posición interna de ActA, o se conecta tanto al término C de ActA de longitud completa como también que reside en una posición interna de ActA.

(3) Un ActA truncado que normalmente soporta menos de 90% de la actividad de nucleación del complejo Arp2/3, como se compara con la actividad de ActA de longitud completa; convencionalmente soporta menos de 80% de la actividad de nucleación de ActA de longitud completa; soporta de manera característica menos de 70% de la actividad de nucleación de ActA de longitud completa; típicamente soporta menos de 60% de la actividad de

nucleación de ActA de longitud completa; más típicamente soporta menos de 50% de la actividad de nucleación de ActA de longitud completa; a lo máximo típicamente soporta menos de 40% de la actividad de nucleación de ActA de longitud completa; con frecuencia soporta menos de 30% de la actividad de nucleación de ActA de longitud completa; con más frecuencia soporta menos de 20% de la actividad de nucleación de ActA de longitud completa; a lo máximo con frecuencia soporta menos de 10% de la actividad de nucleación de ActA de longitud completa; usualmente soporta menos de 5% de la actividad de nucleación de ActA de longitud completa; más usualmente soporta menos de 2% de la actividad de nucleación de ActA de longitud completa; y a lo máximo usualmente no es detectable en ninguna habilidad para nuclear el complejo Arp2/3. La actividad de nucleación reducida, o eliminada de ActA progresivamente truncado se demostró por Skoble (Skoble, *et al.* (2000) *J. Cell Biol.* 150:527-537). Se demostró que ActA truncado en aminoácido 101, y ActA truncado en aminoácido 135, tienen poca o nada de actividad de nucleación, mientras ActA truncado en los aminoácidos 165, 201, y 263, son tan potentes como ActA de longitud completa en la nucleación del complejo Arp2/3.

(4) Un ActA truncado, en donde el ActA se trunca en aproximadamente el aminoácido 40; trunca en aproximadamente el aminoácido 45; trunca en aproximadamente el aminoácido 50; trunca en aproximadamente el aminoácido 55; trunca en aproximadamente el aminoácido 60; trunca en aproximadamente el aminoácido 65; trunca en aproximadamente el aminoácido 70; trunca en aproximadamente el aminoácido 75; trunca en aproximadamente el aminoácido 80; trunca en aproximadamente el aminoácido 85; trunca en aproximadamente el aminoácido 90; trunca en aproximadamente el aminoácido 95; trunca en aproximadamente el aminoácido 100; trunca en aproximadamente el aminoácido 105; trunca en aproximadamente el aminoácido 110; trunca en aproximadamente el aminoácido 115; trunca en aproximadamente el aminoácido 120; trunca en aproximadamente el aminoácido 125; trunca en aproximadamente el aminoácido 130; trunca en aproximadamente el aminoácido 135; trunca en aproximadamente el aminoácido 140; trunca en aproximadamente el aminoácido 145; trunca en aproximadamente el aminoácido 150; trunca en aproximadamente el aminoácido 155; y trunca en aproximadamente el aminoácido 160. El término "aproximadamente" en este contexto significa más o menos un aminoácido, más o menos dos aminoácidos, más o menos tres aminoácidos, más o menos cuatro aminoácidos, o más o menos cinco aminoácidos.

(5) secuencia secretora ActA (aminoácidos 1-29 del No. de Acceso de GenBank X59723, o de una secuencia ActA homóloga o similar).

(6) No comprende una secuencia secretora ActA (aminoácidos 1-29 del No. de Acceso de GenBank X59723, o de una secuencia ActA homóloga o similar).

(7) secuencia secretora ActA y el dominio N-terminal maduro (aminoácidos 1-263 del No. de Acceso de GenBank X59723, o de una secuencia ActA homóloga o similar).

(5) Dominio N-terminal maduro sin la secuencia secretora (aminoácidos 30-263 del No. de Acceso de GenBank X59723, o de una secuencia ActA homóloga o similar).

(9) Secuencia ActA con habilidad reducida para estimular directamente la polimerización de actina. La habilidad reducida puede estar, e.g., normalmente a lo mucho 90% máximo, más normalmente a lo mucho 80% máximo, a lo máximo normalmente a lo mucho 70% máximo, usualmente a lo mucho 60% máximo, más usualmente a lo mucho 50% máximo, a lo máximo usualmente a lo mucho 40% máximo, con frecuencia a lo mucho 30% máximo, con más frecuencia a lo mucho 20% máximo, a lo máximo con frecuencia a lo mucho 10% máximo, y típicamente a lo mucho 5% máximo.

(10) Secuencia ActA con una habilidad reducida para unirse a un miembro de la familia Ena/VASP de proteínas (mamífero Permitido (Mena); proteína similar a Ena/VASP (Evl); fosfoproteína estimulada por vasodilatador (VASP) (ver, e.g., Machner, *et al.* (2001) *J. Biol. Chem.* 276:40096-40103). La habilidad reducida puede ser, e.g., normalmente a lo mucho 90% máximo, más normalmente a lo mucho 80% máximo, a lo máximo normalmente a lo mucho 70% máximo, usualmente a lo mucho 60% máximo, más usualmente a lo mucho 50% máximo, a lo máximo usualmente a lo mucho 40% máximo, con frecuencia a lo mucho 30% máximo, con más frecuencia a lo mucho 20% máximo, con frecuencia a lo mucho 10% máximo, y típicamente a lo mucho 5% máximo.

(11) ActA que se trunca en el punto de, elimina en, o muta en aminoácidos 93-98 del No. de Acceso de GenBank X59723, o de una secuencia ActA homóloga o similar (LKEKAE (SEQ ID NO: 124)) (homóloga a dominio de unión a actina de caldesmon (ver, e.g., Pistor, *et al.* (2000) *J. Cell Science* 113:3277-3287; Lasa, *et al.* (1997) *EMBO J.* 16:1531-1540).

(12) ActA que se trunca en el punto de, elimina en, o muta en, aminoácidos 126-155 (PAIQ, etc.) del No.

de Acceso de GenBank X59723, o de una secuencia ActA homóloga o similar, que son críticos para formación de dímero ActA (ver, e.g., Mourrain, *et al.* (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:10034-10039).

(13) ActA que se trunca en el punto de, elimina en, o muta en, aminoácidos 121-170 del No. de Acceso de GenBank X59723, o de una secuencia ActA homóloga o similar (dominio de activación ARP2/3 mínimo) (ver, e.g., Zalevsky, *et al.* (2001) J. Biol. Chem. 276:3468-3475).

(14) ActA que se trunca en el punto de, elimina en, o muta en, aminoácidos 146-150 KKRRK (SEQ ID NO:30)) del No. de Acceso de GenBank X59723, o de una secuencia ActA homóloga o similar (una región esencial para reclutar el complejo Arp2/3) (Lasa, *et al.* (1997) EMBO J. 16:1531-1540; Pistor, *et al.* (2000) J. Cell Science 113:3277-3287).

(15) ActA que se trunca en el punto de, elimina en, o muta en, aminoácidos 41-46 DEWEEE (SEQ ID NO:31) del No. de Acceso de GenBank X59723, o de una secuencia ActA homóloga o similar (una región incluida en la unión del complejo Arp2/3) (ver, e.g., Boujemaa-Paterski, *et al.* (2001) Biochemistry 40: 11390-11404).

(16) ActA que se trunca en el punto de, elimina en, o muta en, aminoácidos 481-492 (DRLADLRDRGTG (SEQ ID NO:32)), que es una región de homología de vinculina. La vinculina media la extensión de célula a célula de *S. flexneri* (ver, e.g., Kocks, *et al.* (1992) Cell 68:521-531).

(17) ActA que se trunca en el punto de, elimina en, o muta en, el dominio de homología de cofilina (IKKKRRKAIASSD (SEQ ID NO:33)) (aminoácidos 145-156 del No. de Acceso de GenBank X59723, o de una secuencia ActA homóloga o similar) (ver, e.g., Skoble, *et al.* (2000) J. Cell Biol. 150:527-537).

(18) ActA que se trunca en el punto de, elimina en, o muta en, aminoácidos 50-125 del No. de Acceso de GenBank X59723, o de una secuencia ActA homóloga o similar (continuidad de región de elongación de filamento) (ver, e.g., Lasa, *et al.* (1997) EMBO J. 16:1531-1540).

(19) ActA que se trunca en el punto de, elimina en, o muta en, el primer motivo FP₄ (aminoácidos 265-269, o 264-269, y lo similar), segundo motivo FP₄ (aminoácidos 300-304, o 299-304, y lo similar), tercer motivo FP₄ (aminoácidos 335-339, o 334-339, y lo similar), cuarto motivo FP₄ (aminoácidos 380-384, o 379-384, y lo similar), todos los cuatro motivos FP₄, o cualquier combinación de lo anterior, donde los aminoácidos se refieren al No. de Acceso de GenBank X59723, o una secuencia ActA homóloga o similar (ver, e.g., Machner, *et al.* (2001) J. Biol. Chem. 276:40096-40103). Los motivos FP₄ mejoran la polimerización de actina y movilidad bacterial al reclutar las proteínas de contacto focal (e.g., VASP y Mena) y profilina, que promueven la elongación de los filamentos nucleados por interacciones entre motivos en la región N-terminal del complejo ActA y Arp2/3 (ver, e.g., Welch, *et al.* (1998) Science 281:105-108; Skoble, *et al.* (2000) J. Cell Biol. 150:527-537; Pistor, *et al.* (2000) J. Cell Science 113:3277-3287).

(20) ActA que se trunca en el punto de, elimina en, o muta en, aminoácidos 136-165 del No. de Acceso de GenBank X59723, o de una secuencia ActA homóloga o similar (región de homología de cofilina, una región que estimula el complejo Arp2/3) (ver, e.g., Lauer, *et al.* (2001) Mol. Microbiol. 42:1163-1177).

(21) ActA que se trunca en el punto de, elimina en, o muta en, el "estiramiento ácido," es decir, aminoácidos 31-58 (TDSED (SEQ ID NO:34), etc.) del No. de Acceso de GenBank X59723, o de una secuencia ActA homóloga o similar. El estiramiento ácido contribuye a la polimerización de actina, movimiento de *Listeria* en el citoplasma de célula huésped, extensión de célula a célula, y a tamaño de placa (ver, e.g., Skoble, *et al.* (2000) J. Cell Biol. 150:527-537; Lauer, *et al.* (2001) Mol. Microbiol. 42:1163-1177).

(22) ActA que se trunca en el punto de, elimina en, o muta en, aminoácidos 60-101 (región AB, un dominio de unión a actina) del No. de Acceso de GenBank X59723, o de una secuencia ActA homóloga o similar (ver, e.g., Lauer, *et al.* (2001) Mol. Microbiol. 42:1163-1177).

(23) ActA que se trunca en el punto de, elimina en, o que contiene la mutación de mutante 34 (sin movimiento; sin placa) aminoácidos 117-121 (KKRRK (SEQ ID NO:30)) del No. de Acceso de GenBank X59723, o de una secuencia ActA homóloga o similar (Lauer, *et al.* (2001) Mol. Microbiol. 42:1163-1177).

(24) ActA que se trunca en el punto de, elimina en, o que contiene la mutación de mutante 34 (sin movimiento; sin placa) aminoácidos 244-249 (DKSAGLID (SEQ ID NO: 123)) del No. de Acceso de GenBank X59723, o de una secuencia ActA homóloga o similar. La mutación puede ser, e.g., reemplazo de D, K, y D por alaninas (Lauer, *et al.* (2001) Mol. Microbiol. 42:1163-1177).

(25) ActA que se trunca en el punto de, elimina en, o que contiene la mutación de mutantes 39, 47-52, 54 y/o 48 (movimiento reducido) (Lauer, *et al.* (2001) Mol. Microbiol. 42:1163-1177).

(26) ActA que se trunca en el punto de, elimina en, o muta en, aminoácidos 264-390 (región de repetición central) del No. de Acceso de GenBank X59723, o de una secuencia ActA homóloga o similar (ver, e.g., Lauer, *et al.* (2001) Mol. Microbiol. 42:1163-1177; Skoble, *et al.* (2000) J. Cell Biol. 150:527-537; Skoble, *et al.* (2001) J. Cell Biol. 155:89-100).

5 La presente descripción proporciona una pareja de proteína de fusión a base de ActA que puede comprender cualquiera, o cualquier combinación de, las modalidades descritas arriba. Modalidades “que consisten de” también están disponibles, y aquí la pareja de proteína de fusión a base de ActA puede consistir de una o más de las modalidades descritas arriba.

10 Cuando se proporciona con la presente descripción, el experto puede contemplar y preparar modalidades que contienen modificaciones conservadoras, o modificaciones donde se eliminan uno o más aminoácidos, o donde uno o más aminoácidos se reemplazan con alanina, y lo similar.

15 En el presente contexto, “pareja de proteína de fusión” comprende, pero no se limita a, un ácido nucleico que codifica un polipéptido, o el polipéptido por sí mismo, que ocurre como una proteína de fusión con un antígeno heterólogo, donde la pareja de proteína de fusión mejora, e.g., la transcripción, traducción, estabilidad, procesamiento por una célula que presenta antígeno (APC), presentación por una APC, presentación inmune, respuesta de célula T citotóxica, respuesta de célula T CD8⁺, respuesta de célula T CD4⁺, reducción en tamaño de tumor, número, o metástasis, incremento en supervivencia a un tumor o agente infeccioso, y lo similar.

20 La presente descripción proporciona ácidos nucleicos y polipéptidos de ActA-N100, y proteínas de fusión de los mismos, incluyendo proteínas de fusión que comprenden al menos un antígeno. Sin implicar ninguna alimentación en la invención, el al menos un antígeno puede comprender mesotelina, H-ras, un derivado de mesotelina, un derivado de H-ras, o cualquier combinación de los mismos. El ácido nucleico que codifica al menos un antígeno puede avanzarse operativamente a, y en estructura con, el término N de una pareja de proteína de fusión a base de ActA. Alternativamente, el ácido nucleico que codifica el al menos un antígeno puede avanzarse operativamente a, y en estructura con, el término C de la pareja de proteína de fusión ActA. O el ácido nucleico que codifica el al menos un antígeno puede enlazarse operativamente con, y reside dentro de un ácido nucleico que codifica una pareja de proteína de fusión a base de ActA.

EJEMPLO IV. Bloques de formación utilizados para ensamblar ácidos nucleicos que codifican las proteínas de fusión ActA

30 Lo siguiente describe ácidos nucleicos y polipéptidos utilizados para hacer construcciones que contienen ActA-N100 como una pareja de proteína de fusión. Se identifican el codón de secuencias optimizadas para expresión en *L. monocytogenes*, y secuencias optimizadas sin codón.

Ácido nucleico que codifica secuencia nativa ActA-N100 (codón no optimizado), incluyendo la secuencia Shine-Dalgarno (SEQ ID NO:122)	GTGGGATTAAATAGATTTATGCGTGCGATGATGGTAGT TTTCATTACTGCCAACTGCATTACGATTAACCCCGACA TAATATTTGTCAGCGACAGATAGCGAAGATTCAGTCTA AACACAGATGAATGGGAAGAAGAAAAACAGAAGAGCA GCCAAGCGAGGTAAATACGGGACCAAGATACGAAACTG CACGTGAAGTAAGTTCACGTGATATTGAGGAAGTAGAA AAATCGAATAAAGTGAAAAATACGAACAAAGCAGACCT AATAGCAATGTTGAAAGCAAAGCAGAGAAAGGT
Promotor ActA <i>L. monocytogenes</i> 10403S. (SEQ ID NO:35)	AAGCTTGGAAGCAGTTGGGGTTAACTGATTAAACAAATGTTAGAGAA AAATTAATTCTCCAAGTGATATTCTTAAATAATTCATGAATATTTT TTCTTATATTAGCTAATTAAGAAGATAATTAAGTCTAATCCAATTT TTAACGGAATAAATTAGTGAAATGAAGGCCGAATTTTCCTTGTTCCT AAAAAGGTTGTATTAGCGTATCACGAGGAGGGAGTATAA

Promotor actA nativo junto con el 5' UTR (incluyendo la secuencia Shine Dalgarno), y sitio de translación GUG SEQ ID NO:157) Lo subrayado y en minúscula es un sitio Kpn1 agregado para clonación. El recuadro PrfA se encuentra en cursiva y en negritas 1+ para la transcripción se muestra como "I" La secuencia de Shine-Dalgarno cerca del extremo se subraya.	<pre> ggtaccGGGAAGCAGTTGGGGTAACTGATTAACAAAT GTTAGAGAAAAATTAATTCTCCAAGTGATATTCTTAAA ATaATTCATGAATATTTTTTCTTATATTAGCTAATTAA GAAGATAATTAAGTGCTAATCCAATTTTAAACGGAATA AATTAGTGAAAATGAAGGCCGAATTTTCCTTGTTCTAA AAAGGTTGTATTAGCGTATCACGAGGAGGGAGTATAAgtg </pre>
La minúscula "gtg" en extremo es el sitio de inicio para ActA en <i>Listeria</i>	

Secuencia nativa ActA-N100 (codón no optimizado), incluyendo secuencia de Shine-Dalgarno con mesotelina humana (codón optimizado) con SS suprimido y GPI suprimido. Los sitios <i>Bam</i>HI (GGATCC) y <i>Sac</i>I (GAGCTC) se muestran en NEGRITAS. (SEQ ID NO:36)	GTGGGATTAAATAGATTTATGCGTGCGATGATGGTAGTTTTCAT TACTGCCAACTGCATTACGATTAACCCCGACATAATATTGCGAG CGACAGATAGCGAAGATTCCAGTCTAAACACAGATGAATGGGAA GAAGAAAAACAGAAGAGCAGCCAAGCGAGGTAAATACGGGACC AAGATACGAAACTGCACGTGAAGTAAGTTCACGTGATATTGAGG AACTAGAAAAATCGAATAAAGTGAAAAATACGAACAAAGCAGAC CTAATAGCAATGTTGAAAGCAAAAGCAGAGAAAGGTGGATCCCG AGAACGTGTCCGTGAGTTAGCAGTTGCATTAGCACAAAAAACG TTAAATTATCTACAGAACAGTTACGTTGTTTAGCCCATAGATTA AGCGAACCACCAGAAGACTTAGATGCACCTTCCTTAGACCTTCT TTTATTCTTAAATCCAGATGCATTTTCAGGACCACAAGCATGTA CACGTTTTTTTTTAGTCGAATTACAAAAGCCAATGTTGATTATTA CCTCGTGGGGCTCCTGAAAGACAACGTTTATTACCTGCTGCATT AGCATGCTGGGGTGTTCGCGGTAGCTTATTAAGTGAAGCCGATG TTCGTGCTTTAGGGGGTTTAGCATGTGATTTACCTGGTCGTTTC GTTGCAGAATCAGCAGAAGTGTATTACCGAGATTAGTTTCATG CCCAGGACCTTTAGATCAAGATCAACAAGAGGCAGCTAGAGCAG CTCTTCAAGGAGGAGGCCACCATATGGCCCACCAAGTACATGG AGTGTCTTCTACAATGGATGCGTTAAGAGGTTTATTACCGGTTTT AGGACAACCAATTATTCGTAGTATTCCACAAGGCATTGTAGCAT CATGGCGTCAACGTAGTTCTCGTGATCCGTCTTGGCGACAACCA GAACGTACAATTCTACGTCCAAGATTTTCGTAGAGAAGTAGAAAA AACGGCGTGTCTAGTGGCAAAAAGCACGTGAAATGTGATGAAA GTTTAATTTTTTATAAAAAATGGGAATTAGAAGCATGTGTCGAT GCAGCATTACTAGCTACACAAATGGATCGTGTTAATGCTATTCC ATTCACATATGAACAATTAGATGTTTTAAAGCATAAATTAGACG AATTATATCCACAAGGTTATCCAGAATCAGTTATTTCAACATTTA GGTTACTTTATTTTTTAAAAATGAGTCCAGAAGACATACGCAAATG GAATGTTACAAGTTTtagaaacattaaaagcgcttttagaagtta ACAAAGGTCATGAAATGAGTCCACAAGTTGCTACGTTAATTGAT AGATTTCGTTAAAGGCCGTGGTCAATTAGATAAAGATACTTTAGA TACATTAACAGCATTTTTATCCTGGCTACTTATGCAGTTTTATCAC CAGAAGAATTAAGTTCCGTTCCACCGAGTAGTATCTGGGCAGTT CGTCCGCAAGATTTAGATACATGCGACCCACGTCAATTAGATGT TTTATATCCAAAAGCAAGATTAGCTTTCCAAAATATGAACGGTA GTGAATATTTTCGTAAAAATTCATCCTTTTTAGGTGGTGCACCA ACTGAAGATCTAAAAGCATTAAAGCCAACAAAATGTAAGTATGGA TTTAGCTACGTTTATGAAATTACGTACAGATGCAGTTCTACCAT TAACAGTTGCAGAAGTTCAAAAATTATTAGGTCCACACGTAGAA GGATTAAAAGCAGAAGAACGTCACCGTCCAGTTTCGCGATTGGAT TTTACGTCAACGTCAAGATGATTTAGATACATTAGGTTTAGGTT TACAAGGCTAAGAGCTC
Ácido nucleico que codifica <i>L. monocytogenes</i> de ActA de longitud	GTGGGATTAAATAGATTTATGCGTGCGATGATGGTAGTTT CATTACTGCCAACTGCATTACGATTAACCCCGACATAATAT TTGCGAGCGACAGATAGCGAAGATTCCAGTCTAAACACAGA TGAATGGGAAGAAGAAAAACAGAAGAGCAGCCAAGCGA GGTAAATACGGGACCAAGATACGAAACTGCACGTGAAGTA AGTTCACGTGATATTGAGGAAC TAGAAAAATCGAATAAAG

completa 10403S. (SEQ ID NO:37)	TGAAAAATACGAACAAAGCAGACCTAATAGCAATGTTGAA AGCAAAAGCAGAGAAAGGTCCGAATAACAATAACAAC GGTGAGCAAACAGGAAATGTGGCTATAAATGAAGAGGCTTC AGGAGTCGACCGACCAACTCTGCAAGTGGAGCGTCGTCATC CAGGTCTGTTCATCGGATAGCGCAGCGGAAATTAAGAAAGA AGAAAAGCCATAGCGTCGTGCGATAGTGAGCTTGAAAGCCT TACTTATCCAGATAAAACCAACAAAGCAAATAAGAGAAAAG TGCGGAAAGAGTCAGTTGTGGATGCTTCTGAAAGTGACTTAG ATTCTAGCATGCAGTCAGCAGACGAGTCTACACCACAACCTT TAAAAGCAAATCAAAAACCATTTTTCCCTAAAGTATTTAAAA AAATAAAAGATGCGGGGAAATGGGTACGTGATAAAATCGAC GAAAATCCTGAAGTAAAGAAAGCGATTGTTGATAAAAGTGC AGGGTTAATTGACCAATTATTAACCAAAAAGAAAAGTGAAG AGGTAATGCTTCGGACTTCCCGCCACCACCTACGGATGAAG AGTTAAGACTTGCTTTGCGCAGAGACACCGATGCTTCTCGGTTT TAATGCTCCTACTCCATCGGAACCGAGCTCATTGCAATTTCCG CCGCCACCTACGGATGAAGAGTTAAGACTTGCTTTGCCAGAG ACGCCAATGCTTCTTGGTTTAAATGCTCCTGCTACATCGGAAC CGAGCTCATTCGAATTTCCACCGCCTCCAACAGAAGATGAAC TAGAAATTAATGCGGGAAACAGCACCTTCGCTAGATTCTAGTT TTACAAGCGGGGATTTAGCTAGTTTGAGAAGTGCTATTAATC GCCATAGCGAAAATTTCTCTGATTTCCCACTAATCCCAACAG AAGAAGAGTTGAACGGGAGAGGCGGTAGACCAACATCTGAA GAATTTAGTTTCGCTGAATAGTGGTGATTTTACAGATGACGAA AACAGCGAGACAACAGAAGAAGAAATTGATCGCCTAGCTGA TTTAAGAGATAGAGGAACAGGAAAACACTCAAGAAATGCGG GTTTTTTTACCATTAAATCCATTTATTAGTAGCCCTGTTCCTTCA TTAACTCCAAAGGTACCGAAAATAAGCGCGCGCGCTCTGATA AGTGACATAACTAAAAAAGCGCCATTTAAGAATCCATCACAG CCATTAAATGTGTTTAAATAAAAAAACTACAACGAAAACAGTG ACTAAAAAACCACCCCTGTAAAGACCGCACCAAAGCTAGCA GAACTTCTTGCCACAAAACCACAAGAAACCGTACTTAGGGAA AATAAAACACCCCTTTATAGAAAAACAAGCAGAAACAAACAAG CAGTCAATCAATATGCCGAGCCTACCAGTAATCCAAAAAGAA GCTACAGAGAGCGATAAAGAGGAAATGAAACCACAAACCGA GGAAAAAATGGTAGAGGAAAGCGAATCAGCTAATAACGCAA ACGGAAAAAATCGTTCTGCTGGCATTGAAGAAGGAAAACTAA TTGCTAAAAGTGCAGAAAGACGAAAAAGCGAAGGAAGAACCA GGGAACCATACGACGTTAATTCTTGCAATGTTAGCTA TTGGCGTGTTCTCTTTAGGGGCGTTTATCAAAATTATT CAATTAAGAAAAAATAATTAA
Polipéptido ActA de <i>L. monocytogenes</i> 10403S. (SEQ ID NO:38) (secuencia de aminoácidos pronostica si no está en terminal N cuando se expresa en <i>Listeria</i>).	VGLNRFMRAMVVFITANCITINPDIIFAATDSEDSSLNTDEWEEKE EEQPSEVNTGPRYETAREVSSRDIEELEKSNKVNTNKADLIAMLKAK AEKGPNNNNNGEQTNVAINEEASGVDRPTLQVERRHPGLSSDSAAE IKKRRKAIASSDSELESLTYPDKPTKANKRKVAKESVVDASESDLSS MQSADESTPQPLKANQKPFPPKVFKKIKDAGKWVRDKIDENPEVKKAI VDKSAGLIDQLLTKKKSEEVNASDFPPPTDEELRLALPETPMLLGFN APTPSEPSSFEPFPPTDEELRLALPETPMLLGFNAPATSEPSSFEPF PPTEDELEIMRETAPSLDSSFTSGDLASLRSAINRHSENFSDFLIP TEEEINGRGGRPTSEEFSSLNSGDFTDENSETTEEEIDRLADLRDRG TGKHSRNAGFLPLNPFISSPVPSLTPKVPKISAPALISDITKKAPFKN PSQPLNVFNKKT'TTKTVTKKPTPVKTA PKLAELPATKPQETVLRENKT PFIEKQAE TNKQ SINMPSLPVIOKEATESDKEEMKPQTEEMVEESES ANNANGKNRSAGIEEGKLIAKSAEDEKAKEEPPGNHTTILAMLAIGVF SLGAFIKIIQLRKNN

Polipéptido ActA de <i>L. monocytogenes</i> 10403S. (SEQ ID NO:152)	MGLNRFMRAMMVVFITANCITINPDIIFAATDSEDSSLNTDEWEEEEKT EEQPSEVNTGPRYETAREVSSRDIEELEKSNKVKNTNKADLIAMLKAK AEKGPNNNNNNGEQTGNVAINEEASGVDRPTLQVERRHPGLSSDSAAE IKKRRKAIASSDSELESALTYPDKPTKANKRKVAKESVVDASESDLSS MQSADESTPQPLKANQKPFPPKVFKKIKDAGKWVRDKIDENPEVKKAI VDKSAGLIDQLLTKKKSEEVNASDFPPPPTDEELRLALPETPMLLGFN APTPSEPSSEFFPPPPTDEELRLALPETPMLLGFNAPATSEPSSEFFP
(Secuencia de aminoácidos actual cuando se expresa en <i>Listeria</i>. A pesar de que la secuencia codificadora contiene un codón de valina en la terminal N, la <i>Listeria</i> actualmente biosintetiza un polipéptido que inicia con metionina, no valina).	PPPTEDELEIMRETAPSLDSSFTSGDLASLRSAINRHSNFSDFLIP TEELNNGRGGRPSTSEEFSSLSNGDFTDDENSETTEEEIDRLADLRDRG TGKHSRNAGFLPLNPFISSPVPSLTPKVPKISAPALISDITKKAPFKN PSQPLNVFNKKTTKTVTKKPTPVKTAPKLAELPATKPQETVLRENKT PFIEKQAEINQKQINMPSLPVIQKEATESDKEEMKPQTEEKMVEESES ANNANGKNRSAGIEEGKLIKSAEDEKAKEEPGNHTTLILAMLAIGVF SLGAFIKIQLRKNN
Ácido nucleico que codifica fragmento ActA-N100 utilizado en nuestras construcciones, incluyendo los sitios de enzima de restricción y promotor (sitio KpnI y sitio BamHI subrayados, secuencia promotor en minúsculas, secuencia N100 ORF en MAYÚSCULAS). (SEQ ID NO:39)	<u>Ggtacccgggaagcagttgggggttaactgattaacaaatgtagagaaa</u> <u>Aattaattctccaagtgatattcttaaaaataattcatgaatattttt</u> <u>Cttatattagctaattaagaagataattaactgctaattccaattttta</u> <u>Acggaataaaattagtgaaaaatgaaggccgaattttccttggtctaaaa</u> <u>AggttgatttagcgtatcacgaggaggaggtataaGTGGGATTAATA</u> <u>GATTTATGCGTGCGATGATGGTAGTTTTCTACTGCCAACTGCATTA</u> <u>CGATTAACCCCGACATAATATTTGCAGCGACAGATAGCGAAGATTCCA</u> <u>GTCTAAACACAGATGAATGGGAAGAAGAAAAACAGAAGAGCAGCCAA</u> <u>GCGAGGTAAATACGGGACCAAGATACGAAACTGCACGTGAAGTAAGTT</u> <u>CACGTGATATTGAGGAAGTAGAAAAATCGAATAAAGTAAAAATACGA</u> <u>ACAAAGCAGACCTAATAGCAATGTTGAAAGCAAAAGCAGAGAAAGGT</u> <u>ggatcc</u>
Secuencia de aminoácidos de ActA-N100. (SEQ ID NO:40) (secuencia de aminoácidos pronosticada si no está en la terminal N cuando se expresa en <i>Listeria</i>)	VGLNRFMRAMMVVFITANCITINPDIIFAATDSEDSS LNTDEWEEEEKTEEQPSEVNTGPRYETAREVSSRDIEE LEKSNKVKNTNKADLIAMLKAKAEGK
Secuencia de aminoácidos de ActA-N100. (SEQ ID NO:153) (secuencia de aminoácidos cuando se expresa en <i>Listeria</i>. El ácido nucleico que codifica ActA-N100 contiene un codón de valina en la terminal N, pero la <i>Listeria</i> actualmente biosintetiza un polipéptido que comienza con metionina, no valina).	MGLNRFMRAMMVVFITANCITINPDIIFAATDSEDSS LNTDEWEEEEKTEEQPSEVNTGPRYETAREVSSRDIEE LEKSNKVKNTNKADLIAMLKAKAEGK

Secuencia de aminoácidos de proteína de fusión de ActA-N100 con mesotelina humana (ss suprimido; GPI suprimido). El sitio <i>Bam</i>HI agrega dos aminoácidos (<u>GS</u>). (SEQ ID NO:41)	VGLNRFMRAMMVVFITANCITINPDIIFAATDSEDSSLNTDEWEE EKTEEQPSVNTGPRYETAREVSSRDIEELEKSNKVNTNKADLI AMLKAKAEK<u>GS</u>SRTLAGETGQEAAPLDGVLTNPPNISSLSPRQLL GFPCAIEVSGLSTERVRELAVALAQKNVKLSTEQLRCLAHRLSEPP EDLDALPLDLLLFLNPDAFSGPQACTRFFSRITKANVDLLPRGA PERQRLLPAAALACWGVRSLLSEADVRLGGLACDLPGRFVAES AEVLLPRLVSCPGPLDQDQQAARAALQGGGPPYPGPSTWSVST MDALRGLLPVLGQPIIRSI PQGIVA AWRQRSSRDPSWRQPRTI LRPRFRREVEKTACPSGKKAREIDESLIFYKKWELEACVDAALL ATQMDRVNAIPFTYEQLDVLKHKLDELYPQGY P ES VIQHLGYLF LKMSPEDIRKWNVTSL ETLKALLEVNKGHEMSPQVATLIDRFVK GRGQLDKDTLDTLTAFYPGYLC SLSP EELSSVP PSSIWA V RPD LDTCDPRQLDVLYPKARLAFQNMNGSEYFVKIQSFLGGAPTEDL KALSQQNVSMDLATFMKLRTDAVLPLTVAEVQKLLGPHVEGLKA EERHRPVRDWILRQRQDDLDLTLGLGLQG
Secuencia de aminoácidos de proteína de fusión de ActA-N100 con mesotelina humana (ss suprimido; GPI suprimido). (SEQ ID NO:154: (Secuencia de aminoácidos actual cuando se expresa en <i>Listeria</i>. El ácido nucleico que codifica ActA-N100, o una proteína de fusión del mismo, contiene un codón válido en la terminal N, pero la <i>Listeria</i> actualmente biosintetiza un polipéptido que comienza con metionina, no valina). El sitio <i>Bam</i>HI agrega dos aminoácidos (<u>GS</u>).	MGLNRFMRAMMVVFITANCITINPDIIFAATDSEDSSLNTDEWEE EKTEEQPSVNTGPRYETAREVSSRDIEELEKSNKVNTNKADLI AMLKAKAEK<u>GS</u>SRTLAGETGQEAAPLDGVLTNPPNISSLSPRQLL GFPCAIEVSGLSTERVRELAVALAQKNVKLSTEQLRCLAHRLSEPP EDLDALPLDLLLFLNPDAFSGPQACTRFFSRITKANVDLLPRGA PERQRLLPAAALACWGVRSLLSEADVRLGGLACDLPGRFVAES AEVLLPRLVSCPGPLDQDQQAARAALQGGGPPYPGPSTWSVST MDALRGLLPVLGQPIIRSI PQGIVA AWRQRSSRDPSWRQPRTI LRPRFRREVEKTACPSGKKAREIDESLIFYKKWELEACVDAALL ATQMDRVNAIPFTYEQLDVLKHKLDELYPQGY P ES VIQHLGYLF LKMSPEDIRKWNVTSL ETLKALLEVNKGHEMSPQVATLIDRFVK GRGQLDKDTLDTLTAFYPGYLC SLSP EELSSVP PSSIWA V RPD LDTCDPRQLDVLYPKARLAFQNMNGSEYFVKIQSFLGGAPTEDL KALSQQNVSMDLATFMKLRTDAVLPLTVAEVQKLLGPHVEGLKA EERHRPVRDWILRQRQDDLDLTLGLGLQG
Secuencia de ácido nucleico de 12ras. (SEQ ID NO:42)	GCATGACAGAATATAAATTAGTTGTAGTTGGTGCAGATGGTGTGGTAAAGTGCATTAACAATTC AATAA
Secuencia de aminoácidos de 12ras (SEQ ID NO:43)	AMTEYKLVVVGADGVGKSALTIQLIQ

Ácido nucleico de proteína de fusión de ActA-N100 con mesotelina humana optimizada por codón (SS suprimida; GPI suprimida) y 12ras. se fusiona al extremo 3' de mesotelina (suprimida en SS; suprimida en GPI). La construcción de fusión mesotelina-ras se optimiza por codón y se clona (como un fragmento *Bam*-*H*I-*S*acI) corriente abajo de la pareja de proteína de fusión ActA-N100. Los nucleótidos **EN NEGRITAS** indican los sitios de restricción. *Bam*HI es GGATCC. *Sac*I es GAGCTG. (SEQ ID NO:44)

GTGGGATTAAATAGATTTATGCGTGCGATGATGGTAGTTTTTCATT
CTGCCAACTGCATTACGATTAACCCCGACATAATATTTGCAGCGAC
AGATAGCGAAGATTCCAGTCTAAACACAGATGAATGGGAAGAAGAA
AAAACAGAAGAGCAGCCAAGCGAGGTAAATACGGGACCAAGATACG
AAACTGCACGTGAAGTAAGTTCACGTGATATTGAGGAAC TAGAAAA
ATCGAATAAAAGTGA AAAATACGAACAAAGCAGACCTAATAGCAATG
TTGAAAGCAAAAGCAGAGAAAGGT**GGATCC**CGTACATTAGCAGGTG
AAACAGGTCAAGAAGCAGCACCACCTTGACGGTGTATTAACGAATCC
ACCAAATATATCAAGTTTAAAGTCCACGTCAATTATTAGGTTTTCCA
TGTCAGAAAGTTTCAGGTTTAAAGTACAGAACGTGTCCGTGAGTTAG
CAGTTGCATTAGCACAAAAAACGTTAAATTATCTACAGAACAGTT
ACGTTGTTTAGCCCATAGATTAAGCGAACCCAGAAAGACTTAGAT
GCACCTTCCTTTAGACCTTCTTTTATTCTTAAATCCAGATGCATTTT
CAGGACCACAAGCATGTACACGTTTTTTTAGTTCGAATTACAAAAGC
CAATGTTGATTTATTACCTCGTGGGGCTCCTGAAAGACAACGTTTAA
TTACCTGCTGCATTAGCATGCTGGGGTGTTCGCGGTAGCTTATTAA
GTGAAGCCGATGTTTCGTGCTTTAGGGGGTTTAGCATGTGATTTACC
TGGTCGTTTCGTGTCAGAAATCAGCAGAAAGTGTATTACCGAGATT
GTTTCATGCCCAGGACCTTTAGATCAAGATCAACAAGAGGCAGCTA
GAGCAGCTCTTCAAGGAGGAGGCCCCACCATATGGCCCCACCAAGTAC
ATGGAGTGTTTCTACAATGGATGCGTTAAGAGGTTTATTACCGGTT
TTAGGACAACCAATTATTCGTAGTATTCACAAAGGCTATTGTAGCAG
CATGGCGTCAACGTAGTTCTCGTGATCCGTCTTGGCGACAACCAGA
ACGTACAATTCTACGTCCAAGATTTTCGTAGAGAAAGTAGAAAAAACG
GCGTGTCTTAGTGGCAAAAAGCACGTGAAATTGATGAAAGTTTAA
TTTTTTATAAAAAATGGGAATTAGAAGCATGTGTGCATGCAGCATT
ACTAGCTACACAAATGGATCGTGTAAATGCTATTCCATTACATAT
GAACAATTAGATGTTTTTAAAGCATAAAATTAGACGAATTATATCCAC
AAGGTTATCCAGAATCAGTTATTCAACATTTAGGTTACTTATTTTTT
AAAAATGAGTCCAGAAGACATACGCAAAATGGAATGTTACAAGTTTA
GAAACATTAAAAGCGCTTTTAGAAGTTAACAAAGGTCATGAAATGA
GTCCACAAGTTGCTACGTTAATTGATAGATTTCGTTAAAGGCCGTGG
TCAATTAGATAAAGATACTTTAGATACATTAACAGCATTTTATCCT
GGCTACTTATGCAGTTTATCACCAGAAGAATTAAGTTCGGTTCCAC
CGAGTAGTATCTGGGCAGTTTCGTCCGCAAGATTTAGATACATGCGA
CCCACGTCAATTAGATGTTTTATATCCAAAAGCAAGATTAGCTTTC
CAAAATATGAACGGTAGTGAATATTTTCGTAAAAATTCAATCCTTTT
TAGGTGGTGCACCAACTGAAGATCTAAAAGCATTAAAGCCAACAAAA

TGTAAGTATGGATTTAGCTACGTTTATGAAATTACGTACAGATGCA
GTTCTACCATTAACAGTTGCAGAAGTTCAAAAATTATTAGGTCCAC
ACGTAGAAGGATTAAAAGCAGAAGAACGTCACCGTCCAGTTTCGCGA
TTGGATTTTACGTCAACGTCAAGATGATTTAGATACATTAGGTTTAA
GGTTTACAAGCGCCCATGACAGAATATAAATTAGTTGTAGTTGGTG
CAGATGGTGTGGTAAAAGTGCATTAACAATTCAATTAATTCAATA
ATTAATTAAGAGCTC

Proteína de fusión de ActA-N100 con mesotelina humana (SS suprimida; GPI suprimida) y 12ras. El sitio <i>Bam</i>HI agrega dos aminoácidos (<u>GS</u>). (SEQ ID NO:45)	VGLNRFMRAMMVVFITANCITINPDIIFAATDSEDSSL NTDEWEEEEKTEEQPSEVNTGPRYETAREVSSRDIEELE KSNKVKNTNKADLIAMLKAKAEK<u>GS</u>RTLAGE TQGEAA PLDGVL TNPPNISSLSPRQLLGFPCA EVSGLSTERVRE LAVALAQKNVKLSTEQLRCLAHRLSEPPEDLDALPLDL LLFLNPDAFSGPQACTRFFSRITKANVDLLPRGAPERQ RLLPAALACWGVRSLLSEADVRLGGLACDLPGRFVA ESAEVLLPRLVSCPGPLDQDQGEAARAALQGGGPPYGP PSTWSVSTMDALRGLLPVLGQPIIRSIPQGIVA AWRQR SSRDPSWRQPERTILRPRFRREVEKTACPSGKKAREID ESLIFYKKWELEACVDAALLATQMDRVNAIPFTYEQLD VLKHKLD ELYPQGYPESVIOHLGYLFLKMSPEDIRKWN VTSLET LKALLEVNKGHEMSPQVATLIDRFVKGRGQLD KDTLDTLTAFYPGYLCSLSPEELSSVPPSSIWAVRPQD LDTCDPRQLDVLYPKARLAFQNMNGSEYFVKIQSFLGG APTEDLKALSQQNVSM DLATFMKLRTDAVLPLTVAEVQ KLLGPHVEGLKAEERHRPVRDWILRQRQDDLDTLGLGL QGAMTEYKLVVVGADGVGKSALTIQLIQ
Proteína de fusión de ActA-N100 con mesotelina humana (SS suprimida; GPI suprimida) y 12ras. (SEQ ID NO:155) (Secuencia de aminoácidos actual cuando se expresa en <i>Listeria</i>. El ácido nucleico que codifica ActA-N100, o una proteína de fusión del mismo, contiene un codón de valina en la terminal N, pero la <i>Listeria</i> actualmente biosintetiza un polipéptido que comienza con la metionina, no valina). El sitio <i>Bam</i>HI agrega dos aminoácidos (<u>GS</u>).	MGLNRFMRAMMVVFITANCITINPDIIFAATDSEDSSL NTDEWEEEEKTEEQPSEVNTGPRYETAREVSSRDIEELE KSNKVKNTNKADLIAMLKAKAEK<u>GS</u>RTLAGE TQGEAA PLDGVL TNPPNISSLSPRQLLGFPCA EVSGLSTERVRE LAVALAQKNVKLSTEQLRCLAHRLSEPPEDLDALPLDL LLFLNPDAFSGPQACTRFFSRITKANVDLLPRGAPERQ RLLPAALACWGVRSLLSEADVRLGGLACDLPGRFVA ESAEVLLPRLVSCPGPLDQDQGEAARAALQGGGPPYGP PSTWSVSTMDALRGLLPVLGQPIIRSIPQGIVA AWRQR SSRDPSWRQPERTILRPRFRREVEKTACPSGKKAREID ESLIFYKKWELEACVDAALLATQMDRVNAIPFTYEQLD VLKHKLD ELYPQGYPESVIOHLGYLFLKMSPEDIRKWN VTSLET LKALLEVNKGHEMSPQVATLIDRFVKGRGQLD KDTLDTLTAFYPGYLCSLSPEELSSVPPSSIWAVRPQD LDTCDPRQLDVLYPKARLAFQNMNGSEYFVKIQSFLGG APTEDLKALSQQNVSM DLATFMKLRTDAVLPLTVAEVQ KLLGPHVEGLKAEERHRPVRDWILRQRQDDLDTLGLGL QGAMTEYKLVVVGADGVGKSALTIQLIQ

Promotor ActA y secuencia codificadora ActA-N100:N100 es nativa. Los antígenos de tumor se insertan en el sitio BamHI (<u>GGATCC</u>). (SEQ ID NO:46)	AAGCTTGGGAAGCAGTTGGGGTAACTGATTAACAAATGTTAGAGAAAAA TTAATTCCTCCAAGTGATATTCTTAAAAATAATTCATGAATATTTTCTTA TATTAGCTAATTAAGAAGATAATTAAGTCTAATCCAATTTTAACGGAA TAAATTAGTGAATGAAGGCCGAATTTCTTGTCTAAAAAGGTTGTA TTAGCGTATCAGAGGAGGAGTATAAGTGGGATTAATAGATTATGCG TGCGATGATGGTAGTTTTCATTACTGCCAACTGCATTACGATTAACCCG ACATAATATTTGCAGCGACAGATAGCGAAGATTCCAGTCTAAACACAGAT GAATGGGAAGAAGAAAAACAGAAGAGCAGCCAAGCGAGGTAAATACGGG ACCAAGATACGAACTGCACGTGAAGTAAGTTCACGTGATATTGAGGAAC TAGAAAAATCGAATAAAGTAAAAATACGAACAAAGCAGACCTAATAGCA ATGTTGAAAGCAAAAGCAGAGAAAGGT<u>GGATCC</u>
Secuencia de aminoácidos de ActAN100:el sitio BamHI agrega dos aminoácidos (GS). (SEQ ID NO:47) (Secuencia de aminoácidos pronosticada si no está en la terminal N cuando se expresa en <i>Listeria</i>).	VGLNRFMRAMMVVFITANCITINPDIIFAATDSEDSSLNTDEWEEK TEEQPSEVNTGPRYETAREVSSRDIEELEKSNKVNTNKADLIAMLK AKAEKGGS
La secuencia de aminoácidos de ActAN100:el sitio BamHI agrega dos aminoácidos (GS). (SEQ ID NO:156) (Secuencia de aminoácidos actual cuando se expresa en <i>Listeria</i>, ya que la <i>Listeria</i> actualmente biosintetiza un polipéptido que inicia con metionina, no valina.)	MGLNRFMRAMMVVFITANCITINPDIIFAATDSEDSSLNTDEWEEK TEEQPSEVNTGPRYETAREVSSRDIEELEKSNKVNTNKADLIAMLK AKAEKGGS

Secuencia de ácido nucleico de la proteína de fusión de ActA-N100 con mesotelina humana (codón optimizado, SS suprimido). El sitio <i>BamHI</i> agrega dos aminoácidos (GS). (SEQ ID NO:158)	GTGGGATTAAATAGATTATGCGTGCGATGATGGTAGTTTTCATTACTGC CAACTGCATTACGATTAAACCCGACATAATATTTGCAGCGACAGATAGCG AAGATTCCAGTCTAAACACAGATGAATGGGAAGAGAAAAACAGAGAG CAGCCAAGCGAGGTAAATACGGGACCAAGATACGAAATGCACGTGAAGT AAGTTCACGTGATATTGAGGAAC TAGAAAAATCGAATAAAGTGAAAAATA CGAACAAAGCAGACCTAATAGCAATGTTGAAAGCAAAAGCAGAGAAAGGT GGATCCCGTACATTAGCAGGTGAAACAGGTCAAGAAGCAGCACCATTGA CGGTGTATTAACGAATCCACCAAATATATCAAGTTTAAGTCCACGTCAAT TATTAGGTTTTCCATGTGCAGAGTTTCAGGTTTAAGTACAGAACGTGTC CGTGAGTTAGCAGTTGCATTAGCACAAAAAACGTTAAATATCTACAGA ACAGTTACGTTGTTTAGCCCATAGATTAAGCGAACACCAGAAGACTTAG ATGCACCTCCCTTAGACCTTCTTTTATTCTTAAATCCAGATGCATTTTCA GGACCACAAGCATGTACACGTTTTTTTAGTCCAATTACAAAAGCCAAATG TGATTTATTACCTCGTGGGGCTCCTGAAAGCAACGTTTATTACCTGCTG CATTAGCATGCTGGGGGTGTCGCGGTAGCTTATTAAGTGAAGCCGATGTT CGTGCTTTAGGGGGTTTAGCATGTGATTTACCTGGTCTTTCGTTGCAGA ATCAGCAGAAGTGTTATTACCGAGATTAGTTTCATGCCAGGACCTTTAG ATCAAGATCAACAAGAGGCAGCTAGAGCAGCTCTTCAAGGAGGAGGCCCA CCATATGGCCCCACCAAGTACATGGAGTGTTTCTACAATGGATGCGTTAAG AGGTTTATTACCGGTTTTAGGACAACCAATTATTCGTAGTATTCCACAAG GCATGTAGCAGCATGGCGTCAACGTAGTTCTCGTGATCCGCTCTTGCCGA CAACCAGAACGTACAATTCTACGTCCAAGATTTCTGTAGAGAAGTAGAAAA AACGGCGTGCTCTAGTGGCAAAAAGCAGCTGAAATTTGATGAAAGTTTAA TTTTTTATAAAAAATGGGAATTAGAACCATGTGTCGATGCAGCATTTACTA GCTACACAAATGGATCGTGTTAATGCTATTCCATTACATATGAACAATT AGATGTTTTTAAAGCATAAATTAGACGAATTATATCCACAAGGTTATCCAG AATCAGTTATTCAACATTTAGGTTACTTATTTTTTAAAAATGAGTCCAGAA GACATACGCAAAATGGAATGTTACAAGTTTAGAAACATTAAAAGCGCTTTT AGAAGTTAACAAAGGTCATGAAATGAGTCCACAAGTTGCTACGTTAATTG ATAGATTTCGTTAAAGGCCGTGGTCAATTAGATAAAGATACTTTTAGATACA TTAACAGCATTTTATCCTGGCTACTTATGCAGTTTATCACACAGAAGAATT AAGTTCGGTTCCACCGAGTAGTATCTGGGCAGTTCTCGTCCGAAGATTTAG ATACATGCGACCCACGTCAATTAGATGTTTTTATATCCAAAAGCAAGATTA GCTTTCCAAAATATGAACGGTAGTGAATATTTCTGTAAAAATTCATCCTT TTTAGGTGGTGACCAACTGAAGATCTAAAAGCATTAAGCCAACAAAATG TAAGTATGGATTAGCTACGTTTATGAAATTACGTACAGATGCAGTTCTTA CCATTAACAGTTGCAGAAAGTTCAAAAATTATAGGTCCACACGTAGAAGG ATTAAAAGCAGAAGAAGTCAACCGTCCAGTTCCGCGATTGGATTTTACGTC AACGTCAAGATGATTTAGATACATTAGGTTTAGGTTTACAAGGCGGTATT CCGAATGGATATTAGTGTTAGATTATTCGGTTCAAGAGCATTAAGTGG TACACCGTGTTTATTAGGTCCAGGTCCAGTTTAAACAGTGTTAGCATTTAT TATTAGCCAGTACATTAGCT
Secuencia de aminoácidos de proteína de fusión de ActA-N100 con mesotelina humana (codón optimizado, SS suprimida). El sitio <i>BamHI</i> agrega dos aminoácidos (GS): (SEQ ID NO:159) (Secuencia de aminoácidos actual cuando se expresa en <i>Listeria</i>, ya que <i>Listeria</i> actualmente biosintetiza un polipéptido que inicia con metionina, no valina.)	MGLNRFMRAMMVVFITANCITINPDIIFAATDSEDSSLNTDEWEEEEKTEE QPSEVNTGPRYETAREVSSRDIEELEKSNKVKNTNKAADLIAMLKAKAEKG GSRLAGETGQEAAPLDGVLNPPNIISSLSRQLLGFPFCAEVSGLSTERV RELAVALAQKNVRLSTEQLRCLAHRLSEPPEDLDALPLDLLFLNPDASF GPQACTRFFSRITKANVDLLPRGAPERQRLLPALACWGVRSLLSEADV RALGGLACDLPGRFVAESAELVLLPRLVSCPGPLDQDQEAARAALQGGGP PYGPPSTWSVSTMDALRGLLPVLGQPIIRSIPOGIVAAWRQRSSRDPSWR QPERTILRPRFRREVEKTACPSGKKAREIDESLIFYKKWELEACVDAALL ATQMDRVNAIPFTYQLDVLKHLDELYPQGPESVIQHLGYLFLKMSPE DIRKWNVTSLKLELVNKGHEMSPQVATLIDRFVKGRLDQDKDTLDT LTAFTYFPGYLCSLSPHEELSSVPPSSIWAVRPQDLDTCDPRLQDLVLYPKARL AFQNMNGSEYFVKIQSFLGGAPTEDLKALSQQNVSMDLATFMKLRTDAVL PLTVAEVQKLLGPHVEGLKAEERHRPVRDWILRQRQDLDLTLGLGLQGGI PNGYLVLDLSVQEAALSGTPCLLGFGPVLTVLALLLASTLA

EJEMPLO V. Bloques de construcción utilizados para ensamblar las proteínas de fusión de listeriolisina (LLO; gen hly).

Ácido nucleico de Estructura de Lectura abierta LLO (ORF) de <i>Listeria</i> tipo silvestre 10403S. (SEQ ID NO:48)	<pre> Atgaaaaaaaaataatgctagttttttattacacttatattagtttagtctt Ccaattgcgcaacaaactgaagcaaaggatgcatctgcattcaataaa Gaaaattcaattttcatccatggcaccaccagcatctccgcctgcaagt Cctaagagcgcaaatcgaaaagaaacacgcggatgaaatcgataagtat Atacaaggattggattacaataaaaaacaatgtattagttataccacgg Agatgcagtgacaaatgtgcccgaagaaaaggttacaaagatggaa Atgaatatattgtttgtggagaaaaagaagaaatccatcaatcaaaat Aatgcagacattcaagttgtgaatgcaatttcgagcctaacctatcc Aggtgctctcgtaaaagcgaattcgggaattagtagaaaaatcaaccag Atgttctccctgtaaaacgtgattcattaacactcagcattgatttg CcaggtatgActAatcaagacaataaaaatcgttgtaaaaaatgccac Taaatcaaacgtttaacaacgcagtaaatacattagtggaagatggga Atgaaaaatatgctcaagcttatccaaatgtaagtgcaaaaattgat Tatgatgacgaaatggcttacagtgaaatcacaattaattgcgaaatt Tggtacagcatttaaaagctgtaataatagcttgaaatgtaaaacttcg Gcgcaatcagtgaaagggaatgcaagaagaagtcattagtttttaa CaaatttActAtaacgtgaatgttaatgaacctacaagaccttccag AttttccggcaaaagctgttActAaagagcagttgcaagcgcttggag Tgaatgcagaaaaatcctcctgcatatatctcaagtgtggcgatggc CgtcaagttttttgaaattatcaActAattcccatagtActAaagt Aaaagctgcttttgatgctgccgtaagcggaaaaatctgtctcaggtg AtgtagaActAacaaatatcatcaaaaattcttcttcaaaagccgtg Atttacggagggttcgcgaagatgaagttcaaatcatcgacggcaa Cctcggagacttacgcgatattttgaaaaaaggcgctacttttaatc Gagaaacaccaggagttcccatgtgttatatacaaaaacttcttaaaa Gacaatgaattagctgtttttaaaaacaactcagaatatattgaaac Aacttcaaaaagcttatacagatggaaaaattaacatcgatcactctg Gaggatacgttgctcaattcaacatttcttgggatgaagtaattat Gatcctgaaggtaacgaaattgttcaacataaaaaactggagcgaaaa Caataaaagcaagctagctcatttcacatcgctccatctatttgctg Gtaacgcgagaaatattaatgtttacgctaaagaatgcaactgggtta Gcttgggaatgggtggagaacggtaattgatgaccggaacttaccact Tgtgaaaaatagaaatatctccatctggggcaccacgctttatccga Aatatagtaataaaagtagataatccaatcgaataa </pre>

Codón optimizado LLO (GGATCC es un sitio BamHI agregado en el extremo 3' para fusiones en estructura). (SEQ ID NO:49)	Atgaaaaaaaaataatgctagctctttattacattaatttttagtaagtctaccaatt gca Caacaaaccgaagctaagatgcatcagcgttcaacaagaaaattcaattagt tca Atggccccaccagcttctccaccagcatctccaaaaacaccaattgaaaaaaaa cat Gcagacgaaattgataaatatattcaagggttagattacaataagaataacgtt tta Gtataccacggcgcagtaacaaatgtacctccaagaaaaggctataaagac gga Aatgaatatattgtgttgtaaaaaaaaaaagaaatctattaatcaaaacaatgcc gac Atccaagtagttaacgcgatttagctcattgacgtatccaggcgcccttgtaaaa gct Aactctgaattagtggaaaatcaaccagacgtacttccagtcacaaactgtagt cta Accttaagtattgatttaccaggaatgacaaatcaagataacaaaattgttgtt aaa AatgcaActAaatccaatgtaataatgcagttaacacattagtagaacgtagg aac Gaaaaatacgcacaggcatacccaaatgtatcagctaaaattgattacgcagac gaa Atggcctactcagaaagtcaattaattgctaaatttggtacagcattcaaagca gtc Aataatagtttaaatgtaaattttggagcgcattctgaaggaaagatgcaggaa gaa Gtaatttcattcaacaattttattataatgttaacgtaaatgaaccaaccgct cct TcccgcttctttggcaagcagttActAaagaacaattacaagcActAggtgtg aat Gcagaaaaaccaccggcatatatttcaagcgtcgcttacggacgacaagtttac tta Aaattatctacaacagtcattagtaaaaagtaaaagcagcattcgatgcagct gtg Tcaggaaaatcagtttagtgagatgtagaattaaccaatattattaaaaattcg agt Tttaaagctgttatttatggaggttctgcaaaagatgaagtacaaattattgac gga Aacttaggcgattttacgtgacattttaaaaaaaggcgcaacatttaataagagaa aca CcaggggttccaattgcttatacaActAattttcttaagataatgaacttgca gta Attaaaaacaattcagaatacattgaaacaacttcgaaagcatatacagacgga aaa Attaatatgatcactcaggagggtacgttgacacaatttaattagttgggat gaa GtaaActAtgatccagaaggcaatgaaattgtacaacataaaaattggctctgaa aat AacaaatctaaActAgcacactttaccagttctatctatttaccaggaaatgct cgc AatattaatgtttacgcaaaagaatgtaccggatttagcatgggaaTGGTGGcgc aca Gttattgacgaccgcaatcttctctagtaaaaaacagaaacatcagcatttgg gga acaacgctttatccgaaatacagtaataaagttgataatccaattgaa GGATCC
--	---

Una variación de mutante en codón optimizado LLO (a medida que una fusión translacional – GGATCC es un sitio BamHI agregado en el extremo 3' para fusiones en estructura; variación de mutante es en CAPS, cambia TGGTGG a TTTTTT, aminoácido cambia WW a FF). (SEQ ID NO:50)	Atgaaaaaataatgctagctctttattacattaattttagtaagtctaccaatt gc Acaacaaaccgaagctaaagatgcatcagcggttcaacaaagaaattcaattag tt Caatggccccaccagcttctccaccagcatctccaaaaacaccaattgaaaaa aa Catgcagacgaaattgataaatatattcaaggttttagattacaataagaataac gt Acggaaatgaatatattgttgttgaaaaaaaagaaatctattaatcaaaaaca at Gccgacatccaagtagttaacgcatgattagctcattgacgtatccaggcgccctt gt Aaaagctaactctgaattagtggaatcaaccagacgtacttccagtcaaacg tg Atagtctaaccttaagtattgatttaccaggaatgacaaatcaagataacaaaa tt GttgttaaaaatgcaActAaatccaatgtaataatgcagtttaacacattagta ga Acgatggaacgaaaaatcgcacaggcatacccaaatgtatcagctaaaattga tt Acgacgacgaaatggcctactcagaaagtcaattaattgtctaaatttggtag ca Ttcaaagcagtcataatagtttaaatgtaattttggagcgatctctgaagga aa Gatgcaggaagaagtaatttcattcaaacaaatttattataatgttaacgtaaa tg AaccaaccgctccttcccgtttcttttgcaagcagttActAagaacaattac aa GcActAggtgtgaatgcagaaaaccacggcatatatttcaagcgtcgcttac gg Acgacaagtttacttaaaattatctacaaacagtcatagtacaaaagtaaaagc ag Cattcgatgcagctgtgtcaggaaaatcagttagtggagatgtagaattaacca at Attattaaaaattcgagtttttaagctgttatttatggaggttctgcaaaagat ga Agtacaaattattgacggaaacttaggcgatttacgtgacattttaaaaaaagg cg CaacatttaatatagagaaacaccagggttccaattgcttatacaActAattttc tt Aaagataatgaacttgcaagtaattaaaaacaattcagaatacattgaaacaact tc Gaaagcatatacagacggaaaaattaatttgatcáctcaggagggtacgttgc ac AatttaattattagttgggatgaagtaaActAtgatccagaaggcaatgaaattg ta CaacataaaaattggtctgaaaataacaaatctaaActAgcacactttaccagt tc Tatctatttaccaggaaatgctcgcaatattaatgttttacgaaaagaatgtac cg GatttagcatgggaaTTTTTcgacagttattgacgaccgcaatcttctctag ta Aaaaacagaaacatcagcatttggggaacaacgctttatccgaaatacagtaat aa agttgataatccaattgaa GGATCC
Ácido nucleico de LLO59 (codón no optimizado). (SEQ ID NO:51)	ATGAAAAAATAATGCTAGTTTTTATTACACTTATATT AGTTAGTCTACCAATTGCGCAACAACTGAAGCAAAGG ATGCATCTGCATTCAATAAAGAAAATTCAATTTCATCC ATGGCACCACCAGCATCTCCGCCTGCAAGTCCTAAGAC GCCAATCGAAAAGAAACACGCGGAT

Ácido nucleico de LLO59, codón optimizado para la expresión en <i>Listeria</i>. (SEQ ID NO:52)	ATGAAAAAAAAATTATGTTAGTTTTTTATTACATTAATTTT AGTTAGTTTACCAATTGCACAACAAACAGAAGCAAAAG ATGCAAGTGCATTTAATAAAGAAAAATAGTATTAGTAGT ATGGCACCACCAGCAAGTCCACCAGCAAGTCCAAAAAC ACCAATTGAAAAAAAAACATGCAGAT
Aminoácidos de LLO59. (SEQ ID NO:53)	MKKIMLVFITLILVSLPIAQOTEAKDASAFNKENSISS MAPPASPPASPKTPIEKKHAD
Ácido nucleico de LLO59, codón optimizado para la expresión en <i>Listeria</i>, mesotelina humana con codón optimizado (SS suprimido; GPI suprimido), clonado en estructura con LLO como un fragmento BamHI/SacI. Los sitios de BamHI (GGATCC) y SacI (GAGCTC) se indican en NEGRITAS. Esta construcción puede denominarse: fusión LLOopt59-hMesotelina (SS suprimido; gpi suprimido). (SEQ ID NO:54)	ATGAAAAAAAAATTATGTTAGTTTTTTATTACATTAATTTTAGTTAGTTTA CCAATTGCACAACAAACAGAAGCAAAAGATGCAAGTGCATTTAATAAA GAAAATAGTATTAGTAGTATGGCACCACCAGCAAGTCCACCAGCAAGT CCAAAAACACCAATTGAAAAAAAAACATGCAGATGGATCCCGTACATTA GCAGGTGAAACAGGTCAAGAAGCAGCACCACCTGACGGTGTATTAAACG AATCCACCAATATATCAAGTTTAAAGTCCACGTCAATTATTAGGTTTTT CCATGTGCAGAAGTTTCAGGTTTAAAGTACAGAACGTGTCCTGAGTTA GCAGTTGCATTAGCACAAAAAACGTTAAATTATCTACAGAACAGTTA CGTTGTTTAGCCCATAGATTAAGCGAACCACCAGAAGACTTAGATGCA CTTCCTTTAGACCTTCTTTATTCTTAAATCCAGATGCATTTTTCAGGA CCACAAGCATGTACACGTTTTTTAGTCGAATTACAAAAGCCAATGTT GATTTATTACCTCGTGGGGCTCCTGAAAGACAACGTTTATTACCTGCT GCATTAGCATGCTGGGGTGTTCGCGGTAGCTTATTAAGTGAAGCCGAT GTTCTGCTTTTAGGGGTTTAGCATGTGATTTACCTGGTCTGTTCTGTT GCAGAATCAGCAGAAGTGTATTACCGAGATTAGTTTCATGCCCAGGA CCTTTAGATCAAGATCAACAAGAGGCAGCTAGAGCAGCTCTTCAAGGA GGAGGCCACCATATGGCCCAAGTACATGGAGTGTCTTCTACAATG GATGCGTTAAGAGGTTTATTACCGGTTTTAGGACAACCAATTATTCGT AGTATTCACACAAGGCATTGTAGCAGCATGGCGTCAACGTAGTTCTCGT GATCCGTCTTGGCGACAACCAGAACGTACAATTCTACGTCCAAGATTT CGTAGAGAAGTAGAAAAACGGCGTGTCTAGTGGCAAAAAAGCACGT GAAATTGATGAAAGTTTAAATTTTTTATAAAAAATGGGAATTAGAAGCA TGTGTCGATGCAGCATTACTAGCTACACAAATGGATCGTGTTAATGCT ATTCCATTACATATGAACAATTAGATGTTTAAAGCATAAATTAGAC GAATTATATCCACAAGGTTATCCAGAATCAGTTATTCAACATTTAGGT TACTTATTTTTAAAAATGAGTCCAGAAGACATACGCAAAATGGAATGTT ACAAGTTTAGAAACATTAAAAGCGCTTTTAGAAGTTAACAAAGGTCAT GAAATGAGTCCACAAGTTGCTACGTTAATTGATAGATTCTGTTAAAGGC CGTGGTCAATTAGATAAAGATACTTTAGATACATTAAACAGCATTTTAT CCTGGCTACTTATGCAGTTTATCACCAGAAGAATTAAAGTTCCGTTCCA CCGAGTAGTATCTGGGCAGTTTCGTCCGCAAGATTTAGATACATGCGAC CCACGTCAATTAGATGTTTATATCCAAAAGCAAGATTAGCTTTCCAA AATATGAACGGTAGTGAATATTTTCGTAAAAATTCATCTTTTATAGGT GGTGACCAACTGAAGATCTAAAAGCATTAAGCCAACAAAATGTAAGT ATGGATTTAGCTACGTTTATGAAATTACGTACAGATGCAGTTCTACCA TTAACAGTTGCAGAAGTTCAAAAATTAATTAGGTCCACACGTAGAAGGA TTAAAAGCAGAAGAAGCTCACCGTCCAGTTTCGCGATTGGATTTTACGT CAACGTCAAGATGATTTAGATACATTAGGTTTAGGTTTACAAGGCTA AGAGCTC

Aminoácidos de proteína e fusión de LLO59, codón optimizado, con mesotelina humana con codón optimizado (SS suprimido; GPI suprimido). (SEQ ID NO:55)	MKKIMLVFITLILVSLPIAQQTEAKDASAFNKENSISSMAPPAS PPASPKTFPIEKKHADGSRITLAGETGQEAAPLDGVLTNPPNISSL SPRQLLGGFPCAENVSGLSTERVRELAVALAQKNVKLSTEQRLCLA HRLSEPPEDLDALPLDLLLFLNPDASFSGPQACTRFFSRITKANV DLLPRGAPERQRLPLPAALACWGVRSLLSEADVRLGGLACDLP GRFVAESAENVLLPRLVSCPGPLDQDQQAARAALQGGGPPYPGP STWSVSTMDALRGLLPVLGQPIIRSIPQGIVAARQRSSRDPSW RQPERTILRPRFRREVEKTACPSGKKAREIDESLIFYKKWELEA CVDAALLATQMDRVNAIPFTYEQLDVLKHKLDELYFQGYPESEVI QHLGYLFLKMSPEDIRKWNVTSLKLETLKALLEVNKGHEMSPQVAT LIDRFVKGRGQLDKDTLDTLTAFFPYGYLCSLSPEELSSVPPSSI WAVRPQDLDTCDPRQLDVLYPKARLAFQNMNGSEYFVKIQSFLG GAPTEDLKALSQQNVSMDLATFMKLRTDAVLPLTVAEVQKLLGP HVEGLKAEERHRPVRDWILRQRQDDLDLGLGLQG
Ácido nucleico de proteína de fusión de LLO59 (codón no optimizado) con mesotelina humana (codón optimizado) con SS suprimido y GPI suprimido, como fragmento BamHI-SacI. El sitio <i>BamHI</i>(GGATCC) y el sitio <i>SacI</i> (GAGCTC) se muestran en NEGRITAS. Esta secuencia puede llamarse: fusión LLOnat59 hMesotelina (SS suprimido; gpi suprimido). "nat" significa natural, codón no optimizado. Con respecto a las secuencias de aminoácidos, el aminoácido codificado por esta secuencia es la misma que aquella codificada por la secuencia correspondiente en donde mesotelina es codón optimizado (SEQ ID NO:56)	ATGAAAAAAAAATAATGCTAGTTTTTTATTACACTTATATTAGTTA GTCTACCAATTGCGCAACAACTGAAGCAAAGGATGCATCTGC ATTCAATAAAGAAAAATTCATTTTCATCCATGGCACCACCAGCA TCTCCGCCTGCAAGTCCTAAGACGCCAATCGAAAAGAAACACG CGGATGGATCCCGTACATTAGCAGGTGAAACAGGTCAAGAAGC AGCACCACCTTGACGGTGTATTAACGAATCCACCAAATATATCA AGTTTAAAGTCCACGTCATTTATTAGGTTTTTCATGTGCAGAAG TTTTCAGGTTTTAAGTACAGAACGTGTCCGTGAGTTAGCAGTTGC ATTAGCACAAAAAACGTTAAATTATCTACAGAACAGTTACGTT TGTTTAGCCCATAGATTAAGCGAACCACCAGAAGACTTAGATG CACTTCCTTTAGACCTTCTTTTATTCTTAAATCCAGATGCATT TTCAGGACCACAAGCATGTACACGTTTTTTTAGTTCGAATTACA AAAGCCCAATGTTGATTTATTACCTCGTGGGGCTCTGAAAGAC AACGTTTATTACCTGCTGCATTAGCATGCTGGGGTGTTCGCGG TAGCTTATTAAAGTGAAGCCGATGTTTCGTGCTTTAGGGGGTTTA GCATGTGATTTTACCTGGTCTGTTTCGTTCGAGAATCAGCAGAAG TGTTATTACCGAGATTAGTTTCATGCCCAGGACCTTTAGATCA AGATCAACAAGAGGCAGCTAGAGCAGCTCTTCAAGGAGGAGGC CCACCATATGGCCCACCAAGTACATGGAGTGTCTTCTACAATGG ATGCGTTAAGAGGTTTTATTACCGGTTTTTAGGACAACCAATTAT TCGTAGTATTCCACAAGGCATTGTAGCAGCATGGCGTCAACGT AGTTCCTGCTGATCCGTCCTGGCGACAACCAGAACGTACAATTC TACGTCCAAGATTTTCGTAGAGAAGTAGAAAAACGGCGTGTCC TAGTGGCAAAAAAGCACGTGAAATTGATGAAAGTTTAATTTTT TATAAAAAATGGGAATTAGAAGCATGTGTCGATGCAGCATTAC TAGCTACACAAATGGATCGTGTAAATGCTATTCCATTACATA TGAACAATTAGATGTTTTAAAGCATAAATTAGACGAATTATAT CCACAAGGTTATCCAGAATCAGTTATTCAACATTTAGGTTACT TATTTTTTAAAAATGAGTCCAGAAGACATACGCAAAATGGAATGT TACAAGTTTAGAAACATTAAGAGCGTTTTTAGAAGTTAACAAA GGTCAATGAAATGAGTCCACAAGTTGCTACGTTAATTGATAGAT TCGTTAAAGGCCGTGGTCAATTAGATAAAGATACTTTAGATAC ATTAACAGCATTTTATCCTGGCTACTTATGCAGTTTATCACCA GAAGAATTAAAGTTCCGTTCCACCGAGTAGTATCTGGGCAGTTC GTCCGCAAGATTTAGATACATGCGACCEACGTCAATTAGATGT TTTATATCCAAAAGCAAGATTAGCTTTTCCAAAATATGAACGGT AGTGAATATTTTCGTAAAAATTCAATCCTTTTTAGGTGGTGCAC CAACTGAAGATCTAAAAGCATTAAGCCAACAAAATGTAAGTAT GGATTTAGCTACGTTTATGAATTACGTACAGATGCAGTTCTA CCAATTAACAGTTGCAGAAGTTCAAAAATTATTAGGTCCACACG TAGAAGGATTAAAAGCAGAAGAAGTCACCGTCCAGTTCGCGA TTGGATTTTACGTCAACGTCAAGATGATTTAGATACATTAGGT TTAGGTTTTACAAGGCTAAGAGCTC

Promotor <i>hly</i> (SEQ ID NO:57)	GGTACCTCCTTTGATTAGTATATTCCTATCTTAAAGTTACT TTTATGTGGAGGCATTAACATTTGTTAATGACGTCAAAAGG ATAGCAAGACTAGAATAAAGCTATAAAGCAAGCATATAATA TTGCGTTTCATCTTTAGAAAGCGAATTTGCGCAATATTATAA TTATCAAAAGAGAGGGGTGGCAAACGGTATTTGGCATTTATT AGGTTAAAAAATGTAGAAGGAGAGTGAAACCC
Ácido nucleico para péptido de señal de BaPa optimizado por codón (SEQ ID NO:58)	ATGAAAAAACGTAAAGTTTTTAATTCATTAAATGGCATTAAAGTACAA TTTTAGTTAGTAGTACAGGTAATTTAGAAGTTATTCAAGCAGAAGT TGGATCC
Aminoácidos de péptido de señal de BaPa (SEQ ID NO:59)	MKKRKVLIIPLMALSTILVSSTGNLEVIQAEVGS
El promotor <i>hly</i> y el péptido de señal BaPa se fusionan juntas de manera constante. El promotor <i>hly</i> y el péptido de señal BaPa se fusionan juntas (sin sitios de restricción) y el ensamble de péptido de señal de promotor se inserta en plásmidos como un fragmento <i>KpnI</i> (GGTACC)- <i>BamHI</i> (GGATCC). El antígeno de tumor se inserta en el sitio <i>BamHI</i> (SEQ ID NO:60)	GGTACCTCCTTTGATTAGTATATTCCTATCTTAAAGTTACTTTTATGTGG AGGCATTAAACATTTGTTAATGACGTCAAAAGGATAGCAAGACTAGAATAA AGCTATAAAGCAAGCATATAATATTGCGTTTCATCTTTAGAAGCGAATTT CGCCAATATTATAATTATCAAAAGAGAGGGGTGGCAAACGGTATTTGGCA TTATTAGGTTAAAAAATGTAGAAGGAGAGTGAAACCCATGAAAAAACGTA AAGTTTTTAATTCATTAAATGGCATTAAAGTACAATTTTAGTTAGTAGTACA GGTAATTTAGAAGTTATTCAAGCAGAAGTTGGATCC

EJEMPLO VI. Bloques de construcción utilizados para ensamblar proteínas de fusión p60 y proteínas de fusión de otros polipéptidos que median la secreción dependiente de SecA2.

La presente descripción proporciona un polinucleótido que comprende un primer ácido nucleico que codifica una proteína secretada por una trayectoria dependiente de SecA2 y un segundo ácido nucleico que codifica un antígeno heterólogo. Las autolisinas, tales como p60 y NamA (N-acetil-muramidasa), son proteínas secretadas de *Listeria* por la trayectoria dependiente de SecA2 (Lenz, *et al.* (2003) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100:12432-12437). En una modalidad, la pareja de proteína de fusión (e.g., p60 o NamA) retiene su actividad enzimática o estructural. En otra modalidad, la pareja de proteína de fusión carece de su actividad estructural o enzimática. Todavía otra modalidad coloca o inserta un ácido nucleico que codifica una proteína heteróloga entre la secuencia de señal (SS) y ácidos nucleicos que codifican los dominios de enlace por pared celular (LysSM) y dominios catalíticos Lys-2 (NamA) y p60-dom (p60).

Lo siguiente describe, como un ejemplo no limitante, los ácidos nucleicos que codifican las proteínas de fusión que comprenden p60 y mesotelina humana (hMeso). La mesotelina se insertó la proteína p60 de *Listeria* como sigue. Un ácido nucleico que codifica la mesotelina se insertó en un ácido nucleico que codifica p60, de modo que cuando se expresa, la mesotelina se insertaría en p60 en aminoácido 70. Un polinucleótido que codifica la proteína de fusión resultante se preparó para uso en expresión por una bacteria *Listeria*.

En otra modalidad, la quimera de proteína contuvo codones óptimos para la expresión en *Listeria* en los aminoácidos 1-70 p60 así como en la secuencia codificadora de mesotelina completa. Todavía en otra modalidad, la quimera de proteína de mesotelina humana p60 se enlaza funcionalmente al promotor *hly* *L. monocytogenes*, en el

vector pPL2, el cual se utilizó subsecuentemente para generar las cepas *L. monocytogenes* recombinantes que expresan y secretan la mesotelina humana.

La secuencia de los primeros 70 aminoácidos de p60 de *L. monocytogenes*, la cepa 10403S se describe.

5 M N M K K A T I A A T A G I A V T A F A A P T I A S A S T V V V
E A G D T L W G I A Q S K G T T V D A I K K A N N L T T D K I V
P G Q K L Q (SEQ ID NO:61)

10 La secuencia de ADN sintetizado correspondiente a los 70 aminoácidos p60 de terminal N promotor *hly*, se muestra abajo. Los codones que codifican los residuos de aminoácido 69 p60 (L) y 70 (Q), se modificaron para contener una secuencia de reconocimiento de enzima *PstI* única, para facilitar la inserción funcional de una secuencia heteróloga (e.g., un ácido nucleico que codifica mesotelina). Además, el extremo 5' del sub-fragmento sintetizado contiene una secuencia de reconocimiento de enzima *KpnI* única.

15 En este punto en el comentario sobre la síntesis de vector, la secuencia de ácido nucleico corresponde a lo siguiente:

promotor *hly*-p60 (70 aminoácidos de terminal N de p60).

El sitio *PstI* único (CTGCAG) es visible en el extremo 3'.

20 GGTACCTCCTTTGATTAGTATATTCCTATCTTAAAGTTACTTTTATGTGGAGGCAT
TAACATTTGTTAATGACGTCAAAAGGATAGCAAGACTAGAATAAAGCTATAAAG
CAAGCATATAATATTGCGTTTCATCTTTAGAAAGCGAATTCGCCAATATTATAATT
ATCAAAAGAGAGGGGTGGCAAACGGTATTTGGCATTATTAGGTTAAAAAATGTA
GAAGGAGAGTGAAACCCATGAATATGAAAAAAGCTACGATTGCAGCTACAGCCG
25 GCATTGCCGTAACAGCTTTTGCAGCACCAACTATTGCCTCAGCCTCTACAGTTGTT
GTCGAAGCAGGAGACACATTATGGGGAATCGCACAATCAAAAGGTACAACGGTT
GATGCTATTAAAAAAGCGAATAATTTAACAACAGATAAAATCGTGCCAGGTCAA
AAACTGCAG (SEQ ID NO:62).

30 El sub-fragmento digerido *KpnI* y *PstI* 447 bp se liga en los sitios de *KpnI* y *PstI* correspondientes del vector pPL2, tratado por digestión con las enzimas *KpnI* y *PstI* y digestión con fosfatasa alcalina intestinal de becerro (CIAP). Este plásmido se conoce como pPL2-*hlyP*-Np60 CodOp. En consecuencia, el resto del gen p60 nativo se clonó en el plásmido pPL2-*hlyP*-Np60 CodOp, entre los sitios *PstI* y *BamHI* únicos. El resto del gen p60 se clonó por PCR, utilizando una lectura de prueba que contiene polimerasa termoestable, y el siguiente par de cebador:

35 Cebador delantero:

5'-CGC CTGCAGGTAAATAATGAGGTTGCTG (SEQ ID NO:63)

Cebador inverso:

5'-CGCGGATCCTTAATTATACGCGACCGAAG (SEQ ID NO:64)

40 El amplicon 1241 bp se digiere con *PstI* y *BamHI*, y 1235 bp purificado se liga en el plásmido pPL2-*hlyP*-Np60 CodOp, digerido con *PstI* y *BamHI*, y se trató con CIAP. El plásmido resultante contiene el gen p60 completo con codones óptimos correspondientes a aminoácidos 1-77, y codones nativos correspondientes a aminoácidos 78-

478. El gen p60 completo se enlaza funcional al promotor *hly* *L. monocytogenes*.

En este punto en el comentario sobre la síntesis de vector, la secuencia de ácido nucleico corresponde a lo siguiente:

promotor *hly* p60-[70 aminoácidos de terminal N 1-77 de p60 (codón optimizado)-[*Pst*I]-[aminoácidos 78-478 de terminal C de p60 (no codón optimizado)].

En este punto, la construcción todavía no ha recibido un ácido nucleico que codifica un antígeno heterólogo. En comentario a seguir, el sitio *Pst*I único recibirá un ácido nucleico que codifica un antígeno heterólogo (mesotelina). Este plásmido, que contiene p60 de longitud completa, pero con el codón de región de terminal N optimizado, y el no codón de región de terminal C optimizado, se conoce como: pPL2-*hly*P-Np60 CodOp (1-77). La secuencia del sub-fragmento *Kpn*I-*Bam*HI que contiene el *hly*P enlazado funcionalmente a la secuencia codificadora p60 se muestra abajo (SEQ ID NO:65). La secuencia esperada del plásmido pPL2-*hly*P-Np60 CodOp (1-77) se confirmó por la secuenciación.

```

GGTACCTCCTTTGATTAGTATATTCCTATCTTAAAGTTACTTTTATGTGGAGGCAT
TAACATTTGTTAATGACGTCAAAAGGATAGCAAGACTAGAATAAAGCTATAAAG
CAAGCATATAATATTGCGTTTCATCTTTAGAAGCGAATTTGCGCAATATTATAATT
ATCAAAAGAGAGGGGTGGCAAACGGTATTTGGCATTATTAGGTTAAAAAATGTA
GAAGGAGAGTGAAACCCATGAATATGAAAAAAGCTACGATTGCAGCTACAGCCG
GCATTGCCGTAACAGCTTTTGCAGCACCAACTATTGCCTCAGCCTCTACAGTTGTT
GTCGAAGCAGGAGACACATTATGGGGAATCGCACAAATCAAAAGGTACAACGGTT
GATGCTATTAAAAAAGCGAATAATTTAACAACAGATAAAATCGTGCCAGGTCAA
AAACTGCAGGTAATAATGAGGTTGCTGCTGCTGAAAAAACAGAGAAATCTGTT
AGCGCAACTTGTTAAACGTCCGTACTGGCGCTGGTGTGATAACAGTATTATTA
CGTCCATCAAAGGTGGAACAAAAGTAACTGTTGAAACAACCGAATCTAACGGCT
GGCACAAAATTACTTACAACGATGGAAAAACTGGTTTCGTTAACGGTAAATACTT
AACTGACAAAGCAGTAAGCACTCCAGTTGCACCAACACAAGAAGTGAAAAAAG
AAACTACTACTCAACAAGCTGCACCTGTTGCAGAAACAAAAACTGAAGTAAAC
AAACTACACAAGCAACTACACCTGCGCCTAAAGTAGCAGAAACGAAAGAAACTC
CAGTAATAGATCAAAATGCTACTACACACGCTGTCAAAAGCGGTGACACTATTTG
GGCTTTATCCGTAAAATACGGTGTTTCTGTTCAAGACATTATGTCATGGAATAAT
TTATCTTCTTCTTCTATTTATGTAGGTCAAAAGCTTGCTATTAACAAACTGCTAA
CACAGCTACTCCAAAAGCAGAAGTGAAAACGGAAGCTCCAGCAGCTGAAAAAC
AAGCAGCTCCAGTAGTTAAAGAAAATACTAACACAAATACTGCTACTACAGAGA
AAAAAGAAACAGCAACGCAACAACAACAGCACCTAAAGCACCAACAGAAGCT
GCAAAACCAGCTCCTGCACCATCTACAAACACAAATGCTAATAAAACGAATACA
AATACAAATACAAACAATACTAATACACCATCTAAAAATACTAATACAAACTCA
AATACTAATACGAATACAAACTCAAATACGAATGCTAATCAAGGTTCTTCCAACA
ATAACAGCAATTCAAGTGCAAGTGCTATTATTGCTGAAGCTCAAAAACACCTTGG
AAAAGCTTATTCATGGGGTGGTAACGGACCAACTACATTTGATTGCTCTGGTTAC
ACTAAATATGTATTTGCTAAAGCGGGTATCTCCCTTCCACGTACATCTGGCGCAC
AATATGCTAGCACTACAAGAATTTCTGAATCTCAAGCAAAACCTGGTGATTTAGT

```

ATTCTTCGACTATGGTAGCGGAATTTCTCACATTGGTATTTATGTTGGTAATGGTC
 AAATGATTAACGCGCAAGACAATGGCGTTAAATACGATAACATCCACGGCTCTG
 GCTGGGGTAAATATCTAGTTGGCTTCGGTCGCGTATAATAAGGATCC (SEQ ID
 NO:65).

La siguiente etapa en la construcción es la inserción funcional de una secuencia codificadora de proteína heteróloga en el sitio *Pst*I único de plásmido como pPL2-hlyP-Np60 CodOp (1-77).

Un ácido nucleico que codifica mesotelina humana que se optimizó por codón para expresión óptima en *L. monocytogenes* se insertó en el sitio *Pst*I único de plásmido como pPL2-hlyP-Np60 CodOp (1-77). Específicamente, la mesotelina de longitud completa, o mesotelina que se suprimió del péptido de señal y dominios de enlazador GPI (mesotelina Δ SP/ Δ GPI) se clonó de un plásmido que contiene la mesotelina humana de longitud completa, que contiene codones óptimos para la expresión en *L. monocytogenes*, utilizando una polimerasa termoestable con actividad de lectura por prueba, y el par de cebador abajo mostrado. La presente invención se proporciona para otros ácidos nucleicos que codifican antígenos diferentes a mesotelina o además de mesotelina, para uso en el protocolo actual. Además, la presente invención se proporciona para la optimización por codón de ácidos nucleicos que codifican un antígeno, optimización por codón de ácidos nucleicos que codifican una pareja de proteína de fusión, y/u optimización por codón de ácidos nucleicos que codifican una pareja de proteína de fusión.

El experto en la materia entenderá que las expresiones que citan “un antígeno se insertó en un polipéptido”, o expresiones para ese efecto, pueden comprender “un primer ácido nucleico que codifica un antígeno se insertó en un segundo ácido nucleico que codifica un polipéptido”, y lo similar.

Los cebadores PCR utilizados para amplificar la mesotelina humana de longitud completa:

Cebador Delantero (huMeso 3F):

5'-AAACTGCAGGCATTGCCAACTGCACGTCC (SEQ ID NO:66)

Cebador Inverso (hMeso 1935R):

5'-AAACTGCAGAGCTAATGTACTGGCTAATAATAATGCTAAC (SEQ ID NO:67)

Los cebadores PCR utilizados para amplificar la mesotelina humana (Δ SS Δ GPI de anclaje).

Cebador Delantero (huMeso 133F):

5'-CGCCTGCAGCGTACATTAGCAGGTGAAACAGG (SEQ ID NO:68)

Cebador Inverso (huMeso 1770R):

5'-CGCCTGCAGGCCTTGTAACCTAAACCTAATGTATC (SEQ ID NO:69)

En vista de las siguientes modalidades de mesotelina, el experto en la materia reconocerá que los ácidos nucleicos descritos y los polipéptidos de mesotelina pueden insertarse o utilizarse en una variedad de construcciones de polipéptido que incluyen las proteínas de fusión, ácidos nucleicos que codifican proteínas de fusión y lo similar, construcciones multicistrónicas, plásmidos, vectores, proteínas de fusión, vacunas bacterianas, y lo similar.

Ácido nucleico del péptido de señal de mesotelina humana (SEQ ID NO:70)	GCATTGCCAACTGCACGTCCATTACTAGGTAGTTGCGGTACACCAGCACTAGGTTCTTTATTATTTTGTGTTTCTCTAGGTTGGGTTCAACCAAGT
---	--

Ácido nucleico de GPI de anclaje de mesotelina humana. (SEQ ID NO:71)	GGTATTCCGAATGGATATTTAGTGTTAGATTT ATCTGTTCAAGAAGCATTAAAGTGGTACACCGT GTTTATTAGGTCCAGGTCCAGTTTTTAACAGTGT TAGCATTATTATTAGCCAGTACATTAGCT
Casete de ácido nucleico de mesotelina humana, codón optimizado para expresión en <i>Listeria</i>, con sitios de clonación 5'-<i>BamH</i>' (GGATCC) y 3'-<i>SacI</i> (GAGCTC). Como esta es mesotelina de longitud completa, contiene el dominio de gpi de anclaje de terminal C (SEQ ID NO:72)	GGATCCGCATTGCCAACTGCACGTCCATTACTAGGTAGTTGCG GTACACCAGCACTAGGTTCTTTATTATTTTGTATTCTCT AGGTTGGGTTCAACCAAGTCGTACATTAGCAGGTGAAACAGGT CAAGAAGCAGCACCACCTTGACGGTGTATTAACGAATCCACCAA ATATATCAAGTTTAAGTCCACGTCAATTATTAGGTTTTCCATG TGCAGAAGTTTCAGGTTTAAGTACAGAACGTGTCCGTGAGTTA GCAGTTGCATTAGCACAAAAAACGTTAAATTATCTACAGAAC AGTTACGTTGTTTAGCCCATAGATTAAGCGAACACCAGAAAGA CTTAGATGCACCTTCTTTAGACCTTCTTTATTCTTAAATCCA GATGCATTTTTCAGGACCACAAGCATGTACACGTTTTTTTAGTC GAATTACAAAAGCCAATGTTGATTTATTACCTCGTGGGGCTCC TGAAAGACAACGTTTATTACCTGCTGCATTAGCATGCTGGGGT GTTTCGCGGTAGCTTATTAAAGTGAAGCCGATGTTTCGTGCTTAG GGGGTTTTAGCATGTGATTTACCTGGTTCGTTTTCGTTGCAGAATC AGCAGAAGTGTTATTACCGAGATTAGTTTCATGCCCAGGACCT TTAGATCAAGATCAACAAGAGGCAGCTAGAGCAGCTCTTCAAG GAGGAGGCCACCATATGGCCCAAGTACATGGAGTGTTTC TACAATGGATGCGTTAAGAGGTTTATTAACCGGTTTTAGGACAA CCAATTATTTCGTAGTATTCCACAAGGCATTGTAGCAGCATGGC GTCAACGTAGTTCTCGTGATCCGTCTTGGCGACAACCAGAACG TACAATTCTACGTCCAAGATTTTCGTAGAGAAGTAGAAAAAACG GCGTGTCCTAGTGGCAAAAAGCACGTGAAATTGATGAAAGTT TATCACCAGAAGAATTAAGTTCCGTTCCACCGAGTAGTATCTG GGCAGTTTCGTCCGCAAGATTTAGATACATGCGACCCACGTCAA TTAGATGTTTTATATCCAAAAGCAAGATTAGCTTTCCAAAATA TGAACGGTAGTGAATATTTTCGTAAAAATTCAATCCTTTTTAGG TGGTGCACCAACTGAAGATCTAAAAGCATTAAAGCCAACAAAAT GTAAGTATGGATTTAGCTACGTTTATGAAATTACGTACAGATG CAGTTCTACCATTAACAGTTGCAGAAGTTCAAAAATTATTAGG TCCACACGTAGAAGGATTAAAAGCAGAAGAACGTCACCGTCCA GTTTCGCGATTGGATTTTACGTCAACGTCAAGATGATTTAGATA CATTAGGTTTAGGTTTACAAGGCGGTATTCCGAATGGATATTT AGTGTTAGATTTATCTGTTCAAGAAGCATTAAAGTGGTACACCG TGTTTATTAGGTCCAGGTCCAGTTTTTAACAGTGTTAGCATTAT TATTAGCCAGTACATTAGCTTAAGGAGCTC

Aminoácidos de mesotelina humana de longitud completa (SEQ ID NO:73) (Si la secuencia se fusiona en la terminal N a una secuencia heteróloga, la metionina inicial se suprime opcionalmente (por supresión del codón correspondiente).)	MALPTARPLLGSCGTPALGSLLFLLFSLGWVQPSRTLAG ETGQEAAPLDGVLTNPPNISSLSRQLLGFPCEVSGL STERVRELAVALAQKNVKLSTEQLRCLAHRLSEPPEDL DALPLDLLLFLNPDAFSGPQACTRFFSRITKANVDLLP RGAPERQRLPAALACWGVRSLLSEADVRLGGLACD LPGRFVAESA EVLLPRLVSCPGPLDQDQQAARAALQG GGPPYGPPSTWSVSTMDALRGLLPVLGQPIIRSI PQGI VAAWRQRSSRDPSWRQPERTILRPRFRREVEKTACPSG KKAREIDESLI FYKKWELEACVDAALLATQMDRVNAIP FTYEQLDVLKHKLDELYPQGYPESVIQHLGYLFLKMSP EDIRKWNVTSL ETLKALLEVNKGHEMSPQVATLIDRFV KGRGQLDKDTLDTLTAFYPGYLCSLSPEELSSVPPSSI WAVRPQDLDTCDPRQLDVLYPKARLAFQNMNGSEYFVK IQSFLGGAPTE DLKALSQQNVSMDLATFMKLRTDAVLP LTVAEVQKLLGPHVEGLKAEERHRPVRDWILRQRQDDL DTLGLGLQGGI PNGYLVLDSL VQEALSGTPCLLGPGPV LTVLALLLASTHA
--	--

Ácido nucleico de mesotelina humana (codón optimizado), SS suprimido, GPI suprimido de anclaje. Este es un casete que codifica la mesotelina humana, en donde el casete contiene los sitios de restricción 5'-*Bam*HI y 3'-*Sac*I. (SEQ ID NO:74)

GGATCCCGTACATTAGCAGGTGAAACAGGTCAAGAAGCAGCACC
ACTTGACGGTGTATTAACGAATCCACCAAATATATCAAGTTTAA
GTCCACGTCAATTATTAGGTTTTCCATGTGCAGAAGTTTCAGGT
TAAAGTACAGAACGTGTCCGTGAGTTAGCAGTTGCATTAGCACA
AAAAAACGTTAAATTATCTACAGAACAGTTACGTTGTTTAGCCC
ATAGATTAAGCGAACACCAGAAAGACTTAGATGCACCTTCCTTTA
GACCTTCTTTTATTCTTAAATCCAGATGCATTTTCAGGACCACA
AGCATGTACACGTTTTTTTTAGTCGAATTACAAAAGCCAATGTTG
ATTTATTACCTCGTGGGGCTCCTGAAAGACAACGTTTATTACCT
GCTGCATTAGCATGCTGGGGTGTTCGCGGTAGCTTATTAAGTGA
AGCCGATGTTTCGTGCTTTAGGGGGTTTAGCATGTGATTACCTG
GTCGTTTCGTTGCAGAATCAGCAGAAGTGTTATTACCGAGATTA
GTTTCATGCCCAGGACCTTTAGATCAAGATCAACAAGAGGCAGC
TAGAGCAGCTCTTCAAGGAGGAGGCCCCACCATATGGCCCACCAA
GTACATGGAGTGTCTTACAATGGATGCGTTAAGAGGTTTATTA
CCGGTTTTTAGGACAACCAATTATTTCGTAGTATTCCACAAGGCAT
TGTAGCAGCATGGCGTCAACGTAGTTCTCGTGATCCGTCTTGGC
GACAACCAGAACGTACAATTCTACGTCCAAGATTTTCGTAGAGAA
GTAGAAAAACGGCGTGTCTAGTGGCAAAAAAGCAGTGAAAT
TGATGAAAGTTTAATTTTTTATAAAAAATGGGAATTAGAAGCAT
GTGTCGATGCAGCATTACTAGCTACACAAATGGATCGTGTTAAT
GCTATTCCATTACATATGAACAATTAGATGTTTTAAAGCATAA
ATTAGACGAATTATATCCACAAGGTTATCCAGAATCAGTTATTC
AACATTTAGGTTACTTATTTTTTAAAAATGAGTCCAGAAGACATA
CGCAAATGGAATGTTACAAGTTTAGAAACATTAAAAAGCGCTTTT
AGAAGTTAACAAAGGTCATGAAATGAGTCCACAAGTTGCTACGT
TAATTGATAGATTCGTTAAAGGCCGTGGTCAATTAGATAAAGAT
ACTTTAGATACATTAAACAGCATTTTATCCTGGCTACTTATGCAG
TTTATCACCAGAAGAATTAAGTTCCGTTCCACCGAGTAGTATCT
GGGCAGTTCGTCCGCAAGATTTAGATACATGCGACCCACGTCAA
TTAGATGTTTTATATCCAAAAGCAAGATTAGCTTTCCAAAATAT
GAACGGTAGTGAATATTTTCGTAAAAATTCAATCCTTTTTAGGTG
GTGCACCAACTGAAGATCTAAAAGCATTAAGCCAACAAAATGTA
AGTATGGATTTAGCTACGTTTATGAAATTACGTACAGATGCAGT
TCTACCATTAACAGTTGCAGAAGTTCAAAAATTATTAGGTCCAC
ACGTAGAAGGATTAAGCAGAAGAACGTCACCGTCCAGTTCCGC
GATTGGATTTTACGTCAACGTCAAGATGATTTAGATACATTAGG
TTTAGGTTTACAAGGCTAAGAGCTC

Aminoácido de mesotelina humana, SS suprimido, GPI suprimido de anclaje. (SEQ ID NO:75)	RTLAGETGQEAAPLDGVLTNPPNISSLSRQLLGFP CAEVSGLSTERVRELAVALAQKNVKLSTEQLRCLAHRLSE PPEDLDALPLDLLLFLNPDAFSGPQACTRFFSRITKAN VDLLPRGAPERQRLPLAALACWGVRSLLSEADVRLG GLACDLPGRFVAESADEVLLPRLVSCPGPLDQDQQAAR AALQGGGPPYPGPSTWSVSTMDALRGLLPVLGQPIIRS IPQGIWAARQRSSRDPSWRQPERTILRPRFRREVEKT ACPSGKKAREIDESLIFYKKWELEACVDAALLATQMDR VNAIPFTYEQLDVLKHKLDLYPQGYPESVIQHLGYLF LKMSPEDIRKWNVTSLKALLEVNGKHEMSPQVATL IDREVKGRGQLDKDTLDTLTAIFYPGYLCSLSPPELSSV PPSSIWAVRPQDLDTCDPRQLDVLVYPKARLAFQNMNGS EYFVKIQSFLGGAPTEDLKALSQQNVSMDLATFMKLRT DAVLPLTVAEVQKLLGPHVEGLKAEERHRPVRDWILRQ RQDDLDTLGLGLQG
--	---

Los amplicones PCR de 1932 bps (mesotelina de longitud completa) y 1637 bps (mesotelina Δ SP/ Δ GPI) se purificaron, digirieron con *Pst*I, se purificaron y se ligaron en el sitio *Pst*I único de plásmido pPL2-hlyP-Np60 CodOp (1-77), se trató por digestión con *Pst*I, y digestión con CIAP. La orientación consistente de terminal amino a terminal carboxi del p60 y dominios de Mesotelina se confirmó por mapeo de endonucleasa de restricción. Estos plásmidos se conocen como mesotelina de pPL2-hlyP-Np60 CodOp (1-77) y Δ SP/ Δ GPI de mesotelina de pPL2-hlyP-Np60 CodOp (1-77), y se introdujeron en cepas de *L. monocytogenes* seleccionadas.

La secuencia del sub-fragmento *Kpn*I-*Bam*HI de plásmido mesotelina pPL2-hlyP-Np60 CodOp (1-77) que contiene el promotor *hly* enlazado funcionalmente al gen que codifica la quimera de proteína de mesotelina humana p60 tiene la secuencia mostrada abajo.

GGTACCTCCTTTGATTAGTATATTCCTATCTTAAAGTTACTTTTATGTGGAGGCAT
TAACATTTGTGAATGACGTCAAAAGGATAGCAAGACTAGAATAAAGCTATAAAG
CAAGCATATAATATTGCGTTTCATCTTTAGAAAGCGAATTCGCCAATATTATAATT
ATCAAAAGAGAGGGGTGGCAAACGGTATTTGGCATTATTAGGTTAAAAAATGTA
GAAGGAGAGTGAAACCCATGAATATGAAAAAGCTACGATTGCAGCTACAGCCG
GCATTGCCGTAAACAGCTTTTGCAGCACCAACTATTGCCTCAGCCTCTACAGTTGTT
GTCGAAGCAGGAGACACATTATGGGGAAATCGCACAAATCAAAAGGTACAACGGTT
GATGCTATTAATAAAGCGAATAATTTAACAACAGATAAAATCGTGCCAGGTCAA
AAACTGCAGGCATTGCCAACTGCACGTCCATTACTAGGTAGTTGCGGTACACCAG
CACTAGGTTCTTTATTATTTTGTATTCTCTAGGTTGGGTTCAACCAAGTCGT
ACATTAGCAGGTGAAACAGGTCAAGAAGCAGCACCCTTGACGGTGTATTAACG
AATCCACCAATATATCAAGTTAAGTCCACGTCAATTATTAGGTTTTCATGTG
CAGAAGTTTCAGGTTAAGTACAGAACGTGTCCGTGAGTTAGCAGTTGCATTAGC
ACAAAAAACGTTAAATTATCTACAGAACAGTTACGTTGTTTAGCCCATAGATTA
AGCGAACCACCAGAAGACTTAGATGCACTTCCTTTAGACCTTCTTTATTCTTAA
ATCCAGATGCATTTTCAGGACCACAAGCATGTACACGTTTTTTTAGTCGAATTAC
AAAAGCCAATGTTGATTATTACCTCGTGGGGCTCCTGAAAGACAACGTTTATTA
CCTGCTGCATTAGCATGCTGGGGTGTTCGCGGTAGCTTATTAAGTGAAGCCGATG

TTCGTGCTTTAGGGGGTTTAGCATGTGATTTACCTGGTCGTTTCGTTGCAGAATCA
 GCAGAAGTGTTATTACCGAGATTAGTTTCATGCCCAGGACCTTTAGATCAAGATC
 AACAAAGAGGCAGCTAGAGCAGCTCTTCAAGGAGGAGGCCACCATATGGCCAC
 5 CAAGTACATGGAGTGTTTCTACAATGGATGCGTTAAGAGGTTTATTACCGGTTTT
 AGGACAACCAATTATTCGTAGTATTCCACAAGGCATTGTAGCAGCATGGCGTCAA
 CGTAGTTCTCGTGATCCGTCTTGCGGACAACCAGAACGTACAATTCTACGTCCAA
 GATTTTCGTAGAGAAGTAGAAAAACGGCGTGCCTAGTGGCAAAAAAGCACGTG
 AAATTGATGAAAGTTTAATTTTTATAAAAAATGGGAATTAGAAGCATGTGTCGA
 10 TGCAGCATTACTAGCTACACAAATGGATCGTGTTAATGCTATTCCATTACATAT
 GAACAATTAGATGTTTTAAAGCATAAATTAGACGAATTATATCCACAAGGTTATC
 CAGAATCAGTTATTCAACATTTAGGTTACTTATTTTTAAAAATGAGTCCAGAAGA
 CATA CGCAAATGGAATGTTACAAGTTTAGAAACATTAAAAAGCGCTTTTAGAAGTT
 AACAAAGGTCATGAAATGAGTCCACAAGTTGCTACGTTAATTGATAGATTTCGTTA
 15 AAGGCCGTGGTCAATTAGATAAAGATACTTTAGATACATTAACAGCATTTTATCC
 TGGCTACTTATGCAGTTTATCACCAGAAGAATTAAGTTCCGTTCCACCGAGTAGT
 ATCTGGGCAGTTCGTCCGCAAGATTTAGATACATGCGACCCACGTCAATTAGATG
 TTTTATATCCAAAAGCAAGATTAGCTTTCCAAAATATGAACGGTAGTGAATATTT
 CGTAAAAATTCAATCCTTTTTAGGTGGTGCACCAACTGAAGATCTAAAAGCATTAA
 AGCCAACAAAATGTAAGTATGGATTTAGCTACGTTTATGAAATTACGTACAGATG
 20 CAGTTCTACCATTAACAGTTGCAGAAGTTCAAAAATTATTAGGTCCACACGTAGA
 AGGATTA AAAAGCAGAAGAACGTCACCGTCCAGTTTCGCGATTGGATTTTACGTCA
 ACGTCAAGATGATTTAGATACATTAGGTTTAGGTTTACAAGGCGGTATTCCGAAT
 GGATATTTAGTGTTAGATTTATCTGTTCAAGAAGCATTAAAGTGGTACACCGTGTT
 TATTAGGTCCAGGTCCAGTTTAAACAGTGTTAGCATTATTATTAGCCAGTACATTA
 25 GCTCTGCAGGTAAATAATGAGGTTGCTGCTGCTGAAAAAACAGAGAAATCTGTT
 AGCGCAACTTGGTTAAACGTCCGTACTGGCGCTGGTGTTGATAACAGTATTATTA
 CGTCCATCAAAGGTGGAACAAAAGTAACTGTTGAAACAACCGAATCTAACGGCT
 GGCACAAAATTACTTACAACGATGGAAAACTGGTTTCGTTAACGGTAAATACTT
 AACTGACAAAGCAGTAAGCACTCCAGTTGCACCAACACAAGAAGTGAAAAAAG
 30 AAATACTACTCAACAAGCTGCACCTGTTGCAGAAACAAAACTGAAGTAAAC
 AAATAACACAAGCAACTACACCTGCGCCTAAAGTAGCAGAAACGAAAGAACTC
 CAGTAATAGATCAAAATGCTACTACACACGCTGTCAAAAGCGGTGACACTATTTG
 GGCTTTATCCGTAAAATACGGTGTTTCTGTTCAAGACATTATGTCATGGAATAAT
 TTATCTTCTTCTTCTATTTATGTAGGTCAAAAGCTTGCTATTAAACAACTGCTAA
 35 CACAGCTACTCCAAAAGCAGAAGTGAAAACGGAAGCTCCAGCAGCTGAAAAAC
 AAGCAGCTCCAGTAGTTAAAGAAAATACTAACACAAATACTGCTACTACAGAGA

AAAAAGAAACAGCAACGCAACAACAAACAGCACCTAAAGCACCAACAGAAGCT
 GCAAAACCAGCTCCTGCACCATCTACAAACACAAATGCTAATAAAACGAATACA
 AATACAAATACAAACAATACTAATACACCATCTAAAAATACTAATACAAACTCA
 AATACTAATACGAATACAAACTCAAATACGAATGCTAATCAAGGTTCTTCCAACA
 ATAACAGCAATTCAAGTGCAAGTGCTATTATTGCTGAAGCTCAAAAACACCTTGG
 AAAAGCTTATTCATGGGGTGGTAACGGACCAACTACATTTGATTGCTCTGGTTAC
 ACTAAATATGTATTTGCTAAAGCGGGTATCTCCCTTCCACGTACATCTGGCGCAC
 AATATGCTAGCACTACAAGAATTTCTGAATCTCAAGCAAAACCTGGTGATTTAGT
 ATTCTTCGACTATGGTAGCGGAATTTCTCACATTGGTATTTATGTTGGTAATGGTC
 AAATGATTAACGCGCAAGACAATGGCGTTAAATACGATAACATCCACGGCTCTG
 GCTGGGGTAAATATCTAGTTGGCTTCGGTCGCGTATAATAAGGATCC (SEQ ID
 NO:136).

La secuencia del sub-fragmento *KpnI-BamHI* de plásmido $\Delta SS/\Delta GPI$ de mesotelina pPL2-hlyP-Np60 CodOp (1-77) que contiene el promotor *hly* enlazado funcionalmente al gen que codifica la quimera de proteína $\Delta SS/\Delta GPI$ de mesotelina humana p60, tiene la secuencia mostrada abajo.

GGTACCTCCTTTGATTAGTATATTCCTATCTTAAAGTTACTTTTATGTGGAGGCAT
 TAACATTTGTTAATGACGTCAAAAGGATAGCAAGACTAGAATAAAGCTATAAAG
 CAAGCATATAATATTGCGTTTCATCTTTAGAAGCGAATTTGCGCAATATTATAATT
 ATCAAAAGAGAGGGGTGGCAAACGGTATTTGGCATTATTAGGTTAAAAAATGTA
 GAAGGAGAGTGAAACCCATGAATATGAAAAAAGCTACGATTGCAGCTACAGCCG
 GCATTGCCGTAACAGCTTTTGCAGCACCAACTATTGCCTCAGCCTCTACAGTTGTT
 GTCGAAGCAGGAGACACATTATGGGGAATCGCACAAATCAAAGGTACAACGGTT
 GATGCTATTAAAAAAGCGAATAATTAAACAACAGATAAAATCGTGCCAGGTCAA

5 AA ACTGCAGCGTACATTAGCAGGTGAAACAGGTCAAGAAGCAGCACCACCTTGAC
 GGTGTATTAACGAATCCACCAAATATATCAAGTTTAAGTCCACGTCAATTATTAG
 GTTTTCCATGTGCAGAAGTTTCAGGTTTAAGTACAGAACGTGTCCGTGAGTTAGC
 AGTTGCATTAGCACAAAAAACGTTAAATTATCTACAGAACAGTTACGTTGTTTA
 10 GCCCATAGATTAAGCGAACCACCAGAAGACTTAGATGCACTTCCTTTAGACCTTC
 TTTTATTCTTAAATCCAGATGCATTTTCAGGACCACAAGCATGTACACGTTTTTTT
 AGTCGAATTACAAAAGCCAATGTTGATTTATTACCTCGTGGGGCTCCTGAAAAGAC
 AACGTTTATTACCTGCTGCATTAGCATGCTGGGGTGTTCGCGGTAGCTTATTAAG
 TGAAGCCGATGTTTCGTGCTTTAGGGGGTTTAGCATGTGATTTACCTGGTTCGTTTCG
 15 TTGCAGAATCAGCAGAAGTGTTATTACCGAGATTAGTTTCATGCCCAGGACCTTT
 AGATCAAGATCAACAAGAGGCAGCTAGAGCAGCTCTTCAAGGAGGAGGCCACC
 ATATGGCCCCACCAAGTACATGGAGTGTTTCTACAATGGATGCGTTAAGAGGTTTA
 TTACCGGTTTTAGGACAACCAATTATTCGTAGTATTCCACAAGGCATTGTAGCAG
 CATGGCGTCAACGTAGTTCTCGTGATCCGTCTTGCGGACAACCAGAACGTACAAT
 TCTACGTCCAAGATTTTCGTAGAGAAGTAGAAAAAACGGCGTGTCTAGTGGCAA
 20 AAAAGCACGTGAAATTGATGAAAGTTTAATTTTTTATAAAAAATGGGAATTAGA
 AGCATGTGTCGATGCAGCATTACTAGCTACACAAATGOATCGTGTTAATGCTATT
 CCATTCACATATGAACAATTAGATGTTTAAAGCATAAATTAGACGAATTATATC
 CACAAGGTTATCCAGAATCAGTTATTCAACATTTAGGTTACTTATTTTTAAAAAT
 GAGTCCAGAAGACATACGCAAATGGAATGTTACAAGTTTAGAAACATTAAAAAGC
 GCTTTTAGAAGTTAACAAAGGTCATGAAATGAGTCCACAAGTTGCTACGTTAATT
 25 GATAGATTCGTTAAAGGCCGTGGTCAATTAGATAAAGATACTTTAGATACATTAA
 CAGCATTTTATCCTGGCTACTTATGCAGTTTATCACCAGAAGAATTAAGTTCCGTT
 CCACCGAGTAGTATCTGGGCAGTTCGTCCGCAAGATTTAGATACATGCGACCCAC
 GTCAATTAGATGTTTTATATCCAAAAGCAAGATTAGCTTTCAAAAATATGAACGG
 TAGTGAATATTTTCGTAAAAATTCAATCCTTTTTAGGTGGTGCACCAACTGAAGAT
 30 CTAAAAGCATTAAAGCCAACAAAATGTAAGTATGGATTAGCTACGTTTATGAAAT
 TACGTACAGATGCAGTTCTACCATTAAACAGTTGCAGAAGTTCAAAAATTATTAGG
 TCCACACGTAGAAGGATTAAAAGCAGAAGAACGTCACCGTCCAGTTCGCGATTG
 GATTTTACGTCAACGTCAAGATGATTTAGATACATTAGGTTTAGGTTTACAAGGC
 CTGCAGGTAAATAATGAGGTTGCTGCTGCTGAAAAAACAGAGAAATCTGTTAGC
 35 GCAACTTGGTTAAACGTCCGTACTGGCGCTGGTGTTGATAACAGTATTATTACGT
 CCATCAAAGGTGGAACAAAAGTAACTGTTGAAACAACCGAATCTAACGGCTGGC
 ACAAATTAATTACAACGATGAAAAAAGTGGTTTCGTTAACGGTAAATACTTAAAC

5 TGACAAAGCAGTAAGCACTCCAGTTGCACCAACACAAGAAGTGAAAAAAGAAA
 CTACTACTCAACAAGCTGCACCTGTTGCAGAAACAAAACTGAAGTAAAAACAAA
 CTACACAAGCAACTACACCTGCGCCTAAAGTAGCAGAAACGAAAGAACTCCAG
 TAATAGATCAAAATGCTACTACACACGCTGTCAAAGCGGTGACACTATTTGGGC
 TTTATCCGTAAAATACGGTGTTTCTGTTCAAGACATTATGTCATGGAATAATTTAT
 CTTCTTCTTCTATTTATGTAGGTCAAAGCTTGCTATTAACAACTGCTAACACA
 GCTACTCCAAAAGCAGAAGTGAAAACGGAAGCTCCAGCAGCTGAAAAACAAGC
 10 AGCTCCAGTAGTTAAAGAAAAATACTAACACAAATACTGCTACTACAGAGAAAAA
 AGAAACAGCAACGCAACAACAAACAGCACCTAAAGCACCAACAGAAGCTGCAA
 AACCAGCTCCTGCACCATCTACAAACACAAATGCTAATAAACGAATACAAATA
 CAAATACAAACAATACTAATACACCATCTAAAAATACTAATACAACTCAAATA
 CTAATACGAATACAACTCAAATACGAATGCTAATCAAGGTTCTTCCAACAATAA
 CAGCAATTCAAGTGCAAGTGCTATTATTGCTGAAGCTCAAAAACACCTTGGA
 15 AGCTTATTCATGGGGTGTTAACGGACCAACTACATTTGATTGCTCTGGTTACACT
 AAATATGTATTTGCTAAAGCGGGTATCTCCCTTCCACGTACATCTGGCGCACAAT
 ATGCTAGCACTACAAGAATTTCTGAATCTCAAGCAAAACCTGGTGATTTAGTATT
 CTTGACTATGGTAGCGGAATTTCTCACATTGGTATTTATGTTGGTAATGGTCAA
 ATGATTAACGCGCAAGACAATGGCGTTAAATACGATAACATCCACGGCTCTGGC
 20 TGGGGTAAATATCTAGTTGGCTTCGGTTCGCGTATAATAAGGATCC. (SEQ ID
 NO:76)

25 EJEMPLO VII. Proteínas de fusión basadas en ActA-N100; proteínas de fusión basadas en LLO (síntesis; vacunación; inmunogenicidad).

La Tabla 11 describe algunas de las cepas bacterianas que se prepararon. Las bacterias se utilizaron para vacunación en ratones que llevan el tumor. En donde se indica, la vacunación dio como resultado respuestas inmunes anti-tumorales, la reducción en el número y tamaño de tumor, y supervivencia incrementada.

Tabla 11. Bacteria <i>L. monocytogenes</i> recombinante de la presente invención. "Delta" significa suprimido. La mutación E30R y la mutación E30M, en donde se indican, se originan en en la secuencia secretora (BaPA) de Antígeno Protector <i>Bacillus</i> . La mutación S28D y la mutación S28R, en donde se indican, se originan en p60.					
Cepa (nombre sencillo)	Construcción	Antecedente genético	Sitio de integración	Promotor	Secuencia secretora (SS)
-	Longitud completa (FL) hMesotelina	Δ ActA Δ inB	tARN Arg	Hly	BaPA
hMeso1	hMeso [deltaSS	Δ ActA Δ inB	tARN Arg	Hly	BaPA

	delta GPI]				
hMeso2	HMeso [deltaSS delta GPI]	Δ ActA Δ inB prfA*	tARN Arg	ActA	BaPA
hMeso3	hMeso [deltaSS delta GPI]	Δ ActA Δ inB	ActA	ActA	BaPA
hMeso4	HMeso [deltaSS delta GPI]	Δ ActA Δ inB	inIB	Hly	BaPA
hMeso5	p60-hMeso [deltaSS delta GPI]	Δ ActA Δ inB	tARN Arg	Hly	p60
hMeso6	ActA-N100 hMeso [deltaSS delta GPI]	Δ ActA Δ inB	ActA	act	ActA
hMeso8	hMeso [deltaSS delta GPI]- rasG12D	Δ ActA Δ inB	tARN Arg	hly	BaPA
hMeso10	ActA-N100 hMeso [deltaSS delta GPI]-rasG12D	Δ ActA Δ inB	ActA	ActA	ActA
hMeso11	hMeso [deltaSS delta GPI]- rasG12D	Δ ActA Δ inB	inIB	Hly	BaPA
hMeso12	hMeso [deltaSS delta GPI]- rasG12D	Δ ActA Δ inB	tARN Arg	Hly	BaPA (E30R)
hMeso13	hMeso [deltaSS delta GPI]- rasG12D	Δ ActA Δ inB	tARN Arg	hly	BaPA (E30M)
hMeso14	LLO62-hMeso [deltaSS delta GPI]-rasG12D	Δ ActA Δ inB	tARN Arg	hly	LLO(62)
hMeso15	LLO62- hMeso[deltaSS delta GPI]- rasG12D	Δ ActA Δ inB	tARN Arg	Hly	LLO(opt62)
hMeso18	A30R ActA-N100- hMeso [deltaSS delta GPI]-12ras (el ras tiene una mutación G12D	Δ ActA Δ inB	ActA	ActA	ActA (A30R)

hMeso19	S28D p60hMeso [deltaSS delta GPI]	Δ ActA Δ inB	tARN Arg	hly	p60
hMeso20	S28R deltap60hMeso [deltaSS delta GPI]	Δ ActA Δ inB	tARN Arg	hly	p60
hMeso22	LLO44I-hMeso [deltaSS delta GPI]-rasG12D	Δ ActA Δ inB	tARN Arg	hly	LLO
hMeso26	Act-A-N100 hMeso [delta SS delta GPI]	Δ ActA Δ inB	inIB	ActA	ActA
hMeso31	ActA-N100 (A30R en ActA-N100)- hMeso [delta SS delta GPI]	Δ ActA Δ inB	ActA e inIB	ActA y ActA	ActA y ActA
hMeso32	ActA-N100 hMeso [delta SS delta GPI] diploide	Δ ActA Δ inB	inIB y tARNArg	ActA y ActA	ActA y ActA
hMeso33	ActA-N100 deltaSS (que contiene GPI)	Δ ActA Δ inB	tARNArg integra-do con pINT	ActA	ActA
hMeso37	ActA-N100 deltaSS (que contiene GPI)	Δ ActA Δ inB	tARNArg integrado con pINT	ActA	ActA
hMeso37 difiere de hMeso33 en que hMeso37 se trató con un plásmido que codifica la recombinasa Cre para efectuar la remoción de ADN flanqueado por loxP. La recombinasa Cre se proporcionó por medio del plásmido pCON2. pCON2 es sensible a la temperatura. La temperatura de cambio da como resultado la remoción de ADN flanqueado por loxP y da como resultado la pérdida de pCON2 de la célula. pCON se describe (véase, e.g., Behari, <i>et al.</i> (1998) J. Bacteriol. 180:6316-6324; Milenbachs, <i>et al.</i> (2004) Microbiology 150:321-333).					
hMeso38	ActA-N100-hmeso [deltaSS] (no suprimido en GPI). (hmeso33alelo)	Δ ActA Δ inB	inIB	ActA	ActA

hMeso40 (véase Tabla 12)	hMeso26 con su integración adicional: pINT-ActA-N100-db12ras3	Δ ActA Δ inB	inIB y tARN ^{Arg}	ActA y ActA	ActA y ActA
hMeso41 (véase Tabla 12)	hMeso26 con su integración adicional: pINT-ActA-N100-db12ras4	Δ ActA Δ inB	inIB y tARN ^{Arg}	ActA y ActA	ActA y ActA
hMeso42 (véase Tabla 12)	hMeso26 con su integración adicional: pINT-ActA-N100-db12ras5	Δ ActA Δ inB	inIB y tARN ^{Arg}	ActA y ActA	ActA y ActA
hMeso43 (véase Tabla 12)	hMeso26 con su integración adicional: pINT-ActA-N100-db12ras6	Δ ActA Δ inB	inIB y tARN ^{Arg}	ActA y ActA	ActA y ActA

En donde un polinucleótido se integra en el sitio ActA, el gen ActA se suprime durante la recombinación homóloga, al menos que se especifique de otra forma. En donde se integra un polinucleótido en el sitio ActA, y en donde la construcción comprende una proteína de fusión que incluye ActA-N100, y en donde la secuencia secretora se enlista como la secuencia secretora ActA, la secuencia secretora ActA viene de la pareja de proteína de fusión ActA-N100 (no del gen ActA genómico, por la razón de que el gen ActA genómico se suprimió durante la recombinación homóloga), como en hMeso6, hMeso10 y hMeso18.

5 Tabla 12. Secuencias en casetes de expresión de hMeso40, hMeso41, hMeso42, y hMeso43. "ActA-N100" indica que la secuencia de ActA-N100 precede inmediatamente los aminoácidos indicados que siguen.

Secuencia Db112ras3 de hMeso40	(ActA-N100) GSAKVLEEDDEEEALPTARPLLGSCGTPALGSLLFLLFSLGWVQ PSRTLAGETGQEAEEDEEEADLVLAQVLMTEYKLVVVGADGVGKSALTIQLIQ ADLVLAQVLMTEYKLVVVGAVGVGKSALTIQLIQADLVLAQVLESII NFEKLAD LVAEQKLISEEDLV (SEQ ID NO:77)
Secuencia Db112ras3 de hMeso41	(ActA-N100) GSAKVLEEDDEETPALGSLLFLLFSLGWVQPEDEEEADLVLAQ VLMTEYKLVVVGADGVGKSALTIQLIQADLVLAQVLMTEYKLVVVGAVGVGKSA LTIQLIQADLVLAQVLESII NFEKLADLVAEQKLISEEDLV (SEQ ID NO:78)

Secuencia Db112ras5 de hMeso42	(ActAN100) GSAKVLMT ⁵ EYKLVVVGADGVGKSALTIQLIQADLVLA ⁵ KVLMTEYKLVVVGAVGVGKSALTIQLIQADLVLA ⁵ KVLEDEDEEALPTARPLGSCGTPALGSLFLFLFSLGWVQPSRTLAGE ⁵ TGQEA ⁵ EEDEE ⁵ ADLVLA ⁵ KVLESIINFEKLADLVAEQKLISEEDLV (SEQ ID NO:79)
Secuencia Db112ras6 de hMeso43	(ActAN100) GSAKVLMT ⁶ EYKLVVVGADGVGKSALTIQLIQADLVLA ⁶ KVLMTEYKLVVVGAVGVGKSALTIQLIQADLVLA ⁶ KVLEDEDEETPALGSLFLFLFSLGWVQPEEDEE ⁶ ADLVLA ⁶ KVLESIINFEKLADLVAEQKLISEEDLV (SEQ ID NO:80)
Identificación de detalles dentro de las secuencias anteriores	
rasG12D (a.k.a. 12rasD)	MTEYKLVVVGADGVGKSALTIQLIQ (SEQ ID NO:81)
rasG12V (a.k.a. 12rasV)	MTEYKLVVVGAVGDGKSALTIQLIQ (SEQ ID NO:82)
Secuencia secretora Meso (MesoSS)	ALPTARPLGSCGTPALGSLFLFLFSLGWVQPSRTLAGE³TGQEA³A (SEQ ID NO:83)
Epítipo MesoA2 que ocurre dentro de MesoSS	TPALGSLFLFLFSLGWVQP (SEQ ID NO:84)
Separador	EEDEEE (SEQ ID NO:85)

Las siguientes construcciones Δ ActA Δ inIB de *Listeria*, adecuadas como construcciones de control, se encontró que no expresaron de manera detectable: (1) hMeso deltas deltaGPI ras (la ras tuvo una mutación G12D). Esta construcción tuvo un promotor ActA, secuencia de señal BaPA, con un sitio ActA de integración; (2) A30R ActA-N100 hMeso Δ SS Δ GPI ras (la ras tuvo una mutación G12D). Esta construcción en particular tuvo un promotor ActA, secuencia de señal BaPA, con un sitio ActA de integración.

Los promotores de la presente invención pueden incluir uno o más de los siguientes unidos operativamente con un ácido nucleico que codifica un antígeno: hly, ActA, p60, pHyper, y así sucesivamente. pHyper se describe (véase, e.g., Solicitud de Patente de Estados Unidos 2005/0147621 de Higgins, *et al.*). La presente invención proporciona secuencias de señal, tales como una o más de la secuencia de señal de LLO, ActA, BaPA, BsPhoD, p60, y así sucesivamente. Las socios de proteína de fusión de la presente descripción puede incluir una o más de LLO₁₋₆₂, LLO₁₋₄₄₁, ActA-N100, p60, PFO₁₋₃₉₀, BaPA₁₋₈₂, y lo similar.

Las construcciones que contienen una pareja de proteína de fusión basada en ActA o una pareja de proteína de fusión basada en LLO se sintetizaron como sigue. Cuando se completa la síntesis, la construcción se integró en el genoma de *L. monocytogenes*. Mientras que la integración se medió por vectores tales como pKSV7, pPL2, y pINT,

la presente descripción no se limita a ningún vector de integración particular o mecanismo de integración. Varios polinucleótidos se ensamblaron en una forma modular, es decir, al ligar los ácidos nucleicos prefabricados juntos en el andamio pKSV7. Estos ácidos nucleicos prefabricados son como sigue:

La construcción promotor ActA/ActA-N100/ Δ SS Δ GPI de Mesotelina humana, se ensambló utilizando los siguientes componentes: Un primer polinucleótido que consiste de un primer ácido nucleico que codifica la secuencia de promotor ActA listerial nativo (incluyendo el sitio Shine Dalgarno) conectada directamente a un segundo ácido nucleico que codifica ActA-N100 (el primer polinucleótido tuvo un sitio 5'-*HindIII* y un sitio 3'-*BamHI*). Un segundo polinucleótido consistió de Δ SS Δ GPI de Mesotelina humana (sitio 5'-*BamHI* y sitio 3'-*SacI*). El pKSV7 recibió un inserto que consiste del primer polinucleótido conectado directamente al segundo polinucleótido. En una variación de esta construcción, el segundo polinucleótido consistió de un primer ácido nucleico que codifica Δ SS Δ GPI de Mesotelina humana conectada directamente a un segundo ácido nucleico que codifica 12 ras (sitio 5'-*BamHI* y sitio 3'-*SacI*). La mesotelina humana se pretende como un ejemplo no limitante.

La construcción promotor hly/LLO62/ Δ SS Δ GPI de Mesotelina humana/12ras se ensambló utilizando los siguientes componentes. LLO62 significa un ácido nucleico que codifica aminoácidos 1-62 de listeriolisina (LLO). Se preparó un primer polinucleótido que consistió de un primer ácido nucleico que codifica la secuencia de promotor hly listerial nativo (incluyendo el sitio Shine Dalgarno) conectada directamente a un segundo ácido nucleico que codifica LLO62 (el primer polinucleótido tuvo un sitio 5'-*KpnI* y un sitio 3'-*BamHI*). Se preparó un segundo polinucleótido que consistió de un primer ácido nucleico que codifica Δ SS Δ GPI de Mesotelina humana conectada directamente a un segundo ácido nucleico que codifica 12ras (el segundo polinucleótido tuvo un sitio 5'-*BamHI* y un sitio 3'-*SacI*). El pKSV7 recibió un inserto que consiste del primer polinucleótido conectado directamente a un segundo polinucleótido. Una variación de esta construcción utilizó LLO60 (codón optimizado) en lugar de LLO62.

La Figura 7 describe un número de modalidades de la presente invención, incluyendo las proteínas de fusión basadas en LLO y proteínas de fusión basadas en actA-N100.

La Figura 8 describe la expresión de varias construcciones de los cultivos celulares de *Listeria* diseñada. En este contexto, la expresión significa la secreción y biosíntesis de proteína en el medio, en donde la construcción indicada se había integrado en el genoma listerial. La expresión se condujo en un medio que contiene extracto de levadura sin glucosa a una densidad bacteriana correspondiente a OD₆₀₀=0.8. El término pPL2 indica que la construcción se insertó a manera de recombinación específica de sitio que utiliza el vector pPL2, pKSV7 significa que la construcción se insertó por recombinación homóloga que utiliza el vector pKSV7 (véase Tabla 13).

El anticuerpo para detectar la expresión de mesotelina fue un anticuerpo policlonal de conejo, producido al inmunizar el conejo con tres péptidos de mesotelina humana, en donde el anticuerpo se purificó por un péptido único que se conserva completamente entre el ratón y la mesotelina humana (SEADVRLGGLAC (SEQ ID NO:86)).

Tabla 13. Leyenda de la Figura 8.

	Construcción	Promotores	Secuencias secretoras (SS) de construcción:	Integración mediada por:
Línea P	<i>L. monocytogenes</i> genitor Δ ActA Δ inIB	N.A.	N.A.	N.A.
Línea 1.	pPL2 LLO BaPA Δ SS hMeso Δ SS Δ GPI-12-ras	hly	LLO	pPL2
Línea 2.	pPL2 LLO BaPA E30R hMeso Δ SS Δ GPI-12-ras	hly	LLO y BaPA	pPL2

Línea 3.	pPL2 LLO BaPA E30M hMeso Δ SS Δ GPI-12-ras	hly	LLO y BaPA	pPL2
Línea 4.	pPL2 LLO _{natural} hMeso Δ SS Δ GPI-12-ras	hly	LLO	pPL2
Línea 5.	pPL2 LLO _{opt} hMeso Δ SS Δ GPI-12-ras	hly	LLO	pPL2
Línea 6.	pKSV7 ActA::ActA-N100 hmeso Δ SS Δ GPI	ActA	ActA	pKSV7
Línea 7.	pKSV7 ActA::ActA-N100 hmeso Δ SS Δ GPI-12-ras	ActA	ActA	pKSV7
Línea 8.	pKSV7 ActA::ActA-N100 hmeso Δ SS Δ GPI	ActA	ActA	pKSV7
Línea 9.	pKSV7 inIB:BaPA hMeso Δ SS Δ GPI-12-ras.	inIB	BaPA	pKSV7
Línea 10	Marcadores de peso molecular	N.A.	N.A.	N.A.
Los dos puntos dobles de "ActA::ActA-100" significa que el sitio de inserción fue el gen ActA. LLO significa listeriolisina. El gen hly codifica listeriolisina.				

Los resultados del gel (Figura 8) muestran las proteínas en el sobrenadante (proteínas secretadas).

5 La línea P, un experimento de control que utiliza la *Listeria* genitora, no muestra ninguna banda con color obvio.

Las líneas 1-4 muestran pocas o nada de bandas.

La línea 5 muestra algo de secreción de LLO_{opt}hmeso Δ SS Δ GPI-12ras, en donde la integración fue por integración medida por pPL2 en el gen de tARN^{Arg} listerial.

10 La línea 6, que representa un intento para secretar la mesotelina de ratón, no muestra nada de banda con color obvio.

La línea 7, mostró la secreción marcada del ActA-N100 hMeso Δ SS Δ GPI-12ras, en donde la integración se medió por pKSV7 en el sitio ActA del genoma listerial.

La línea 8 muestra secreción aún mayor, en donde la construcción fue ActA-N100 hMeso Δ SS Δ GPI, y en donde la integración se medió por pKSV7 en el sitio ActA del genoma listerial (Figura 7).

15 La línea 9 muestra poca o nada de bandas.

20 La Figura 9 demuestra la secreción de proteína de Δ ActA Δ inIB *L. monocytogenes*, en donde la *Listeria* expresó varias proteínas de fusión que comprenden Δ SS Δ GPI de mesotelina humana. Todas las construcciones de mesotelina se expresaron de *L. monocytogenes* por ácidos nucleicos optimizados por codón para *L. monocytogenes*. Se prepararon varias construcciones para el estudio de secreción (véase Tabla 14). En estos experimentos también, el anticuerpo para detectar la expresión de mesotelina fue un anticuerpo policlonal de conejo, producido al inmunizar el conejo con tres péptidos de mesotelina humana, en donde el anticuerpo se purificó por un péptido único que se

conserva completamente entre el ratón y la mesotelina humana (SEADVRLGGLAC (SEQ ID NO:86)).

Tabla 14. Leyenda para la Figura 9. Análisis Western blot para la secreción de mesotelina humana (hMeso).

Línea	Construcción	Promo-tores	Secuencias secretoras (SS) de cons-trucción:	Integra-ción mediada por:
P.	<i>L. Monocytogenes</i> genitor Δ ActA Δ inIB (no mesotelina)	N.A.	N.A.	N.A.
1.	<i>L. monocytogenes</i> Δ ActA Δ inIB LLO441 _{opt} mesotelina humana Δ SS Δ GPI-12-ras	ActA	LLO	pPL2
2.	<i>L. monocytogenes</i> Δ ActA Δ inIB ActA::BaPA ActA-N100(A30R)-mesotelina humana Δ SS Δ GPI (clon 2.25).	ActA	BaPA	pKSV7 en sitio ActA
3.	<i>L. monocytogenes</i> Δ ActA Δ inIB ActA::BaPA ActA-N100(A30R)-mesotelina humana Δ SS Δ GPI (clon 2.69).	ActA	BaPA	pKSV7 en sitio ActA
4.	<i>L. monocytogenes</i> Δ ActA Δ inIB ActA::BaPA ActA-N100(A30R)-mesotelina humana Δ SS Δ GPI-ras (clon 1.1)	ActA	BaPA	pKSV7 en sitio ActA
5.	<i>L. monocytogenes</i> Δ ActA Δ inIB ActA:ActA-N100(A30R)-mesotelina humana Δ SS Δ GPI (clon 1.46). A30R indica la mutación en el ActA en la que se basa ActA-N100	ActA	ActA	pKSV7 en sitio ActA

6.	<i>L. monocytogenes</i> Δ ActA Δ inIB ActA::ActA-N100(A30R)- mesotelina humana Δ SS Δ GPI (clon 2.14). A30R indica la mutación en el ActA en la que se basa ActA-N100	ActA	ActA	pKSV7 en sitio ActA
7.	<i>L. monocytogenes</i> Δ ActA Δ inIB inIB::ActA-N100- mesotelina humana Δ SS Δ GPI (clon BH77). ActA-N100 se basa en ActA tipo silvestre.	inIB	ActA	pKSV7 en sitio inIB
8.	<i>L. monocytogenes</i> Δ ActA Δ inIB inIB::ActA-N100- mesotelina humana Δ SS Δ GPI (clon BH78). ActA-N100 se basa en ActA tipo silvestre.	inIB	ActA	pKSV7 en sitio inIB
9.	<i>L. monocytogenes</i> Δ ActA Δ inIB inIB::ActA-N100(A30R)- mesotelina humana Δ SS Δ GPI (clon BH85). A30R indica la mutación en el ActA en la que se basa ActA-N100	inIB	ActA	pKSV7 en sitio inIB
10.	<i>L. monocytogenes</i> Δ ActA Δ inIB inIB::ActA-N100(A30R)- mesotelina humana Δ SS Δ GPI (clon BH85). A30R indica la mutación en el ActA en la que se basa ActA-N100	inIB	ActA	pKSV7 en sitio inIB
11.	<i>L. monocytogenes</i> Δ ActA Δ inIB ActA-N100 Ndegcon-mesotelina humana (clon A11-2).	ActA	ActA	pKSV7 en sitio ActA
12.	<i>L. monocytogenes</i> Δ ActA Δ inIB ActA-N100 Ndegcon-mesotelina humana (clon A11-2).	ActA	ActA	pKSV7 en sitio ActA
13.	<i>L. monocytogenes</i> Δ ActA Δ inIB ActA-N100	ActA	ActA	pKSV7 en sitio ActA

	<i>Ndegcon-mesotelina humana ΔSSΔGPI-12-ras (clon 1-3).</i>			
14.	<i>Marcadores de peso molecular</i>	N.A.	N.A.	N.A.
N.A. significa no aplicable. Los dos puntos dobles encontrados en "inIB::ActAN100" indica el sitio de la construcción, es decir, en el gen inIB. "Ndegcon" se refiere a las construcciones que incluyen las secuencias consenso modeladas después de las secuencias establecidas por Suzuki y Varshavsky (1999) EMBO J. 18:6017-6026.				

La construcción utilizada para la Línea 1 utilizó LLO441 como la fuente de secuencia secretora, en donde el ácido nucleico para LLO441 se había optimizado por codón para la expresión en *L. monocytogenes*, y en donde el antígeno heterólogo fue Δ SS Δ GPI de mesotelina humana (Línea 1). Esta construcción produjo el nivel más alto de secreción en este experimento en particular (Línea 1). El material de peso molecular alto mostrado en el western blot representa LLO₄₄₁ fusionado a mesotelina en donde el material de peso molecular inferior representa probablemente los productos de degradación.

Las construcciones utilizadas para las Líneas 2 y 4 se basaron en ActA-N100, pero con la secuencia de señal de ActA suprimida y reemplazada con la secuencia de señal de BaPA. La expresión de estas construcciones fue relativamente baja (Líneas 2 y 4) (Figura 9).

Todas las construcciones restantes contuvieron ActA-N100 de longitud completa como la fuente de secuencia secretora, pero en donde ActA-N100 tuvo una mutación A30R (Línea 5); en donde ActA-N100 no tuvo mutación (Línea 7); en donde ActA-N100 tuvo una mutación A30R (Línea 9); y en donde ActA-N100 tuvo cuatro mutaciones (designadas "Ndegcon") (Línea 11). Las cuatro mutaciones en ActA-N100 designadas por "Ndegcon" fueron Arg-29, Lys-32, Lys-37, y Lys-44. La Ndegcon se situó (o insertó) en entre ActA-N100 y la mesotelina. La proteína secretada se colectó por precipitación con ácido tricloroacético de cultivos medio-exponenciales crecidos en extracto de levadura sin glucosa.

La Figura 10 muestra estimulación inmune, como se determina después de una vacunación única con la construcción Δ ActA Δ inIB *L. monocytogenes* indicada, en donde se recolectaron los bazo siete días después de la vacunación y se utilizaron como la fuente de esplenocitos. Las respuestas inmunes específicas de mesotelina se encontraron después de la vacunación con cada una de las cuatro construcciones: (1) el promotor hly se une operativamente con secuencia de señal BaPA y hMeso (integrado en sitio de tARN^{Arg}); (2) el promotor hly se unió operativamente con la secuencia de señal BaPA y hMeso (integrado en sitio inIB); (3) el promotor ActA se unió operativamente con ActA-N100 y hMeso (integrado en ActA); y (4) el promotor hly se unió operativamente con p60 y hMeso (integrado en sitio de tARN^{Arg}).

Los resultados indican un papel del promotor ActA en la estimulación de la respuesta inmune; un papel de la pareja de fusión ActA-N100 en la mejora de la respuesta inmune; así como un papel de integración en sitio ActA en el incremento de respuesta inmune; y demuestran la habilidad mejorada para estimular la respuesta inmune en donde el promotor ActA se une operativamente con la pareja de proteína de fusión ActA-N100 e integración es en sitio ActA (Figura 10).

Los detalles adicionales del estudio anterior se describen como sigue. Los ratones fueron inyectados con *Listeria*, seguido por un período de tiempo (7 días) para permitir a la *Listeria* tomarse y procesarse por células que presentan antígeno (APCs). Después de la toma de la *Listeria*, los antígenos codificados por *Listeria* presentada por APC a células T, dan como resultado la activación y expansión clonal de las células T. Se removieron los bazo, y se aislaron los esplenocitos (incluyendo las células T y APCs). A los esplenocitos aislados se agregó ya sea el regulador o un grupo de péptidos de mesotelina humana (0.002 mg/ml de concentración final del grupo). Después de agregar los péptidos, se permitió a las células dendríticas (DCs) en la preparación de esplenocito presentar el péptido a cualquiera de las células T activadas. La presentación exitosa dio como resultado la secreción de la célula T de interferona-gamma, como se refleja por las señales en los ensayos formadores de mancha (células formadoras de mancha; SFC) (Figura 10).

El grupo de péptido de mesotelina (también conocido como grupo 15 x 11) consistió de 153 diferentes

péptidos, todos ellos 15 mers, girando la secuencia entera de mesotelina humana, en donde los péptidos subsiguientes se superponen por once aminoácidos. Los resultados demostraron que la expresión de interferona-gamma (IFGgamma) fue mayor en donde el grupo de péptidos se había agregado a los esplenocitos, que en donde no se utilizó grupo de péptido. Las Figuras 10-12 comparan la respuesta inmune en donde los ratones fueron vacunados con 1×10^7 CFU o 3×10^7 CFU (Figura 10); 1×10^6 CFU o 1×10^7 CFU (Figura 11); o 1×10^6 CFU o 1×10^7 CFU de *L. monocytogenes* (Figura 12). En la mayoría de los casos aquí descritos, la respuesta inmune fue mayor en donde los ratones fueron inyectados con números grandes de bacterias.

Las Figuras 11 y 12 describen los estudios similares que utilizan los ensayos de célula formadora de manchas.

Los datos puros (fotografías de ensayos de célula formadora de manchas) de la Figura 11 se hicieron en un gráfico en la Figura 12. La Figura 12 describe el número de células que producen una señal IFNgamma (célula formadora de manchas; SPC) por número de esplenocitos. Los datos describen las respuestas inmunes específicas de mesotelina comparables, en donde la construcción fue con promotor hly unido operativamente con la secuencia de señal BaPA y hMeso (sitio inIB), o en donde la construcción fue con promotor ActA unido operativamente con la secuencia de señal ActA y ActA-N100 y hMeso (sitio ActA).

Las Figuras 13-14 describen los datos de metástasis de tumor. El estudio midió la metástasis de células que expresan mesotelina humana CT-26 a los pulmones. A t=0 días, las células tumorales CD-26 se inyectaron i.v. (células 2×10^5). A t=3 días, los ratones fueron administrados con vacuna *Listeria* indicada. A t=18 días, se recolectaron los pulmones. Las "células 2×10^5 " significan 2×10^5 células.

Los ratones inoculados con célula tumoral se trataron como sigue: (1) sólo agua de sal (HBSS); (2) Δ ActA Δ inIB *L. monocytogenes* que no codifica el antígeno heterólogo (control negativo); (3) Δ ActA Δ inIB *L. monocytogenes* que codifica el péptido AH1-A5 derivado del antígeno tumoral gp70 (un antígeno diferente de mesotelina – control positivo); y (4)-(7) Δ ActA Δ inIB *Listeria* que codifica varias construcciones de mesotelina. El péptido AH1-AT se deriva del antígeno tumoral gp70. AH1-A5 se utiliza como un control positivo en los presentes experimentos (véase, e.g., Brockstedt, *et al.* (2004) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101:13832-13837; Slansky, *et al.* (2000) Immunity 13:529-538).

La Figura 14 revela efectos equivalentes de las cuatro construcciones de *Listeria* que expresan mesotelina en la eliminación de metástasis tumoral.

Tabla 15. Grupos de ratones estimulados con células tumorales CT26 y tratadas con vacunas *Listeria*.

Tabla 15. Grupos de ratones desafiadas con células tumorales CT26 y tratadas con vacunas *Listeria*

Grupo	Vacuna <i>Listeria</i>	Sitio de integración
1	Solución salina tamponada de Hank sólo (HBSS) (no <i>Listeria</i>) (control negativo).	Sin <i>Listeria</i>
2	<i>L. monocytogenes</i> Δ ActA Δ inIB (cepa genitora) (control negativo).	Ninguno
3	<i>L. monocytogenes</i> Δ ActA <i>L. monocytogenes</i> Δ inIB-OVA-AH1-A5. El epítipo AH1-A5 se insertó en estructura dentro de OVA al utilizar un sitio Avall único (expresado del promotor hly como parte del vector pPI2) (control positivo)	Sitio tARNArg
4	<i>L. monocytogenes</i> Δ ActA Δ inIB prfA* (E77K)-BaPa secuencia de señal-Mesotelina humana Δ SS Δ GPI (véase, e.g., Mueller y Freitag 2005) Infect. Immun. 73:1917-1926).	Sitio ActA
5	<i>L. monocytogenes</i> Δ ActA Δ inIB-BaPa secuencia de señal-	Sitio ActA

	mesotelina humana $\Delta SS\Delta GPI$ (expresada del promotor ActA)	
6	<i>L. monocytogenes</i> $\Delta ActA\Delta inlB$ -BaPa secuencia de señal-mesotelina humana $\Delta SS\Delta GPI$ (expresada de promotor hly)	Sitio inlB
7	<i>L. monocytogenes</i> $\Delta ActA\Delta inlB$ -ActA secuencia de señal-ActA-N100-mesotelina humana $\Delta SS\Delta GPI$ (expresada de promotor ActA)	Sitio ActA

La Figura 15 demuestra que varias *Listeria* que expresan mesotelina son eficaces en la reducción de tumores de pulmón, en donde se probaron tres diferentes dosis de cada *Listeria* que expresa mesotelina. hMeso6 es más eficaz que, por ejemplo, hMeso2 o hMeso4, en la detención de la metástasis de pulmón (Figura 15).

La Figura 16 describe la supervivencia a los tumores con varias vacunas listeriales. Con tratamientos de control negativo (HBSS; *Listeria* genitora), ninguno de los ratones sobrevivieron más allá de 22 días. La *Listeria* de control positivo expresó un antígeno derivado de gp70. El antígeno (AH1-A5) se derivó del antígeno inmunodominante de células CT26 (Slansky, *et al.*, (2000) *Immunity* 13:529-538). Los ratones tratados con la vacuna de control positivo sobrevivieron hasta o más allá de 60 días (Figura 16).

La Figura 17 describe los geles, con análisis western blot, para detectar la mesotelina secretada (mancha superior) y mesotelina expresada total (mancha inferior). $\Delta ActA\Delta inlB$ *L. monocytogenes* se diseñó para contener un polinucleótido que contiene las secuencias secretoras indicadas y se cultivaron los antígenos, y se midió la mesotelina secretada o total. Las secuencias secretoras fueron BaPA o Bs phoD, como se indica. Los antígenos fueron mesotelina humana de longitud completa (FL) o mesotelina humana suprimida en su secuencia secretora y GPI de anclaje (hMeso $\Delta SS\Delta GPI$), como se indica. Los resultados indican que la expresión total fue de cierta manera mayor con Bs phoD (líneas 4-5; gel inferior) que con BaPA (líneas 2-3; gel inferior). Los resultados también demuestran que, al menos con las construcciones que contienen Bs phoD, la secreción fue mayor con hMeso ($\Delta SS\Delta GPI$) (líneas 4-5; gel superior) que con hMeso de longitud completa (líneas 8-9; gel superior).

La Figura 18 compara la respuesta inmune específica de mesotelina a la vacunación con hMeso1, hMeso2, hMeso3, y hMeso4. La comparación lado por lado de hMeso1 y hMeso2 revela que una construcción *Listeria* que comprende un ácido nucleico que codifica para PrfA constitutivamente activo (prfA*) incrementa la respuesta inmune, como se compara a una construcción *Listeria* que no comprende ese ácido nucleico. Las comparaciones lado por lado de hMeso1 y hMeso4 revela que la respuesta inmune incrementada se encuentra con integración genómica en el sitio inlB (hMeso4), como se compara a la respuesta inmune en donde la integración genómica se encuentra en el sitio tARN^{Arg} (hMeso1). La comparación de la respuesta inmune a hMeso3 y hMeso4 sugiere que la respuesta inmune puede mejorarse al utilizar el promotor hly, como se compara a la respuesta inmune con el promotor ActA. El análisis Elispot se utilizó para valorar la respuesta inmune. Los esplenocitos (más o menos estimulación de esplenocitos con un grupo de péptidos de mesotelina) para ensayos de elispot, en donde los ensayos de elispot midieron la expresión IFN γ .

Los geles de la Figura 18 describen las western blots sensibles a la expresión total de mesotelina o a secreción de mesotelina. hMeso2 produjo los niveles más altos de secreción, indicando la utilidad de la siguiente combinación para incrementar la secreción: (1) ácido nucleico prfA*; (2) Integración en sitio tARN Arg; (3) El promotor hly; y (4) secuencia secretora BaPa. Nuevamente, la utilidad del ácido nucleico prfA*, se demuestra.

La Figura 19 compara la respuesta inmune a hMeso12 y hMeso1. La respuesta inmune específica de mesotelina se representa por los datos puros (ensayos de elispot) y por histogramas que muestran el número de esplenocitos formadores de manchas por 2×10^5 de esplenocitos. Los resultados indican que la secuencia ras presente en la proteína de fusión de hMeso $\Delta SS\Delta GPI$ (hMeso12) da como resultado una respuesta inmune inferior (ensayos de elispot) y expresión inferior (western blots), como se compara a los resultados en donde la proteína de fusión no comprendió ras (hMeso1) (Figura 19).

Los ratones fueron vacunados con las dos cepas (hMeso12 o hMeso1), y se removieron los esplenocitos y se

utilizaron para ensayos de elispot, en donde las mezclas de ensayo se hicieron palpar con grupo de péptidos de hMeso estándar. Como se describe anteriormente, hMeso1 (la secuencia secretora de BaPA es tipo silvestre) estimuló una respuesta inmune específica de mesotelina mayor que hMeso12 (la secuencia secretora BaPA es E30R).

La Figura 20 compara la respuesta inmune a hMeso1, hMeso5, hMeso19, y hMeso20. Los resultados demuestran que la respuesta inmune específico de mesotelina más grande fue para hMeso1, en donde también hubo algo de respuesta específica de mesotelina detectable a hMeso5. Los resultados demuestran que la secuencia secretora de BaPA da como resultado una mayor respuesta inmune, como se compara a la secuencia secretora p60, o a derivados de secuencia secretora p60. El gel demuestra que la secuencia secretora p60 soporta la secreción de mesotelina. Véanse líneas marcadas hMeso5 o hMeso20 (Figura 20).

La Figura 21 compara las respuestas inmunes a hMeso11, hMeso6, hMeso10, y hMeso18. Las respuestas inmunes específicas de mesotelina ocurrieron con cada una de estas vacunas, en donde las respuestas más altas se provocaron por hMeso10 y hMeso18. En comparación a hMeso6 y hMeso10, puede observarse que la ras (hMeso10) puede mejorar la respuesta inmune específica de mesotelina. Aquí, se utilizaron ambas cepas *Listeria* de secuencia secretora ActA, se utilizó el promotor ActA, y se utilizó el sitio ActA de integración. El alto grado de respuesta inmune a hMeso18 puede deberse al uso de la secuencia secretora ActA (A30R). La presente invención proporciona una *Listeria* que contiene un polinucleótido que comprende un primer ácido nucleico que codifica ActA (A30R), unido operativamente con y en estructura con un segundo ácido nucleico que codifica un antígeno heterólogo, e.g., un antígeno derivado de un tumor, tal como antígeno de mesotelina, o un antígeno derivado de un agente infeccioso. El gel revela que la cepa *Listeria* hMeso18 secretó las cantidades relativamente bajas de mesotelina, como se compara con la secreción por hMeso10 y hMeso6 (Figura 21).

La Figura 22 compara las respuestas inmunes a hMeso1, hMeso14, hMeso15, y hMeso22. Las respuestas inmunes específicas de mesotelina a hMeso1, hMeso14, y hMeso22 fueron comparables, mientras que hMeso15 fue mayor. Las secuencias secretoras (SS) de cada una de estas cuatro cepas de vacuna, son diferentes. Las secuencias secretoras (SS) de hMeso1 es BaPA; hMeso14 (LLO62); hMeso15 (LLO opt62); hMeso22 (LLO441).

La Figura 23 revela la respuesta inmune en voluntarios humanos saludables, a listeriolisina (LLO) y a mesotelina. La respuesta inmune a epítopes de LLO y a mesotelina se encontró en todos los tres sujetos probados.

La Figura 24 ilustra la expresión de mesotelina humana por hMeso6 o hMeso5, en brote BHI y en macrófagos J774, en donde la expresión se valoró por separación de gel y detección por el método western blot. Los resultados demuestran la expresión relativamente baja por hMeso6 en brote (y expresión alta por hMeso5 en brote), y expresión relativamente alta por hMeso6 dentro de las células de mamífero (y baja expresión por hMeso5 dentro de las células de mamífero). La gráfica demuestra la respuesta inmune relativamente alta (respuesta meso-específica; ensayos de elispot) después de la vacunación con hMeso6, y la baja respuesta inmune después de la vacunación con hMeso5 (Figura 24).

La Figura 25 describe la respuesta inmune específica de mesotelina, en donde los ratones se habían vacunado con *Listeria* que contiene un polinucleótido que comprende un primer ácido nucleico que codifica p60, BaPA, LLO441, ActA-N100, como se indica, y un segundo ácido nucleico que codifica hMeso. La integración fue en el sitio tARN^{Arg}, sitio ActA, o sitio inIB, del genoma listerial, como se indica.

La Figura 26 ilustra la expresión *in vivo* de mesotelina de macrófagos J774, como se detecta por el western blotting utilizando un anticuerpo anti-mesotelina. La expresión *in vivo* similar ocurrió cuando los macrófagos J744 se infectaron con hMeso6 o con hMeso26.

La Figura 26, así como la Figura 27, muestra que la mesotelina específica montada después de la vacunación con varias *Listeria* diseñadas fueron mayores con la cepa hMeso26 que con las otras cepas probadas.

Las Figuras 28 (fotografías de pulmones), 29 (histogramas de datos de pulmones), y 30 (supervivencia de ratón) revelan el tratamiento exitoso de tumores de pulmón al administrar hMeso6 y hMeso26. Los ratones fueron tratados con un control negativo (HBSS); control positivo (*Listeria* que expresa AH1-A5); o los números indicados de hMeso6 o hMeso26. Los tumores se indujeron por una inyección con células CT26. Los resultados demuestran que tanto hMeso6 como hMeso26 fueron eficaces en la reducción de la metástasis tumoral, en donde hMeso26 fue más efectiva que hMeso6 (Figura 30).

La Figura 31 compara la expresión, y las respuestas inmunes a la vacunación, con varias cepas *Listeria* diseñadas para contener los casetes de expresión integrados en diferentes puntos en el genoma listerial. La bacteria de control (*L. monocytogenes* Δ ActA Δ inIB) no contuvo casete de expresión, mientras que hMeso26 contuvo sólo un

casete de expresión integrado. Las cepas hMeso40, hMeso41, hMeso42, y hMeso43, cada una contuvieron dos diferentes de casetes de expresión (integrados en dos diferentes puntos en el genoma), en donde la expresión de estas cepas *Listeria* y respuesta inmune a estas cepas *Listeria* se muestran (Figura 31).

La Figura 32 muestra la expresión *in vivo* de mesotelina, es decir, *in vivo* dentro de macrófagos J744, después de la infección con (1) hMeso6; (2) hMeso26; o (3) *L. monocytogenes* Δ ActA Δ inlB (tres construcciones idénticas) que llevan un casete de expresión que codifica la mesotelina humana de longitud completa, e integrado en sitio tARN^{Arg}. Las tres construcciones idénticas, o hermanas, se etiquetan 1-1, 7-1, y 8-1.

La Figura 33 describe la expresión *in vivo* de mesotelina por hMeso6, hMeso26, y hMeso38 dentro de los macrófagos murino J774 (geles con western blots). La bacteria de control fue *L. monocytogenes* Δ ActA Δ inlB. También se muestran las respuestas inmunes específicas de mesotelina (ensayos de elispot). Los resultados demuestran la expresión comparable de mesotelina en donde hMeso6, hMeso26, y hMeso38 se ubican en macrófagos, y la respuesta inmune comparable a hMeso26 y hMeso38.

La Figura 34 describe la respuesta inmune específica de mesotelina generada siete días después de una inyección única de hMeso26 o hMeso38, en las dosis indicadas. Las curvas de respuesta de dosis revelan un incremento marcado en ir de un millón de bacterias a diez millones de bacterias. Las curvas de respuesta de dosis encontradas con dos cepas son similares entre sí (Figura 34). La presente invención proporciona hMeso26; hMeso38; una vacuna que comprende hMeso26 y/o hMeso38; un método para administrar hMeso26 y/o hMeso38 a un sujeto mamífero; un método para estimular la respuesta inmune específica de mesotelina contra un cáncer o tumor que comprende administrar hMeso26 y/o hMeso38; un método para incrementar la supervivencia a un cáncer o tumor que comprende administrar hMeso26 y/o hMeso28, y así sucesivamente (Figura 34).

Las Figuras 35A y 35B continúan la narrativa en hMeso26 y hMeso38; y muestra las fotografías de pulmones fijos. Las células tumorales se inyectaron a t=0 días. Las vacunas de *listeria* se inyectaron (i.v.) a T=3 días. Se recolectaron los pulmones en t=19 días, en donde la histografía cuantifica los resultados de metástasis representados por las fotografías de pulmón (Figura 35A,B). Con la concentración de ratones con los números indicados de bacterias, los resultados muestran respuestas similares para ambas cepas listeriales, hMeso26 y hMeso38.

La Figura 36 también continúa la narrativa de cepas *Listeria* hMeso26 y hMeso38. Los resultados demuestran que ambas cepas dan como resultado incrementos similares en supervivencia a células tumorales CT26 inoculadas.

La Figura 37 disecciona la respuesta inmune específico de mesotelina a cepas *Listeria* hMeso26 y hMeso38 en respuesta de célula T CD4⁺ y respuesta de célula T CD8⁺. La respuesta inmune se monitoreó por ensayos de tintación intracelular (ICS). Ambas cepas de *Listeria* se probaron con ratones Balb/c, mientras que sólo la cepa *Listeria* hMeso26 se probó con ratones CD-1. Los resultados demuestran que la proporción de la respuesta inmune que es respuesta de célula T CD4⁺, o respuesta de célula T CD8⁺, pueden diferir en diferentes cepas de ratones.

La Figura 38 demuestra que hMeso38 incrementa la supervivencia a tumores, y disecciona la contribución a supervivencia por células que son CD4⁺, CD8⁺, y células NK. Los ratones fueron tratados con anticuerpos que suprimieron una de las células CD4⁺, células CD8⁺, o células NK. El tratamiento con los anticuerpos anti-CD8 dio como resultado sólo un ligero deterioro de supervivencia incrementada mediada por hMeso38. El tratamiento con los anticuerpos de célula anti-NK dio como resultado los deterioros moderados de supervivencia incrementada mediada por hMeso38. El tratamiento con los anticuerpos anti-CD4 dio como resultado un gran deterioro en la supervivencia incrementada mediada por hMeso38 (Figura 38). La supresión mediada por anticuerpo de las células de ratón se efectuó al administrar anticuerpos en t=menos 8 días, menos 4 días, y menos 1 día. En t=0 días, se inyectaron los ratones (i.v.) con células tumorales. En t=3 días, los ratones fueron inyectados con vacuna *Listeria* (i.v.). Se dieron estímulos de anticuerpo semanalmente para provocar la supresión de las células de ratón. La Figura 39 muestra un experimento similar, pero sólo se administró un anticuerpo, en donde sólo se administró hMeso38, o en donde se administraron tanto hMeso38 como el anticuerpo indicado.

No se pretende que los datos anteriormente expuestos limiten la presente invención a las modalidades que comprenden *L. monocytogenes* Δ ActA Δ inlB que contiene un ácido nucleico que codifica mesotelina humana. La presente exposición proporciona otras plataformas de vacuna listerial atenuada, e.g., KBMA *L. monocytogenes*, *L. monocytogenes* Δ inlB; *L. monocytogenes* Δ ActA; *L. monocytogenes* Δ hly; KBMA *L. monocytogenes* Δ inlB; KBMA *L. monocytogenes* Δ ActA; KBMA *L. monocytogenes* Δ ActA Δ inlB; KBMA *L. monocytogenes* Δ hly. Además, también lo que se proporciona son las construcciones que codifican antígeno diferentes a, o además de, mesotelina humana.

EJEMPLO VIII. Ácidos nucleicos que codifican las integrasas de fago, sitios de unión de fagos (attPP') y sitios de

unión bacteriana (attBB').

La integración específica de sitio de un primer ácido nucleico en un polinucleótido puede medirse por una integrasa de fago, un sitio attPP' que reside en el primer ácido nucleico, y un sitio attBB' compatible o correspondiente que reside en el polinucleótido. La presente descripción proporciona un número de ácidos nucleicos, que codifican integrasas de fago, sitios attPP', y sitios attBB', útiles para mediar la integración de un primer ácido nucleico en un polinucleótido, en donde el polinucleótido puede ser un plásmido o genoma bacteriano, para proporcionar algunos ejemplos no limitantes.

La Figura 40, Figura 41, Figura 42, Figura 43 y Figura 44, describen las secuencias de aminoácido de algunas integrasas de fago de la presente descripción. Lo que se contempla son los polinucleótidos que codifican estas integrasas de fago, los ácidos nucleicos que hibridizan bajo condiciones rigurosas a estas polinucleótidos en donde los ácidos nucleicos codifican las integrasas de fago funcional. También se contemplan otros polinucleótidos que se encierran en corchetes por un par de cebadores PCR, en donde el par de cebadores PCR corresponde exactamente a dos posiciones de un polinucleótido que codifica una integrasa de fago de la presente descripción.

Se proporcionan los ácidos nucleicos que codifican las siguientes integrasas de fago, los polipéptidos de integrasa de fago, ácidos nucleicos que codifican los sitios de unión de fago relevantes (attPP') y ácidos nucleicos que codifican los sitios de unión bacterianos (attBB'). La presente descripción comprende las siguientes integrasas: (1) *L. innocua* 0071 integrasa; (2) *L. innocua* 1231 integrasa; (3) *L. innocua* 1765 integrasa; (4) *L. innocua* 2610 integrasa; y (5) *L. monocytogenes* f6854_2703 integrasa.

La identificación de ácidos nucleicos que codifican integrasas, sitios attPP', y sitios attBB', fue de acuerdo con el siguiente procedimiento de múltiples etapas. Las secuencias de ácido nucleico candidato se adquirieron inicialmente, y las homologías pueden identificarse, utilizando, e.g., la característica BLAST de nucleótido o proteína en la red a nivel mundial en ncbi.nlm.nih.gov, y utilizando la característica de genomas microbianos completos en la red a nivel mundial a tigr.org.

Etapas 1. Se identificaron nuevas secuencias de integrasa de fago como sigue. Los ácidos nucleicos de una integrasa de fago conocida se utilizaron para buscar una secuencia similar en un genoma listerial, en donde el genoma listerial alberga un profago. Las secuencias de integrasas de fago conocidas utilizadas en esta etapa de la búsqueda, fueron aquellas que codifican la integrasa PSA e integrasa U153.

Etapas 2. Una vez que un ácido nucleico que codifica una nueva integrasa de fago se identifica, se revisa el cebador 3 ADN al ácido nucleico que codifica la integrasa para la apariencia de un sitio de unión. El sitio de unión normalmente toma la forma de un híbrido del sitio de unión de fago y el sitio de unión bacteriana (attPB'). El sitio de unión toma la forma de este híbrido debido a que el fago se ha integrado por sí mismo en el genoma listerial.

Etapas 3. Las regiones del genoma listerial que contienen un sitio attPB' putativo se compararon con la región correspondiente de otra cepa listerial o especie listerial, en donde ésta otra especie o cepa listerial no se espera que contenga un fago integrado. El punto de cruzamiento (punto de cruzamiento entre secuencia de fago y secuencia bacteriana en attPB') toma la forma de una discontinuidad. El punto de cruzamiento puede ocurrir en una estructura de lectura abierta o en una región intergénica.

Etapas 4. La secuencia de nucleótidos que reside inmediatamente corriente abajo del (inmediatamente extremo del cebador 3 del) gen de integrasa, y corriente arriba al punto de cruzamiento, se identifica como secuencia derivada por fago, y constituye una "primera mitad" del sitio de unión de fago.

Etapas 5. La "segunda mitad" del sitio de unión de fago puede identificarse al revisar las secuencias de ácido nucleico que residen corriente arriba al (cebador 5 al) gen de integrasa, en comparación con las regiones correspondientes de una especie o cepa listerial que no se espera que contenga algún fago integrado (fago no integrado en la región genómica de interés), y la identificación de una región de discontinuidad. La combinación de la primera mitad del sitio de unión de fago y la segunda mitad del sitio de unión de fago es attPP'.

Etapas 6. Los sitios de unión de fago y los sitios de unión bacteriana normalmente contienen una región de identidad, por ejemplo, de entre tres a 10, 20, 30 o más nucleótidos. Una región de identidad puede ayudar a encontrar la ubicación general del sitio de unión de fago y el sitio de unión bacteriana.

Etapas 7. En donde la especie listerial de interés es una especie diferente a *L. monocytogenes*, e.g., *L. innocua*, el sitio de unión bacteriana identificada en el genoma *L. innocua* puede utilizarse como un medidor por computadora para buscar el genoma *L. monocytogenes* para secuencias homólogas. El resultado de esta búsqueda del genoma *L. monocytogenes* en donde el resultado del medidor será el sitio de unión bacteriana (attBB').

Etapa 8. En donde la región de identidad es relativamente larga, e.g., 40-50 nucleótidos, esta región de identidad puede constituir el sitio de unión de fago completo (attPP') y sitio de unión bacteriana completa (attBB').

La mayoría de las integrasas específicas de sitio son de la familia de recombinasa de tirosina o familia de recombinasa de serina. Aproximadamente 100 genes de integrasa codificados por fago, se han identificado. Estos genes, codificados por el genoma fago, pueden encontrarse en el genoma de fago y/o también con un genoma bacteriano después de la integración de fago en el genoma bacteriano.

Las recombinasas de serina tienen un dominio catalítico en la terminal N, que incluye un número de residuos invariantes, incluyendo Arg-8, Ser-10, y Arg-68. El dominio catalítico de terminal N se sigue por una región de aproximadamente 220 aminoácidos, que contiene al menos diez residuos conservados (incluyendo tres cisteínas). Esta región se sigue por aproximadamente 125 aminoácidos en residuos no conservados, por una región de 30 aminoácidos rica en Leu, Ile, Val y/o Met, y finalmente un extremo de terminal C de 4-200 aminoácidos en longitud (véase, e.g. Smith y Thorpe (2002) Mol. Microbiol. 44:299-307; Nunes-Darby, *et al.* (1998) Nucleic Acids Res. 26:391-406; Esposito y Scocca (1997) Nucleic Acids Res. 25:3605-3614).

Las integrasas de fago de la familia de recombinasa de tirosina pueden identificarse por un motivo R-H-R-Y conservado. El motivo R-H-R-Y es un distintivo para la familia de integrasa de recombinasas. La histidina (H) puede sustituirse por arginina, lisina, asparagina, o tirosina. En integrasa de fago lambda, por ejemplo, los aminoácidos del motivo R-H-R-Y ocurren en aminoácidos R212, H308, R311, y Y342 (véase, e.g., No. de Acceso de GenBank P03700) (Nunes-Duby, *et al.*, *supra.*). Las integrasas de fago se identifican además por el Recuadro I (véase, e.g., A202-G225 de integrasa de fago lambda), Recuadro II (véase, e.g., T306-D344 de integrasa de fago lambda), y por ciertos motivos que ocurren antes o entre Recuadro I y Recuadro II. El Recuadro II puede incluir la secuencia de consenso LLGH, en donde la glicina (G) puede reemplazarse por A, S, o T (SEQ ID NO:137) (Nunes-Duby, *et al.*, *supra.*). Además del motivo de Recuadro I y el motivo de Recuadro II, tres "parches" de secuencias conservadas ocurren en integrasas procarióticas, tales como integrasas de fago. El parche I se encuentra corriente arriba del Recuadro I, y tiene la secuencia de consenso LT-EEV-LL (SEQ ID NO:88). En la integrasa de fago lambda, el Parche I tiene la secuencia LTADEYLKIY (SEQ ID NO:87) (aminoácidos 180-189 de No. de Acceso de GenBank P03700). El Parche II es lisina (K235 de integrasa de fago lambda) flanqueada en ambos lados por serina, treonina, glicina, o metionina. En la integrasa de fago lambda, el Parche II ocurre como SKT, mientras que el Parche II de recombinasa Cre ocurre como TKT, y en recombinasa XerD ocurre como GKG. El Parche III, que ocurre entre Recuadros I y II, es [D,E]-[F,Y,W,V,L,I,A]₃₋₆[S,T] (SEQ ID NO:89, 138, 139, 140). En integrasa de fago lambda, el Parche III ocurre en aminoácidos 269-274 (Nunes-Duby, *et al.*, *supra.*). En el uso de una secuencia de integrasa de fago candidato como una secuencia de consulta, para comparación con secuencias de integrasa de fago, podría ser útil introducir una abertura o extensión para traer al Recuadro I y Recuadro II en alineación.

El motivo R-H-R-Y conservado (Tabla 16) reside en las integrasas de fago de la presente invención. Las posiciones se determinaron por inspección manual. Esposito y Scocca proporcionan secuencias conservadas adicionales dentro del Recuadro I (a.k.a. Recuadro A) y Recuadro II (a.k.a. Recuadro B) (Esposito y Scocca (1997) Nucleic Acids Res. 25:3605-3614). Esposito y Scocca describen que la Arginina (en el Recuadro I (Recuadro A) del motivo R-H-R-Y) reside en el siguiente contexto: TGL**R**XTEL (SEQ ID NO:91), y que la histidina y la segunda arginina (en el Recuadro II (Recuadro B) del motivo R-H-R-Y) reside en el siguiente contexto: **HXL****R**HAXATLXXXG (SEQ ID NO:90). La histidina (H) y la segunda arginina (R) del motivo R-H-R-Y están en negritas y subrayada. Las secuencias correspondientes a estos dos contextos pueden encontrarse fácilmente, por inspección manual, en los Recuadros I y II de *L. innocua* 0071. Esposito y Scocca colocan la Tirosina (Y) del motivo R-H-R-Y en un motivo identificado como Recuadro C, en donde el Recuadro C de Esposito y Scocca es: VXXXLGHXXXXTXX**Y**XH (SEQ ID NO:92). La Y del motivo R-H-R-Y está en negritas y subrayada. La inspección de la secuencia de integrasa *L. innocua* 0071 demuestra que la secuencia de consenso de recuadro C reside en integrasa *L. innocua* 0071 de la presente invención.

La inspección revela que el Recuadro B y el Recuadro C de Esposito y Scocca existe en integrasa *L. innocua* 1765 de la presente invención. Además, la inspección demuestra que el Recuadro A de Esposito y Scocca reside en integrasa *L. innocua* 2601 de la presente invención. Además, la inspección de la secuencia de integrasa f6854_2703 *L. monocytogenes* muestra la ocurrencia de Recuadro A, B, y C. Tomadas en conjunto, las secuencias de consenso de Nunes-Duby, *et al. supra.*, y de Esposito y Scocca, *supra.*, confirman las secuencias identificadas como integrasas de fago. La inspección de la secuencia de integrasa de fago PSA revela los motivos similares a los Recuadros A, B, y C de Esposito y Scocca.

La integrasa *L. innocua* 1231 de la presente invención puede identificarse como una recombinasa de serina. Yang y Steitz expusieron un número de motivos invariantes, y motivos sustituidos de manera conservada, de la familia de recombinasa de serina (Yang y Steitz (1995) Cell 82:193-207). El motivo YxRVSTxxQ (SEQ ID NO:93) de Yang y

Steitz ocurre en integrasa *L. innocua* 1231. También, el motivo VLVxxLDRLxR (SEQ ID N0:141) de Yang y Steitz puede encontrarse en integrasa *L. innocua* 1231. Además, el motivo VAQAER.xxxxERxxxG (SEQ ID N0:94) de Yang y Steitz se encuentra en integrasa *L. innocua* 1231 de la presente descripción.

Tabla 16. Motivos R-H-R-Y conservados en integrasas de fago.

	Arginina (R)	Histidina (H)	Arginina (R)	Tirosina (Y)
<i>L. innocua</i> 0071 integrasa	382	595	598	631
<i>L. innocua</i> 1765 integrasa	241	334	337	369
<i>L. innocua</i> 2601 integrasa (90.9% idéntica a PSA integrasa)	199	309	312	344
<i>L. monocytogenes</i> f6854_2703 integrasa	204	328	331	364
Fago Lambda. No. de Acceso de GenBank P03700	212	308	311	342
Fago PSA. No. de Acceso de GenBank CAC85582	199	309	312	344
<i>L. innocua</i> 0071 integrasa. Secuencia codificadora más Shine Dalgarno y terminador. Véase, e.g., No. de Acceso de GenBank AL596163.1 (Segmento 1/12). (SEQ ID NO:95) <pre> AggagggccttattttATGGTAAAAAAGTAAAAGGTAGGCGTTATGAGGGTCTATT GAACAACGTAGCAAAAATTCATGGCGTATGCGCGTGACTGTAGGCTATGACTACAA AGGTACGCCGATTTCGAGCTGACAGAACGACGCAACAAAAATGAGAGGGAGCGAG AAAGAGAGTAAAGAAATTTTCATCACAGAATTAGAGCAAAATGGATATACAGCTCCT GCAAGAATGACATTTAAAGCATTTGTTGAGAATGAGTATATGCCGAAACATGCACA AAATAACCTAGAAAGTTAAACCTGGACAGAATACTACAAATCTATAGTAGCAAGAG CTTACCCAGCCTTTGGCGGCGTTCAAATGGATAAAATAACTACACTTCATATAGTT AACTTAGTCGCAAAATTACAAAAGCCCGGCGCAAGATTAGATGTTAAACCTACAGA TTCAGACGAAAAGAAAATAAGCCGCTTTTCGCCGCGATCTATCAGAAATATTTATT TTGCGATAAATTCAGTATTTGAACTGCGGTTGAGTGGAAAGTAATCCCAATTAAAC CCGCGAGAGGGTGTAAGGCTTCCAAAAACAATAAAAGACCGCTACTATTTATAC TCCTGCTGAAATTGAATTGTTAAATGCAGCTCTAGTGAAAGAGCCACTTAGATTGC AAGTAATGATTATATAGCGCTGATTTTCAGGTTGTAGAGAAGCTGAATTAGCAGCA TTAGAAGTAAAACACGTGAACCTTAATAGAAGATGAGCTAACATTCGAACAAACGCT AGTTGCAAAAGCAGGAGAAGGTTTACTTCTTAAAGAATCAACTAAGAATGATGTAG CTGGGATAGTTTCTATACCCGCTTGGTTAACTAATTTAATAGAAACATATATAAGC AATGAAGTTTATAGACCTAAAACCTGAAGGGAAATGGGCCAATCACAAATTTTATT CGCCGACATGGAAGGCAAACCGATTAGGCCTGATTCGATTTATCAGCGTTGGAAC GATTTTATAGAAAGACACAACCTTGCCGGTGATTCGTTTTTCATGATTTGCGTCACACA TCTGCTACACTTTTATTGAACAAAGGTAGAGATATAAAATTTATCCAAGAGCGGCT TAGACATAAATCTAGTGTGACCACTTCAAACATTTATGCACATGTTTTGAAAGATA CGCACAAGATGCAGCTAGCGATTTTGAGAACCCCTTTTAAgctttctgccccacc tctgccccacttaataaaaaaaggcaatttttaaActAaaatttcacaaacaaaaaa ccgcttaaacgctttgttttaggcgg </pre>				

Secuencia codificadora sólo de integrasa. <i>L. innocua</i> 0071. (SEQ ID NO:96)	ATGGTAAAAAAGTAAAAGGTAGGCGTTATGAGGGTTCATTGAACAACGTAGCAA AAATTCATGGCGTATGCGCGTACTGTAGGCTATGACTACAAAGGTACGCCGATTC GAGCTGACAGAACGACGCGAACAAAAATGAGAGGGAGCGAGAAAGAGAGTTAAGA AATTTTCATCACAGAATTAGAGCAAAATGGATATACAGCTCCTGCAAGAATGACATT TAAAGCATTGTGTGAGAATGAGTATATGCCGAAACATGCACAAAATAACCTAGAAG TTAAAACCTGGACAGAATACTACAAATCTATAGTAGCAAGAGCTTACCCAGCCTTT GGCGGCGTTCAAATGGATAAAATAACTACACTTCATATAGTTAACTTAGTCGCAAA ATTACAAAAGCCCGCGCAAGATTAGATGTTAAACCTACAGATTGACAGCAAAAGA AAAATAAGCCGCTTTCGCCGCGATCTATCAGAAATATTTATTTTTCGATAAAATTCA GTATTTGAAACTGCGGTTGAGTGGAAAGTAATCCCAATTAACCCCGCAGAGGGTGT AAGGCTTCCAAAAACAATAAGACCGCTACTATTTTACTCCTGCTGAAATTG AATTGTTAAATGCAGCTCTAGTGAAAGAGCCACTTAGATTGCAAGTAATGATTTAT ATAGCGCTGATTTAGGTTGTAGAGAAGCTGAATTAGCAGCATTAGAAGTAAACA CGTGAACCTTAATAGAGATGAGCTAACATTGCAACAAACGCTAGTTGCAAAAGCAG GAGAAGGTTTACTTCTTAAAGAATCAACTAAGAATGATGTAGCTGGGATAGTTCT ATACCCGCTTGGTTAACTAATTTAATAGAAACATATATAAGCAATGAAGTTTGA CCTAAAACTGAAGGGAATGGGCCAATCACAATTTTTATTCGCCGACATGGAAG GCAAAACCGATTAGGCTGATTGCGATTTATCAGCGTTGGAACGATTTTGAAGA CACAACTTGCCGCTGATTGCTTTTCATGATTGCGTCACACATCTGCTACACTTT ATTGAACAAAGGTAGAGATATAAAATATCCAAGAGCGCTTAGACATAAATCTA GTGTGACCACTTCAACATTTATGCACATGTTTGAAGATACGCACAAAGATGCA GCTAGCGATTTTGAGAACCCTTTTAA
Secuencia de aminoácidos de <i>L. innocua</i> 0071 integrasa (SEQ ID NO:97)	MVKVKGRRYEGSIEQSKNSWRMRVTVGVDYKGTPIRADRTTRTKNERERERELR NFITELEQNGYTAPARMTFKAFVENEYMPKHAQNNLEVKTWEYYKSIVARAYPAF GGVQMDKITTLHIVNLVAKLQKPGARLDVKPTDSDEKKNKPLSPRSIRNIYFAINS VFETAVEWKVIPINPAEGVRLPKTKRPPTIYTPAEIELLNAALVKEPLRLQVMIY IALISGCREAELAALVKHVNLIIEDELTFEQTLVAKAGEGLLKESTKNDVAGIVS IPAWLTNLIETYSNEVLDLKTEGKWANHKLFLADMEGKPIRPDSIYQRWKFLER HNLFPVIREHDLRHTSATLLLNKGRDIKIIQERLRHKSSVTTNSIYAHVLKDKTHKDA ASDFENPF
<i>L. innocua</i> 0071 Sitio de Unión bacteriana (entre <i>L. monocytogenes</i> f2365_0095 & <i>L. monocytogenes</i> f2365_0096, en el gen tARN-lys (sitio de unión subrayado). (SEQ ID NO:98)	taccgaaaaatatagccgcagcgagtggtgctgctgctgtgttttatcgctgaattat ggtataatattttttgtcggaatacgacaacgggtgttagctcagttggttagagc agctgactcttaatacagcgggtcggggttcgaaacccctcacaaccataaaaaaca aacgccagtgactgttaaaagtcgttggtgtttgtcgtttttacgggcaaaatggt aataatttcaataataagctgatttctttttgattatttatcgattacatagaaaa taagtggaaatttcaaagtatctaataatttActAcatgatatacaaaaggagttgt ttca
<i>L. innocua</i> 0071 sitio de unión por fago. (Secuencia común entre fago y cromosoma (attP y attB)). (SEQ ID NO:99)	ACTCTTAATCAGCGGGTTCGGGGGTTTCGAAACCCTCACAACCCATA

Secuencia de ácido nucleico de <i>L. innocua</i> 1231 integrasa. <i>L. innocua</i> lip11262 genoma completo. No. de Acceso de GenBank AL596168.1 (segmento 6/12 nucleótidos 29,995 a 28,563). (SEQ ID NO:100)	TggaggtgagaaagttcATGACTGTAGGGATTTATATAAGGGTTTCC ACTGAAGAACAAGTGAAGGAAGGCTTTTCTATATCAGCACAGAAAGA GAAGTTAAAAGCATATTGACACAGCGCAAGGATGGGAAGATTTCAAGT TTTACGTCGATGAAGGTAAATCAGCAAAAGATATGCACCGCCCTCTT CTACAAGAAATGATTTACATATATAAAAAAAGGACTTATAGACACAGT CCTAGTATATAAATTGGATCGTCTTACTAGGTCCGTTGTAGATTTTGC ATAATTTATTAAGTATATTTGATGAATTTAACTGTGCATTTAAAAGC GCTACTGAAGTCTACGATACTTCTTCCGCTATGGGCAGATTTTTTAT TACAATAATAAGTTCAGTTGCTCAATTTGAAAGAGAGAATACCTCTG AACGAGTTAGCTTTGGGATGGCTGAGAAAGTGCGTCAAGGAGAATAT ATTCTCTCTCGCTCCCTTCGGTTATACTAAGGGGACTGACGGAAAAC AATAGTAAATAAAATAGAAAAAGAAATATTTTTACAAGTAGTTGAAA TGGTTTCAACCGGTTATTCTTTACGACAACTTGTGAATATTTAACA AATATTGGTTTGAAAAACAAGGCGTTCAAATGATGTGTGGAAAGTATC TACATTAATTTGGATGTTAAAAAATCCTGCTGTCTACGGAGCGATAA AATGGAATAATGAAATATATGAAAAATACACATGAGCCTCTAATCGAT AAGGCAACATTTAATAAAGTAGCCAAAAATACTATCAATAAGAAGTAA ATCAACAACAAGCCGTCGTGGACACGTTTCATCACATTTTAAAAATA GATTAATTTGTCCAGCTTGTGGAAAAAGATTATCTGGATTAAGAACA AAATATATAAATAAAAAATAAGGAACTTTTTATAACAATAACTATCG TTGTGCTACCTGCAAAGACATAGACGTCCAGCAGTACAGATAAGCG AGCAAAAAATAGAGAAAGCATTATTTGATTATATTTCAAACATATA CTCAATAAAGCAAATATCTCTTCTAAAAAATTAGATAATAATTTGAG AAAACAAGAAATGATTCAAAAAGAAATTATTTCACTTCAAAGAAAAC GTGAAAAGTTTCAGAAAGCATGGGCTGCTGACCTTATGAATGATGAT GAATTTTCTAAATTAATGATTGATACAAAAATGGAGATTGATGCTGC AGAAGATAGAAAAAAGAATATGACGTATCATTATTTGTATCTCCTG AAGATATTGCTAAAAGAAATAACATCTTCGTGAATAAAAAATAAAT TGGACTTCATTATCTCCTACTGAAAAAACAGATTTTATAAGTATGTT TATTGAAGGAATTGAATATGTAAAAGATGATGAAAATAAAGCGGTTA TAACGAAAATAAGTTTTTTATAA
Secuencia de aminoácido <i>L. innocua</i> 1231 integrasa (SEQ ID NO:101)	MTVGIYIRVSTEEQVKEGFSISAQKEKLKAYCTAQGWEDFKFYVDEGKSA KDMHRPLLQEMISHIKKGLIDTVLVYKLDRLTRSVVDLHNLISIFDEFNC AFKSATEVYDTSSAMGRFFITIISSVAQFERENTSERVSFGMAEKVRQGE YIPLAPFGYTKGTDGKLIVNKIEKEIFLQVVMVSTGYSLRQTCEYLNTNI GLKTRRSNDVWKVSTLIWMLKNPAVYGAIKWNNIYENTHEPLIDKATFN KVAKILSIRSKSTTSRRGHVHHIFKNRLICPACGKRLSGLRKYINKNKE TFYNNNYRCATCKEHRRAVQISEQKIEKAFIDYISNYTLNKANISSKKL DNNLRKQEMIQKEIISLQRKREKFQKAWAADLMNDDEFSKLMIDTKMEID AAEDRKKEYDVSFVSPEDIKRNNILRELKINWTSLSPTKTDKFISMFI EGIEYVKDDENKAVITKISFL
Sitio de unión por fago <i>L. innocua</i> 1231 attPP'. Este sitio reside en la cepa <i>L.</i>	Taaataattgtcagtcgaatcaaaagaattatattataggttttttgtcaaata Tggtgatgtgtacttataacccatttttcttgcaataaaagcttgtgttatt ccccgttcta

<i>monocytogenes</i> 4bF2365 (complemento a 2495122 a 2495193), y es esencialmente el mismo como una secuencia encontrada en la cepa <i>L. monocytogenes</i> EGD (nt 145171 a 145423 del No. de Acceso de GenBank AL591983.1 segmento 11/12). (SEQ ID NO:102)	
Sitio de unión <i>L. innocua</i> 1231 attBB' dentro de <i>L. monocytogenes</i> 1263: (SEQ ID NO:103)	Ttcataaaagaattttcaaatacgacattaaaattttcacttagaataa Cagcatttttgtgtgatagtctaacagttcctttttcaatgttactg Taacctgatgtgtacctatagcccatccgtcgcgcaatgaaagcttg Ggtgatttcctcgctgcaatcgtaattctcgaatttttgtgtattaa ttcttctggtgtctactgttttcat
<i>L. innocua</i> 1765 integrasa. Véase también <i>L. innocua</i> Clip1162 genoma completo, segmento 7/12 (nucleótido 210, 321 a 211,089). (SEQ ID NO:104)	AggatgaaagagaATGGCAAAGAACAATGGCAACCCACTAAA CATTTAGGAATTTATGAATACATGACTAAAAAGGAAAGCGTT ATGGGATACGAGATTCGTTTATAAGCAAGGTAATGATTATCCTGA AATAAATAAATCTGGTTTTGAGACAATTGCAGCTGCAAAAGTTT ATAAAAACAACATTGAAAATTTGAAAGCTAATAAAAAAGAATAT GTTTTTACAAATGAAAAATTAACATTAAATACTTGGTTTGCTTC TTACATGGAAATGTTTTAAAAAGAAAAACAAAAGTAAAGACACAA TAGCGAATAAATATAGTATTTATAATAATCACTTAGAAATCCCT TTTGGTAATTACTATTTAACTGATATAAGTTTAGATATTTACGA AGACTTTTTGCGCGAAAAAATTAATAATGGATACGCAACAACCT CAGTCAAAGCGATGCATAAATTAATGAAAAGCATTTTAAACGCT GCTGTTAGATATGAGAACTAGAAAAAACAGACTTCAATTTGC TGAAATAGAGCAATTAGAAGAAAATGAAGTTATTGAGCTTAAGG TATTAGAAACAGATGAGTTTAATGTATTTATATCAGCTTGTAGA GCATTTTTTACTAAATATGATTTTACAATGATTTATCTTGCACT TTGGGGGATGCGTCGCGGTGAAGTTATGGGGGTAAACTTAAAA ATCTTACTTTTGATGATGCTAAACAACAAGTACGTATTACACTA GATTCCTACTCGAACCCTTCGTACTCCCGAGGGAAAAGGTACGAA AACACCAGCTGGTAGAAGAATATTACTAATAGACGGCGAAGGTT ATCGACTACTTAAATATTCGGTAGAAAAAGCGGTTAGCATTGCT AAAGACCATGGATCTGTTTTGCACCAGGATGATTTTATTTTATG AAACCCAACCTTCTAATCGTCCTTGGGCGGTTACGCGTATGAATG ATTTACTACGAAAATTAGAAAAAGAATACGACATAAAAGTTTAC CCTCATCTATTACGCCATAACTTTAATACTCAGGCATTATTGGC TGGAGCTAATAGCAATGATTTACGAAAATTTATTGGCCACAAAA ACAGTAGCATGACTGATCATTATTCACATGCGACAGACGAGGGA CGAGAAAAATTAATGAATACGATGAAAGACAGATTGTCAGGAAT CTAG

Secuencia de aminoácidos de <i>L. innocua</i> 1765 integrasa. (SEQ ID NO:105)	MAKNKWQPTKHLGIYEYMTKKGKRYGIRVRYKQGNDYPEINKSGFETIAA AKVYKNNIENLKANKKEYVFTNEKLTNTWTFASYMEMFKKKNKSKDTIAN KYSIYNNHLEIPFGNYLTDISLDIYEDFLREKIKNGYANNSVKAMHKLM KSIILNAAVRYEKLEKNRLQFAEIEQLEENEVIELKVLETDEFNVFISACR AFFTKYDFTMIYLAVWGMRRGEVMGVKLKNLTFDDAKQQVRITLDSTRTL RTPEGKGTCTPAGRRILLIDGEGYRLKYSVEKAVSIAKDHGSVLHQDDF IFRNPTSNRPWAVTRMNDLLRKLEKEYDIKVYPHLLRHNFNTQALLAGAN SNDLRKEFIGHNSSMTDHYSHATDEGREKLMNTMKDRLSGI
<i>L. innocua</i> 1765 Sitio de unión por fago (SEQ ID NO:106)	Aaaattgtgtgggataaaaattaaatataaaaaatatccacaaaa Aaatcccaaatagtttgatattgtatgatattcaaatgaaa Tcaaaaaaataaaaaaccccgatatttcctaagaaaatacgggg ttttgatatcatataaaaatcaattaaaaattgac
<i>L. innocua</i> 1765. Sitio de unión bacteriana. Esta secuencia reside en <i>L. monocytogenes</i> EGDe (genoma completo) No. de Acceso de GenBank AL591824 a nt 1,705,630 a nt 1,706,203. Las secuencias similares ocurren en <i>L. monocytogenes</i> cepa 4bF2365 (nt 216008 a 216262 de la sección 6) y en <i>L. innocua</i> Clip11262 nt 77369 a 77270 (SEQ ID NO:107)	Tcttggtgcctcctttttgtaatcaatagttgcaatgcaa Gagtatcataaaaaagcgatgtataacaaaaatgtaatg aatgtccgattccttgctcgtgaacgActAgaaaaatggagc ttatttagagatatattcttacacaacgtgagtatcattaag ttttttggtcataagataataactcattatgagttActAtt cacatttttaaacattcctgtttctattttatcacaaaaaat acatatcaatccaagatatgcggttatttcacttatgaata ttccttattttattttaattattttatcagttttattttattac taggtgaataatatagttataattattcacctacgacagac gagacacgagaaaaattaatgaatacgtgaaagacagat tgtcaggaatctagaaaaattgtgggataaaaaattaaatat aaaaatatcccaaaaaaatcccaataattttgatattg tatgatattcaaatgaaatcaaaaaaatcaaaaccccgca tttcctaagaaaatacgggggttttgatatcatataaaaatc gattttaaattggac

<i>L. innocua</i> 2610. Gen de integrasa de <i>L. innocua</i>. La presente invención también proporciona el ácido nucleico y polipéptido de <i>L. innocua</i> Clip11262 genoma completo segmento 11/12 No. de Acceso de GenBank AL596173.1 (nucleótidos 14,676 a 15,804). (SEQ ID NO:108)	ATGAAAATAAAAAAATGAAAAATGGTAAATATACTGTTTCGTTTGCSTAT TAAAGTTGATGGAGAGTGGAAAGAAAAACGTTTGACAGATACAAGTGAAA CAAATTTGATGTACAAAGCATCAAATTTATTTAAACAAGTTGAACATGAT AGTAATTCATAAAAGAATGGAATTTCAAAGAATTCATTTCGCTATTTAT GAAAACTTTCAAAGAAAATAAAAGTAGTCAATCAACAATTAACCTGTATG ACTTAGCTTATAATCAGTTCGTTAATTTATTTTCGACGAAAAAATAAGTTA AATTCAATTGACGCTGTTCAATATCAGCAATTTATTAATCATTTAGCATT AGATTACGCTGTCGCTACTATAGATACCAGACACCGCAAAATTAGAGCGA TTTTCAATAAAGCCGTCCTTTAGGTTACATGAAAAAAAACCTGCTCTG GGCGCTCACATAAGCGGTCTGATATAGCAAAAACAAAAGCGCAATATTT AGAAACAGATAAAGTACATCTATTATTAGAAGAGCTTGCAAACTTCATT CTATATCAAGAGCAGTTATTTTTTTTAGCAGTTCAAACAGGAATGCGATTT GAAGAAATTATTGCACTGACAAAAAAGATATTATTTTACTAAACGTTT TATATCAGTGAATAAGGCATGGGATTATAAATACACTAACACGTTTACGG ACACTAAAACAAAAAGTCACGAGTAATCTATATGATAAATCAACTGTT CAATATTTACAGTCTTACCTTGCTTGGCATGCTGATTATATGAAGAGCA TGCAATTGAAAATCCGGTGATGTTGTTATTCTATTACTTATCACAATAAAC CTGTTGACAACGCTTCATGTAACAAAGCACTGAAGAAAATATGTACTACA ATTAATTCTGAAACAGTAACATTACACAAGCTTCGACACACGCACACAGG TCTATGTGTAGAGGCTGGTATGGATATTATTTATGTAGCTGACAGGCTTG GTCATGATGATATTAATACAACATTAAATATTATAGTCATCTGAGTTCT AATTTACGACACAAAATCAATCTAAAGTAGATGCTTTTTTCACACTAAA AACAGATGAAAATACCACAAAATTTGCCACAAATGCCACAAAACAACGG AA
<i>L. innocua</i> 2610 integrasa, secuencia de aminoácidos (90.9% idéntica a PSA integrasa). (SEQ ID NO:109)	MKIKKMKNGKYTVRLRIKVDGEWKEKRLTDTSETNLMYKASKLLKQVEHD SNSLKEWNFKFYSLFMKTFKENKSSQSTINLYDLAYNQFVNYFDEKIKL NSIDAVQYQQFINHLALDYAVATIDTRHRKIRAI FNKAVHLGYMKKNPAL GAHISGHDIAKTKAQYLETDKVVHLLLEELAKLHSISRIVFLAVQTGMRF EEIIALTKKDINFTRKRSISVNKAWDYKYNTFTDTKTKSRVIYIDNSTV QYLQSYLAWHADYMKEHAIENPVMLLFITYHNKPVDNASCNKALKKICTT INSETVTLHLRHTHTGLCVEAGMDIYVADRLGHDINTTLKYYSHLSS NLRQQNQSKVDAFFTLKTDENTTKFATNATKTTE
<i>L. innocua</i> 2610. Esta secuencia es un sitio attBB' de <i>L. innocua</i>. El sitio de unión (gen tARN-Arg5 más secuencias circundantes, integra la cepa <i>L. innocua</i>). Sitio de unión por núcleo en negritas (atgccctcggaggga). (SEQ ID NO:110)	Taaaacgggtattgcaagggtataaaaaaatctctaaaacattcgttttatc CtttaatatcaaggatttccaacgtttttagagatttctttacatcActAc Ttaaatgccctcggagggaatcgaacccccattttaagaaccggaatctta Cgtgctatccggttcaccacgagggtttatgtacaaagaaaatgtttac Cgtacgaataataattatagcgaaattcgtatgtttttacaagctttatt Ttgaatgaagaagccagcgcacatcctgagatttgctggcttcaatagtta
Sitio de unión por núcleo (en negritas) (SEQ ID NO:111)	atgccctcggaggga

Esta secuencia es un sitio attBB' de <i>L. monocytogenes</i> f2365. Sitio de unión de cepa no integrada (<i>L. monocytogenes</i> F2365; sitio de unión en gen tARN-Arg5 subrayado. Sitio de unión por núcleo se encuentra en NEGRITAS. (atgccctcggaggga). (SEQ ID NO:112)	Taaaatgaaaaaacatctttacaacatggcttttgccagatgtgggatgt Ttttttagtatg<u>ccctcggaggga</u>atcgaacccccatttttaagaaccgg <u>Aatctttacgtgctatccgttgaccacgagggtat</u>atgtaggccagaa Atgcttaccgtacgaataataattatagcgaaattcgtagtgttttaca Agttttatttttaaatgaagaagccagcgcctccaaagatttgctggctc aagtatta
<i>L. monocytogenes</i> f6854_2703 integrasa-2680803:2681963 (la mayoría de esta secuencia se encuentra disponible en tigr.org) (SEQ ID NO:113)	ATGGCTAGCTATGTAAATTTAGGAAATAATAAATATGAGCTAAGAGTTT CAAAGGGATATGATGCACGTGGAAAAACAAATACGCARAAACAAAAACGT CACAGTTAAAAACAGTAAAAAGCGTTAAAACTAGAACCTTCTAATTTTGAA GCTTATGTCTATTCAAGCGATTACACAGAAATAAAAGATATGCGATTTA TTGACTTTGTGGAAAAATGGCGCTTAAATTACGCAAAAAGAGAATAAA AGGTAATACTATTGATAAGTATAACCTCTTTCTCGAAAACCTGGATTATA CCTTATTTTGAGAGGAAGAAAAATAAGTAAAATTACAACCTATGCAGTTGC TCGACTACTTTTCATGAAGTTCAAAAAAAGGAGTTGGTCCAAGCGCTTT AGAGGGACATCATCGAGTTATAAGAAGTTTATTTAAATATGCTACCTTG TGGGGAATTACTGAAACAGACGTATCTTTATCAGTGAAAAAACCTACCT ATAAAGTGCCAGAAAAAATATTTATAATAGACGAGAAATAGAAGTGTT AATAGATCGCATTAAAGATATTACAAAAATATCAACAAGTAATGATTAAA TTAGCGCTATACTGCGGTCTTAGACGTGGCGAAGTTATCGGTTTAACAA CTAAAGATATGAATTACAATAAAATACAATTAACGTTTATAGAGCGGT TATAAAGAGTGCTAGCGAAGGTATAAACTAGATGAACCTAAAAATAAG CGAAAAAGAATTGTCCCGCTCCCGCTGGACTGATGCAAGAAATTAAG AAGTTGCAAAAAGAAAAAGCAAAAAAACAAGATAAATTAGGTTTGTGTG GAAAGGAACAAAAGATTTAGATGGGAAAACCTGTTGTATTATTTTCAGT CATGACGACGGCACCCCTTTACCCCGCTTCTGTCACTAGAAATGTTTA ATCGATTTTATAGAGAAAGAAGAAAATAACGATCTTACTAAAATATCATT TCATGATTTGCGTCATTCTGCTGCAAGCTTCCTTCTCGAACAAGGTATT AATGTAAAAGTCATTCAAAACATTTTAGGACATTCAGACATTAAAGTTA CATTAAATACGTATGCACATATCACTGAAGATGGTTACTCAGAAGCAGC AAAAACTTTTGATAATTTCTATAAATCTAGTAA
<i>L. monocytogenes</i> f6854_2703 integrasa 2,680,803: 2,681,963. (SEQ ID NO:114)	MASYVNLGNKKYELRVSKGYDARGKQIRKTKNVTVKTVKALKLELSNFEA YVYSSDYTEIKDMRFIDFVEKWRLNYAKRELKGNITDKYNLFLENWIIIPY FERKKISKITTMQLLDYFHEVQKKGVGPSALEGHRVIRSLFKYATLWGI TETDVSLSVKKPTYKVPKNIYNRREIEVLIDRIKILQKYQQVMIKLALY CGLRRGEVIGLTTKDMNKNKNTINVYRAVIKSASEGIKLDKTKNKRKRIV PAPAGLMQEIKELAKEKQKNKDKLGLLWKGTKDLDGKTVVLIFSHDDGTP FTPASVTRMFNRFLEKEENNDLTKISFHDLRHSAASFLEQGINVKVION ILGHSDIKVTLNTYAHITEDGYSEAAKTFDNFYKSSK

<i>L. monocytogenes</i> f6854 2703. Sitio de unión por fago (SEQ ID NO:115)	<pre>TaaggtgtcgaataaggtgttttgctatTTTTtaggcaaataaAaaaagc TtcgcataattagogaacacctaagcagcaccacgTTTTtatattaagcca Cttgtcggatttgaaccgacgaccccttccttaccatggaagtgtctta Ccaactgagctaaagcggcagcaaagcctttcaataaaaaaatggctc Cacaggcaggactcgaacctgcgacgatcggttaacagccgattgtctc Taccaactgagctactgtggaataataaattgcccggcagcgacctact CtcgcagggggaagccccaActAccattggcgagagaagcttaActA CcggtgttcgggatgggaacgggtgtgaccttctcgccataActAccaga CaatattgagttgttgaagattgtctctctcaaaaActAgagaagaaagt Gttcagttaggtaacttcgtttcatttttgggttaagtcctcgatcgat Tagtatttgtccgctccatgtatcgctacacttccactccaaacctatc Tacctgatcatotttcagggatcttaactttccgaagaaatgggaaatct Catcttgaggggggttcacgcttagatgctttcagcggttatccctgc Cacacatagctacccagcgatgctcctggcggaacaaactggtagaccag CggtgtgtccatcccggtcctctcgtActAaggacagctcctctcaaat Ttcttgccgcccgcgaaggatagggaaccgaactgtctcacgacgttctga Accagctcgcggtgcgctttaatgggcgaacagcccaacccttgggac CgActAca</pre>
Sitio de unión por fago (attPP'). Sitio de unión Phi6854.3 se encuentra dentro del gen tARN-Thr-4. El sitio de unión por fago se destaca en negritas y subrayado, y se anota como un sitio de unión por fago en el genoma F2365 (Nelson, <i>et al.</i> (2004) Nucleic Acids. Res. 322:2386-2395). (SEQ ID NO:116)	<pre>AaaaacacccccaccggttctgtattatacccatagataatcGatttatActAc CtAttcaagatatccataataaatatcattattCtttaaacaaatAaaaaagcct cgcAtActAgogaacatAcaaattatccatatattat <u>ttaagccactgtcggatttgaaccgacgaccccttccttaccatggaag</u> <u>tgctctaccaactgagCtaaagcggcagcaaagcctttcaataaaaaaatgg</u> <u>ctccacaggcaggactCgaacctgcgaCcGatcggttaacagccgattgtct</u> <u>ctaccaactgagctactgtGgaataataaattgcccggcagcgacctaactctgc</u> <u>cagggggaagccccaActAccattggcgagagaagcttaa</u></pre>
Fago (attPP') Phi6854.3 El sitio de unión (igual que el anterior) se encuentra dentro del gen tARN-Thr-4, en donde el gen tARN-Thr-4 se muestra subrayado en un recuadro (SEQ ID NO:117)	<pre>AaaaacacccccaccggttctgtattatacccatagataatcGatttat ActAcctAttCaagatatccataataaatatcattattCtttaaacaaatA aaaaaagcctcgcAtActAgcgaacatAcaaattatccatatattatta <u>agccactgtcggatttgaaccgacgaccccttccttaccatggaagtgtctaccaact</u> <u>gagCtaaagcggcagcaaagcctttcaataaaaaaatggctccacaggcaggact</u> <u>CgaacctgcgaCcGatcggttaacagccgattgtctaccaactgagctactgt</u> <u>Ggaataataaattgcccggcagcgacctaactctgcagggggaagccccaact</u> <u>Accattggcgagagaagcttaa</u></pre>

Phi6854.3 bacteriano (attBB') el sitio de unión se encuentra dentro del gen tARN-Thr-4. El sitio de unión se resalta en negritas y subrayado, y se anota como un sitio de unión por fago en el genoma F2365 (Nelson, <i>et al.</i> (2004) El gen tARN-Thr-4 se subraya en recuadro. (SEQ ID NO:118)	<pre> Aaaaacacccaccggttctgttattatacccatagataaatcgatttat ActAcctattcaagataaccataataaatatcattattctttaacaata aaaaagcctcgcacActAgcgaacatacaaaattacatattat <u>tttagccactgtcggatttgaacgcagaccccttccatggaagtgcctaccaact</u> gagctaaagcggcagcaaaagcctttcaataaaaaaatggctccacaggcaggactcgaacct gcgaccgatcggttaacagccgattgctctaccaactgagctactgtggaataataaattgcc cggcagcgacctactctcgcagggggaagccccaActAccattggcgcagagaagcctaa </pre>
Las secuencias de ácido nucleico pueden encontrarse en la red a nivel mundial a tigr.org. y dando click: (1) Recursos microbianos comprensivos; (2) búsquedas; (3) CMR BLAST; y (4) colocar una secuencia integrasa listerial como una secuencia de consulta. Si se conoce un número de acceso, puede encontrarse una secuencia en la red a nivel mundial a tigr.org. al dar click: (1) Recursos microbianos comprensivos; (2) Genomas; (3) <i>Listeria monocytogenes</i> 1/2a F6854; (4) Búsquedas; (5) Sitio; (6) Mecanografía "LMO6854_2703" en el recuadro; y (7) Dé click en las secuencias TIGR en la barra lateral.	

5 Un sitio de unión de fago (attPP') o sitio de unión bacteriana (attBB') de la presente invención puede implantarse en un polinucleótido a manera de recombinación específica de sitio, recombinación homóloga, por uso de sitios de restricción, por métodos de química orgánica sintética, o por otros métodos. En particular, en donde se utiliza la recombinación homóloga, un sitio attBB' puede implantarse en un gen de virulencia, en donde la integración da como resultado una inserción simple o, alternativamente, una inserción con supresión de una región correspondiente del gen de virulencia.

10 De esta manera, la presente descripción proporciona métodos para implantar un sitio de unión de fago (attPP') en un plásmido. Se proporcionan los métodos para implantar un sitio de unión bacteriana (attBB') en un plásmido, así como métodos corriente abajo en donde el plásmido por último puede ser utilizado para transferir el attBB' en un genoma bacteriano. En un aspecto, el plásmido contiene un primer ácido nucleico que codifica un sitio attPP' y un segundo ácido nucleico que codifica un antígeno heterólogo. En este caso, esta descripción contempla los métodos para incorporar el segundo ácido nucleico en un sitio attBB' que reside en un polinucleótido objetivo, en donde el polinucleótido objetivo puede ser un genoma bacteriano.

15 El polinucleótido objetivo de la recombinación específica de sitio, recombinación homóloga, o diseño al utilizar sitios de restricción, no se limitará a genes de virulencia, pero también comprende sin limitación algún polinucleótido, plásmido, episoma, elemento extracromosomal, genoma bacteriano, genoma listerial, genoma de *Bacillus anthracis*, o genoma de *Francisella tularensis*.

La presente descripción comprende un ácido nucleico que codifica una integrasa de fago, un sitio attPP', o un sitio attBB', en donde el ácido nucleico puede hibridizar bajo condiciones rigurosas a uno de los ácidos nucleicos reivindicados como parte de la presente descripción, es decir, a uno de los ácidos nucleicos que codifican una integrasa de fago, sitio attPP', o sitio attBB', y en donde el polinucleótido de hibridización puede codificar una integrasa de fago funcional, sitio attPP', o sitio attBB'.

También se comprende un ácido nucleico derivado de una reacción de cadena de polimerasa (PCR), en donde el par de cebadores PCR combina exactamente y coloca en corchetes una región funcional de uno de los ácidos nucleicos de la presente descripción, descritos en la presente, que codifican una integrasa de fago, sitio attPP', o sitio attBB'. La reacción PCR puede llevarse a cabo en silicio. La presente descripción comprende un ácido nucleico derivado de la reacción PCR, en donde el ácido nucleico codifica una integrasa de fago funcional, sitio attPP', o sitio attBB'. Los cebadores PCR pueden ser diseñados para colocar en corchetes el ácido nucleico completo que codifica la integrasa de fago, sitio attPP', o sitio attBB', expuestos en la presente, o pueden ser diseñados para colocar en corchetes una parte más corta, funcionalmente activa, del ácido nucleico.

EJEMPLO IX. Reactivos y métodos utilizados para los Ejemplos X y XI

El antígeno heterólogo en las cepas *L. monocytogenes* (Lm) puede construirse alternativamente para contener la secuencia de nucleótidos que codifica los ocho amino SIINFEKL (SEQ ID NO:142)péptido (también conocidos como SL8 y ovalbumina₂₅₇₋₂₆₄), colocados en estructura en la terminal carboxi de una proteína de fusión ActAN100-PSCA. Las composiciones tales como el epítipo SL8 sirven como un sustituto para demostrar la habilidad de las cepas de vacuna *L. monocytogenes* recombinante para ser tomadas por las células que presentan antígeno y de manera subsiguiente la presentación de programa de antígenos por medio de la trayectoria de MHC clase I, utilizando un ensayo de presentación de antígeno *in vitro*.

Este ensayo de presentación puede llevarse a cabo utilizando la línea de célula dendrítica derivada C57BL/6 DC2.4 junto con la línea celular de hibridoma de célula T B3Z. la línea DC2.4 se generó de DC derivado de médula ósea que se transformaron de manera subsiguiente con los oncogenes *myc* y *raf*. Previamente se ha mostrado que las células DC2.4 presentan antígeno exógenamente agregado tanto por trayectorias MHC clase I como clase II. La presentación de péptido por las células DC2.4 en las moléculas de clase I siguiendo la fagocitosis de *L. monocytogenes* recombinante, se midió después de la incubación con células B3Z. B3Z es un hibridoma de célula T CD8⁺ inducible por lacZ específico para el epítipo SL8 presentado en la molécula clase I murino K^b. La presentación restringida por Clase I de células SL8 a B3Z da como resultado la inducción de síntesis de beta-galactosidasa por B3Z. La cantidad de beta-galactosidasa producida puede medirse por la hidrólisis del sustrato cromogénico CPRG y es una indicación de la cantidad de complejos SL8/K^b presentados en la superficie de células que presentan antígeno. De esta manera, el ensayo de presentación de antígeno *in vitro* es una medición directa de la habilidad de las cepas *L. monocytogenes* recombinantes que utilizan cualquier proteína de fusión de antígeno heterólogo ActAN100 predeterminado para expresar y secretar la proteína de fusión de antígeno dentro de las células huésped infectadas, conduciendo a la presentación y procesamiento adecuado en las moléculas MHC y estimulación de linfocitos T específicos de antígeno (Dubensky, *et al.*, Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos No. 2004/0228877).

Alternativamente, la habilidad de las cepas *L. monocytogenes* recombinantes que utilizan cualquier composición de antígeno heterólogo ActAN100 seleccionado para expresar y secretar la proteína de fusión de antígeno dentro de las células huésped infectadas puede medirse mediante el análisis de Western Blot de los lisatos de célula huésped infectada con *L. monocytogenes* recombinante, utilizando un anticuerpo que es específico para la pareja de fusión de región de terminal N ActAN100. El anticuerpo anti-ActA utilizado en este Ejemplo fue un anticuerpo policlonal de conejo elevado contra un péptido sintético (ATDSEDSSLNTDEWEEEEK (SEQ ID NO: 143)) correspondiente a 18 aminoácidos de terminal N maduro de ActA (Mourrain, *et al.* (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 10034-10039).

El siguiente regulador de lisis se utilizó para extraer las proteínas codificadas por *L. monocytogenes* que se habían expresado y secretado dentro de una célula huésped de mamífero, e.g., en el citosol de la célula huésped de mamífero. El regulador de lisis se preparó en un volumen total de 50 ml, y contuvo 2.5 ml de 1 M de Tris HCl, pH 6.8; 10 ml de 10% de dodecilsulfato de sodio; 5 ml de glicerol; 0.1 g. de azul bromofenol; y 5 ml de 1 M de ditiotreitól. La extracción fue con calentamiento a 100° por 5 minutos.

La respuesta inmune en ratones vacunados con las cepas *L. monocytogenes* recombinante se valoró como sigue. Los ensayos de elispot se utilizaron para valorar las respuestas inmunes que se habían generado en ratones inoculados con las construcciones de vacuna *L. monocytogenes*. En corto, los ratones Balb/c se inocularon con la

cepa *L. monocytogenes* indicada (5×10^6 cfu). Después de una semana, se recolectaron los bazo, y los esplenocitos aislados (2×10^5 de esplenocitos) se incubaron durante la noche con o sin los péptidos indicados. Las incubaciones durante la noche se condujeron en cavidades revestidas con anticuerpo anti-interferona- γ inmovilizado. El anticuerpo inmovilizado sirvió para capturar cualquier IFN- γ secretado, permitiendo de ese modo la medición subsiguiente de IFN- γ secretado, y valoración de la respuesta inmune a la vacuna. Para observar el cuadro en general, las respuestas inmunes generadas en el ratón se visualizaron en los ensayos de expresión de IFN- γ de esplenocito *in vitro*. En la Figura 48, el grupo de péptidos abarcó la secuencia de aminoácidos de PSCA humano. En la Figura 50, los péptidos agregados fueron ya sea el grupo PSCA, el grupo de mesotelina, o un péptido único correspondiente a un epítipo de la proteína listerial, p60. El péptido p60 fue p60₂₁₇₋₂₂₅ (KYGVSVQDI(SEQ ID NO:144)).

En los ensayos Elispot, el grupo de péptido PSCA fue un grupo de 28 péptidos, en donde los 28 péptidos abarcaron la longitud de PSCA humano. Cada péptido fue un 15-mer, en donde los péptidos adyacentes se superpusieron entre sí por 11 aminoácidos. La concentración de cada péptido fue 1 microgramo/ml.

El grupo de péptido de mesotelina fue un grupo de 153 diferentes péptidos que abarcan la secuencia completa de Mesotelina humana, en donde los péptidos sucesivos se superpusieron por 11 aminoácidos. La concentración de cada péptido fue 1 microgramo/ml. Cada péptido fue un 15-mer.

EJEMPLO X. Construcción e Inmunogenicidad de cepas *L. monocytogenes* recombinantes que codifican Antígeno de Célula Germinal de Próstata (PSCA)

La construcción y la inmunogenicidad de *L. monocytogenes* recombinantes que contienen un casete de expresión que codifica una proteína de fusión basada en Antígeno de Célula Germinal de Próstata-ActAN100 (PSCA) es todavía un ejemplo no limitante adicional de la utilidad de las composiciones y los métodos establecidos en esta invención. Los Ejemplos describen la expresión y secreción de antígenos heterólogos de *Listeria* recombinante dentro de células huésped de mamífero infectadas, que conducen a una respuesta inmune celular específica para el antígeno.

El antígeno de célula germinal de próstata (PSCA) es un antígeno de superficie de célula asociado con el cáncer humano. Un número de secuencias PSCA y secuencias derivadas por PSCA, se muestran abajo. Lo que se describe es la secuencia de aminoácidos de PSCA optimizado por codón (optimizado por codón para expresión en *Listeria monocytogenes*), en donde el PSCA se suprimió en su secuencia de señal y la secuencia de GPI de anclaje; la secuencia de aminoácidos codificada por esta secuencia de ácido nucleico optimizada por codón; y la secuencia de aminoácidos de una proteína de fusión PSCA humano ActAN100, modificada para contener un péptido inmunogénico estándar (SIINFEKL (SEQ ID NO:142)). La secuencia de GPI de anclaje se refiere a una secuencia de aminoácidos que ocurre en la terminal C de PSCA para la modificación post-translacional mediante glicosilfosfatidilinositol (GPI).

Secuencia de aminoácidos de PSCA humano (SS & GPI en cursiva):

MKAVLLALLMAGLALQPGTALLCYSCKAQVSNECLQVENCTQLGEQCWTARIRAVG
LLTVISKGCSLNCVDDSDQYYVGKKNITCCDTLDCNASGAHALQPAAAILALLPALGLL
LWGPQQL - (SEQ ID NO:145)

PSCA optimizado por codón, BamHI-SpeI delta SS, delta GPI (aminoácidos 18-101):

ggatccGGTACAGCACTTTTATGTTATTCCTGTAAAGCACAAGTATCAAATGAAGAC
TGTTTACAAGTAGAAAATTGTACACAATTGGGAGAACAAATGTTGGACTGCGAGA
ATTCGAGCCGTAGGTTTATTAAGTGAATTAGTAAAGGATGTTTCGTTAAACTGTG
TAGATGACTCACAAGATTATTACGTTGGCAAAAAAATATTACATGCTGTGACAC
TGATTTATGCAATGCAAGTGGCGCTCACGCTCTTCAAactagt (SEQ ID NO:146)

Traducción de PSCA optimizado por codón BamHI-SpeI delta SS, delta GPI (GS y TS son sitios de restricción BamHI y SpeI, respectivamente);

5 GSGTALLCYSCKAQVSNEDCLQVENCTQLGEQCWTARIRAVGLLTVISKGCSLNCVD
DSQDYYVGKKNITCCDTDLCNASGAHALOTS (SEQ ID NO:147)

ActAN100-hPSCA 18-101-SIINFEKL (secuencia pronosticada con base a la secuencia de ácido nucleico, el primer aminoácido es Valina). (La secuencia PSCA se encuentra subrayada):

10 VGLNRFMRAMMVVFITANCITINPDIIFAATDSEDSSLNTDEWEEEKTEEQPSEVNTG
PRYETAREVSSRDIEELEKSNKVKNTNKADLIAMLKAKAEKGGSGTALLCYSCKAOV
SNEDCLOVENCTQLGEQCWTARIRAVGLLTVISKGCSLNCVDDSODYYVGKKNITC
CDTDLCNASGAHALOTSQLADLVLAKVLQLESIINFEKLADLVA (SEQ ID NO:148)

15 ActAN100-hPSCA 18-101-SIINFEKL, (el primer aminoácido es metionina) (Secuencia actual expresada en *Listeria monocytogenes* cuando el primer aminoácido es el aminoácido de terminal amino (la secuencia PSCA se encuentra subrayada):

20 MGLNRFMRAMMVVFITANCITINPDIIFAATDSEDSSLNTDEWEEEKTEEQPSEVNTG
PRYETAREVSSRDIEELEKSNKVKNTNKADLIAMLKAKAEKGGSGTALLCYSCKAOV
SNEDCLOVENCTQLGEQCWTARIRAVGLLTVISKGCSLNCVDDSODYYVGKKNITC
CDTDLCNASGAHALOTSQLADLVLAKVLQLESIINFEKLADLVA (SEQ ID NO:149)

25 La Figura 45 describe la configuración esquemática del vector, ADN de plásmido pINT-ActAN100-BamHI-SpeI-MfeI-SIINFEKL. Este vector contiene un sitio attPP', que media la integración específica de sitio en un ácido nucleico que contiene un sitio attBB' correspondiente. El vector también contiene un promotor ActA, actA-N100, un sitio de clonación que contiene un número de sitios de restricción, y una secuencia SIINFEKL (SEQ ID NO:142). El vector también codifica los genes de resistencia antibiótica (ErmC y CAT), que se flanquean por sitios loxP, en donde los sitios loxP facilitan la eliminación catalizada por recombinasa Cre de los genes de resistencia antibiótica. La eliminación de estos genes es útil, por ejemplo, después de que el vector se ha integrado en un genoma bacteriano, y después del aislamiento de la bacteria con la integración exitosa.

30 La Figura 46 describe la configuración esquemática de construcciones moleculares de PSCA con una sobrecapa Kyte-Doolittle. Los diagramas incluyen los siguientes dominios, principalmente, secuencia de señal actA (actA SS); actA-N100; secuencia de señal PSCA; PSCA; la región de GPI de anclaje de PSCA, y SIINFEKL ((SEQ ID NO:142) abreviad como "SL8"). Como se indica en la Figura, "delta mitad SS, delta mitad GPI" se refiere a PSCA SS con la mitad de esta secuencia suprimida, y el PSCA GPI de anclaje con mitad de su secuencia suprimida. Los aminoácidos 1-9 de la secuencia de señal se suprimieron, mientras que los aminoácidos 112-123 de la GPI de anclaje se habían suprimido.

40 Lo siguiente se refiere a la terminología en la Figura 46. El diagrama identifica por separado ActA SS y ActA-N100. ActA-N100 incluye, dentro de ella, una secuencia de señal ActA. Sin embargo, la secuencia de aminoácidos de la secuencia de señal ActA no se duplicó en las construcciones, y la identificación separada de ActA SS y ActA-N100 es sólo por conveniencia. En este diagrama, la anotación PSCA significa PSCA de longitud completa, pero sin PSCA SS y sin PSCA GPI de anclaje. De esta manera, en donde el diagrama muestra que una construcción contiene tanto "SS" como "PSCA", existe sólo una secuencia de señal PSCA en la construcción.

La Figura 47A describe la respuesta de una línea de célula T reportera (células B3Z) a péptidos presentados por las células dendríticas. La gráfica de barras a la izquierda demuestra que las proteínas de fusión ActA-N100-PSCA heterólogas codificadas por *L. monocytogenes* recombinante, se expresaron y secretaron dentro de las células dendríticas huésped infectadas, y de manera subsiguiente se procesaron y presentaron en las moléculas MHC por las células dendríticas. Varios *L. monocytogenes* recombinantes se utilizaron para identificar las células DC2.4, como se indica en la Figura. Con la infección, *L. monocytogenes* recombinante expresó y secretó los polipéptidos dentro de las células DC2.4. Las células DC2.4 presentaron péptidos, en donde la detección de péptidos presentados fue a manera de una línea de hibridoma de célula T reportera (hibridoma de célula T B3Z). CRS-100 es una cepa *L. monocytogenes* con supresiones tanto en genes *actA* como *inlB* (*Lm ΔactAΔinlB*). La cepa CRS-100 no se diseñó para expresar cualquier antígeno heterólogo, a pesar de que puede ser modificada para contener más mutaciones o para expresar los antígenos heterólogos.

Tabla 17. Cepas *Listeria monocytogenes* que expresan proteínas de fusión ActA-N100-PSCA

Cepa	Construcción	Antecedente
BH137	pPL2_ActAN100-AH1A5-OVA	CRS-100
CRS-100		
BH419	p221_ActAN100_PSCA-1_SL8	CRS-100
BH470	p221_ActAN100_PSCA-1-100_SL8	CRS-100
BH472	p221_ActAN100_PSCA-10-110_SL8	CRS-100
BH474	p221_ActAN100_PSCA-16-122_SL8	CRS-100
BH476	p221_ActAN100_PSCA-16-100_SL8	CRS-100

La Figura 47A describe los resultados de los ensayos de célula T B3Z. Varias cepas *L. monocytogenes* (2×10^7 cfu) se incubaron por una hora con 100,000 de células DC2.4 a 37° , para permitir la infección de las células DC2.4. Después de una hora de incubación, se agregaron 100,000 células B3Z, junto con gentamicina a una concentración final de 0.1 mg/ml. El volumen final fue 0.2 ml/cavidad. La mezcla se incubó durante la noche, seguida por la recolección de todas las células por centrifugación, lisis de células, y ensayo de la beta-galactosidasa expresada por la línea de célula T B3Z reportera. Los resultados fueron una función de un número de etapas, por ejemplo, expresión y secreción bacteriana, y la presentación de célula DC2.4 del péptido SL8 a manera de MHC Clase I. Los resultados similares se encontraron con todas las *L. monocytogenes* recombinantes indicadas que codificaron el epítipo SL8.

El Western blot (Figura 47B) demuestra que las células de macrófago J774 infectadas por *L. monocytogenes* recombinante expresan y secretan las proteínas de fusión ActA-N100-PSCA heterólogas. El Western blot describe los resultados de infecciones *L. monocytogenes* recombinante de células J774. Los macrófagos J774 se infectaron con *L. monocytogenes* recombinante, en donde la figura identifica cada una de las cepas *L. monocytogenes* recombinante. Las células J774 (1×10^6 células) se infectaron con *L. monocytogenes* (50×10^6 cfu), a una multiplicidad de infección de 50. La mezcla se incubó por 30 minutos, se lavó, después se complementó con gentamicina y se incubó por 5-7 horas a 37° . Después de esta incubación, las células J774 se usaron con lisinas, utilizando regulador de lisis, a fin de liberar la proteína de fusión ActA-N100-PSCA expresada y secretada, mientras que se deja la bacteria intacta.

La Western blot demuestra que la construcción de delta GPI, delta SS se expresó y secretó de manera más eficaz (línea 6). Los dominios SS y GPI de anclaje contienen regiones de hidrofobicidad que pueden complicar la secreción. La invención proporciona construcciones de antígeno suprimidas en dominios SS y GPI.

Tabla 18. Leyenda para la Figura 47B.

Análisis Western Blot para expresión y secreción de proteínas de

fusión ActA-N100-PSCA

Línea	Cepa	Antígeno
1	hMeso26	ActAN100-hMeso Δ SS, Δ GPI
2	BH419	ActAN100-PSCAf_SL8
3	BH470	ActAN100-PSCA 1-100_SL8
4	BH472	ActAN100-PSCA 10-110_SL8
5	BH474	ActAN100-PSCA 16-122_SL8
6	BH476	ActAN100-PSCA 16-100_SL8
7	CRS-100	-

5 El peso molecular esperado del polipéptido expresado de la cepa *L. monocytogenes* BH419 (actA-N100-longitud completa PSCA-SL8) es 24 kDa. El peso molecular esperado para el polipéptido expresado de *L. monocytogenes* BH476 (actA-N100-PSCA 16-100-SL8) es 20.3 kDa.

10 La cepa *L. monocytogenes* BH476 produjo los niveles más grandes de expresión y secreción como se demuestra por el gel, en donde el gel reveló la tintación densa de polipéptidos en un rango de peso molecular en la proximidad del marcador de peso molecular de 19 kDa.

La Figura 48 describe las respuestas inmunes de célula T específica de PSCA inducido por vacuna en ratones vacunados con varias cepas *L. monocytogenes* recombinantes que expresan proteínas de fusión ActA-N100-PSCA.

15 Los ratones Balb/c se inocularon con la cepa *L. monocytogenes* recombinante indicado. Después de una semana, se recolectaron los bazo y los esplenocitos aislados se incubaron durante la noche con o sin los péptidos indicados, en ensayos Elispot. Las incubaciones estuvieron en la presencia o ausencia del grupo de péptido PSCA. Los resultados demuestran que *L. monocytogenes* recombinante que codifica el PSCA de longitud completa indujo a la respuesta inmune más baja, mientras que Lm-PSCA- Δ SS- Δ GPI (Lm-PSCA-16-100) indujo a la respuesta inmune más alta (Figura 48). Estos resultados demuestran que el grado de expresión y secreción de la proteína de fusión ActA-N100-PSCA por *L. monocytogenes* recombinante dentro de las células huésped infectadas se correlaciona directamente con su inmunogenicidad en animales vacunados. Esta correlación puede observarse al comparar los Western blots con los resultados de Elispot.

25 EJEMPLO XI. Construcción e inmunogenicidad de cepas *L. monocytogenes* bivalente recombinante que codifican el Antígeno de Célula Germinal de ActA-N100-Próstata (PSCA) y ActA-N100-Mesotelina.

30 Se conoce muy bien en la materia que los tumores seleccionados expresan varios antígenos que se relacionan al tumor, y que la inducción de respuestas inmunes celulares a más de uno de estos antígenos asociados por tumor puede mejorar la potencia de una vacuna de cáncer seleccionada. Esta descripción proporciona las composiciones y métodos para las cepas de vacuna *L. monocytogenes* recombinante que expresan y secretan más de un antígeno heterólogo, en donde la vacunación conduce a la inducción de inmunidad celular en animales vacunados a cada uno de los antígenos heterólogos expresados. El Ejemplo XI describe, como un ejemplo no limitante, la utilidad de las composiciones y los métodos de las cepas *L. monocytogenes* bivalente recombinante que codifican dos proteínas de fusión de antígeno heterólogo ActAN100 distintas.

Las Figuras 49A y 49B describen una cepa de vacuna *L. monocytogenes* bivalente recombinante que expresa dos antígenos de cáncer humano diferentes, Mesotelina y PSCA, cada antígeno tomando la forma de una proteína de fusión ActA-N100. La utilidad se demostró por la inmunidad de célula T inducida, en donde la inmunidad de célula T se indujo contra cada antígeno expresado y secretado en animales vacunados con la vacuna bivalente.

5 El esquema mostrado en la Figura 49A muestra una primera proteína de fusión de actA-N100 y Mesotelina Δ SS Δ GPI, y una segunda proteína de fusión de actA-N100 y PSCA Δ SS Δ GPI. El diagrama identifica el gen de internalina B *L. monocytogenes* (gen *inlB*) como el sitio de integración de un primer ácido nucleico que codifica la primera proteína de fusión, y el sitio tARN^{Arg} de *L. monocytogenes* como el sitio de integración de un segundo ácido nucleico que codifica la segunda proteína de fusión.

10 El Western blot (Figura 49B) demuestra la expresión y secreción en ambas proteínas de fusión, es decir, la actA-N100-mesotelina Δ SS Δ GPI y actA-N100-PSCA Δ SS Δ GPI, mediante cepas de vacuna *L. monocytogenes* bivalente recombinante en células de macrófago J774 infectadas. La cepa de vacuna *L. monocytogenes* bivalente recombinante (Lm cepa BH648) expresó y secretó tanto las proteínas de fusión ActA-N100 PSCA como Mesotelina en los macrófagos J774 infectados, como se demuestra por el Western blot (línea 3). La expresión de ActAN100-PSCA
15 fue similar a aquella encontrada con la cepa *L. monocytogenes* monovalente recombinante que codifica sólo actA-N100-PSCA Δ SS Δ GPI (línea 2), mientras que la expresión de actA-N100-mesotelina fue similar a aquella encontrada con la cepa *L. monocytogenes* monovalente recombinante que codifica sólo actA-N100-mesotelina Δ SS Δ GPI (línea 4).

La Figura 50 describe la inmunización de ratones con *L. monocytogenes* monovalente recombinante que codifica sólo ActAN100-PSCA (BH476) o con *L. monocytogenes* bivalente recombinante que codifica las proteínas de fusión ActA-N100 tanto PSCA como Mesotelina (BH648). Las secuencias de PSCA y Mesotelina en estas construcciones son delta SS y delta GPI.
20

Los ratones Balb/c fueron inmunizados con la cepa de vacuna *L. monocytogenes* recombinante (5×10^6 cfu). Después de una semana, se recolectaron los bazos, y los esplenocitos aislados se incubaron durante la noche con o sin los péptidos indicados, en ensayos de Elispot.

25 Los ensayos de Elispot describen los resultados de inmunización con una de las dos cepas de vacuna *L. monocytogenes* diferentes. Los ratones Balb/c fueron inmunizados con la cepa *L. monocytogenes* monovalente recombinante BH476, la cual codificó sólo un antígeno de cáncer humano (PSCA), o con cepa *L. monocytogenes* bivalente recombinante BH648, la cual codificó dos antígenos de cáncer humano (PSCA y Mesotelina). Los resultados demuestran que la cepa *L. monocytogenes* monovalente recombinante estimuló una respuesta inmune
30 contra PSCA, mientras que la cepa *L. monocytogenes* bivalente recombinante estimuló la respuesta inmune tanto contra PSCA como Mesotelina. Los resultados demuestran que la magnitud de inmunidad celular específica de PSCA producida en ratones inmunizados ya sea con cepas *L. monocytogenes* monovalentes o bivalentes recombinantes que expresan la proteína de fusión ActAN100-PSCA fueron los mismos, ilustrando de ese modo la utilidad de cepas de vacunas *L. monocytogenes* recombinante que contienen dos o más casetes de expresión de antígeno que
35 codifican las proteínas de fusión de antígeno ActA-N100-heterólogo, como se aplica a cualquier antígeno heterólogo seleccionado deseado.

REIVINDICACIONES

1. Un polinucleótido que comprende:
 - (a) un promotor; y
 - (b) un ácido nucleico unido operativamente al promotor, en donde el ácido nucleico codifica una
 - (i) un ActA modificado que comprende al menos los primeros 59 residuos de aminoácido de SEQ ID NO:38 o SEQ ID NO:152, y menos de los primeros 380 aminoácidos de SEQ ID NO:38 o SEQ ID NO:152; y
 - (ii) un antígeno heterólogo.
2. El polinucleótido de la reivindicación 1, en donde el ActA modificado comprende al menos los primeros 59 a 125 residuos de aminoácido de SEQ ID NO:38 o SEQ ID NO:152.
3. El polinucleótido de la reivindicación 1, en donde el ActA modificado comprende los aminoácidos 1-100 de SEQ ID NO:38 o SEQ ID NO:152.
4. El polinucleótido de la reivindicación 1, en donde el ActA modificado comprende la mutación en inactivación en, supresión de, o truncación previa a al menos un dominio seleccionado del grupo que consiste de la región de homología de cofilina (KKRR) (SEQ ID NO:23), y el dominio de enlace central de fosfolípido (KVFKKIKDAGKWVRDKI) (SEQ ID NO:20).
5. El polinucleótido de la reivindicación 4, en donde el ActA modificado comprende todos los cuatro dominios ricos en prolina (FPPPP, FPPPP, FPPPP, FPIIP) (SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:22) de ActA.
6. El polinucleótido de la reivindicación 1, en donde el ActA modificado consiste de una secuencia que tiene al menos 80% de identidad de aminoácidos a ActA-N100 (residuos 1-100 de SEQ ID NO:38).
7. El polinucleótido de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde el promotor es un promotor actA.
8. El polinucleótido de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde el antígeno heterólogo es de, o se deriva de, una célula cancerígena, tumor, o agente infeccioso.
9. El polinucleótido de la reivindicación 8, en donde el antígeno heterólogo es mesotelina humana.
10. El polinucleótido de la reivindicación 8, en donde el antígeno heterólogo es un derivado de mesotelina humana que comprende una supresión de su región de péptido de señal, su región de GPI de anclaje, o tanto su péptido de señal como región de GPI de anclaje.
11. El polinucleótido de la reivindicación 8, en donde el antígeno heterólogo es PSCA humano.
12. El polinucleótido de la reivindicación 8, en donde el antígeno heterólogo es un derivado de PSCA humano que comprende una supresión de:
 - (a) parte o toda su región de péptido de señal;
 - (b) su región de GPI de anclaje; o
 - (c) su región de GPI de anclaje y parte o toda su región de péptido de señal.
13. Un plásmido que comprende el polinucleótido de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12.
14. Una bacteria *Listeria* que comprende el polinucleótido de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12.
15. La bacteria *Listeria* de la reivindicación 14, la cual es *Listeria monocytogenes*.
16. La bacteria *Listeria* de la reivindicación 15, la cual se atenúa para dispersión de célula a célula y/o entrada en células no fagocíticas.
17. La bacteria *Listeria* de la reivindicación 16, la cual es un mutante de supresión *actA* o un mutante de inserción *actA*.
18. La bacteria *Listeria* de cualquiera de las reivindicaciones 14 a 17, en donde la bacteria *Listeria*

comprende el polinucleótido en su genoma.

19. La bacteria *Listeria* de la reivindicación 18, en donde el polinucleótido se ha integrado en un gen de virulencia en el genoma, en donde la integración del polinucleótido:

- (a) interrumpe la expresión del gen de virulencia; o
- (b) interrumpe una secuencia codificadora del gen de virulencia.

5

20. La bacteria *Listeria* de la reivindicación 19, en donde el gen de virulencia es gen dependiente de *prfA*, *actA* o *inlB*.

21. Una vacuna que comprende la bacteria *Listeria* de cualquiera de las reivindicaciones 14-20.

Fig. 1

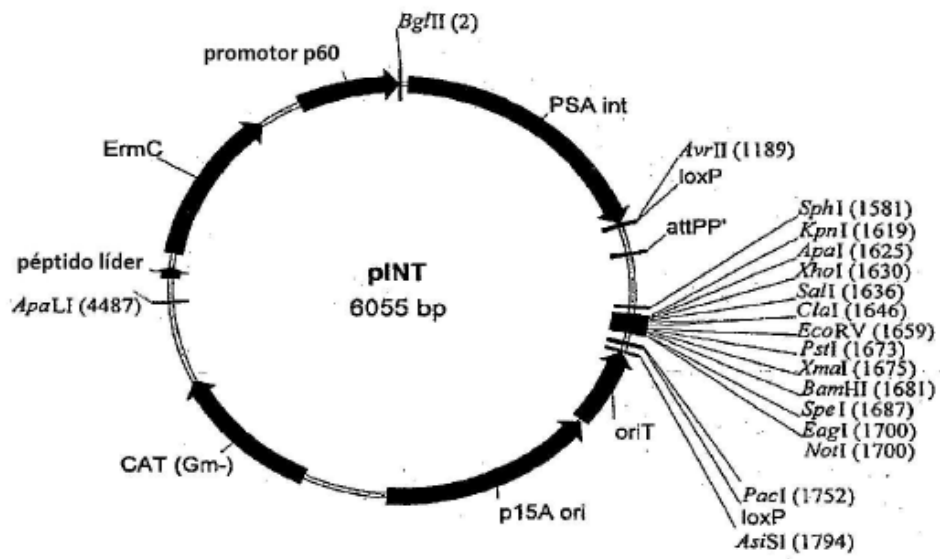


Fig. 2.

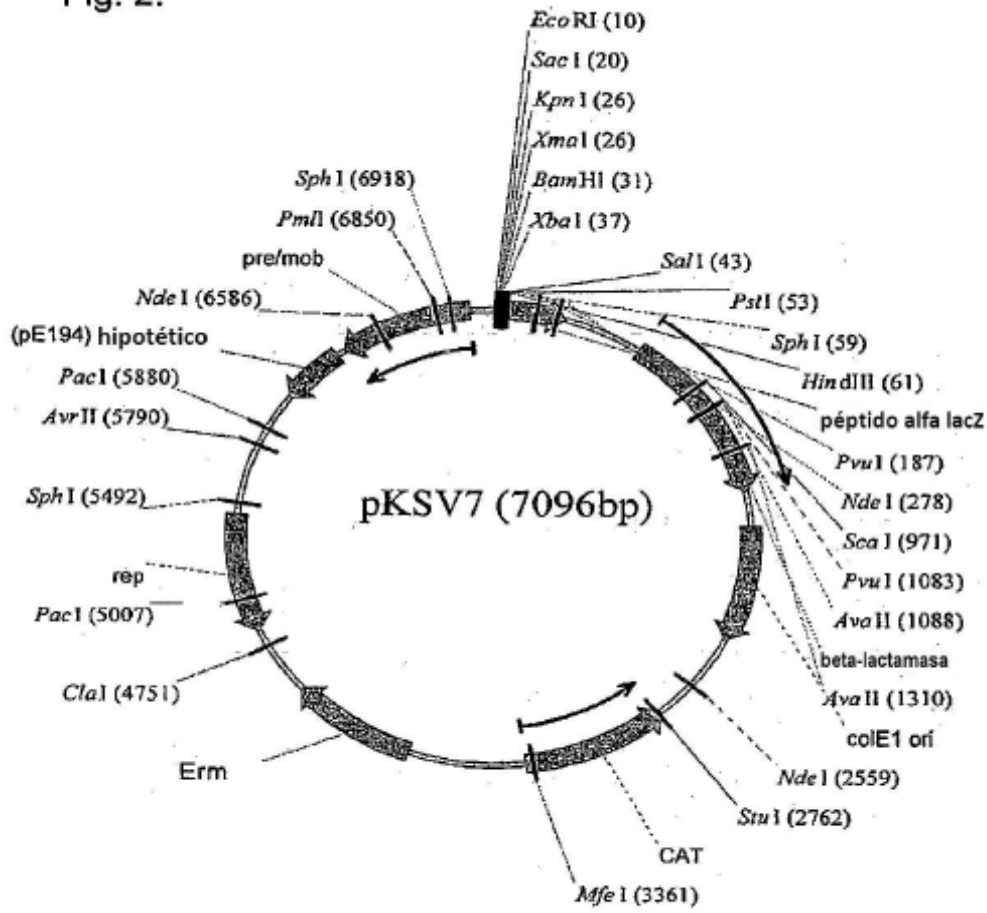
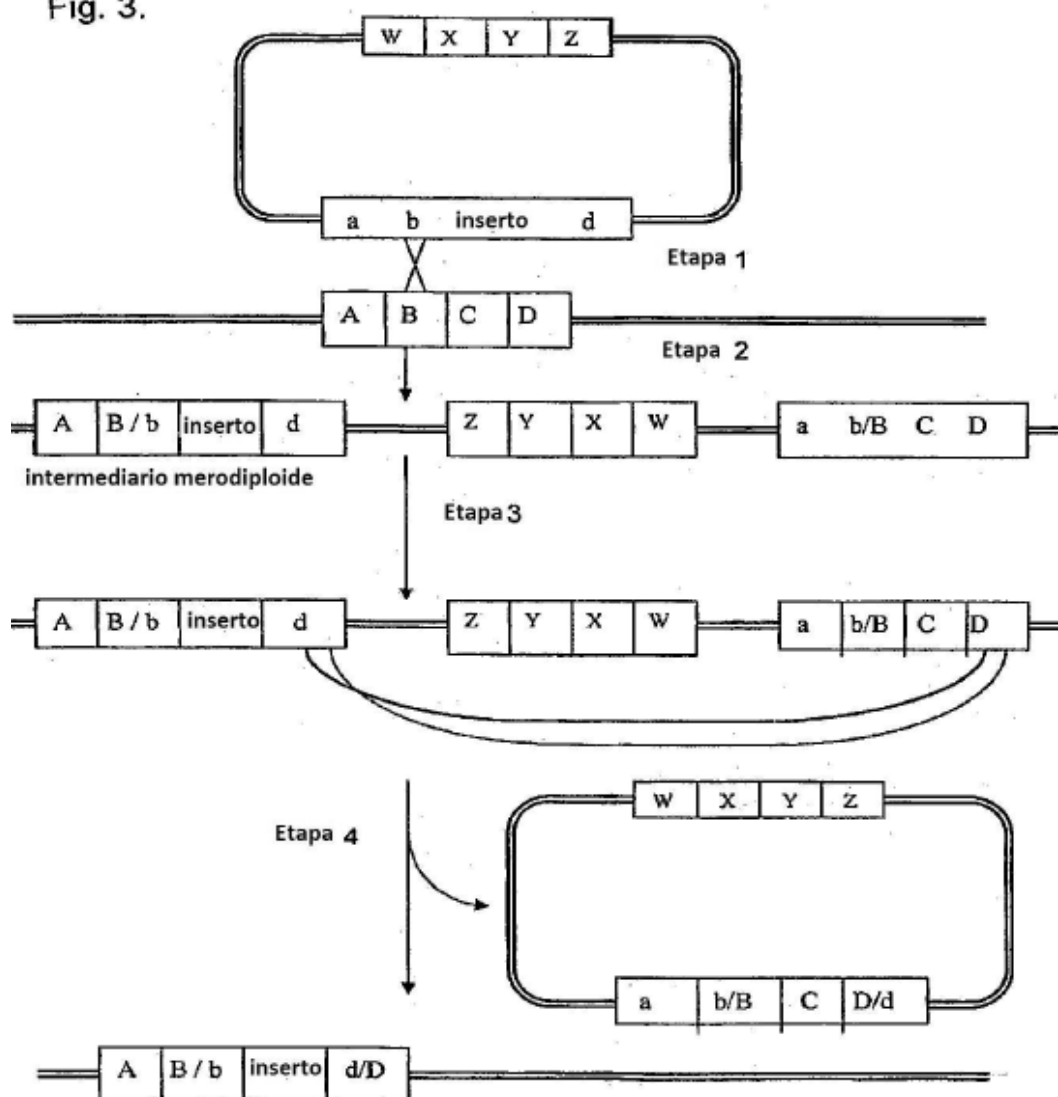


Fig. 3.



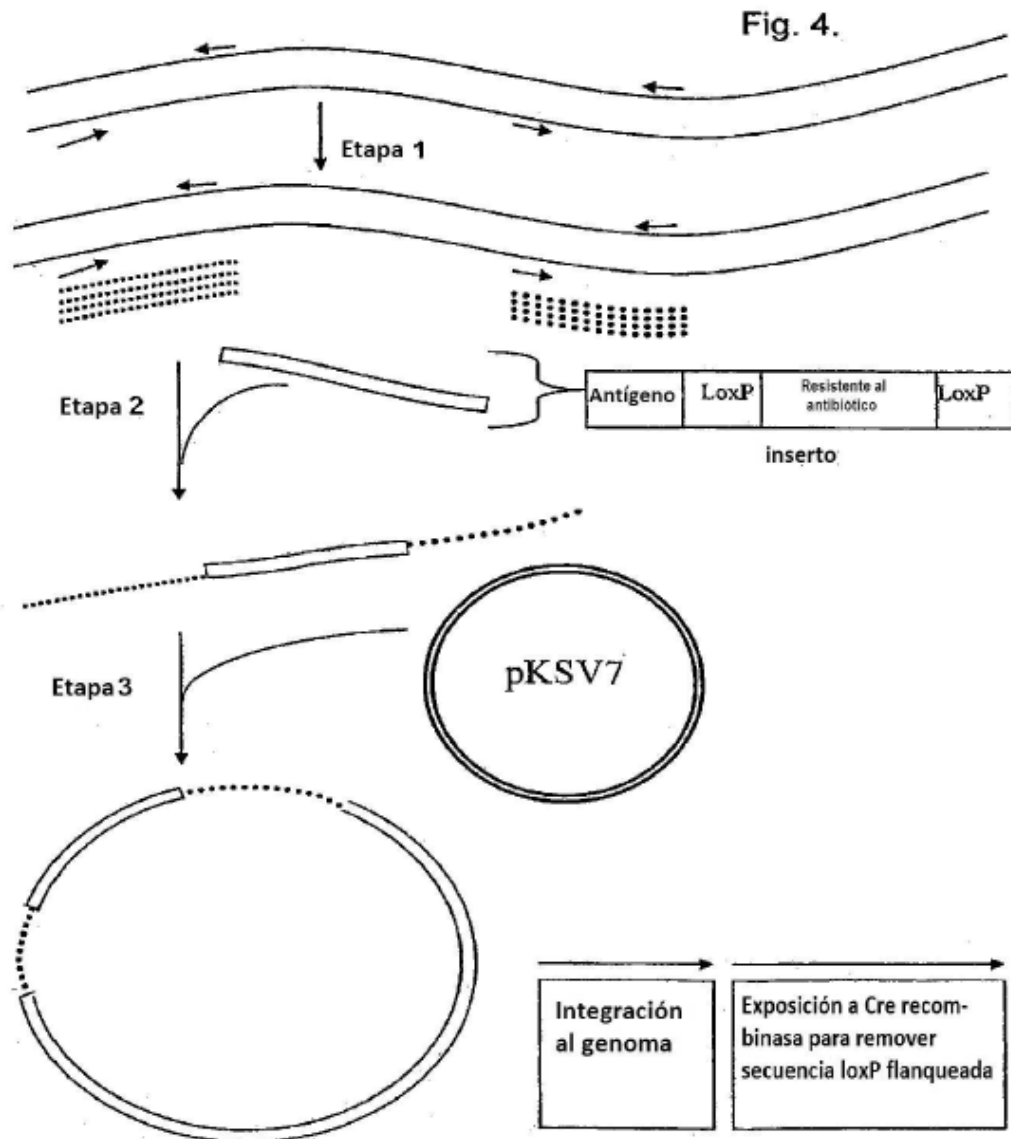


Fig. 5

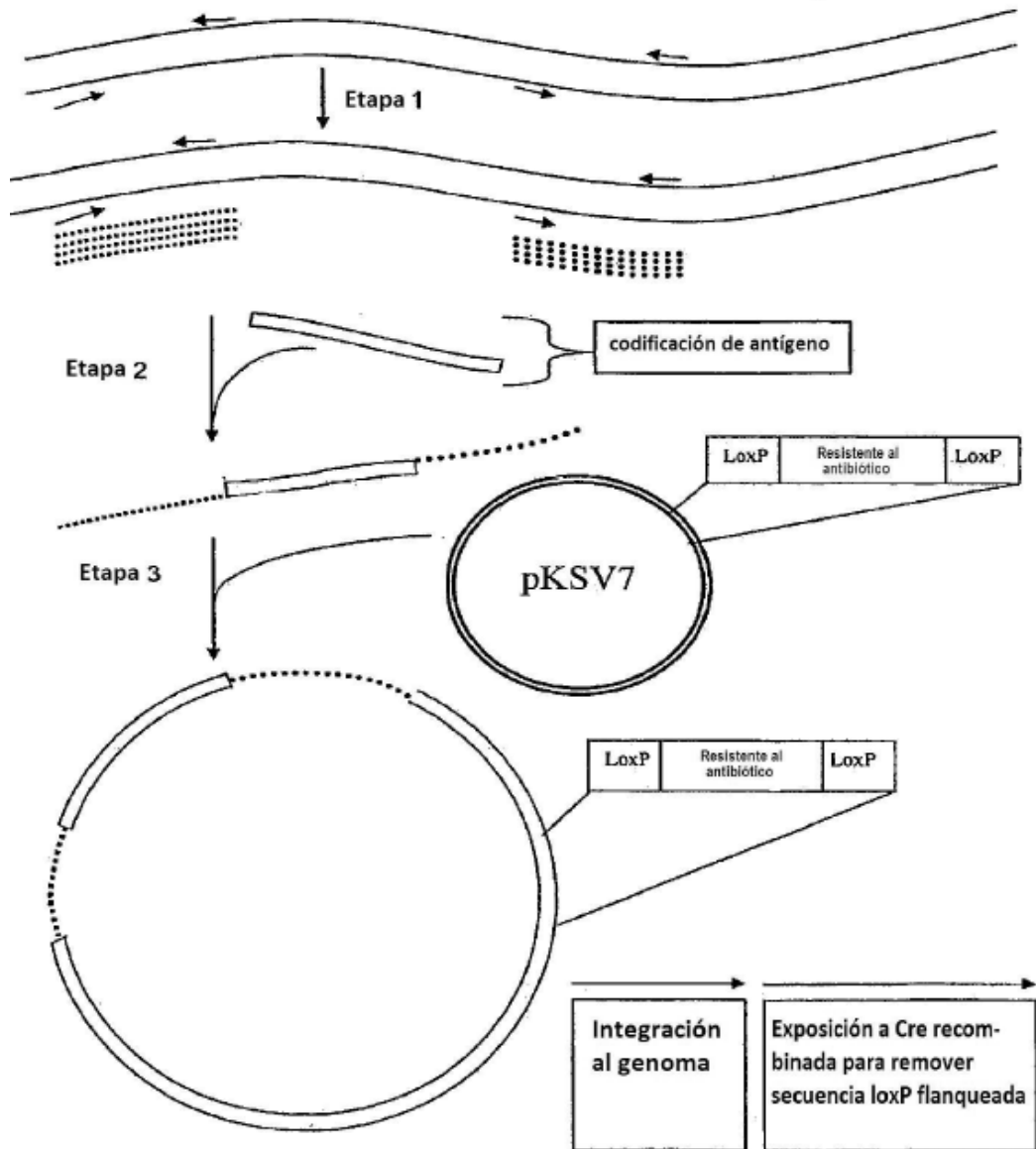


Fig. 6.

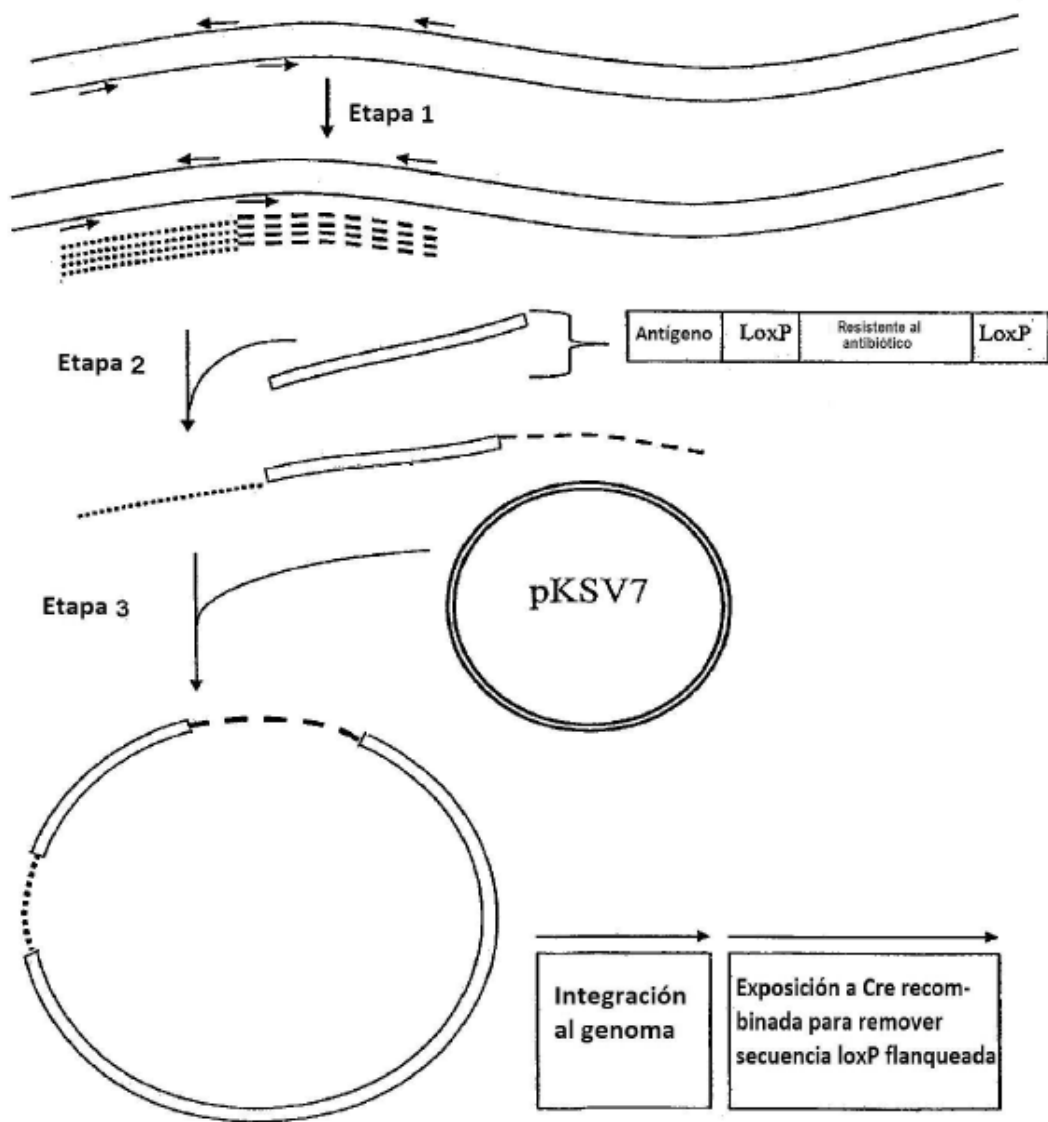


Fig. 7.

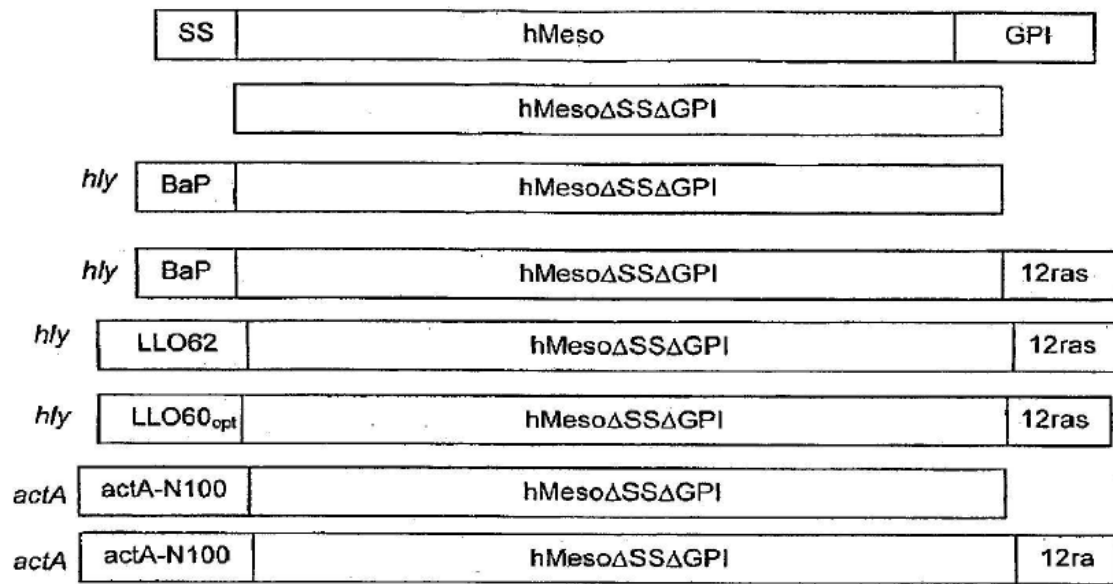


Fig. 8.

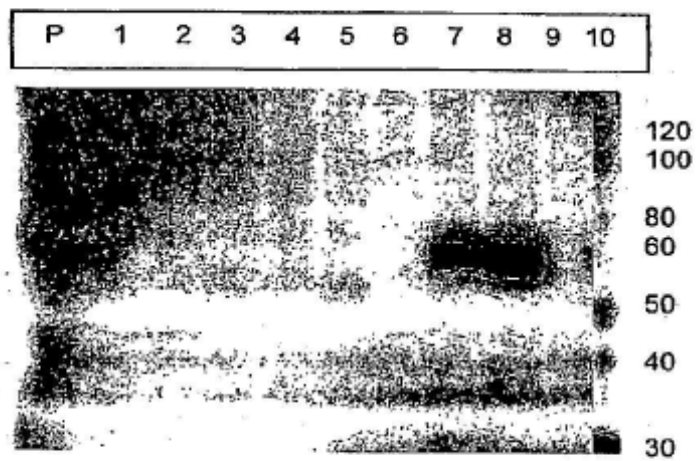


FIG. 9

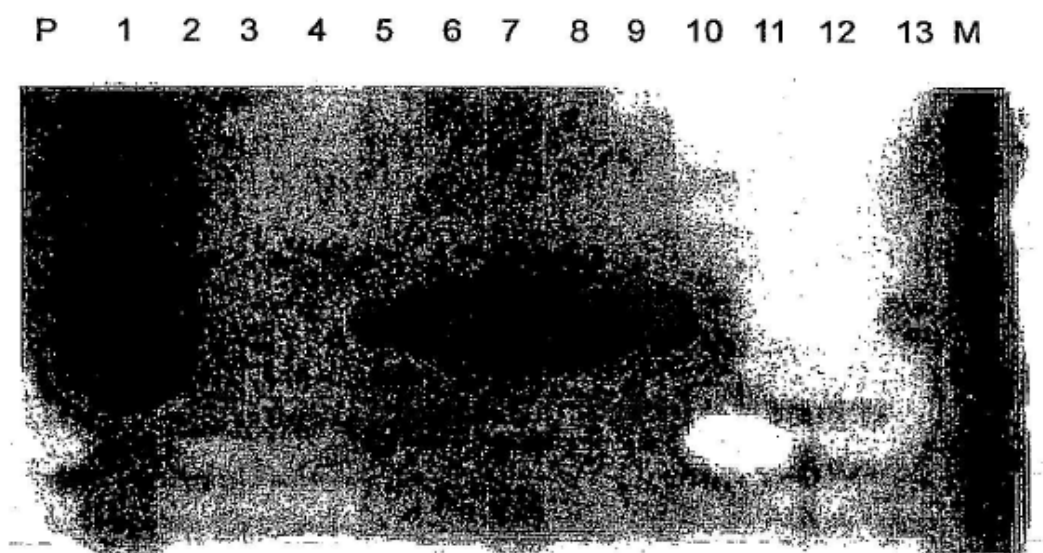


FIG. 10

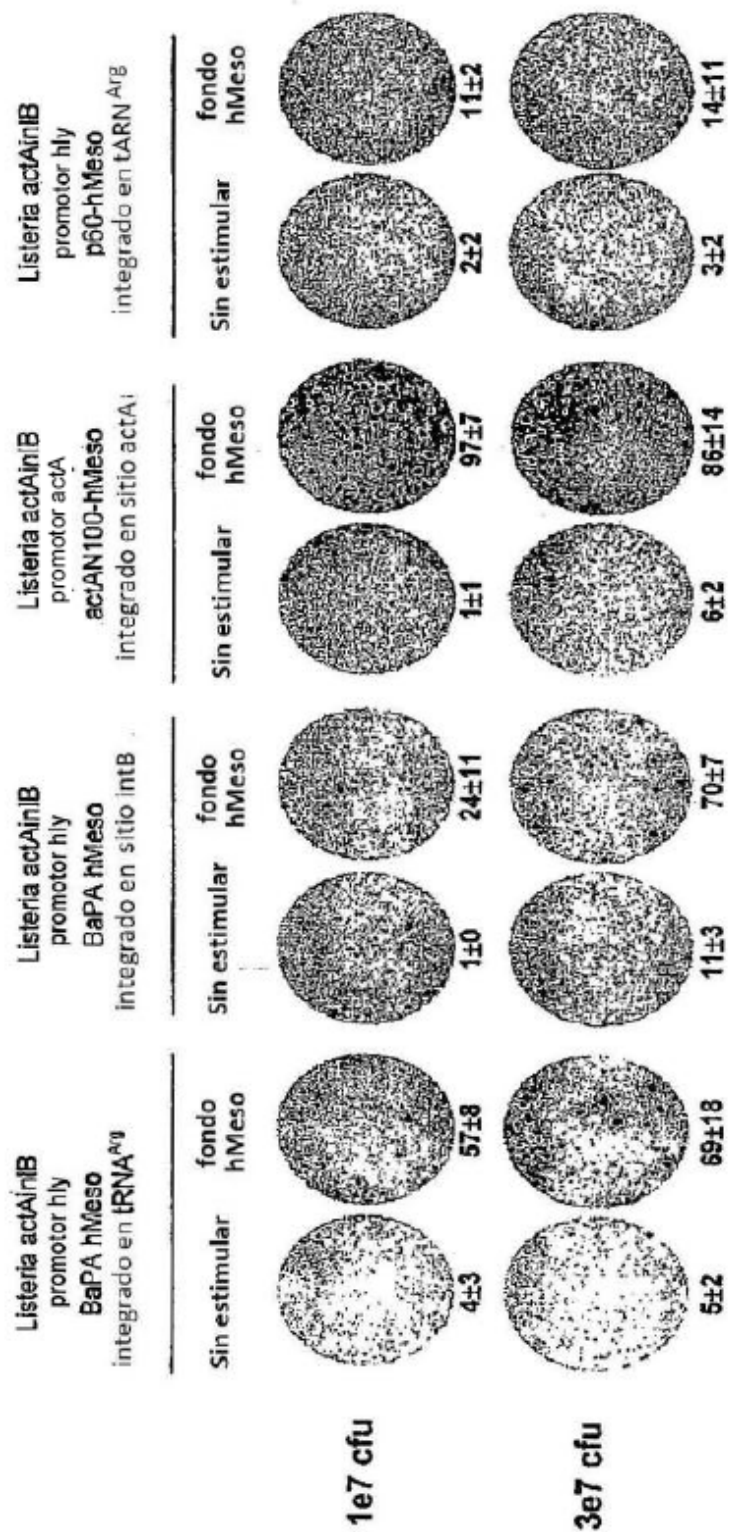


Fig. 11

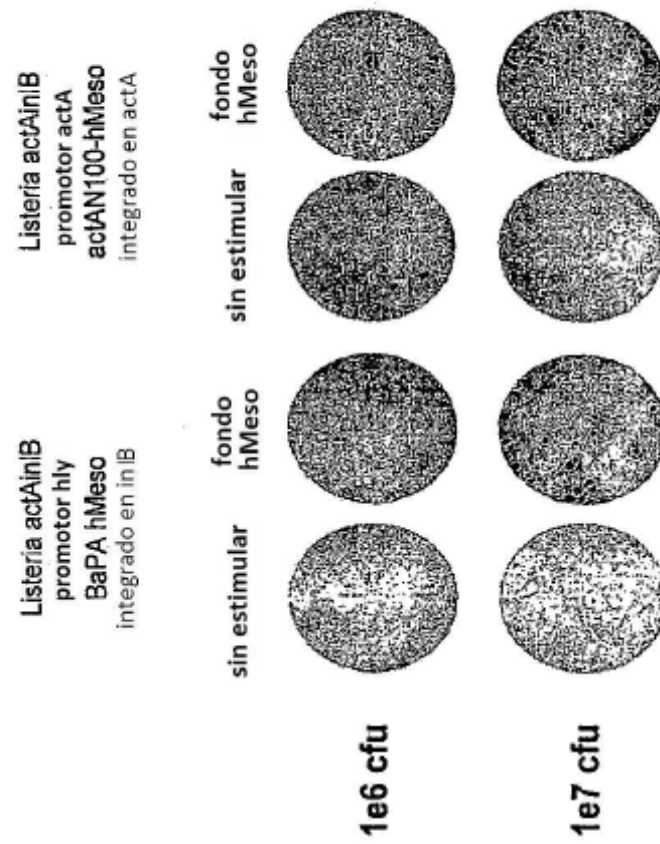


Fig. 12.

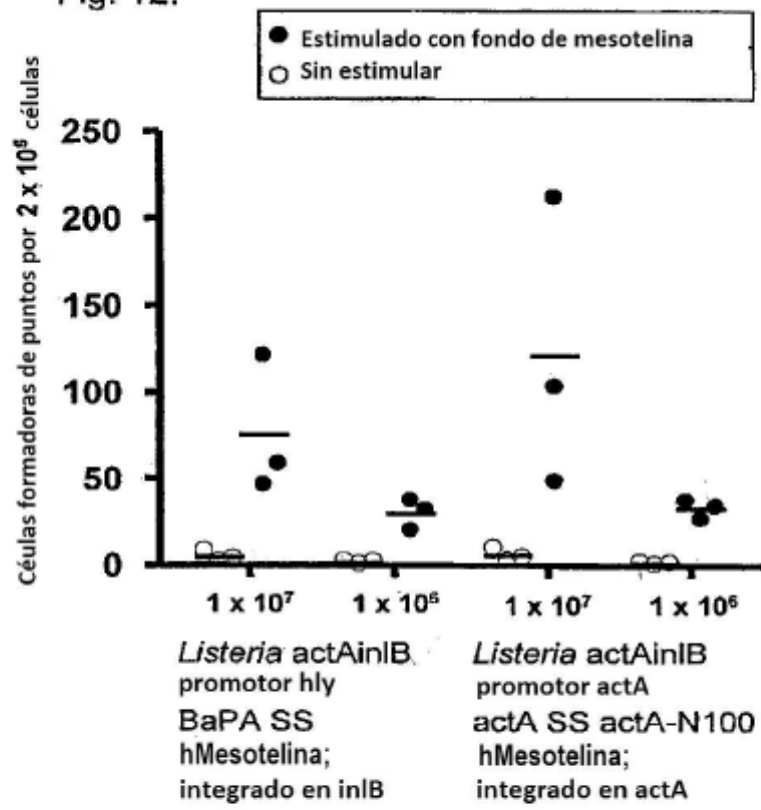


Fig. 13

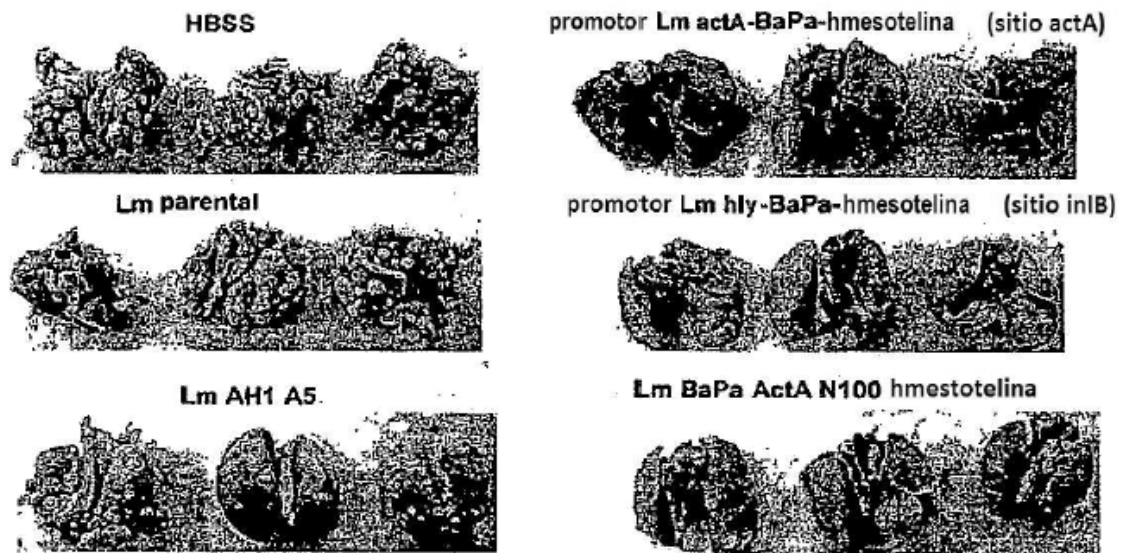


Fig. 14.



Fig. 15A-G. Cosecha de esplenocitos en día 23 post-implante de tumor

A. Testigos:

(1) HBSS solamente; (2) Padre

L. monocitogenes

ΔactA/inIB solamente; (3) antígeno

AH1-A5 que expresa listeria

B. hMeso2.

C. hMeso3.

D. hMeso4.



E. hMeso6.

F. hMeso7.

G. hMeso8.

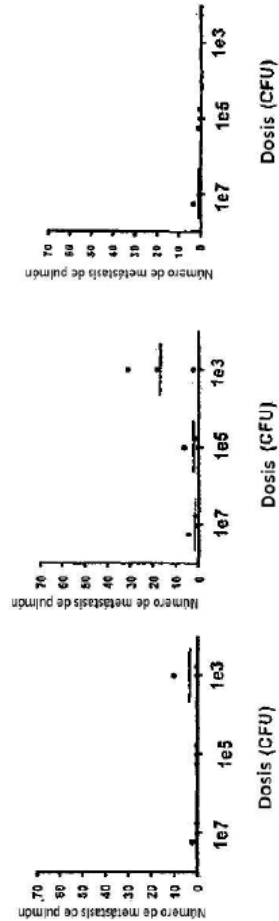
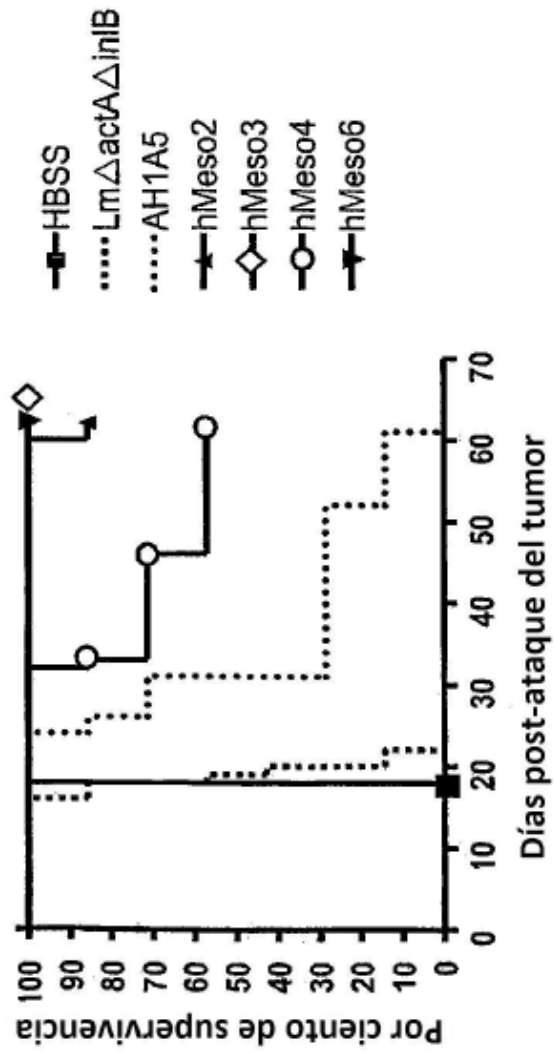


Fig. 16



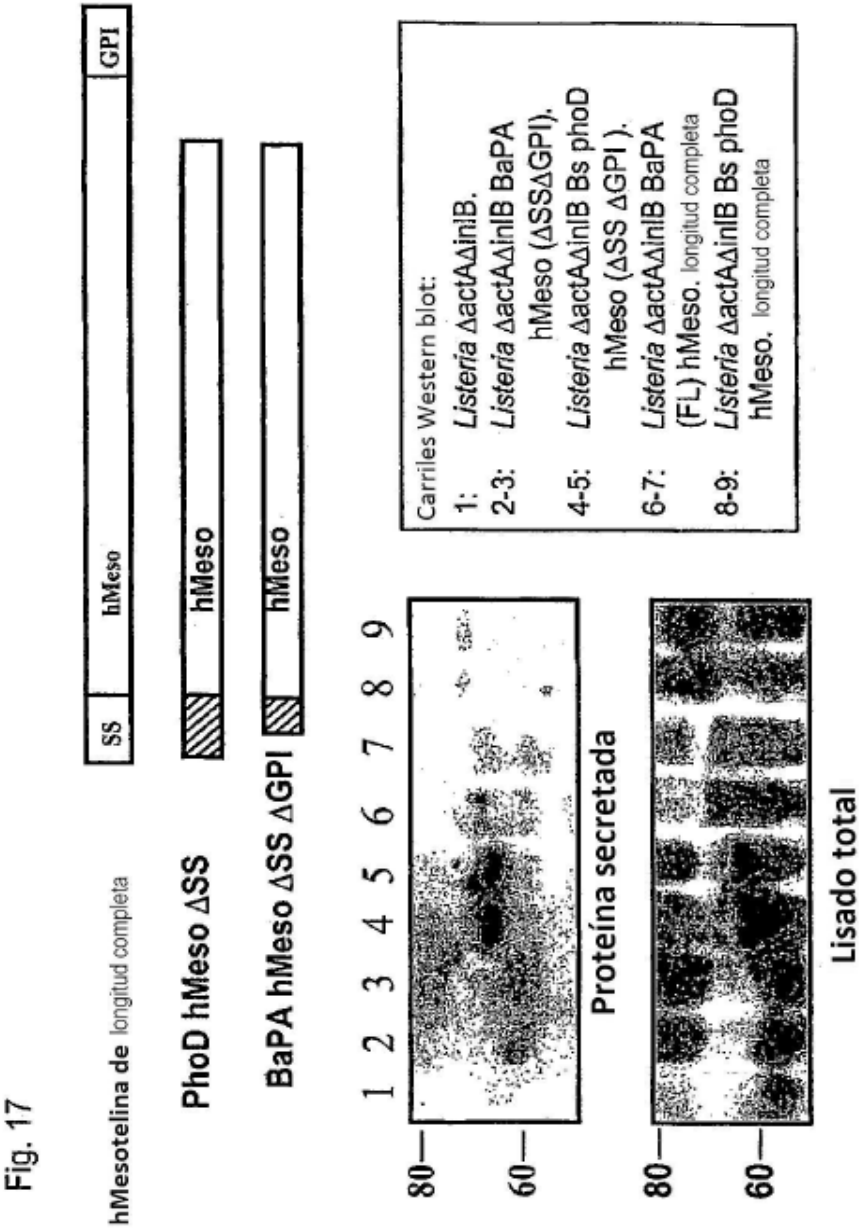


Fig. 18

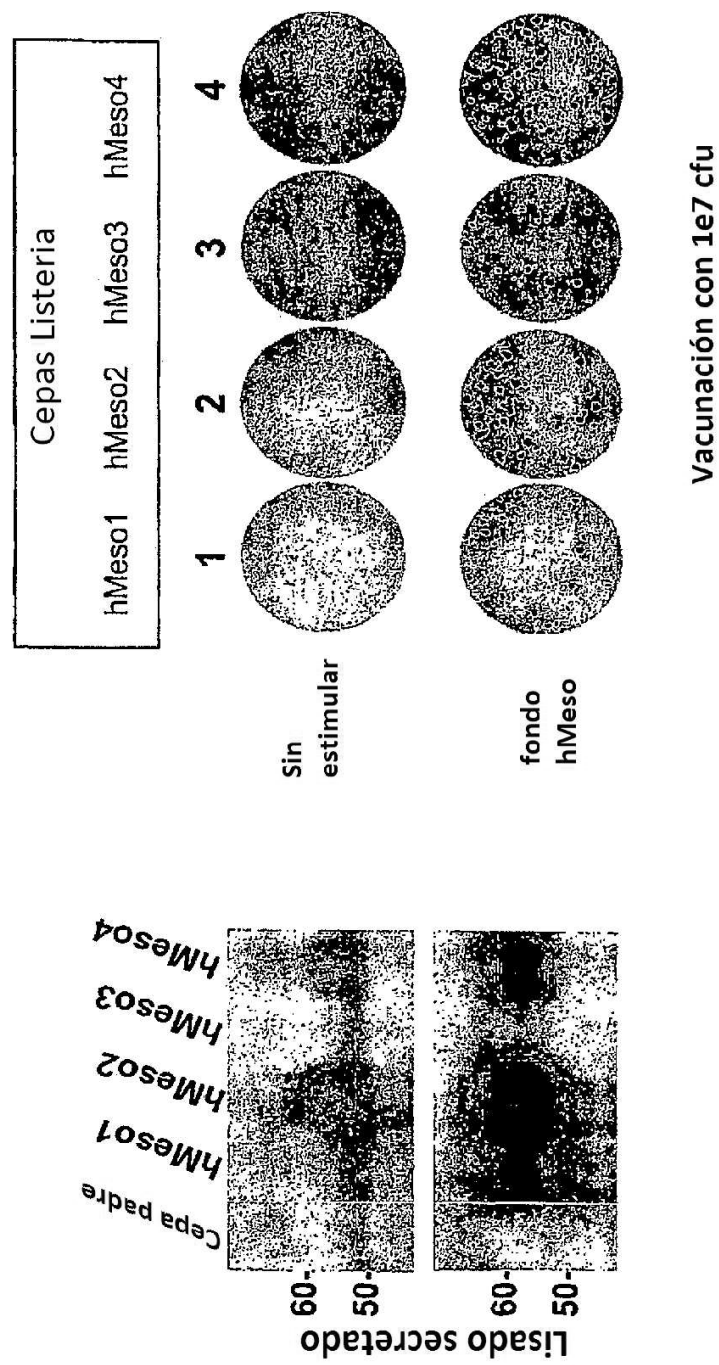
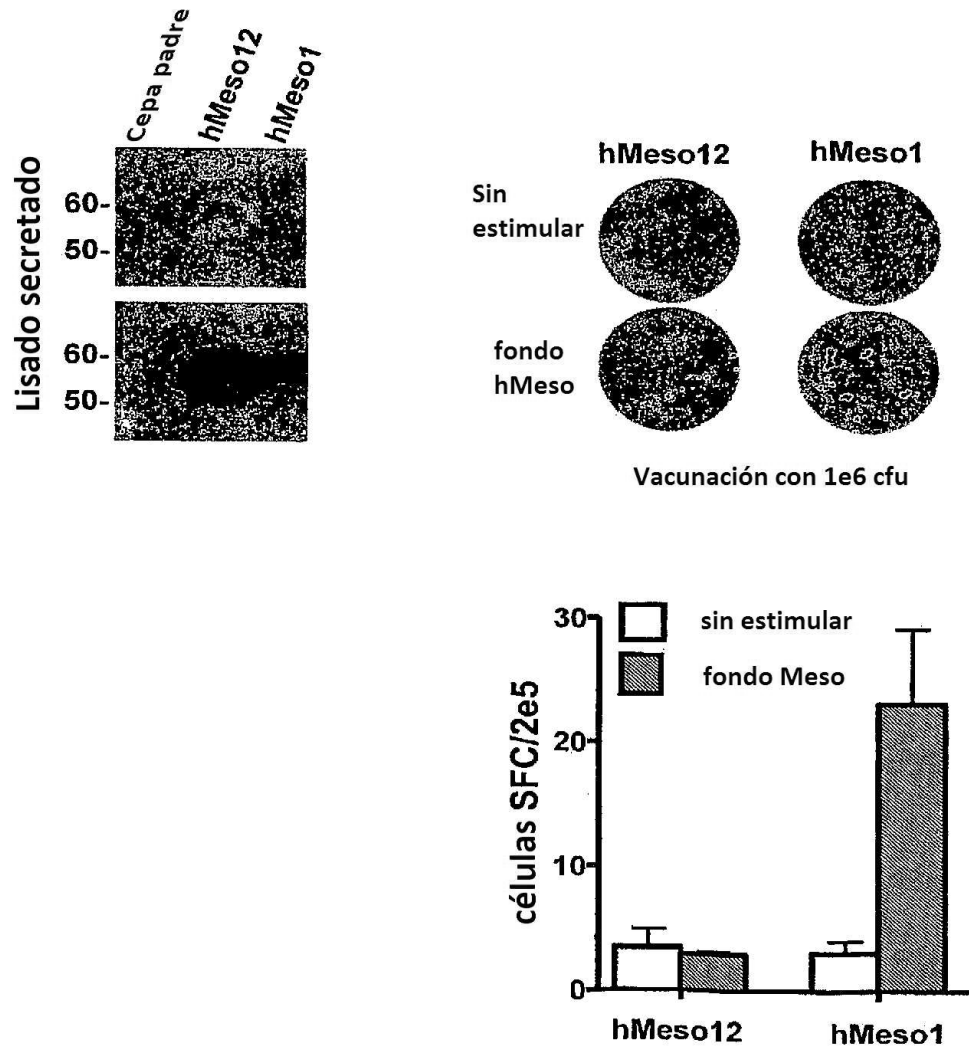
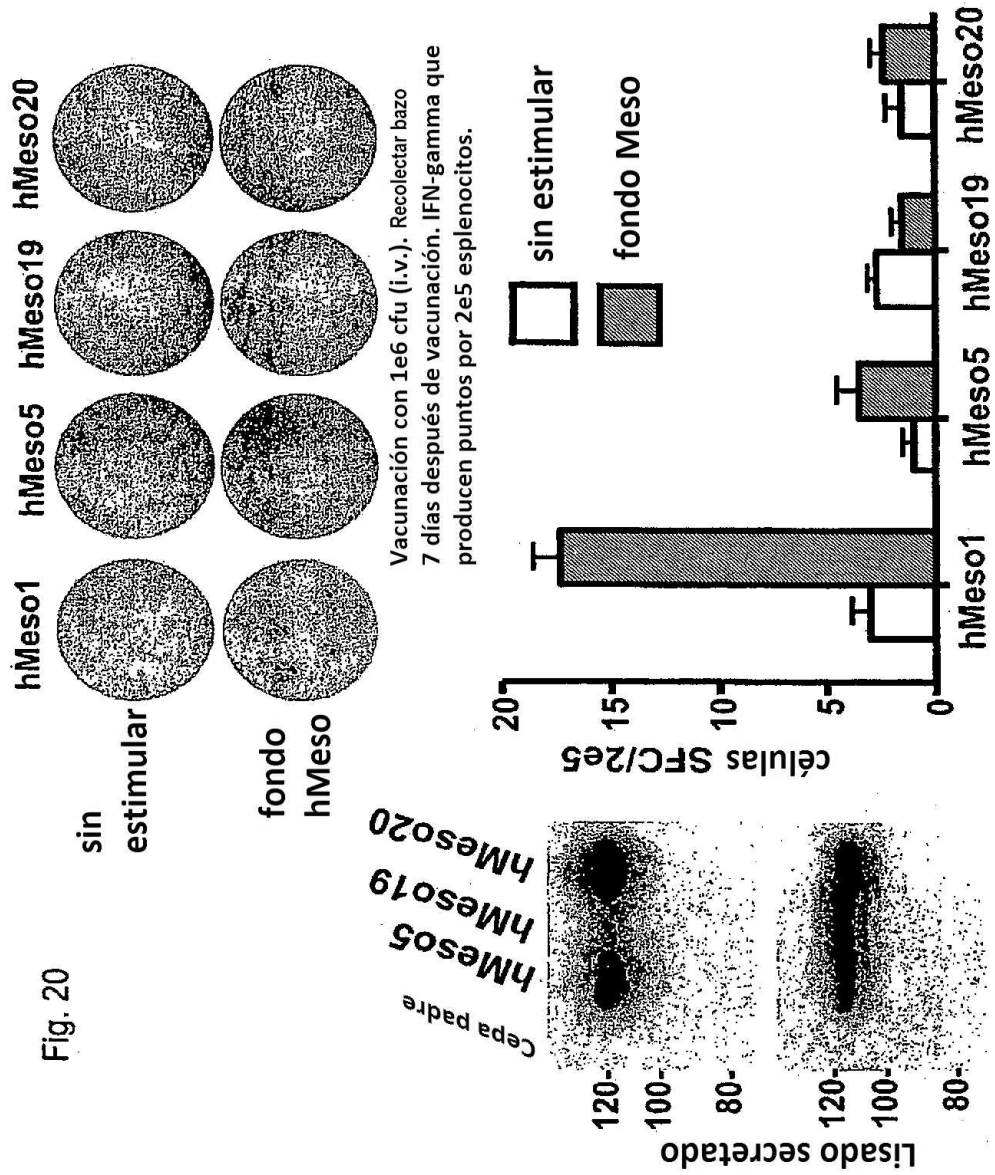
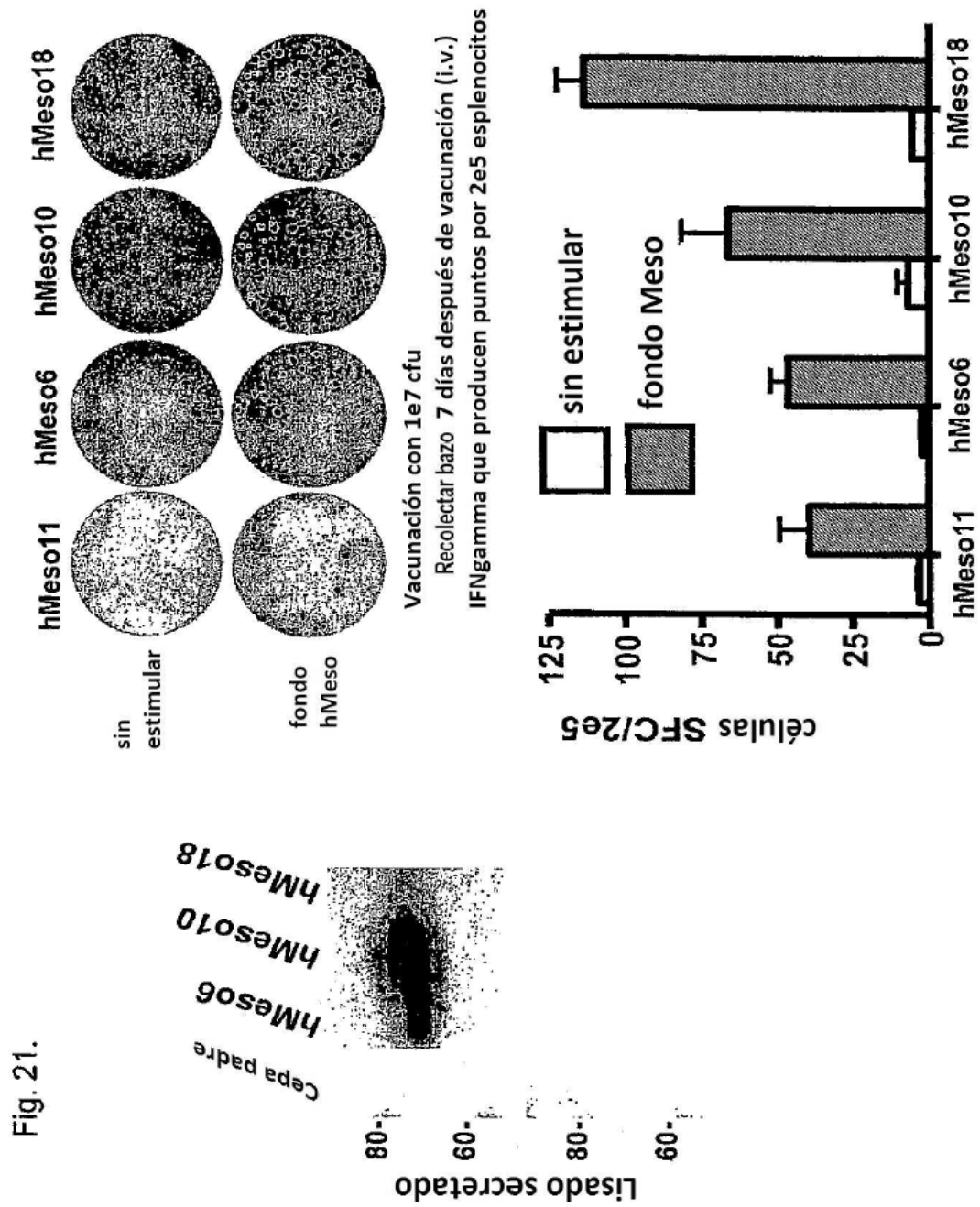


FIG. 19







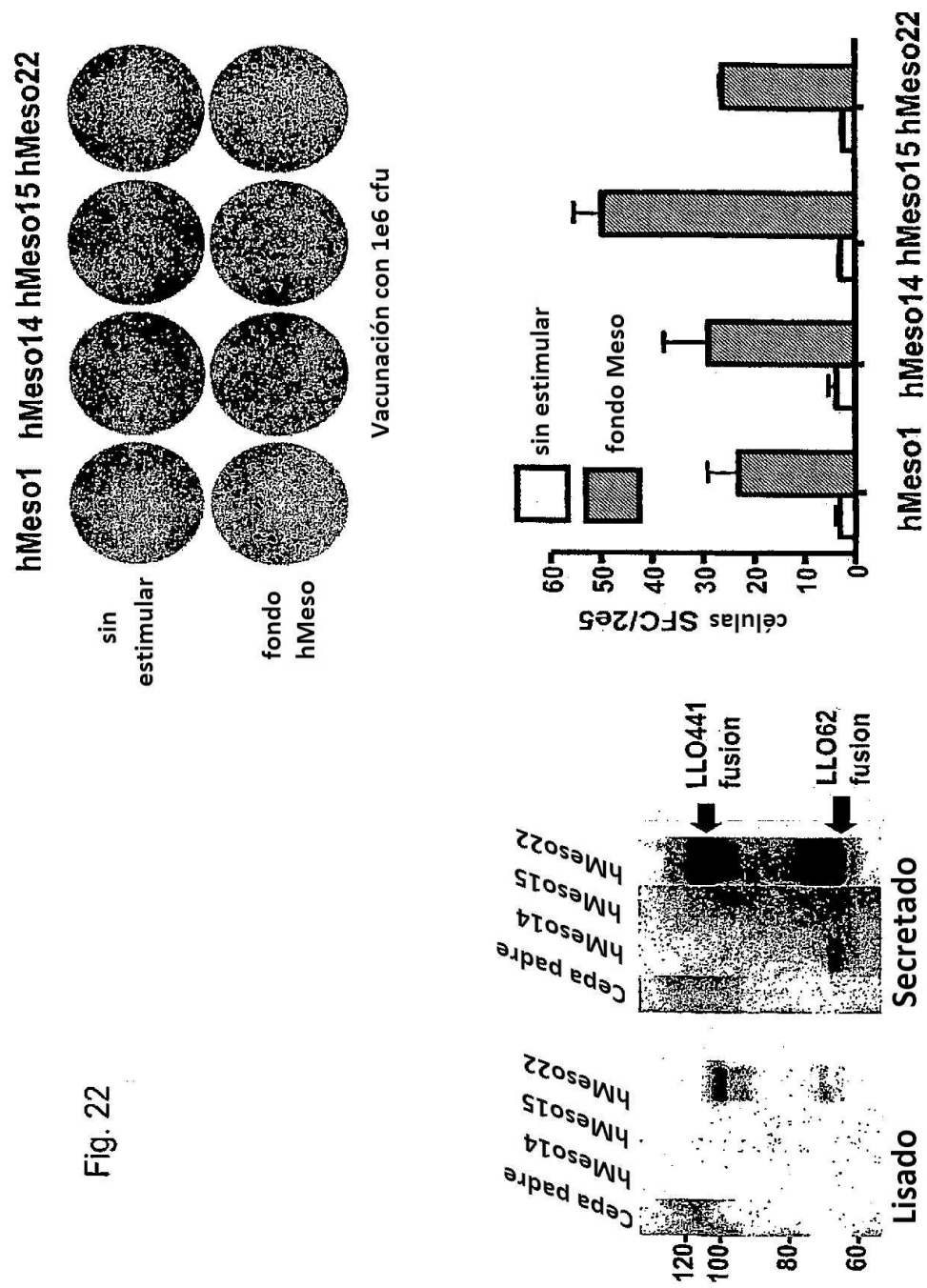


Fig. 23

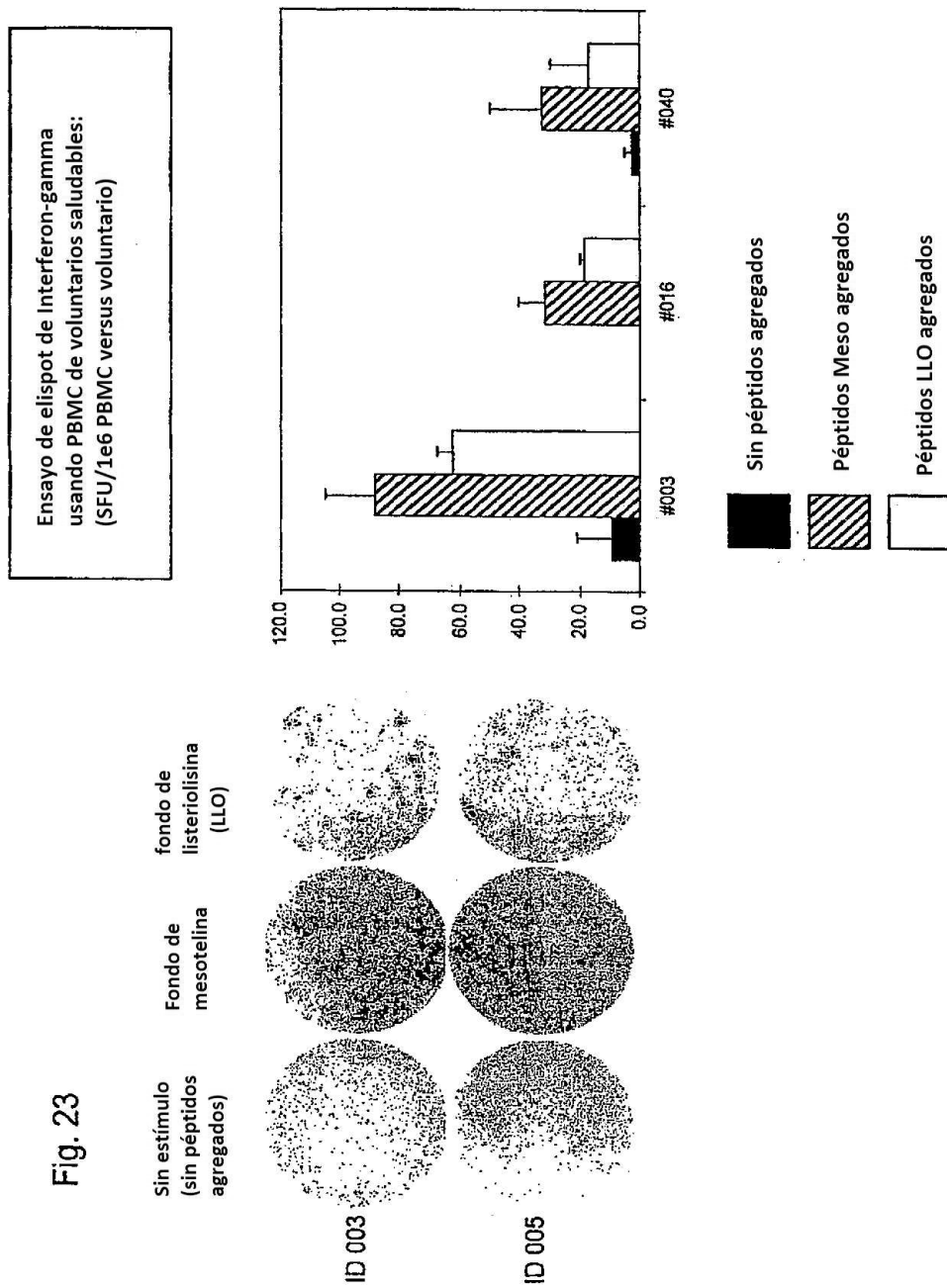


Fig. 24

Expresión de hMeso por Listeria en
caldo o en células mamíferas

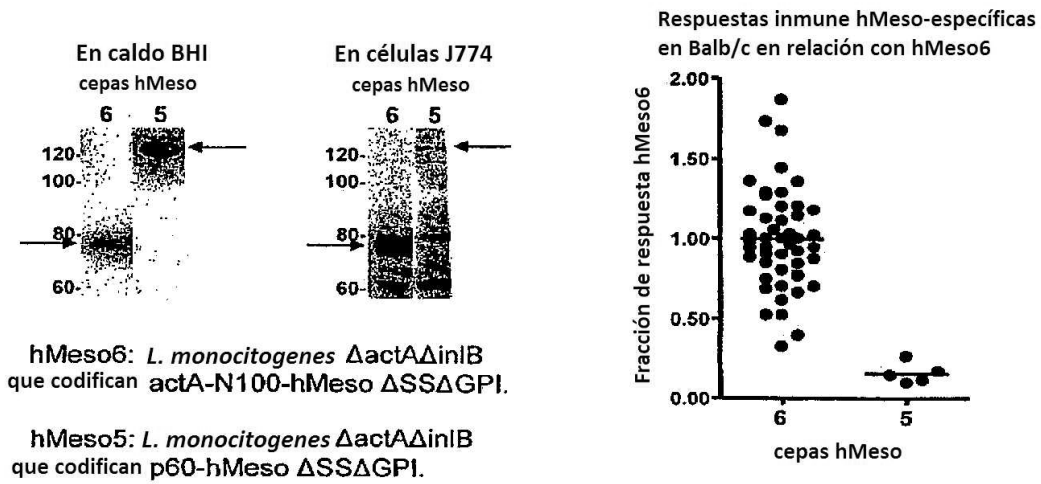


Fig. 25

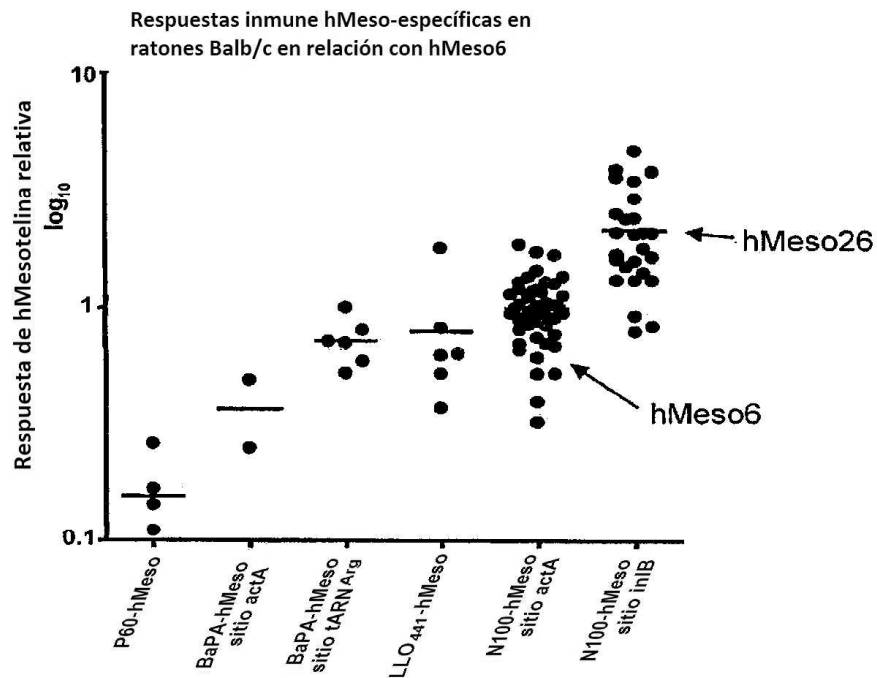
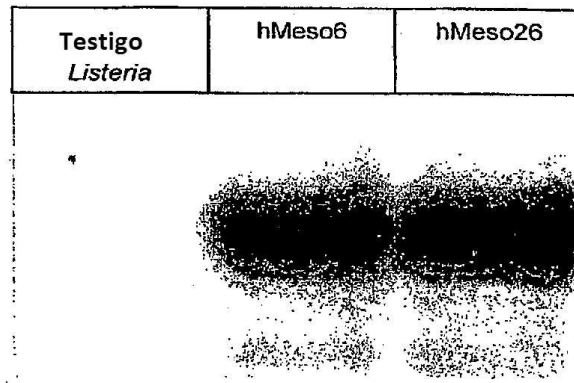


Fig. 26



Respuestas hMeso-específicas en ratones Balb/c en relación con hMeso26

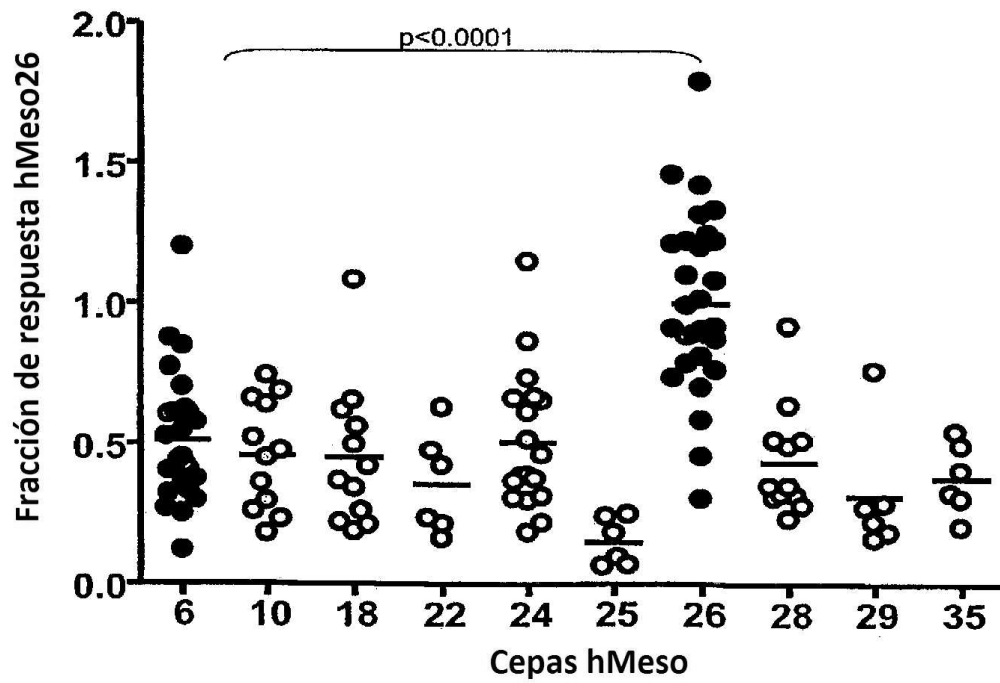


Fig. 27

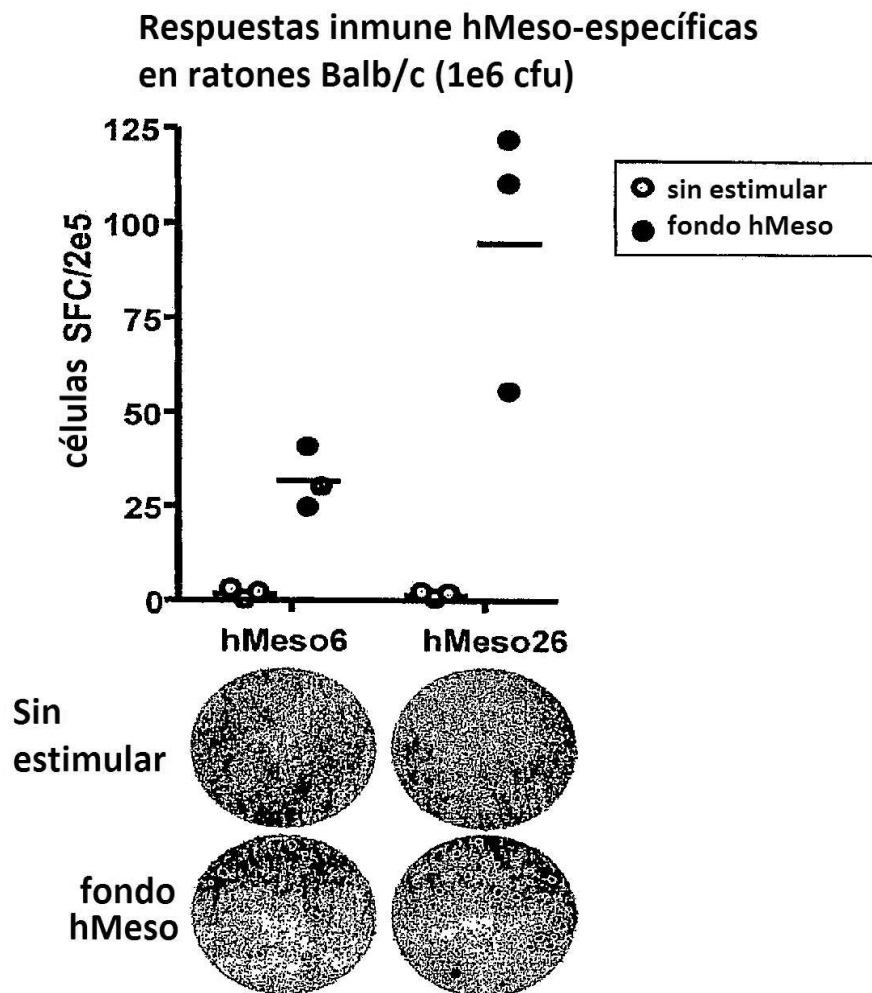
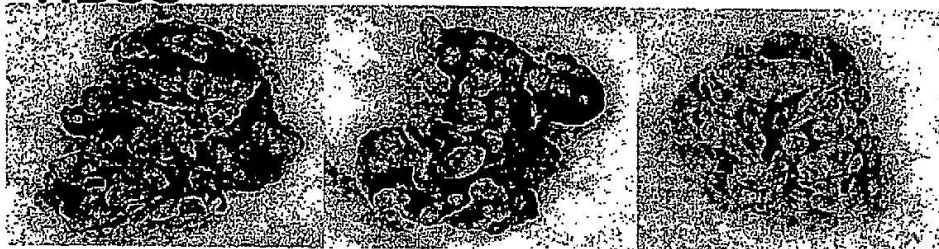


Fig. 28

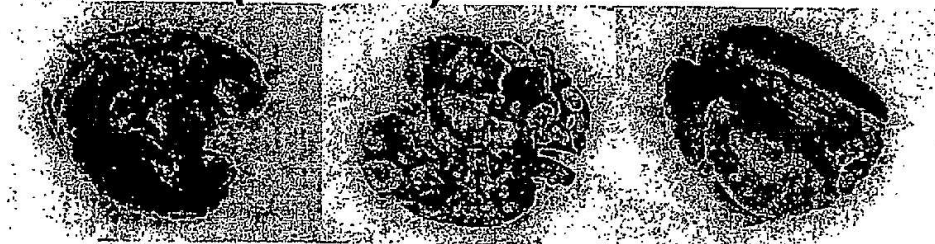
HBSS



AH1-A5 (1e6 cfu)



hMeso6 (1e4 cfu)



hMeso26 (1e4 cfu)

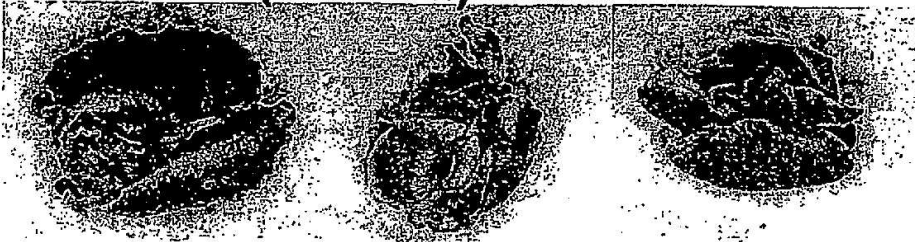


Fig. 29

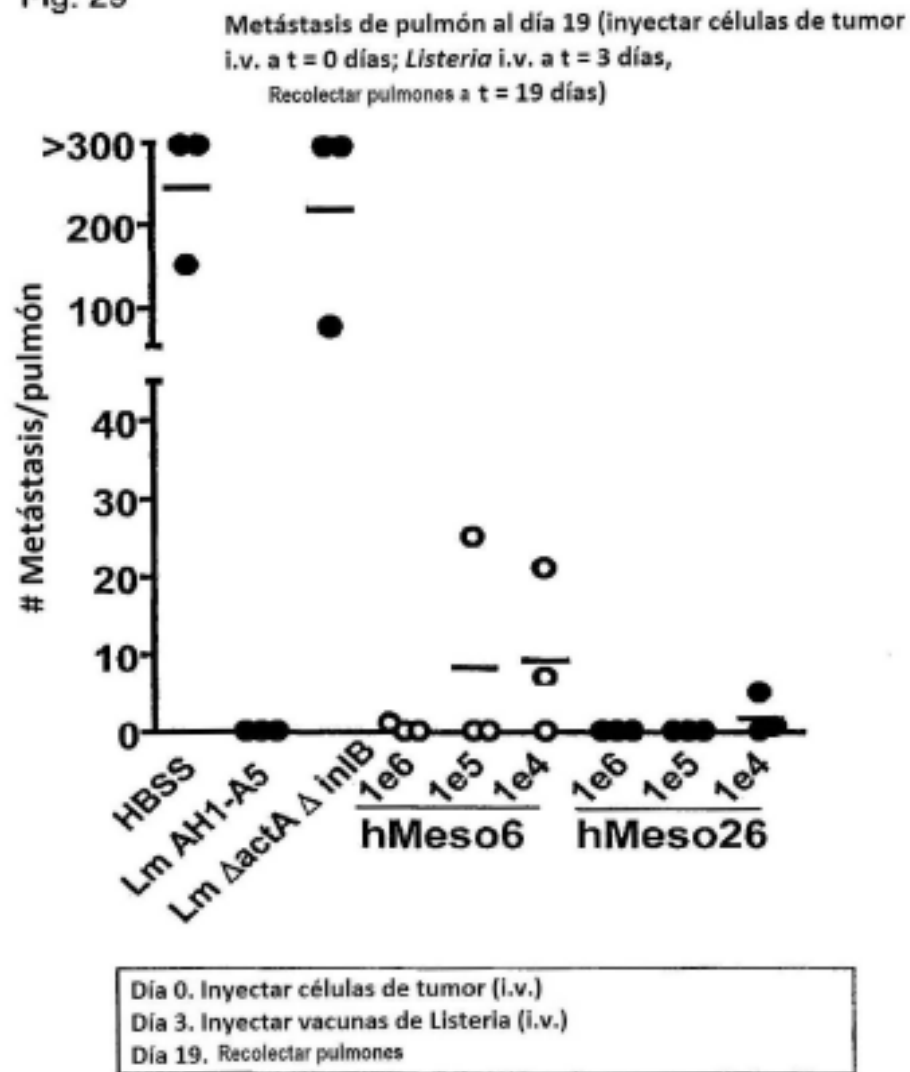
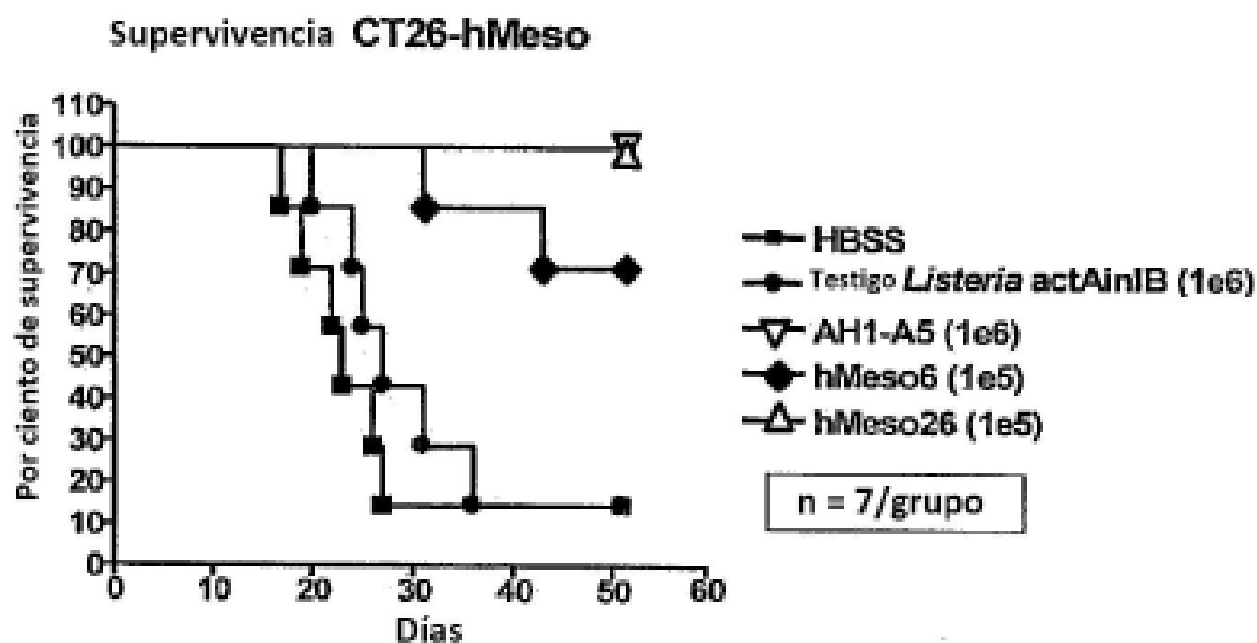


Fig. 30



Día 0. Inyectar células de tumor (i.v.)
 Día 3. Inyectar vacunas de *Listeria* (i.v.)
 Luego determinar la supervivencia

FIG. 31

<i>Lim ΔactA</i>	26	40	41	42	43
<i>ΔiniB</i> (testigo)			hMeso		



Respuestas hMeso-específicas
en ratones Balb/c (5e6cfu)

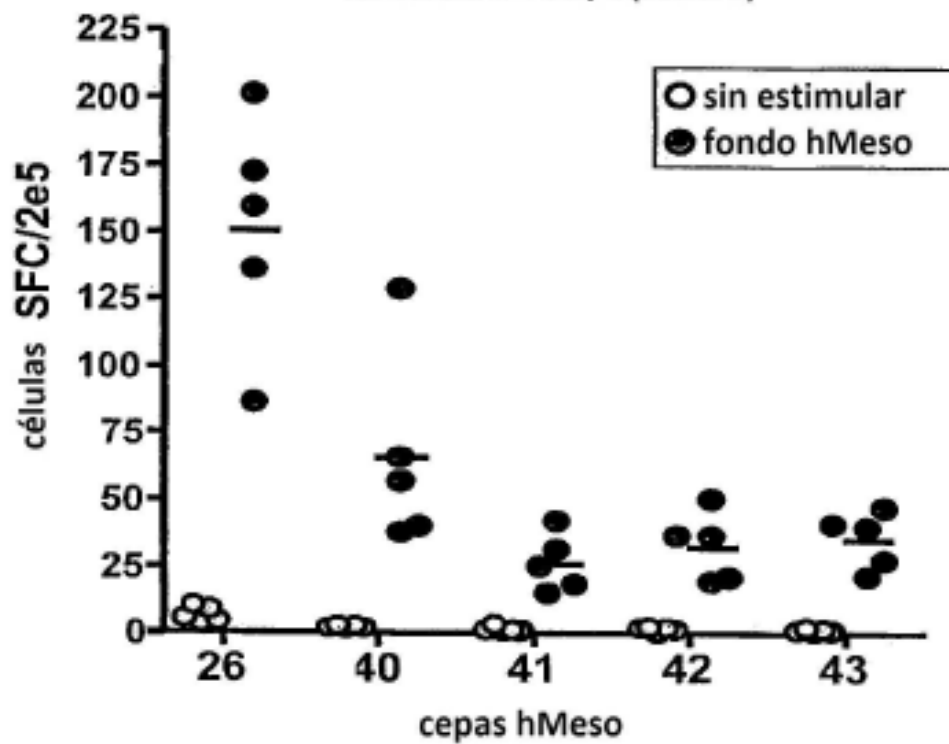


Fig. 32

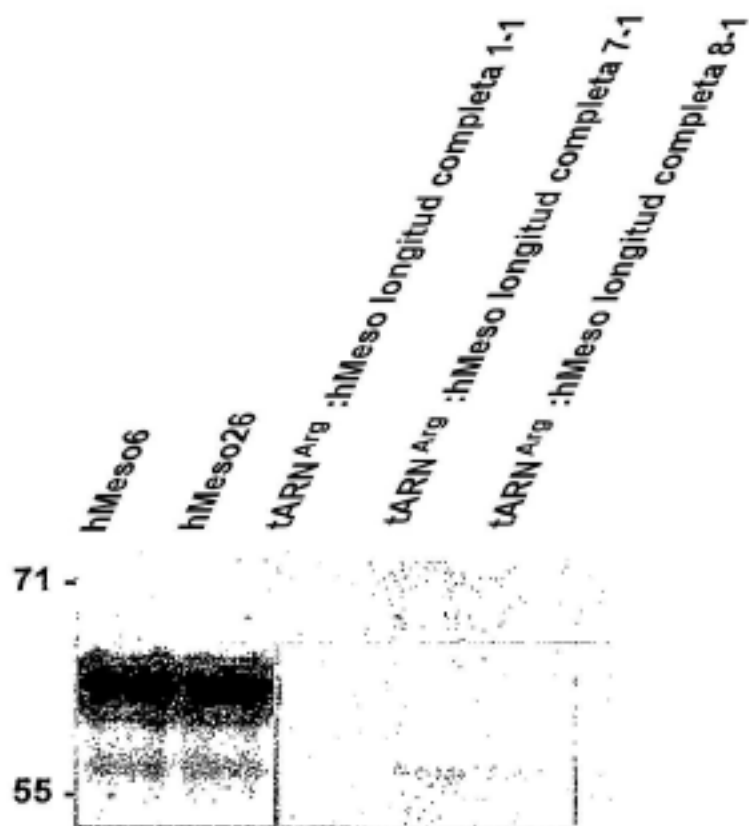
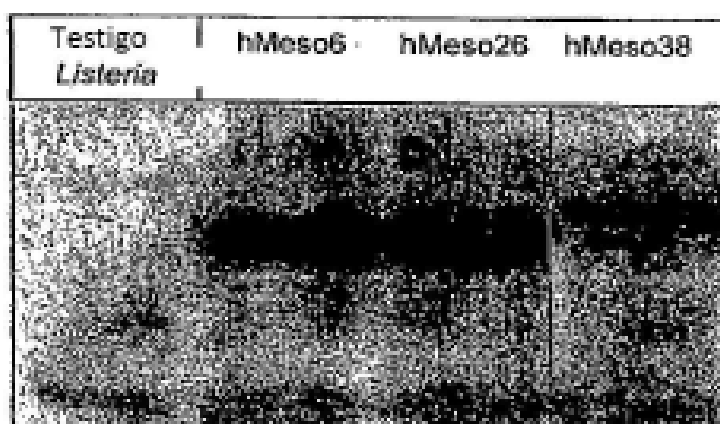


Fig. 33



Respuestas del fondo de hMeso en Balb/c (5e6 cfu)

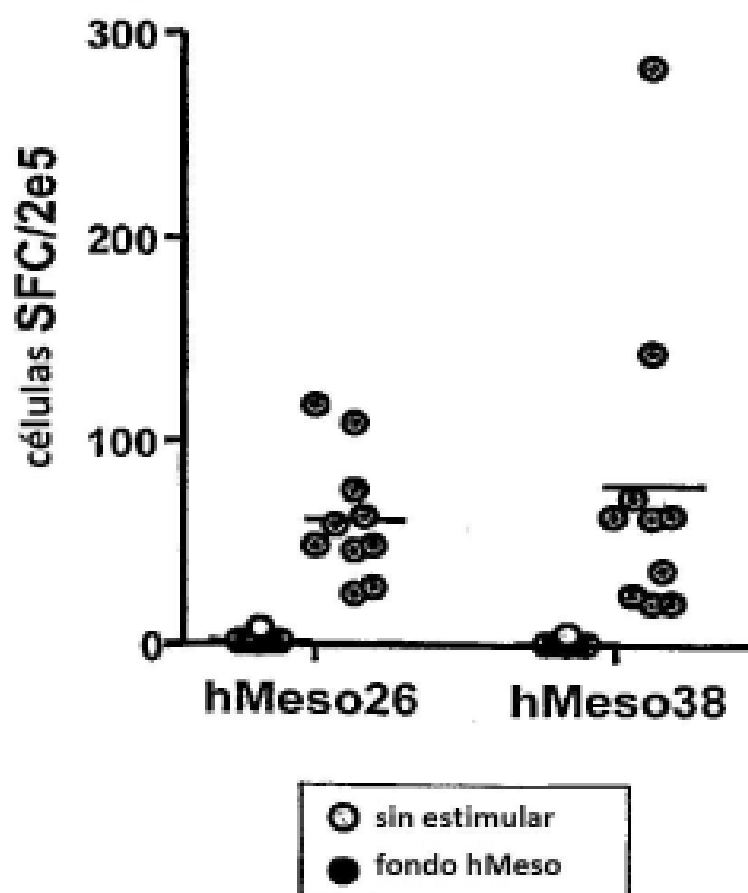


Fig. 34

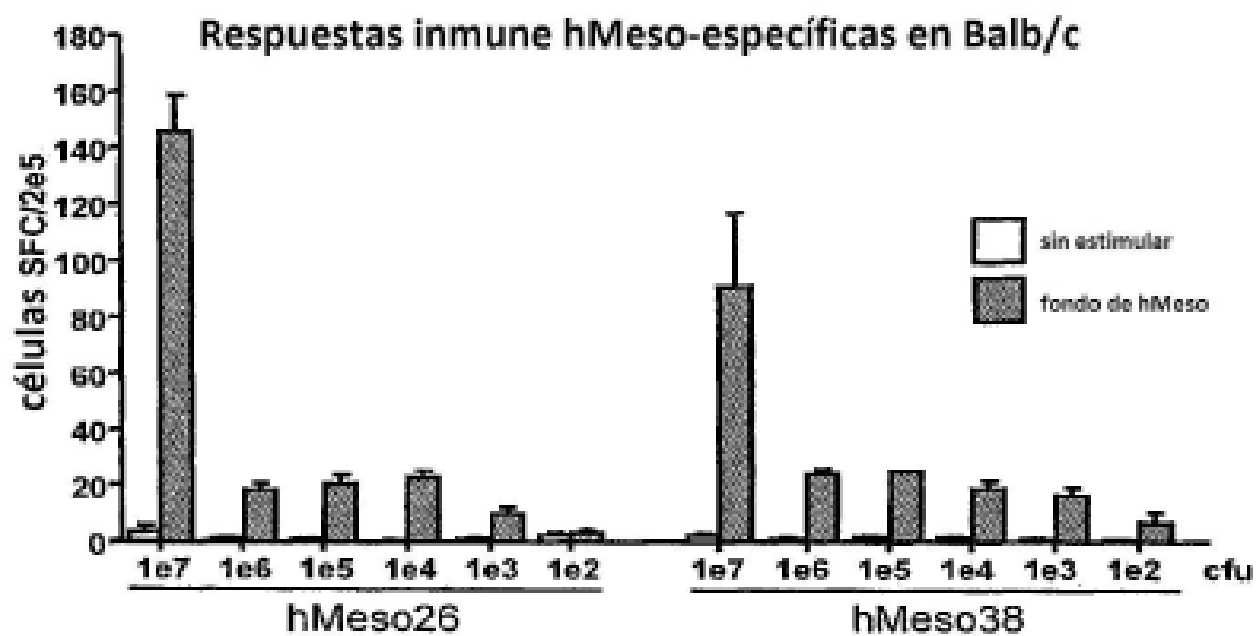


Fig. 35A

Solución salina tamponada de Hank (HBSS)

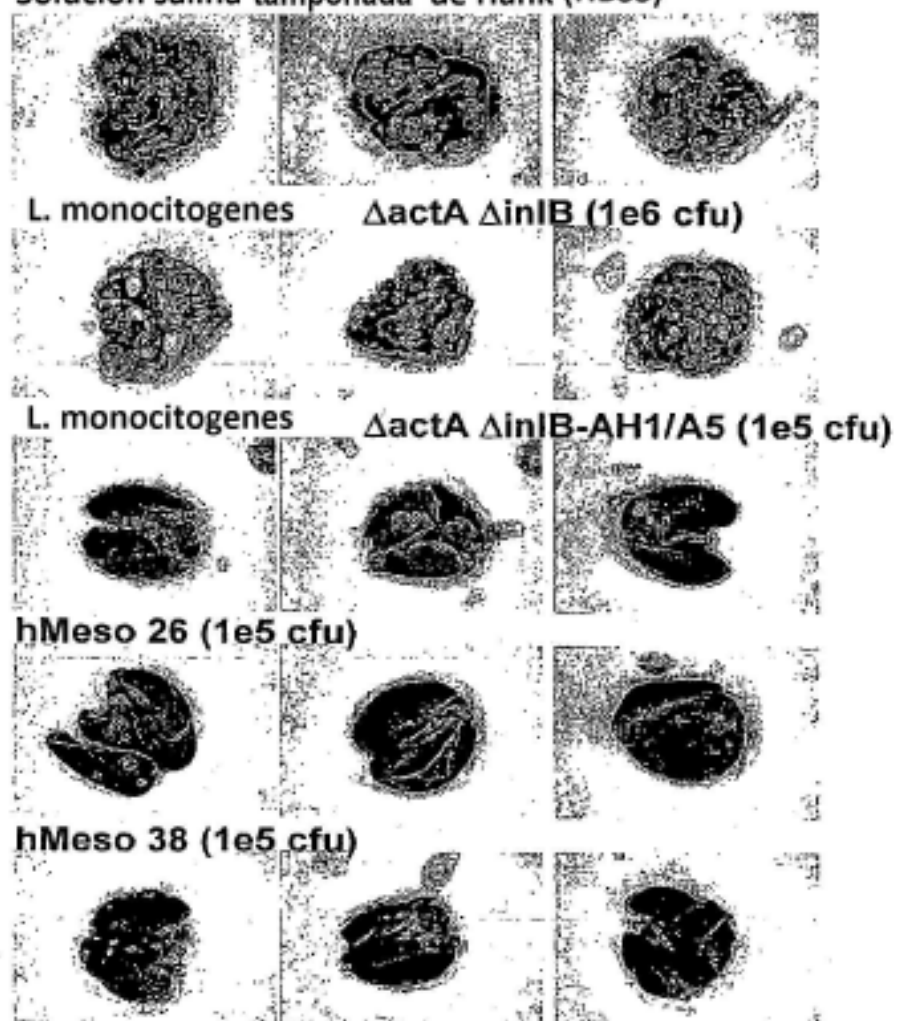
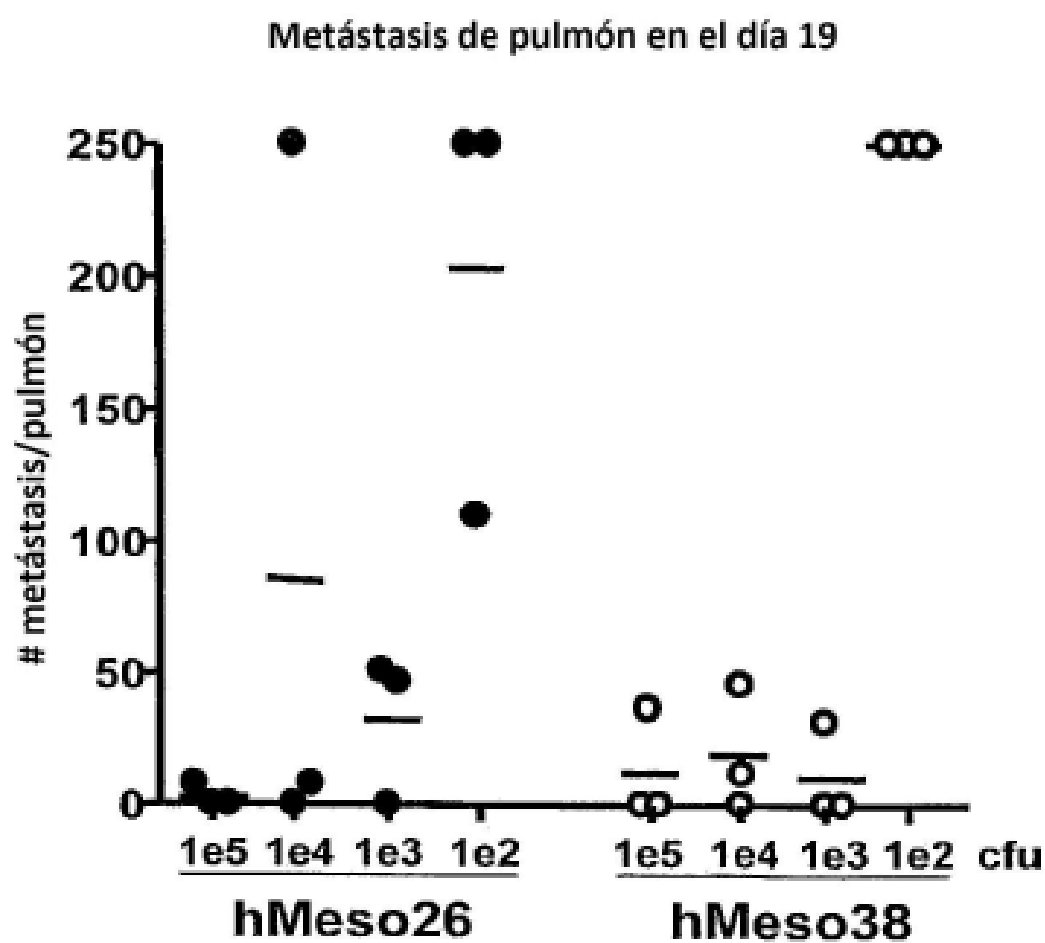


Fig. 35B



Día 0. Inyectar con células de tumor (i.v.).
Día 3. Inyectar vacunas de *Listeria* (i.v.).
Día 19. Recolectar pulmones

Fig. 36

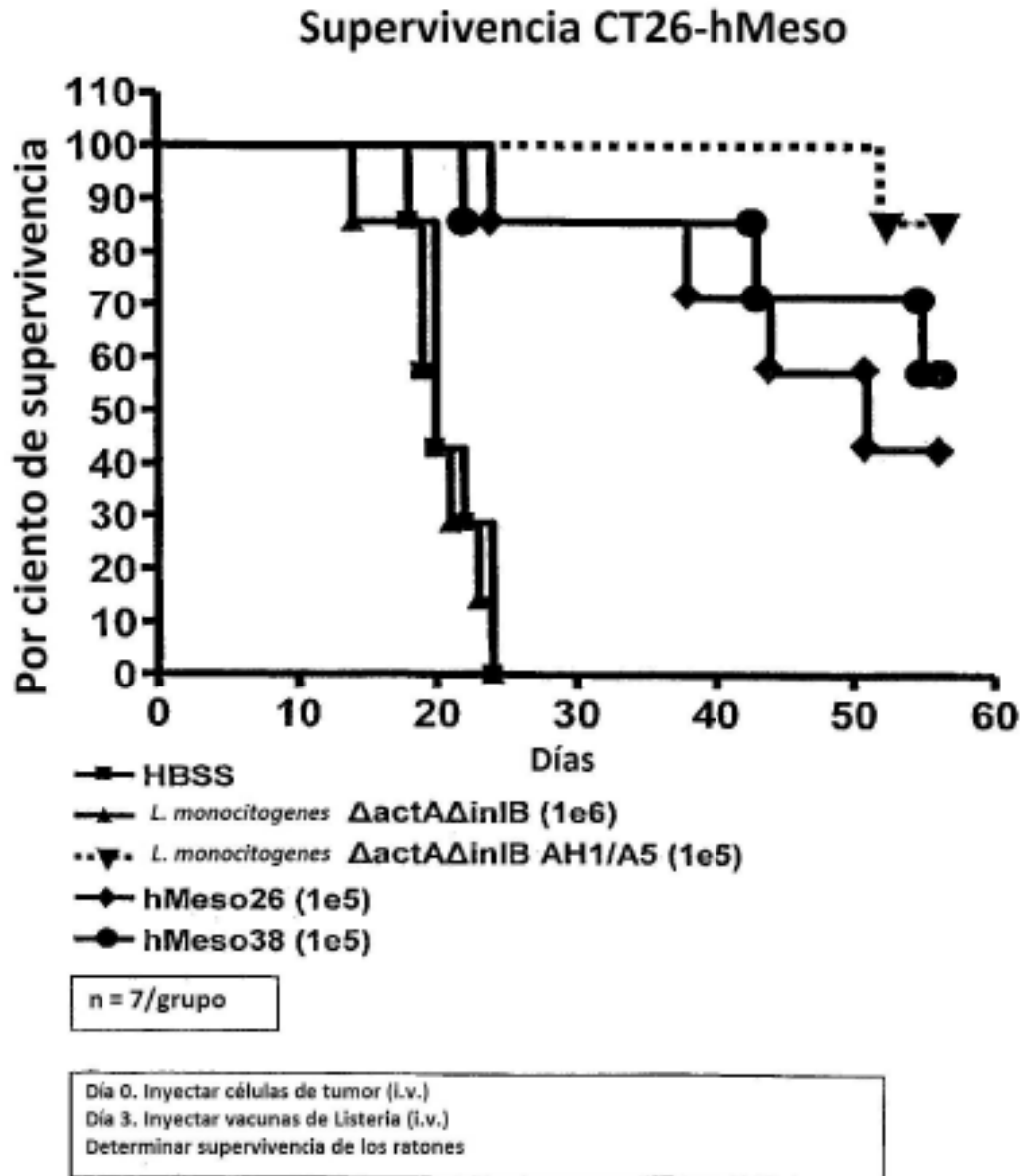


Fig. 37

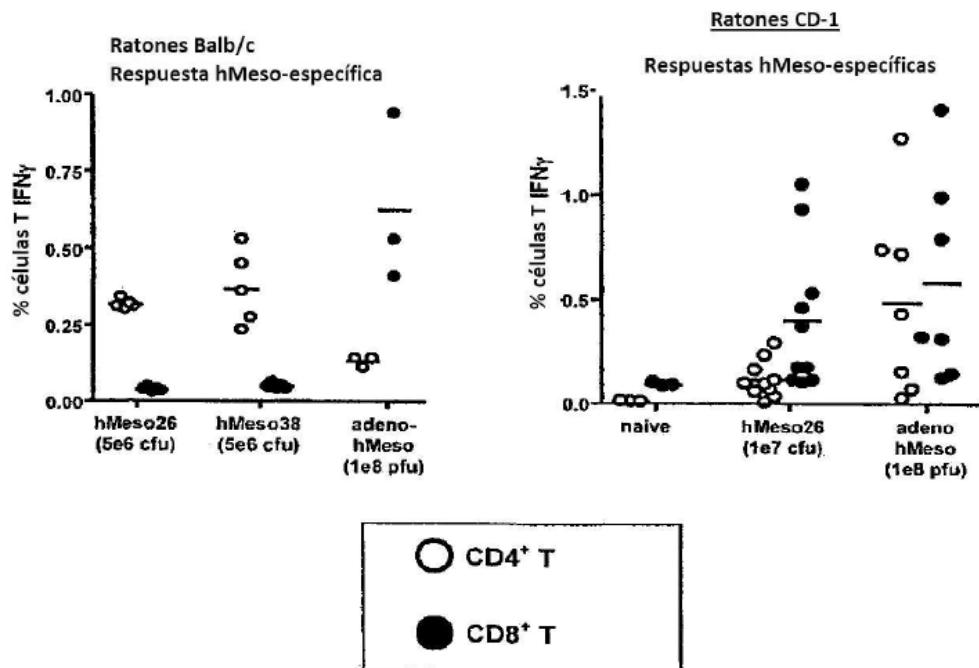
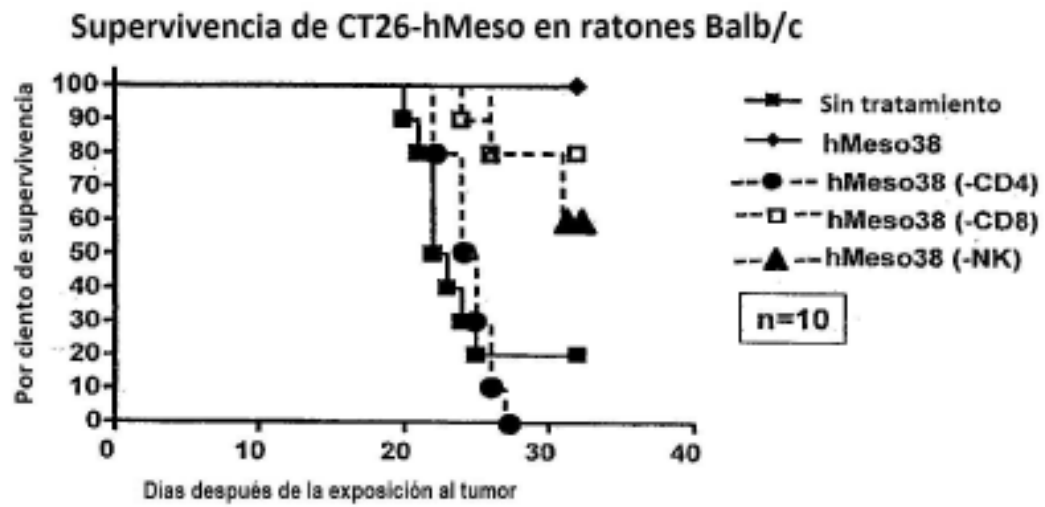
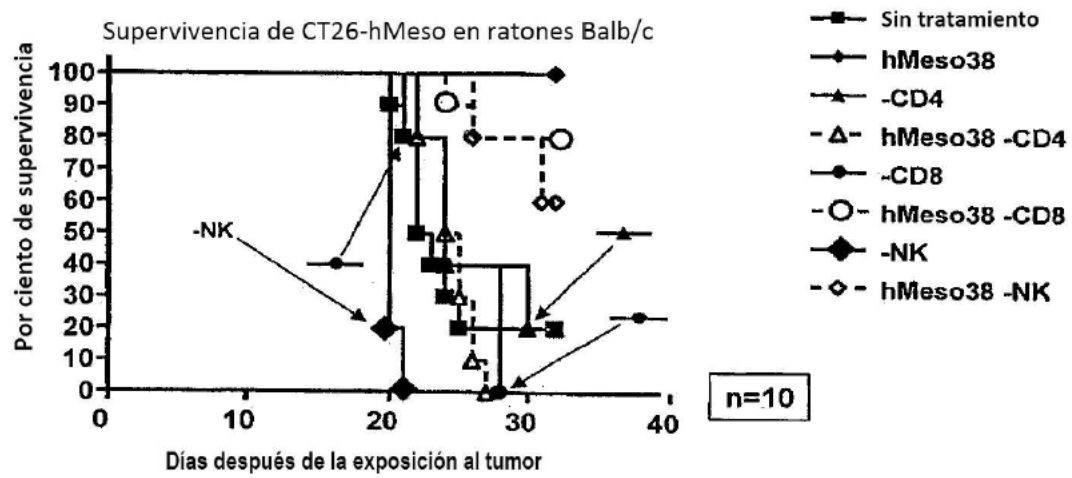


Fig. 38



Días -8, -4 y -1. Inyectar anticuerpos agotantes.
 Día 0. Inyectar células de tumor (i.v.).
 Día 3. Inyectar vaculas de Listeria (i.v.).
 Refuerzos semanales de anticuerpo.
 Probar supervivencia de ratones.

Fig. 39



Días -8, -4, -1. Inyectar anticuerpos agotantes.
 Día 0. Inyectar células de tumor (i.v.)
 Día 3. Inyectar vacunas de Listeria (i.v.)
 Refuerzos de anticuerpo semanales.
 Probar supervivencia de ratones

Fig. 40.

L. innocua 1231.

```

1                               50
U153 int (1) MKAAYIRVSTQEQIEN-YSIQAQTEKLTALCRSKDWDVYDIFIDGGYSG
lin1231 (1) MTVGIYIRVSTEEQVKEGFSISAQKEKLKAYCTAQQGWEDFKFYVDEGKSA
Consenso (1) M AIYIRVST EQI FSI AQ EKL A C A WD F FID G SA
51                               100
U153 int (50) SNMNRPALNEMLSKLHE--IDAVVVYRLDRLSRSQRDTITLIEEYFLKNN
lin1231 (51) KDMHRPLLQEMISHIKKGLIDTVLVYKLDRLTRSVVDLHNLISIFDEFN-
Consenso (51) M RP LNEMIS I ID VLVYKLDRLSRS D LI F N
101                               150
U153 int (98) VEFVSLSETLDTSSPFGRAMIGILSVFAQLERETIRD RMVMGKIXRIEAG
lin1231 (100) CAFKSATEVYDTSSAMGRFFITIISVAQFERENTSERVSFGMAEKVRQG
Consenso (101) F S SE DTSS GR I IIS AQ ERE DRM G KI G
151                               200
U153 int (148) LPLTTAKGRTEFGYDV-IDTKLYINEEEAKQLQMIYDIFEEESITTLQKR
lin1231 (150) EYIPLAP---FGYTKGTDGKLIVNKIEKEIFLQVVMVSTGYSRLRQCEY
Consenso (151) I A FGY D KL IN E I DI SI
201                               250
U153 int (197) LKKLGFKVKS-----YSSYNNWLTNDLYCGYVSYADKVHTKGVHEPIIS
lin1231 (197) LTNIGLKTRRSNDVWKVSTLIWMLKNPAVYGAIKWNNEIYEN-THEPLID
Consenso (201) L IG K K SS L N G I W IH HEPII
251                               300
U153 int (241) EEQFYRVQEIEFSRMGKNPNMNR-DSASILNNLVVCGKCGLG FVHRRKDTV
lin1231 (246) KATFNKVAKILSIRSKSTTSRRGHVHHIFKNRLICPACGKRLSGLRTKYI
Consenso (251) F KV I S K R I N LIC CG R I
301                               350
U153 int (290) SRGK-KYHYRYYSCKTYKHTELEKCGNKIWRADKLEELIIDRVNNYSFA
lin1231 (296) NKNKETFYNNNYRCATCKEHRRAVQIS----EQKIEKAFIDYISNYTLN
Consenso (301) K K FH Y C T K KIE ID I NYS
351                               400
U153 int (339) SRNVDEDELOSLN--EKLKTEHVKK--KR-----LFDLYISGSYEVS
lin1231 (342) KANISSKKLDNNLRKQEMIQKEIISLQKKREKFQKAWAADLMNDDEFSKL
Consenso (351) NI L E I E I KR DL F
401                               450
U153 int (378) ELDAMMADIDAQIN---YYEAQIEANEELKKNKKIQENLADLATVDFDSL
lin1231 (392) MIDTKMEIDAEDRKKEYDVSLFVSPEDIK----RNNILRELKINWTSL
Consenso (401) ID M A Y A A EDI K NI I F SL
451                               484
U153 int (425) EFREKQLYLKSLINKIYIDGEQVTIEWL-----
lin1231 (438) SPTEKTD FISM FIEGIEYVKDDENKAVITKISFL
Consenso (451) EK FI I I D I

```

Fig. 41.

L. innocua 0071.

```

1 50
PSA int (1) MKIKKLANGKYCVRLRIKVDGEWKEKRLTDTSETNLMYKASKLLKQVQHD
lin0071 (1) -MVKKVKGRRYEGSIEQRSKNSWRMRVTVGVDYKGTPIRADRTTRTKNER
Consenso (1) IKKL KY I K WK K KA K K N
51 100
PSA int (51) S-----SSLKAWNFEKIFYTLFMKTFKDGKSS-----Q
lin0071 (50) ERERELRNFITELEQNGYTAPARMTFKAFVENEYMPKHAQNNLEVKTWTE
Consenso (51) S L F L K F D
101 150
PSA int (78) STINLYDLAYNQFVDYFDEKIKLNSIDAVQYQQFINHLSVDYAISTVDTR
lin0071 (100) YYKSIVARAYPAFGGVQMDKITLHIVNLVAKLQKPGARLDVKPTDSDEK
Consenso (101) I AY F DK I L LD S D K
151 200
PSA int (128) HR-----K----IRAI FNKAVHLGYMKKNPTIGAHISGQDVAKNKA
lin0071 (150) KNKPLSPRSIRNIYFAINSVFETAVEWKVIPINPAEGVRLP--KTKRPP
Consenso (151) I AIF AV I NP G I K
201 250
PSA int (165) QFMETDKVHLLLEELAKFHSISRRAVIFLAVQTGMRFEI IALTKKDINFT
lin0071 (198) TIYTPAEIELLNAALVKEPLRLQVMIYIALISGCREAELAALVKKHVNLI
Consenso (201) I LL L K MIFIAL SG R EI AL K IN
251 300
PSA int (215) KRSITVKNKAWDYKYNTTFIDTKTKK--SRVIYIDNSTAQYLHSYLNWHT
lin0071 (248) EDELTFEQTLVAKAGEGLLLKESTKNDVAGIVSIPAWLTNLIETYISNEV
Consenso (251) IT K I S K A II I N I SYI
301 350
PSA int (262) DYMKEHAIAKNPLMLLFITYHNKPVDNASCNKALKKICSTINSEPVTLHKL
lin0071 (298) LDLKTEGKWANHKEFLFADMEGKPIRPDSIYQRWKRFLERHNLPIVIRFHD
Consenso (301) LK A LF KPI S KK N I H L
351 400
PSA int (312) RHTHTGLQVEAGMDIIYVADRLGHDDINTTLKYYSHLSSNLRQHNQSKVD
lin0071 (348) RHTSATLLLNKGRDIKI I QERLRHKSSVTTSNIYAHVLKDT HKDAASDFE
Consenso (351) RHT L L G DI I DRL H TT YAH L S D
401 424
PSA int (362) AFFTLKTDENTTNETT NATKTTE-
lin0071 (398) NPF-----
Consenso (401) F

```

Fig. 42.

L. innocua 1765.

		1		50
PSA int	(1)	-----MKIKKLANGKVCVRLRIKVDGEWKEK-----	LTDT	S
lin1765	(1)	MAKNKWQPTKHLGIYEYMTKKGKRYGIRVRYKQGN DYPEINKSGFETIAA		
Consenso	(1)		KY IRLR K DW E	T A
		51		100
PSA int	(33)	ETNLMYKASKLLKQVQHDSSSLKEWNFKFYTLFMKTFKDGKSSQSTINL		
lin1765	(51)	AKVYKNNIENLKANKKEYVFTNEKLTNTWTFASYMEMFKKKNKSKDTIAN		
Consenso	(51)		L N S FF FM FK S TI	
		101		150
PSA int	(83)	YDLAYNQFVDYFDEKIKLNSIDAVQYQQFINHLSVD-YAISTVDTRHRKI		
lin1765	(101)	KYSIYNNHLEIPFGNYLTDISLDIYEDFLREKIKNGYANNSVKAMHKLM		
Consenso	(101)		YNN LD L I Y FI YA SV HK I	
		151		200
PSA int	(132)	RAIFNKAVHLGYMKKN-PTIGAHISGQDVAKNKAQFMETDKVHLLLEELA		
lin1765	(151)	KSILNAAVRYEKLKRNRLQFAEIEQLEENEVIELKVLETDEFNVFISACR		
Consenso	(151)		KAI N AV L KN A D LETD L I	
		201		250
PSA int	(181)	KFHSISRAVIFLAVQTGMRFEIIALTKKDINFTRKSITVKNANDYKYTN		
lin1765	(201)	AFFTKYDFTMIYLAVWGMRRGEVGMVKLKNLTFDDAKQQVRITLDSTRTL		
Consenso	(201)		F S T GMR EIAL K I F V D T	
		251		300
PSA int	(231)	TFIDTKTKKS---R-VIYIDNSTAQYLSYLNWHTDYMKEH--AIKNPLM		
lin1765	(251)	RTPEGKGTPTAGRRILLIDGEGYRLKYSVEKAVSIKDHGSVLHQDDF		
Consenso	(251)		D K KS R II ID L L KDH I N	
		301		350
PSA int	(275)	LLFITYHNKPVDNASCNKALKKICSTINSEPVTLHKLRHTHTGLCVEAGM		
lin1765	(301)	IFRNPTSNRPWAVTRMNDLLRKLEKEYDIK-VYPHLLRHNFNTQALLAGA		
Consenso	(301)		I NKP J LKKI V H LRH L AG	
		351		400
PSA int	(325)	DIIYVADRLGHDDINTTLKYYSHLSSNLRQHNQSKVDAFFTLKTDENTTN		
lin1765	(350)	NSNDRKFIGHKNS-SMTDHYSHATDEGREK-----LMNTMKDRLSGI-		
Consenso	(351)		L IGH S HYSH S R TLK	
		401		411
PSA int	(375)	FTTNATKTTE-		
lin1765	(392)	-----		
Consenso	(401)			

Fig. 43.

L. innocua 2601.

		1	50
PSA .int	(1)	MKIKKLANGKYCVRLRIKVDGEWKEKRLTDTSETNLMYKASKLLKQVQHD	
lin2601	(1)	MKIKKMKNGKYTVRLRIKVDGEWKEKRLTDTSETNLMYKASKLLKQVEHD	
Consenso	(1)	MKIKKL NGKY VRLRIKVDGEWKEKRLTDTSETNLMYKASKLLKQV HD	
		51	100
PSA .int	(51)	SSSLKEWNFEKIFYTLFMKTFKDGKSSQSTINLYDLAYNQFVDYFDEKIKL	
lin2601	(51)	SNSLKEWNFEKIFYSLFMKTFKDKSSQSTINLYDLAYNQFVNYFDEKIKL	
Consenso	(51)	S SLKEWNFEKIFYSLFMKTFKD KSSQSTINLYDLAYNQFV YFDEKIKL	
		101	150
PSA .int	(101)	NSIDAVQYQQFINHLSDYAISTVDTRHRKIRAI FNKAVHLGYMKKNPTI	
lin2601	(101)	NSIDAVQYQQFINHLALDYAVATIDTRHRKIRAI FNKAVHLGYMKKNPAL	
Consenso	(101)	NSIDAVQYQQFINHLALDYAIATIDTRHRKIRAI FNKAVHLGYMKKNP I	
		151	200
PSA .int	(151)	GAHISGQDVAKNKAQFMETDKVHLLLEELAKHSISR AVIFLAVQTGMRF	
lin2601	(151)	GAHISGHDIATKAQYLETDKVHLLLEELAKHSISR AVIFLAVQTGMRF	
Consenso	(151)	GAHISG DIAK KAQFLETDKVHLLLEELAK HSISR AVIFLAVQTGMRF	
		201	250
PSA .int	(201)	EEIIALTKKDINF TKRSITVNKAWDYKYTNTFIDTKTKSRVIYIDNSTA	
lin2601	(201)	EEIIALTKKDINF TKRSISVNKAWDYKYTNTFTDTTKTKSRVIYIDNSTV	
Consenso	(201)	EEIIALTKKDINF TKRSISVNKAWDYKYTNTF DTKTKSRVIYIDNST	
		251	300
PSA .int	(251)	QYLHSYLNWHTDYMKEHAIKNPLMLLFITYHNKPVDNASCNKALKKICST	
lin2601	(251)	QYLQSYLAWHADYMKEHAIENPVMLLFITYHNKPVDNASCNKALKKICTT	
Consenso	(251)	QYL SYL WH DYMKEHAI NPLMLLFITYHNKPVDNASCNKALKKICST	
		301	350
PSA .int	(301)	INSEPVTLHKL RHHTGLCVEAGMDIIYVADRLGHDDINTTLKYYSHLSS	
lin2601	(301)	INSEPVTLHKL RHHTGLCVEAGMDIIYVADRLGHDDINTTLKYYSHLSS	
Consenso	(301)	INSE VTLHKL RHHTGLCVEAGMDIIYVADRLGHDDINTTLKYYSHLSS	
		351	385
PSA .int	(351)	NLRQHNQSKVD AFFTLKTDENTTNFTTNATKTTE-	
lin2601	(351)	NLRQHNQSKVD AFFTLKTDENTTKFATNATKTTE-	
Consenso	(351)	NLRQ NQSKVD AFFTLKTDENTT F TNATKTTE	

Fig. 44.

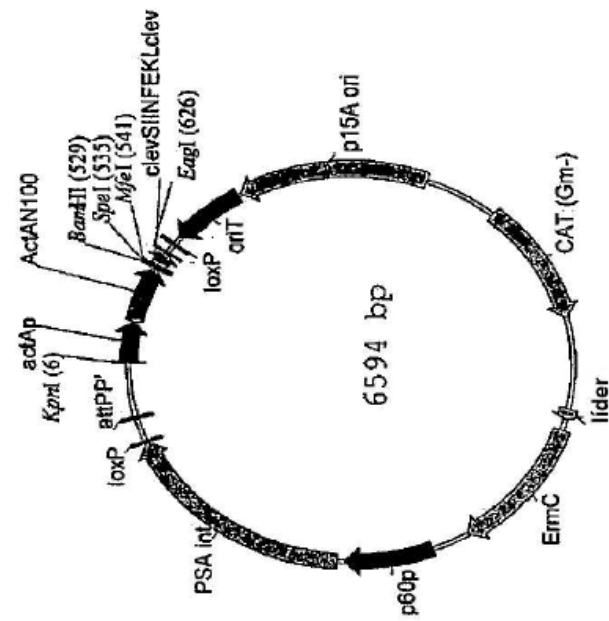
L.monocytogenes f6854.

```

1
PSA int (1) -MKIKKLANGKYCVRLRIKVDGEWK-----EKRLTDTSETNLMYKASKLL 50
lmof6854_2703 (1) MASYVNLGNKKYELRVSKGYDARGKQIRKTKNVTVKTKALKLELSNFEA
Consenso (1) LAN KY LRL DA K T L A
51
PSA int (45) KQVQHDSSSLKEWNEKEFYTLFMKTFKDGKSSQSTINLYDLAYNQFVDYF 100
lmof6854_2703 (51) YVYSSDYTEIKDMRFIDFVEKWRLNYAKRELKGNTIDKYNLFLENWIIPY
Consenso (51) D S IKD F DF F F TI Y L NFI F
101
PSA int (95) DEKIKLNSIDAVQYQQFINHLS-VDYAISTVDTRHRKIRAI FNKAVHLGY 150
lmof6854_2703 (101) FERKKISKITTMQLLDYFHEVQKKGVGPSALEGHRVIRSLFKYATLWGI
Consenso (101) EK KI I MQ F L A S LD HR IRAIF A G
151
PSA int (144) MKKNPTIGAHISGQDVAKNKAQFMETDKVHLLLEELAKFHSISRIVFLA 200
lmof6854_2703 (151) TETDVSLSVKKPTYKVFE--KNIYNRREIEVLIDRIKILQKYQQVMIKLA
Consenso (151) SI V N I LLID I MI LA
201
PSA int (194) VQTGMRFEIIALTKKDINF TKRSITV NKAWDYKYTN--TFIDTKTKKSR 250
lmof6854_2703 (199) LYCGLRRGEVIGLTTKDMNYNKNTIN VYRAVIKSASEGIKLD ETKNKRKR
Consenso (201) L GLR EIIALT KDINF K SI V KA S DTK KK R
251
PSA int (242) VIYIDNSTAQYLHSYLNWHTDYMKEHAIKNP-----LMLLFITYHN 300
lmof6854_2703 (249) IVPAPAGLMQEIKELAKEKQKNKDKLGLLWKGT KDLDGKT VVLI FSHDDG
Consenso (251) II Q I AI LMLIF
301
PSA int (283) KPVDNASCNKALKKKICSTINS--E-PVTLHKL RHTHTGLCVEAGMDIIYV 350
lmof6854_2703 (299) TPFTPASVTRMFNRFLEKEENNDLTKISEHDLRHS AASFLEEQGINVKVI
Consenso (301) P AS K K IS H LRHS LE GI I I
351
PSA int (330) ADRLGHDDINTTLKYYSHLSSNLRQHNQSKVD AFFT LKTDENTTNETTNA 400
lmof6854_2703 (349) QNILGHS DIKVT LNTYAHITEDGYSEAAKTFDNFYKSSK-----
Consenso (351) LGH DI TL YAHIS D FF
401
PSA int (380) TKTTE-
lmof6854_2703 (388) -----
Consenso (401)

```

Fig. 45A

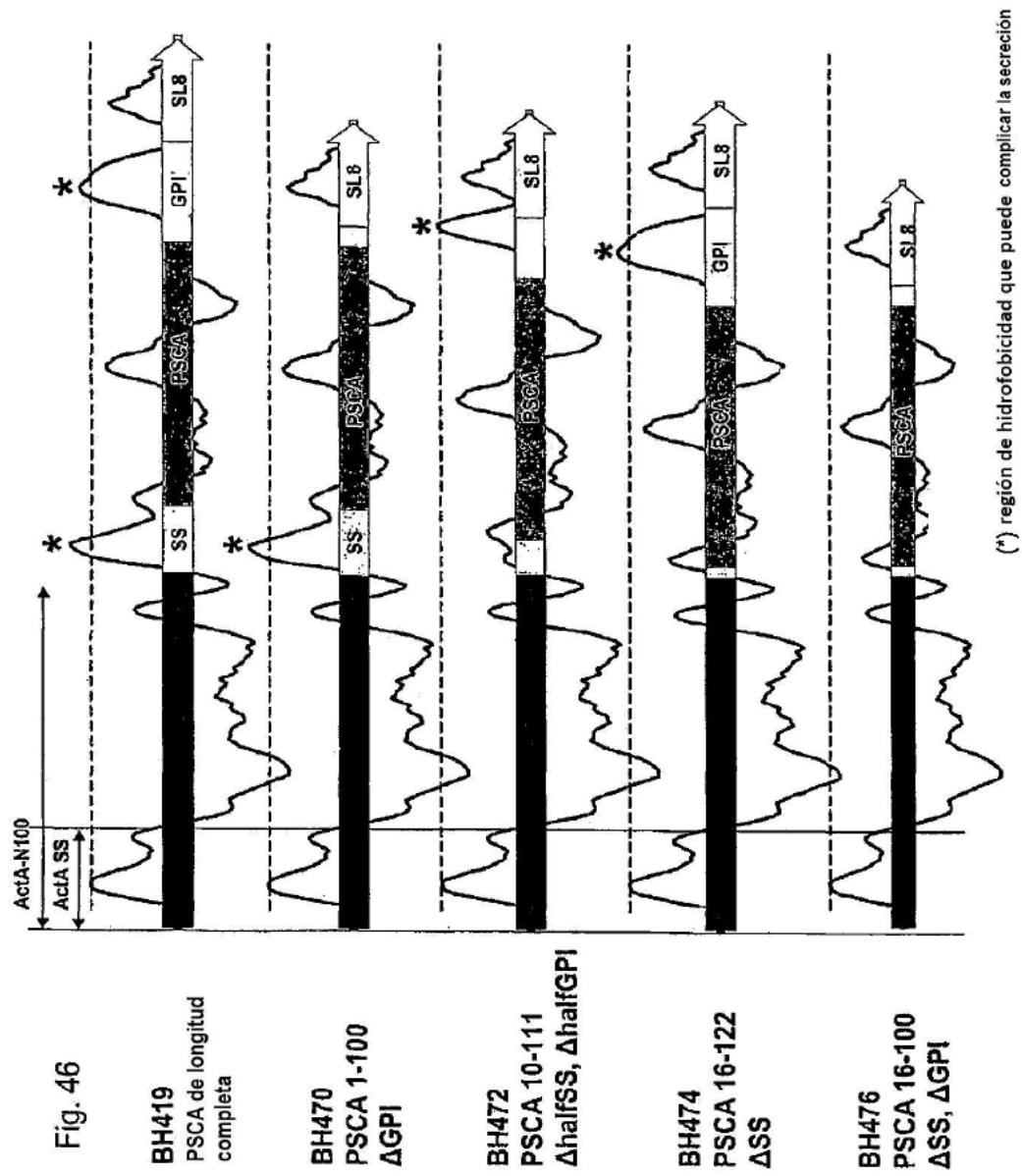


pINT-ActAN100-Bam-Spe-Mfe-SIINFEKL

Fig. 45B

		SpeI			

		BamHI	MfeI	BglII	
		-----	-----	-----	
	K A E K G S T S Q L A D L V L A K V L				
513	AAA GCA GAG AAA GGT GGA TCC ACT AGT CAA TTG GCA GAT CTT GTA TTA GCA AAA GTT TTA				
	←--- AC2AN100-----{ ---enlazador--{				
				BglII	EagI
				-----	-----
	Q L E S I I N F E K L A D L V A				
573	CAA TTA GAA AGT ATT ATT ATT TTT GAA AAA TTA GCA GAT CTT GTA GCA TAA GCG GCC GCC				



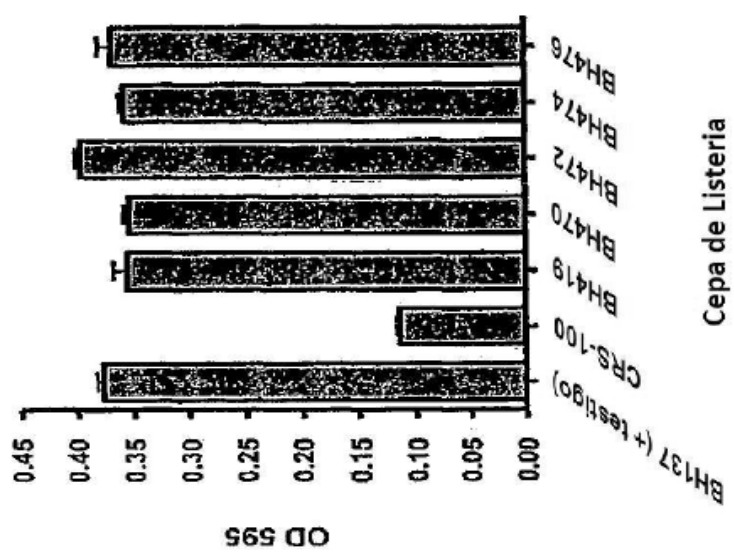


Fig. 47A

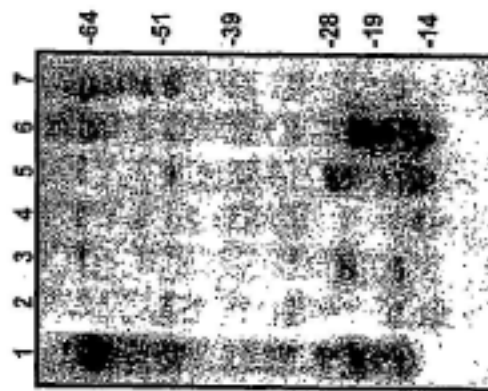


Fig. 47B

Fig. 48

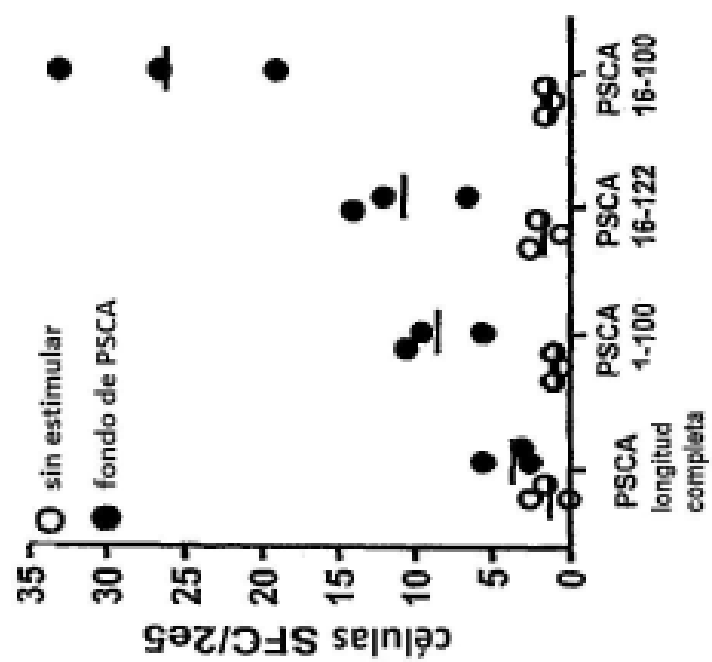
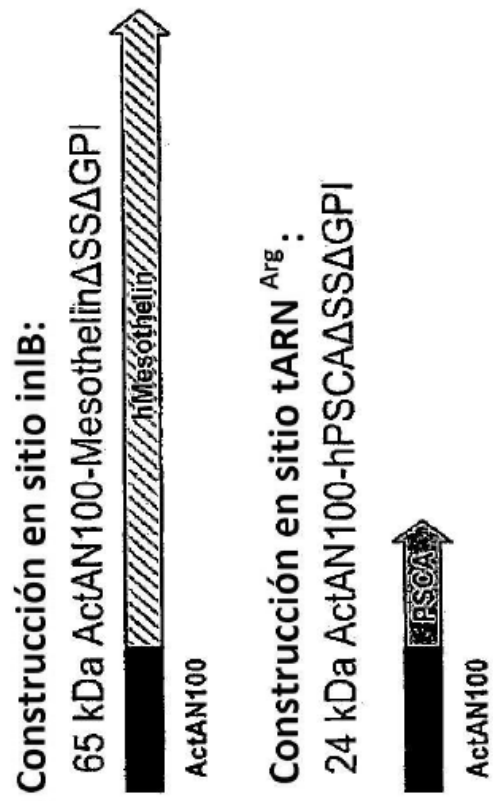


Fig. 49A



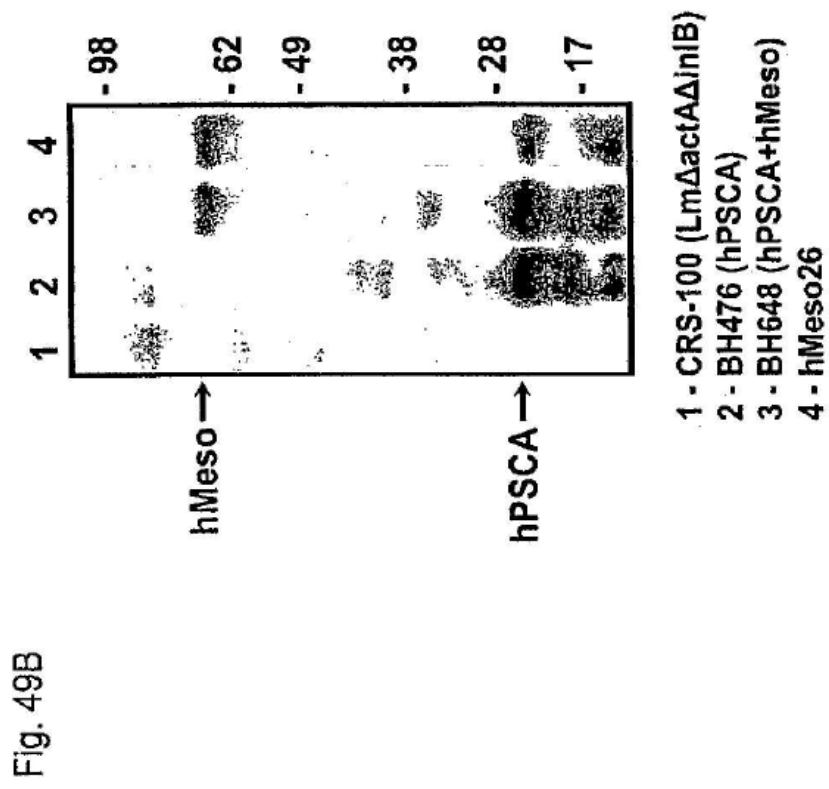


Fig. 50

