

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 543 079**

51 Int. Cl.:

C12N 15/68 (2006.01)
C12N 1/20 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)
C12N 15/65 (2006.01)
C12N 15/74 (2006.01)
A61K 35/74 (2015.01)
C12N 15/61 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.08.2005 E 05808671 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.05.2015 EP 1789559**

54 Título: **Métodos para construir vacunas sin resistencia antibiótica**

30 Prioridad:

13.08.2004 US 601492 P

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

14.08.2015

73 Titular/es:

**THE TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF
PENNSYLVANIA (100.0%)
3160 Chestnut Street, Suite 200
Philadelphia, Pennsylvania 19104-6283, US**

72 Inventor/es:

**PATERSON, YVONNE y
VERCH, THORSTEN**

74 Agente/Representante:

CAMPELLO ESTEBARANZ, Reyes

ES 2 543 079 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

Métodos para construir vacunas sin resistencia antibiótica.

- 5 Se proporcionan cepas vacunales de *Listeria* que expresan un antígeno heterólogo y una enzima metabólica, y métodos para generar las mismas.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

- 10 Las vacunas representan la medida de salud pública más rentable y beneficiosa conocida actualmente. Sin embargo, a medida que crece la comprensión de las enfermedades infecciosas y neoplasias, se ha hecho evidente que las estrategias vacunales tradicionales pueden no ser completamente eficaces. Las vacunas tradicionales han empleado organismos muertos o atenuados o subunidades de antígeno para provocar inmunidad en un animal. Un límite con estos enfoques, especialmente con vacunas muertas o subunidades, es que la respuesta inmune es
15 principalmente humoral en la naturaleza y, por lo tanto, no es eficaz en la lucha contra el organismo intracelular o tumores que requieren inmunidad mediada por células para su destrucción. De forma análoga, las bacterias atenuadas o inactivadas a menudo solamente inducen inmunización durante un período corto de tiempo y la inmunidad se limita a una respuesta humoral. Adicionalmente, las vacunas bacterianas atenuadas o inactivadas tradicionales no provocan la respuesta inmune a los linfocitos T citotóxicos (CTL) necesaria para la lisis de las
20 células tumorales y células infectadas con patógenos intracelulares.

- Las vacunas víricas se usan a menudo para inducir una respuesta CTL en un vacunado. Las vacunas víricas son normalmente virus patógenos atenuados por un pase seriado en un cultivo celular o virus muertos mediante calor o inactivación química. Los virus muertos son incapaces de infectar las células y, por lo tanto, como vacunas de
25 subunidades, principalmente provocan una respuesta inmune humoral. Los virus atenuados son capaces de infectar las células y pueden inducir una respuesta CTL en un individuo. Sin embargo, las vacunas víricas atenuadas no están libres de inconvenientes. En primer lugar, la atenuación de un virus a menudo es un proceso de ensayo y error. En segundo lugar, hay un grave problema de seguridad en el uso de virus atenuados, especialmente en los niños, los ancianos y los inmuno-comprometidos. Existe una solución a los problemas de las vacunas bacterianas y
30 víricas tradicionales con los vectores de vacunas bacterianas, tales como *Listeria monocytogenes* (LM). LM es un microbio intracelular facultativo gram positivo beta hemolítico.

- Actualmente se usan tres métodos para expresar un antígeno heterólogo en *Listeria monocytogenes*, e incluyen sistemas de expresión basados en plásmidos y sistemas de expresión de cromosomas. Se describe un método
35 basado en un cromosoma en Frankel y col. (1995, J. Immunol. 155: 4775-4782) y Mata y col. (2001, Vaccine 19: 1435-1445). En resumen, se pone un gen que codifica el antígeno de interés, junto con un promotor adecuado y la secuencia de la señal, entre dos regiones de ADN homólogas a una región del cromosoma de *Listeria*. Esta recombinación homóloga permite la integración específica del antígeno en el cromosoma de *Listeria*. El cassette que comprende el antígeno y el ADN homólogo está ligado a un plásmido sensible a la temperatura incapaz de
40 replicarse a temperaturas superiores a 40 °C. El plásmido comprende adicionalmente marcadores de resistencia a fármacos para fines de selección y mantenimiento de plásmido. La manipulación y la replicación de este plásmido tiene lugar generalmente en *E. coli*, debido a su rápida replicación y facilidad de transformación, en comparación con la *Listeria*. Puesto que la *Listeria* es un organismo gram positivo y *E. coli* es un organismo gram negativo, los genes resistentes a fármacos pueden ser específicos para cada categoría de organismo, o puede haber dos copias del
45 mismo gen resistente a fármacos eficaces en ambos tipos de organismo, pero bajo el control de promotores gram positivos y gram negativos separados. Después del montaje, el plásmido se transforma en LM por conjugación directa con *E. coli* que comprende el plásmido, o por lisis y aislamiento del plásmido de *E. coli*, seguido de electroporación de LM competente.

- 50 Con el fin de integrar el plásmido en la región deseada del cromosoma de *Listeria*, se sigue el método de intercambio alélico de dos etapas de Camilli y col. (1992, Mol. Microbiol. 8: 143-157). En resumen, la *Listeria* se pasa a más de 40°C para evitar la replicación plasmídica. La integración del plásmido en el cromosoma de *Listeria* se selecciona por el crecimiento a 40 °C en presencia de un fármaco de selección, por ejemplo cloranfenicol. Después de la selección de transformantes, las bacterias se pasan a 30°C y se seleccionan para comprobar la sensibilidad al
55 fármaco para detectar la *Listeria* en la que se ha producido la excisión de secuencias de vectores extraños. La desventaja de este método es que el método de intercambio alélico doble es lento y requiere la selección de muchos clones para llegar a una cepa de vacuna adecuada. Se describe un segundo método cromosómico de producción de cepas de *Listeria* que comprende un antígeno heterólogo por Lauer y col. (2002, J. Bacteriol. 184: 4177-4186). Este método no requiere intercambio alélico, pero en cambio requiere dos vectores de integración basados en fago. Este

método utiliza uno o dos genes de resistencia a fármacos, dando como resultado un organismo de *Listeria* que comprende resistencia a uno o más fármacos. La desventaja de los métodos de Lauer y col. es la presencia de genes de resistencia a fármacos, que no son considerados seguros debido a la preocupación sobre la propagación de la resistencia antibiótica a microorganismos previamente susceptibles a la terapia antibiótica. Por lo tanto, la presencia de genes de resistencia a los antibióticos en un vector vacunal se considera una obligación desde una perspectiva de seguridad.

Un tercer método de expresión del antígeno extraño en *Listeria* es expresar el antígeno episomalmente de un plásmido. Este método se describe en Ikonomidis y col. (1994 J. Exp. Med. 180: 2209-2218) y Gunn y col. (2001, J Immunol 167: 6471-6479). Este método tiene la ventaja de que el gen no tiene que integrarse en el cromosoma y puede expresarse en múltiples copias, lo que puede mejorar la inmunogenicidad. Sin embargo, con el fin de seleccionar los transformantes plasmídicos y asegurar la retención del plásmido durante la propagación *in vitro* es necesario incluir dos genes de resistencia a fármacos en el plásmido, uno para la construcción del plásmido en *E. coli* y uno para la propagación de la *Listeria monocytogenes* transformadas.

Pilgrim S y col.: Bactofection of mammalian cells by *Listeria monocytogenes*: improvement and mechanism of DNA delivery., gene therapy (2003), vol. 10, Nº 24, páginas 2036-2045, desvela la construcción de un sistema letal equilibrado para la bactofección de células mamíferas.

Thompson RJ y col.: Pathogenicity and immunogenicity of a *Listeria monocytogenes* strain that requires D-alanine for growth., Infection and Immunity (1998), vol. 66, Nº 8, páginas 3552-3561, desvela *L. monocytogenes* que comprenden mutaciones en el gen alanina racemasa y el gen D-aminoácido transferasa.

Por lo tanto, dados los usos demostrados de *Listeria* como un vector vacunal, son necesarios en el campo métodos para construir vectores vacunales de *Listeria* sin resistencia antibiótica, aún capaces de provocar una fuerte respuesta inmune.

BREVE RESUMEN DE LA INVENCION

Se proporcionan cepas vacunales de *Listeria* que expresan un antígeno heterólogo y una enzima metabólica, y métodos para generar las mismas.

Se proporciona un método de diseño de una cepa vacunal de *Listeria* para expresar un antígeno heterólogo, comprendiendo el procedimiento poner en contacto una cepa auxótrofa de *Listeria* con un plásmido, comprendiendo el plásmido una primera secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido que comprende el antígeno heterólogo, y comprendiendo adicionalmente el plásmido una segunda secuencia de ácido nucleico que codifica una enzima metabólica, en el que la cepa auxótrofa de *Listeria* absorbe el plásmido, y en el que la enzima metabólica complementa una deficiencia metabólica de la cepa auxótrofa de *Listeria*, diseñando de este modo una cepa vacunal de *Listeria* para expresar un antígeno heterólogo.

Se proporciona una cepa vacunal de *Listeria*, que comprende un plásmido, en la que el plásmido comprende una primera secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido, en la que el polipéptido comprende un antígeno de proteína, y el plásmido comprende adicionalmente una segunda secuencia de ácido nucleico que codifica una enzima metabólica, por lo que la enzima metabólica complementa un gen metabólico endógeno que carece de un cromosoma de la cepa vacunal de *Listeria*, y por lo que el plásmido se mantiene de forma estable en la cepa vacunal de *Listeria* en ausencia de una selección antibiótica.

Se proporciona un método de diseño de una cepa vacunal de *Listeria* para expresar un antígeno heterólogo, comprendiendo el método poner en contacto una cepa auxótrofa de *Listeria* con una construcción de ácido nucleico, comprendiendo la construcción de ácido nucleico una primera secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido que comprende el antígeno heterólogo, y comprendiendo adicionalmente la construcción de ácido nucleico una segunda secuencia de ácido nucleico que codifica una enzima metabólica, por lo que la construcción de ácido nucleico se incorpora en un genoma de la cepa auxótrofa de *Listeria*, y por lo que la enzima metabólica complementa una deficiencia metabólica de la cepa auxótrofa de *Listeria*, diseñando de este modo una cepa vacunal de *Listeria* para expresar un antígeno heterólogo.

BREVE DESCRIPCION DE LOS DIBUJOS

La figura 1 es un mapa esquemático de plásmidos lanzadera de *E. coli-Listeria* pGG55 (lado izquierdo) y

pTV3 (lado derecho). CAT(-):cloranfenicol transferasa de *E. coli*; CAT(+): cloranfenicol transferasa de *Listeria*; Ori Lm: origen de replicación para *Listeria*; Ori Ec: origen de replicación de p15 para *E. coli*, prfA: Factor de regulación de la patogenicidad A de *Listeria*, LLO: Listeriolisina O truncada en el extremo C que incluye su promotor; E7: HPV E7; p60-dal; cassette de expresión del promotor p60 y gel dal de *Listeria*.

5

También se representan los sitios de restricción seleccionados.
Figura 2: Preparación de plásmidos de pTV3 de la cepa *E. coli* MB2159. Se realizó una preparación Midi de Qiagen® de ácidos nucleicos siguiendo el protocolo del fabricante. Carriles de izquierda a derecha: Carriles 1 y 7: Marcador del peso molecular, escalera de 100 pb (Invitrogen). Carril 2: pTV3, clon N° 15. Carril 3: pTV3, clon N° 16. Carril 4: pTV3C, clon N° 22. Carril 5: pTV3C, clon N° 24. Carril 6: control de pGG55.

10

Figura 3. Mantenimiento del plásmido *in vitro* (A) y *in vivo* (B). Para determinar la estabilidad *in vitro*, las cepas se cultivaron con (GG55-Chl) y sin (GG55-no Chl) cloranfenicol (LM-LLO-E7) o con y sin D-alanina [Lmdd(pTV3)]. Los cultivos se diluyeron 1:1000 diariamente LB recién fresco. Las UFC de los cultivos se determinaron diariamente en BHI (BHI) y en BHI con cloranfenicol (BHI-Chl) para LM-LLO-E7 o en BHI con D-alanina (BHI-Ala) para Lmdd(pTV3). Todo el medio líquido y las placas contenían 50 µg más estreptomycin por ml, a la cepa de *Listeria monocytogenes* 10403S es resistente de forma natural. Para determinar el mantenimiento el plásmido *in vivo*, se inyectó por vía intraperitoneal LM a una dosis de 1/10 la DL50 en 50 ratones C57BL/6. Los bazo se cosecharon en diferentes puntos temporales post-inyección y se homogeneizaron en solución salina tamponada con fosfato (PBS). Los recuentos UFC se prepararon en placas BHI con y sin D-alanina para Lmdd(pTV3), en placas BHI con y sin cloranfenicol para LM-LLO-E7, y en placas BHI únicamente para 10403S de tipo salvaje.

15

20

La figura 4 representa el crecimiento en placas de Luria-Bertoni (LB) agar de la cepa de *E. coli* MB2159 (racemato de alanina negativo) transformada con el vector pTV3. Las bacterias se pusieron en placas sobre diferentes medios. Izquierda superior: agar en solitario. MB2159-TV3 crece. Derecha superior: agar con alanina. MB2159-TV3 crece. Izquierda inferior: agar con cloranfenicol. MB2159-TV3 no crece porque falta el gen CAT. Derecha inferior: agar con cloranfenicol y alanina. MB2159-TV3 no crece porque falta el gen CAT. La figura 5 representa el crecimiento en placas de LB agar de la cepa de *E. coli* MB2159 (racemato de alanina negativo) sin el vector pTV3. Se disponen placas de agar como en la figura 5. Izquierda superior: MB2159 no crece. Derecha superior: agar con alanina. MB2159 crece. Izquierda inferior: agar con cloranfenicol. MB2159 no crece. Derecha inferior. MB2159 no crece.

25

30

La figura 6 representa el crecimiento en placas de LB-agar de la cepa de LM Lmdd(-) transformada con el vector pTV3. Las bacterias se pusieron en placas en diferentes medios: Superior: agar con estreptomycin, sin alanina añadida. Lmdd-pTV3 crece (la cepa huésped 10403s es resistente a estreptomycin). Izquierda inferior (agar con cloranfenicol) y derecha inferior (agar con cloranfenicol y alanina): Lmdd-pTV3 no crece porque el gen CAT no está presente en pTV3.

35

La figura 7 representa el crecimiento en placa de LB-agar de la cepa de LM Lmdd(-) sin el vector pTV3. Izquierda superior: agar con estreptomycin. Lmdd (-) no puede crecer en ausencia de d-alanina. Derecha superior: agar con alanina. Lmdd (-) crece. Izquierda inferior (agar con cloranfenicol y alanina) y derecha inferior (agar con cloranfenicol): Lmdd(-) es sensible al cloranfenicol y no crece.

40

La figura 8 representa el crecimiento bacteriano según se mide por densidad óptica (600 nanómetros [nm]) representada frente al tiempo. +Ala: El medio contiene D-alanina; +Chl: el medio contiene cloranfenicol.

La figura 9 representa la regresión tumoral en respuesta a la administración de cepas vacunales de LM (A). Los círculos representan ratones sin tratar, los triángulos invertidos representan ratones a los que se les administró Lmdd-TV3, y las cruces representan ratones a los que se les administró Lm-LLOE7.

45 DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención proporciona cepas vacunales de *Listeria* que expresan un antígeno heterólogo y una enzima metabólica, y métodos para generar las mismas.

50

Se proporciona un método de diseño de una cepa vacunal de *Listeria* para expresar un antígeno heterólogo, comprendiendo el método poner en contacto una cepa auxótrofa de *Listeria* con un plásmido, comprendiendo el plásmido una primera secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido que comprende el antígeno heterólogo, y comprendiendo adicionalmente el plásmido una segunda secuencia de ácido nucleico que codifica una enzima metabólica, por lo que la cepa auxótrofa de *Listeria* absorbe el plásmido, y por lo que la enzima metabólica

55

complementa una deficiencia metabólica de la cepa auxótrofa de *Listeria*, diseñando de este modo una cepa vacunal de *Listeria* para expresar un antígeno heterólogo.

Se proporciona un método de diseño de una cepa vacunal de *Listeria* para expresar un antígeno heterólogo, comprendiendo el método transformar una cepa auxótrofa de *Listeria* con un plásmido que comprende un primer

ácido nucleico que codifica el antígeno heterólogo y un segundo ácido nucleico que codifica una enzima metabólica, por lo que la enzima metabólica complementa una deficiencia metabólica de la cepa auxótrofa de *Listeria*, diseñando de este modo una cepa vacunal de *Listeria* para expresar un antígeno heterólogo.

- 5 "Transformar", se usa de forma idéntica con el término "transfectar", y se refiere a diseñar una célula bacteriana para absorber un plásmido u otra molécula de ADN heteróloga. Como alternativa, "transformar" se refiere a diseñar una célula bacteriana para expresar un gen de un plásmido u otra molécula de ADN heteróloga. Cada posibilidad representa una realización separada de la presente invención.
- 10 Como se demuestra por los datos proporcionados en el presente documento, un vector vacunal bacteriano que comprende un plásmido que expresa un antígeno induce una respuesta inmune más fuerte que una proteína de fusión que comprende un antígeno expresado a partir del cromosoma bacteriano. Por lo tanto, se proporciona un vector vacunal bacteriano que expresa un antígeno de proteína y carece de genes resistentes a antibióticos.
- 15 El plásmido de métodos y composiciones puede comprender adicionalmente un factor de transcripción. El factor de transcripción puede carecer en la cepa auxótrofa de *Listeria* o en el cromosoma bacteriano de una celda de *Listeria*. El factor de transcripción puede ser *prfA* (Ejemplos en el presente documento). El factor de transcripción puede ser cualquier otro factor de transcripción conocido en la técnica.
- 20 El gen metabólico, el factor de transcripción, etc. pueden carecer en un cromosoma de la cepa bacteriana. El gen metabólico, el factor de transcripción, etc. pueden carecer en todos los cromosomas de la cepa bacteriana. El gen metabólico, el factor de transcripción, etc. pueden carecer en el genoma de la cepa bacteriana.
- El factor de transcripción puede mutarse en el cromosoma. El factor de transcripción puede borrarse del cromosoma.
- 25 El factor de transcripción puede mutarse en el cromosoma. El factor de transcripción puede borrarse del cromosoma.
- El plásmido de los métodos y composiciones puede no conferir resistencia antibiótica a la cepa vacunal de *Listeria*. El plásmido puede no contener un gen de resistencia a antibióticos.
- 30 Un polipéptido codificado por una secuencia de ácido nucleico del mismo puede ser una proteína de fusión que comprende el antígeno heterólogo y un polipéptido adicional. El polipéptido adicional puede ser un fragmento no hemolítico de una proteína LLO (Ejemplos en el presente documento). En otra realización, el polipéptido adicional es una secuencia PEST. El polipéptido adicional puede ser una proteína ActA o un fragmento de la misma. Las
- 35 proteínas ActA y fragmentos de las mismas aumentan la presentación de antígeno y la inmunidad de manera similar a LLO.
- La primera secuencia de ácido nucleico de los métodos y composiciones puede estar unida operativamente a una secuencia promotora/reguladora. La segunda secuencia de ácido nucleico puede unirse operativamente a una
- 40 secuencia promotora/reguladora. Cada una de las secuencias de ácido nucleico puede unirse operativamente a una secuencia promotora/reguladora.
- La secuencia promotora/reguladora de la segunda secuencia de ácido nucleico puede funcionar en *E. coli*, permitiendo de esta manera un mantenimiento estable del plásmido en la cepa de *E. coli*. La segunda secuencia de
- 45 ácido nucleico puede expresarse en una cepa de *E. coli* tras transfectar la cepa de *E. coli* con un plásmido de la presente invención, permitiendo así un mantenimiento estable del plásmido en la cepa de *E. coli*.
- Una enzima metabólica codificada por una secuencia de ácidos nucleicos de la misma puede ser una enzima metabólica aminoacídica. La enzima metabólica es una enzima alanina racemasa (*dal*). La enzima metabólica puede
- 50 ser una enzima D-aminoácido transferasa (*dat*). Los genes *dal* y *dat* de LM se clonaron y se aislaron de LM como se describe en Thompson y col. (*Infect Immun* 66: 3552-3561, 1998).
- Un gen *dal* utilizado puede tener la secuencia expuesta en el Número de Acceso al GenBank AF038438. El gen *dal* puede ser cualquier otro gen *dal* conocido en la técnica.
- 55 Un gen *dat* utilizado puede tener la secuencia expuesta en el Número de Acceso al GenBank AF038439. El gen *dat* puede ser cualquier otro gen *dat* conocido en la técnica.
- Se conocen en la técnica bien bacterias auxótrofas para la síntesis de D-alanina, y se describen en, por ejemplo, E.

coli, (Strych y col., 2002, J. Bacteriol. 184: 4321-4325), *Corynebacterium glutamicum* (Tauch y col., 2002, J. Biotechnol 99: 79-91), y *Listeria monocytogenes* (Frankel y col., Patente de Estados Unidos 6.099.848)), especies de *Lactococcus* y especies de *Lactobacillus* (Bron y col., 2002, Appl Environ Microbiol, 68: 5663-70).

- 5 Se proporciona una cepa vacunal de *Listeria*, que comprende un plásmido, en la que el plásmido comprende una primera secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido, en la que el polipéptido comprende un antígeno de proteína, y el plásmido comprende adicionalmente una segunda secuencia de ácido nucleico que codifica una enzima metabólica, por lo que la enzima metabólica complementa un gen metabólico endógeno que carece de un cromosoma de la cepa vacunal de *Listeria*, y por lo que el plásmido se mantiene de forma estable en la cepa vacunal
10 de *Listeria* en ausencia de una selección antibiótica.

El gen metabólico endógeno puede mutarse en el cromosoma. El gen metabólico endógeno puede eliminarse del cromosoma.

- 15 Se proporciona el diseño de una cepa vacunal de *Listeria* para expresar un antígeno heterólogo, comprendiendo los métodos poner en contacto una cepa auxótrofa de *Listeria* con una construcción de ácido nucleico, comprendiendo la construcción de ácido nucleico una primera secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido que comprende el antígeno heterólogo, y comprendiendo adicionalmente la construcción de ácido nucleico una segunda secuencia de ácido nucleico que codifica una enzima metabólica, por lo que la construcción de ácido nucleico se
20 incorpora en un genoma, de la cepa auxótrofa de *Listeria*, y por lo que la enzima metabólica complementa una deficiencia metabólica de la cepa auxótrofa de *Listeria*, diseñando de este modo una cepa vacunal de *Listeria* para expresar un antígeno heterólogo.

- La construcción de ácido nucleico puede no contener una región de replicación de *Listeria*. Por lo tanto, únicamente se seleccionan *Listeria* que contienen una copia que esté integrada en el genoma tras el crecimiento en medio LB.
25 La construcción de ácido nucleico puede contener región de replicación de *Listeria*.

- La construcción de ácido nucleico puede contener un sitio de integración. El sitio puede ser un sitio de integración PSA attPP'. El sitio puede ser cualquier otro sitio de integración conocido en la técnica.
30

- La construcción de ácido nucleico puede contener un gen integrasa. El gen integrasa puede ser un gen PSA integrasa. El gen integrasa puede ser cualquier otro gen integrasa conocido en la técnica.

- El gen integrasa se expresa bajo el control del promotor p60 de *Listeria*. El gen integrasa puede expresarse bajo el control de cualquier otro promotor que funcione en *Listeria*.
35

- La construcción de ácido nucleico puede ser un plásmido. La construcción de ácido nucleico puede ser un plásmido lanzadera. La construcción de ácido nucleico puede ser cualquier otro tipo de construcción de ácido nucleico conocida en la técnica. Cada posibilidad representa una realización separada de la presente invención.
40

- La etapa de incorporar la construcción de ácido nucleico en el genoma de la cepa auxótrofa de *Listeria* puede utilizar intercambio alélico de dos etapas. La etapa de incorporación puede utilizar un vector de integración basado en fago. La etapa de incorporación puede utilizar cualquier otro método de integración conocido en la técnica.

- 45 La etapa de incorporación la construcción de ácido nucleico puede utilizar un sitio de integración de profago de la cepa auxótrofa de *Listeria*. La etapa de incorporación puede utilizarse en cualquier otro sitio de integración conocido en la técnica.

- Se proporciona un plásmido lanzadera de *Listeria monocytogenes-Escherichia coli* que se retiene por complementación de cepas mutantes deficientes en el gen metabólico tanto *in vitro* y *in vivo*. El gen metabólico puede ser un gen D-alanina racemasa. El gen metabólico puede ser cualquier otro gen metabólico conocido en la técnica.
50

- Se proporciona un método de atenuación de una cepa vacunal bacteriana, que comprende introducir en la cepa una mutación en un gen que codifica una enzima metabólica y transfectar la cepa con un plásmido que contiene una secuencia nucleotídica que codifica la enzima metabólica, atenuando así una cepa vacunal bacteriana.
55

Se proporciona un método de atenuación de una cepa vacunal de *Listeria*, que comprende introducir en la cepa una mutación en un gen que codifica una enzima metabólica y transfectar la cepa con un plásmido que contiene una

secuencia nucleotídica que codifica la enzima metabólica, atenuando así una cepa vacunal de enzima metabólica.

Un gen metabólico de los métodos y composiciones de la presente invención puede expresarse en un promotor inducible. El promotor puede ser un promotor constitutivo. El promotor puede ser cualquier otro tipo de promotor conocido en la técnica.

Se proporciona una cepa vacunal bacteriana construida por el método de la presente invención.

Se proporciona una cepa vacunal de *Listeria* construida por el método de la presente invención.

10

El antígeno de los métodos y composiciones de la presente invención puede incluir, pero sin limitación, antígenos de las siguientes enfermedades infecciosas, sarampión, paperas, rubéola, poliomielitis, hepatitis A, B (por ejemplo, N° de Acceso al GenBank E02707) y C (por ejemplo, N° de Acceso al GenBank E06890), así como otros virus de hepatitis, influenza, adenovirus (por ejemplo, tipos 4 y 7), rabia (por ejemplo, N° de Acceso al GenBank M34678), fiebre amarilla, encefalitis Japonesa (por ejemplo, N° de Acceso al GenBank E07883), dengue (por ejemplo, N° de Acceso al GenBank M24444), hantavirus, y SIDA (por ejemplo, N° de Acceso al GenBank U18552). Se obtendrán antígenos bacterianos y parásitos a partir de agentes causantes conocidos responsables de enfermedades que incluyen, pero sin limitación, difteria, tos ferina (por ejemplo, N° de Acceso al GenBank M35274), tétanos (por ejemplo, N° de Acceso al GenBank M64353), tuberculosis, pneumonías bacterianas y fúngicas (por ejemplo, Haemophilus influenzae, Pneumocystis carinii, etc.), cólera, fiebre tifoidea, peste, shigelosis, salmonelosis (por ejemplo, N° de Acceso al GenBank L03833), enfermedad del Legionario, enfermedad de Lyme (por ejemplo, N° de Acceso al GenBank U59487), malaria (por ejemplo, N° de Acceso al GenBank X53832), anquilostoma, oncocercosis (por ejemplo, N° de Acceso al GenBank M27807), esquistosomiasis (por ejemplo, N° de Acceso al GenBank L08198), tripanosomiasis, leishmaniasis, giardiasis (por ejemplo, N° de Acceso al GenBank M33641), amebiasis, filariasis (por ejemplo, N° de Acceso al GenBank J03266), borreliosis y triquinosis.

El antígeno puede ser uno de los siguientes antígenos tumorales: cualquiera de los diversos MAGE (Antígeno E Asociado a Melanoma, *Melanoma-Associated Antigen E*), incluyendo MAGE 1 (por ejemplo, N° de Acceso al GenBank M77481), MAGE 2 (por ejemplo, N° de Acceso al GenBank U03735), MAGE 3, MAGE 4, etc.; cualquiera de las diversas tirosinasas; ras mutante; p53 mutante (por ejemplo, N° de Acceso al GenBank X54156 y AA494311); y antígeno de melanoma p97 (por ejemplo, N° de Acceso al GenBank M12154). Otros antígenos específicos de tumor incluyen el péptido Ras y el péptido p53 asociados con cánceres avanzados, los antígenos HPV 16/18 y E6/E7 asociados a cánceres cervicales, el antígeno MUC 1-KLH asociado con carcinoma de mama (por ejemplo, N° de Acceso al GenBank J0365 1), CEA (antígeno carcinoembrionario) asociado a cáncer colorrectal (por ejemplo, N° de Acceso al GenBank X983 11), antígenos gp100 (por ejemplo, N° de Acceso al GenBank S73003) o MART1 asociados al melanoma, y el antígeno PSA asociado al cáncer de próstata (por ejemplo, N° de Acceso al GenBank X14810). La secuencia del gen p53 se conoce (véase, por ejemplo, Harris y col. (1986) Mol. Cell. Biol., 6: 4650-4656) y se deposita con el N° de Acceso al GenBank M14694. Los antígenos tumorales incluyen adicionalmente, pero sin limitación, Her-2/Neu (por ejemplo, N° de Acceso al GenBank M16789.1, M16790.1, M16791.1, M16792.1), NY-ESO-1 (por ejemplo, N° de Acceso al GenBank U87459), hTERT (aka telomerasa) (N° de Acceso al GenBank NM003219 (variante 1), NM198255 (variante 2), NM 198253 (variante 3), y NM 198254 (variante 4), proteinasa 3 (por ejemplo, N° de Acceso al GenBank M29142, M75154, M96839, X55668, NM 00277, M96628 y X56606) HPV E6 y E7 (por ejemplo, N° de Acceso al GenBank NC 001526) y WT-1 (por ejemplo, N° de Acceso al GenBank NM000378 (variante A), NM024424 (variante B), NM 024425 (variante C), y NM024426 (variante D)), Her-2/Neu (por ejemplo, N° de Acceso al GenBank M16789.1, M16790.1, M16791.1, M16792.1), NY-ESO-1 (por ejemplo, N° de Acceso al GenBank U87459), hTERT (aka telomerasa) (N° de Acceso al GenBank NM003219 (variante 1), NM198255 (variante 2), NM 198253 (variante 3), y NM 198254 (variante 4), proteinasa (por ejemplo, N° de Acceso al GenBank M29142, M75154, M96839, X55668, NM 00277, M96628 y X56606) HPV E6 y E7 (por ejemplo, N° de Acceso al GenBank NC 001526) y WT-1 (por ejemplo, N° de Acceso al GenBank NM000378 (variante A), NM024424 (variante B), NM 024425 (variante C), y NM024426 (variante D)). Por lo tanto, las cepas vacunales desveladas pueden usarse como inmunoterapéuticos para cánceres que incluyen, pero sin limitación, cáncer cervical, de mama, colorrectal, próstata, de pulmón y para melanomas.

Los vectores proporcionan los beneficios de un vector vacunal de *Listeria* sin el riesgo de aumentar la resistencia antibiótica en los organismos bacterianos.

Una ventaja de las cepas vacunales es que los plásmidos recombinantes contenidos en las mismas no suelen conservarse tras la transferencia potencial a otras bacterias en el intestino. La ventaja puede ser que los plásmidos no confieren una ventaja evolutiva en las células normales. La ventaja puede ser que los plásmidos no contengan

sistemas de retención activos, tales como secuencias de reparto. Por lo tanto, fuera de sus células huésped deficientes, los plásmidos se diluirán más probablemente fuera de la población y por último se eliminarán con el tiempo.

- 5 Se proporciona un kit que comprende una cepa bacteriana sin resistencia antibiótica, un vehículo farmacéuticamente aceptable, un aplicador, y un material didáctico para uso de los mismos.

Se proporciona un kit que comprende una cepa de *Listeria* sin resistencia antibiótica, un aplicador, y un material didáctico para uso de los mismos.

10

"Alanina racemasa" se refiere a una enzima que convierte el isómero L del aminoácido alanina en su isómero D. Dichas enzimas se conocen por el número EC 5.1.1.1.

- 15 "Enzima de metabolismo aminoacídico" se refiere a un péptido o proteína que tiene un papel funcional en la conversión de un aminoácido de una forma a otra, tal como, pero sin limitación, en la alteración de la estereoquímica del aminoácido, la hidrolización o la adición de grupos a un aminoácido, la escisión de aminoácidos, y similares.

La expresión "bacteria auxótrofa" se refiere a una cepa bacteriana que no es capaz de crecer o replicarse sin complementación de un factor que permitirá tal crecimiento o replicación.

20

"Proteína de fusión" se refiere a una proteína que comprende dos o más proteínas unidas juntas. Las proteínas pueden unirse a enlaces peptídicos. Las proteínas pueden unirse mediante otros enlaces químicos. Las proteínas pueden unirse mediante uno o más aminoácidos entre las dos o más proteínas, que pueden denominarse como un espaciador.

25

- 30 "Homólogo" se refiere a la similitud de secuencia de subunidad entre dos moléculas poliméricas, por ejemplo, entre dos moléculas de ácido nucleico, por ejemplo, dos moléculas de ADN o dos moléculas de ARN, o entre dos moléculas polipeptídicas. Cuando una posición de subunidad en ambas de las dos moléculas se ocupa por la misma unidad monomérica, por ejemplo, si una posición en cada una de dos moléculas de ADN se ocupa por adenina, entonces son homólogos en esa posición. La homología entre dos secuencias puede ser una función directa del número de posición correspondientes u homólogas, por ejemplo, si la mitad (por ejemplo, cinco posiciones en un polímero de diez subunidades de longitud) de las posiciones en dos secuencias de compuesto son homólogas, entonces las dos secuencias son homólogas al 50 %, si el 90 % de las posiciones, por ejemplo, 9 de 10, se corresponden o son homólogas, las dos secuencias comparten una homología del 90 %. A modo de ejemplo, las secuencias de ADN 3'ATTGCC5' y 3'TATGGC comparten homología al 50 %. "Homología" puede usarse como sinónimo de "identidad". Cuando los términos "homología" o "identidad" se usan en el presente documento para referirse a ácidos nucleicos y proteínas, deben interpretarse como aplicados a la homología o la identidad tanto a nivel de la secuencia de ácidos nucleicos como de la secuencia aminoacídica.

- 40 Los términos "gen" y "gen recombinante" se refieren a moléculas de ácidos nucleicos que comprenden un marco de lectura abierta que codifica un polipéptido. Dichas variaciones alélicas naturales pueden dar como resultado típicamente una varianza del 1-5% en la secuencia nucleotídica de un gen dado. Pueden identificarse alelos alternativos por secuenciación del gen de interés en varios individuos u organismos diferentes. Esto puede realizarse fácilmente usando sondas de hibridación para identificar el mismo locus genético en una diversidad de individuos u organismos.

45

La descripción de dos polinucleótidos como "unidos operativamente" significa que un resto de ácido nucleico de una única hebra o doble hebra comprende los dos polinucleótidos dispuestos en el resto de ácidos nucleicos de tal manera que al menos uno de los dos polinucleótidos sea capaz de ejercer un efecto fisiológico por el que se caracteriza sobre el otro. A modo de ejemplo, un promotor unido operativamente a la región codificante de un gen es capaz de promover la transcripción de la región codificante.

50

- "Secuencia promotora/reguladora" se refiere a una secuencia de ácidos nucleicos que se requiere para, o mejora, la expresión de un producto génico unido operativamente a la secuencia promotora/reguladora. Esta secuencia puede ser la secuencia promotora básico. Esta secuencia también puede incluir una secuencia de potenciador y otros elementos reguladores que se requieren para la expresión del producto génico.

55

I. Cepas Vacunales de Listeria

- La cepa de *Listeria* particular empleada será evidente para el experto en la técnica. Los ejemplos de cepas de *Listeria* que pueden emplearse incluyen *Listeria monocytogenes* (ATCC N° 15313). Las cepas de *Listeria* atenuadas, tales como el mutante delta-actA de LM (Brundage y col., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 90: 11890-11894), o delta-plcA de *L. monocytogenes* (Camilli y col., 1991, J. Exp. Med., 173: 751-754). Se construyen nuevas cepas de
- 5 *Listeria* atenuadas introduciendo una o más mutaciones de atenuación, como se entenderá por un experto en la técnica cuando cuenta con la divulgación en el presente documento. Los ejemplos de dichas cepas incluyen, pero sin limitación, cepas de *Listeria* auxótrofas para aminoácidos aromáticos (Alexander y col., 1993, Infection and Immunity 61: 2245-2248) y mutantes para la formación de ácidos lipoteicoico (Abachin y col., 2002, Mol. Microbiol. 43: 1-14).
- 10 El experto, cuando cuenta con la presente divulgación y los métodos en el presente documento; entenderá fácilmente que pueden usarse con éxito diferentes promotores de transcripción, terminadores, vectores vehículo o secuencias génicas específicas (por ejemplo, aquellos en los vectores de clonación disponibles en el mercado). Como se contempla, estas funcionalidades se proporcionan, por ejemplo, en los vectores disponibles en el mercado
- 15 conocidos como la serie pUC. Pueden eliminarse secuencias de ADN no esenciales (por ejemplo, genes resistentes a antibióticos).
- En otra realización, se usa un plásmido disponible en el mercado en la presente invención. Dichos plásmidos están disponibles a partir de diversas fuentes, por ejemplo, Invitrogen (La Jolla, CA), Stratagene (La Jolla, CA), Clontech
- 20 (Palo Alto, CA), o pueden construirse usando métodos bien conocidos en la técnica. Otra realización es un plásmido, tal como pCR2.1 (Invitrogen, La Jolla, CA), que es un vector de expresión procariota con un origen procariota de replicación y elementos promotores/reguladores para facilitar la expresión en un organismo procariota. En otra realización, las secuencias nucleotídicas extrañas se eliminan para disminuir el tamaño del plásmido y aumentar el tamaño del cassette que puede colocarse en el mismo.
- 25 Dichos métodos se conocen bien en la técnica, y se describen, por ejemplo, en Sambrook y col. (1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York) y Ausubei y col. (1997, Current Protocols in Molecular Biology, Green & Wiley, Nueva York).
- 30 Se usan genes resistentes a antibióticos en los procesos de selección y clonación convencionales empleados comúnmente en biología molecular y la preparación de vacunas. Los genes resistentes a antibióticos contemplados incluyen, pero sin limitación, productos génicos que confieren resistencia a ampicilina, penicilina, metilicina, estreptomycin, eritromicina, kanamicina, tetraciclina, cloranfenicol (CAT), neomicina, higromicina, gentamicina y otros bien conocidos en la técnica.
- 35 Se conocen bien en la técnica métodos para transformar bacterias, e incluyen métodos basados en células competentes de cloruro de calcio, métodos de electroporación, transducción mediada por bacteriófagos, técnicas de transformación química y física (de Boer y col., 1989, Cell 56: 641-649; Miller y col., 1995, FASEB J., 9: 190-199; Sambrook y col. 1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York;
- 40 Ausubel y col., 1997, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Nueva York; Gerhardt et al., eds., 1994, Methods for General and Molecular Bacteriology, American Society for Microbiology, Washington, DC; Miller, 1992, A Short Course in Bacterial Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.) La cepa vacunal de *Listeria* puede transformarse por electroporación.
- 45 Se describen plásmidos y otros vectores de expresión en otra parte en el presente documento, y pueden incluir dichas características como una secuencia promotora/reguladora, un origen de replicación para bacterias gram negativas y gram positivas, un ácido nucleico aislado que codifica una proteína de fusión y un ácido nucleico aislado que codifica un gen de metabolismo aminoacídico. Además, un ácido nucleico aislado que codifica una proteína de fusión y un gen de metabolismo aminoacídico tendrán un promotor adecuado para impulsar la expresión de tal ácido
- 50 nucleico aislado. Los promotores útiles para impulsar la expresión en un sistema bacteriano se conocen bien en la técnica, e incluyen el bacteriófago lambda, el promotor bla del gen beta-lactamasa de pBR322, y el promotor CAT del gen cloranfenicol acetil transferasa de pBR325. Los ejemplos adicionales de los procariotas del promotor incluyen los promotores principales derecho e izquierdo del bacteriófago lambda (P_L y P_R), los promotores trp, recA, lacZ, lad y gal de *E. coli*, la alfa-amilasa (Ulmanen y col., 1985, J. Bacteriol. 162: 176-182) y los promotores
- 55 específicos de S28 de *B. subtilis* (Gilman y col., 1984 Gene 32: 11-20), los promotores de los bacteriófagos de Bacillus (Gryczan, 1982, En: The Molecular Biology of the Bacilli, Academic Press, Inc., Nueva York), y promotores de Streptomyces (Ward y col., 1986, Mol. Gen. Genet. 203: 468-478). Se revisan procariotas de promotores adicionales contemplados en la presente invención, por ejemplo, en Glick (1987, J. Ind. Microbiol. 1: 277-282); Cenatiempo, (1986, Biochimie, 68: 505-516); y Gottesman, (1984, Ann. Rev. Genet. 18: 415-442). Los ejemplos

adicionales de elementos promotores/reguladores contemplados incluyen, pero sin limitación, el promotor *prfA* de *Listerial*, el promotor *hly* de *Listerial*, el promotor *p60* de *Listerial* y el promotor *ActA* de *Listerial* (Nº de Ac. al GenBank NC_003210) o fragmentos de los mismos.

- 5 El gen expresado en un plásmido comprende un ácido nucleico aislado que codifica una proteína que complementa el mutante auxótrofo. Como alternativa, si la bacteria auxótrofa es deficiente en un gen que codifica un gen de síntesis de vitaminas (por ejemplo, ácido pantoténico) necesario para el crecimiento bacteriano, el ADN plasmídico comprende un gen que codifica una proteína para la síntesis de ácido pantoténico. Por lo tanto, la bacteria auxótrofa, cuando expresa el gen en el plásmido, puede crecer en ausencia de ácido pantoténico, mientras que una bacteria auxótrofa que no expresa el gen en el plásmido no puede crecer en ausencia de ácido pantoténico.

- 15 El plásmido puede comprender un gen que codifica una enzima de metabolismo aminoacídico. Dichas enzimas metabolizan aminoácidos de tal forma que puedan usarse para procesos de crecimiento bacteriano y replicación, tales como la síntesis de la pared celular, la síntesis de proteínas, el metabolismo de ácidos grasos, y similares. Una bacteria auxótrofa puede ser deficiente en las enzimas de metabolismo aminoacídico para ácido D-glutámico, un componente de la pared celular. La síntesis de ácido D-glutámico se controla por el gen *dat*, que está implicado en la conversión de D-glu + pyr en alfa-cetoglutarato + D-ala, y la reacción inversa. La síntesis de ácido D-glutámico también se controla por el gen *dga*, y un mutante auxótrofo para la síntesis de ácido D-glutámico no crecerá en ausencia de ácido D-glutámico (Pucci y col., 1995, J Bacteriol. 177: 336-342). Un ejemplo adicional incluye un gen implicado en la síntesis de ácido diaminopimélico. Dichos genes de síntesis codifican la beta-semialdehído deshidrogenasa, y cuando se activa, representa un mutante auxótrofo para esta ruta de síntesis (Sizemore y col., 1995, Science 270: 299-302).

- 25 Un plásmido puede comprender un gen que codifica una proteína de fusión. Pueden prepararse proteínas de fusión que comprenden un antígeno mediante cualquier método adecuado, incluyendo, por ejemplo, la clonación y restricción de las secuencias apropiadas o la síntesis química directa mediante métodos analizados a continuación. Como alternativa, las subsecuencias pueden clonarse y las subsecuencias apropiadas pueden escindirse usando enzimas de restricción apropiadas. Después, los fragmentos pueden ligarse para producir la secuencia de ADN deseada. El ADN que codifica el antígeno puede producirse usando métodos de amplificación de ADN, por ejemplo reacción en cadena de la polimerasa (PCR). En primer lugar, los segmentos del ADN nativo en cualquier lado del nuevo extremo se amplifican por separado. El extremo 5' de la secuencia amplificada codifica el enlazador peptídico, mientras que el extremo 3' de la otra secuencia amplificada también codifica el enlazador peptídico. Puesto que el extremo 5' del primer fragmento es complementario al extremo 3' del segundo fragmento, los dos fragmentos (después de la purificación parcial, por ejemplo en LMP agarosa) pueden usarse como una plantilla solapante en una tercera reacción por PCR. La secuencia amplificada contendrá codones, el segmento en el lado carboxi del sitio de apertura (que ahora forma la secuencia amino), el enlazador, y la secuencia en el lado amino del sitio de apertura (que forma ahora la secuencia carboxilo). El antígeno se liga en un plásmido.

- 35 Se proporciona un sistema de integración cromosómico basado en fago para aplicaciones clínicas. Se usará una cepa huésped que es auxótrofa para enzimas esenciales, incluyendo, pero sin limitación, d-alanina racemasa, por ejemplo *Lmdal(-)dat(-)*. Con el fin de evitar una "etapa de maduración de fago", se usará un sistema de integración de fago en base a PSA (Lauer, y col., 2002 J Bacteriol, 184: 4177-4186). Esto requiere una selección continua por antibióticos para mantener el gen integrado. Por lo tanto, la divulgación actual permite el establecimiento de un sistema de integración cromosómico basado en fago que no requiere la selección con antibióticos. En su lugar, se complementará una cepa huésped auxótrofa.

- 50 Las proteínas recombinantes se sintetizan, usando una metodología de ADN recombinante. Esto implica la creación de una secuencia de ADN que codifica la proteína de fusión, situando el ADN en un cassette de expresión, tal como un plásmido bajo el control de un elemento promotor/regulador particular, y expresando la proteína. El ADN que codifica la proteína de fusión (por ejemplo, LLO no hemolítica/antígeno) puede prepararse mediante cualquier método adecuado, incluyendo, por ejemplo, la clonación y la restricción de las secuencias apropiadas o la síntesis química directa mediante métodos tales como el método fosfotriéster de Narang y col. (1979, Meth. Enzymol. 68: 90-99); el método fosfodiéster de Brown y col. (1979, Meth. Enzymol 68: 109-151); el método de dietilfosforamida de Beaucage y col. (1981, Tetra. Lett., 22: 1859-1862); y el método de soporte sólido de la Pat. de Estados Unidos Nº 4.458.066.

Puede usarse la síntesis química para producir un oligonucleótido de una única hebra. Este oligonucleótido de una única hebra se convierte en un ADN de doble hebra por hibridación con una secuencia complementaria, o por polimerización con ADN polimerasa usando la única hebra como plantilla. Un experto en la técnica reconocerá que

mientras que la síntesis química de ADN se limita a las secuencias de aproximadamente 100 bases, pueden obtenerse mayores secuencias ligando secuencias más cortas. Las subsecuencias se clonaron y las subsecuencias apropiadas se escindieron usando enzimas de restricción apropiadas. Después, los fragmentos se ligan para producir la secuencia de ADN deseada.

- 5 El ADN que codifica la proteína de fusión o la proteína recombinante puede clonarse usando métodos de amplificación de ADN, tal como reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Por lo tanto, el gen para LLO no hemolítica se amplifica por PCR, usando un cebador de sentido directo que comprende un sitio de restricción adecuado y un cebador de sentido inverso que comprende otro sitio de restricción, por ejemplo, un sitio de restricción no idéntico para facilitar la clonación. Lo mismo se repite para el ácido nucleico aislado que codifica un antígeno. La ligación de la LLO no hemolítica y las secuencias de antígeno y la inserción en un plásmido o vector produce un vector que codifica LLO no hemolítica unida a un extremo del antígeno. Las dos moléculas se unen directamente o por un espaciador corto introducido por el sitio de restricción.
- 10
- 15 Las moléculas pueden separarse por un espaciador peptídico que consiste en uno o más aminoácidos, generalmente el espaciador no tendrá ninguna actividad biológica específica distinta de unir las proteínas o conservar cierta mínima distancia u otra relación espacial entre ellas. Sin embargo, los aminoácidos constituyentes del espaciador pueden seleccionarse para influenciar alguna propiedad de la molécula, tal como el plegado, carga neta o hidrofobicidad. Las secuencias de ácidos nucleicos que codifican las proteínas de fusión o recombinantes pueden transformarse en una diversidad de células huésped, incluyendo *E. coli*, otros huéspedes bacterianos, tales como *Listeria*, levadura y diversas células eucariotas superiores, tales como las líneas celulares COS, CHO y HeLa y líneas celulares de mieloma. El gen de proteína de fusión recombinante se unirá operativamente a secuencias de control de la expresión apropiadas para cada huésped. Las secuencias reguladoras de promotor se describen en detalle en otra parte en el presente documento. El plásmido puede comprender adicionalmente elementos reguladores de promotor adicionales, así como un sitio de unión a ribosoma y una señal de terminación de la transcripción. Para las células eucariotas, las secuencias de control incluirán un promotor y un potenciador obtenido a partir de, por ejemplo, genes de inmunoglobulina, SV40, citomegalovirus, etc., y una secuencia de poliadenilación, y puede incluir secuencias donante de empalme y aceptoras.
- 20
- 25
- 30 Una proteína de fusión puede comprender, entre otros, una proteína LLO no hemolítica de LM. La proteína LLO no hemolítica comprende aproximadamente los primeros 400 a 441 aminoácidos de la proteína LLO de longitud completa de 529 aminoácidos, cuya secuencia se describe, por ejemplo, en Mengaud y col., (1988, *Infect. Immun.* 56: 766-772, N° de Ac. al GenBank P13128). La construcción de una proteína de fusión que comprende un antígeno y una proteína LLO no hemolítica se describe en otra parte en el presente documento y, por ejemplo, en Gunn y col., (2001, *J. Immunology* 167: 6471-6479).
- 35

Una proteína de fusión puede comprender una secuencia PEST, de una proteína LLO o de otro organismo, por ejemplo, un organismo procarionta.

- 40 Una proteína de fusión puede comprender una secuencia Act A de un organismo de *Listeria*. La construcción y el uso de una proteína de fusión que comprende una secuencia PEST o una secuencia ActA puede proceder básicamente como se describe en el presente documento y en la Patente de Estados Unidos 6.767.542, la Publicación Internacional N° WO 01/72329 y la Solicitud de Estados Unidos N° 10/835.662 de Paterson y col.
- 45 Los antígenos de estas y otras enfermedades se conocen bien en la técnica, y el experto, cuando cuenta con la presente divulgación y los métodos y técnicas descritos en el presente documento podrá fácilmente construir una proteína de fusión que comprende una proteína LLO no hemolítica y un antígeno. Con el fin de seleccionar una bacteria auxótrofa que comprende el plásmido, la bacteria auxótrofa transformada puede crecer en un medio que seleccionará la expresión del gen de metabolismo aminoacídico. Por ejemplo, una bacteria auxótrofa para la síntesis de ácido D-glutámico se transforma con un plásmido que comprende un gen para la síntesis de ácido D-glutámico, y la bacteria auxótrofa crecerá en ausencia de ácido D-glutámico, mientras que las bacterias auxótrofas que no se han transformado con el plásmido, o no expresan el plásmido que codifica una proteína para la síntesis de ácido D-glutámico, no crecerán. Una bacteria auxótrofa para la síntesis de D-alanina puede crecer en ausencia de D-alanina cuando se transforma y expresa el plásmido si el plásmido comprende un ácido nucleico aislado que codifica una enzima de metabolismo aminoacídico para la síntesis de D-alanina. Dichos métodos para hacer un medio apropiado que comprende o carece de los factores de crecimiento, complementos, aminoácidos, vitaminas, antibióticos, y similares necesarios se conocen bien en la técnica, y están disponibles en el mercado (Becton-Dickinson, Franklin Lakes, NJ).
- 50
- 55

Una vez que la bacteria auxótrofa que comprende el plásmido se ha seleccionado en un medio apropiado, las bacterias se propagan en presencia de una presión selectiva. Dicha propagación comprende el crecimiento de las bacterias en medios sin el factor auxótrofo. La presencia del plásmido que expresa una enzima de metabolismo aminoacídico en la bacteria auxótrofa asegura que el plásmido se replicará junto con la bacteria, seleccionando continuamente de este modo las bacterias que albergan el plásmido. El experto, cuando cuenta con la presente divulgación y métodos en el presente documento podrán fácilmente aumentar la producción del vector vacunal de *Listeria* ajustando el volumen del medio en el que la bacteria auxótrofa que comprende el plásmido está creciendo.

SECCIÓN DE DETALLES EXPERIMENTALES

10

EJEMPLO 1

PRODUCCIÓN DE RESPUESTAS INMUNES POR VECTORES BACTERIANOS QUE LLEVAN CONSTRUCCIONES QUE CODIFICAN ANTÍGENOS EPISOMALES

15

MATERIALES Y MÉTODOS EXPERIMENTALES

Transformación y Selección

20 Se usó la cepa de *E. coli* MB2159 para las transformaciones, usando protocolos convencionales. Las células bacterianas se prepararon para electroporación mediante lavado con H₂O.

Cultivo bacteriano y pase in vivo de Listeria

25 Se cultivaron *E. coli* siguiendo métodos convencionales. *Listeria* crecieron a 37 °C, con agitación a 250 rpm en medio LB (Difco, Detroit, MI) + 50 µg/ml de estreptomycin, y se cosecharon durante una fase de crecimiento exponencial. Para Lm-LLOE7, al medio se le añadieron 37 µg/ml de cloranfenicol. Para las determinaciones de la cinética del crecimiento, las bacterias crecieron durante 16 horas en 10 ml de LB + antibióticos. EL OD_{600 nm} se midió y el cultivo se normalizó entre las cepas. El cultivo se diluyó 1:50 en LB + antibióticos adecuados y D-alanina, si procede.

30

Pase de LM en ratones

Se inyectaron por vía intraperitoneal (ip.) 1 x 10⁸ UFC en ratones C57BL/6. El tercer día, los bazos se aislaron y se homogeneizaron en PBS. Una alícuota de la suspensión de bazos se puso en placas LB con antibióticos, según sea necesario. Varias colonias se expandieron y se mezclaron para establecer un stock de inyección.

35

Generación del plásmido pGG55

40 El punto de inicio para la subclonación de pGG55 fue el plásmido pDP1659. Se generó pDP1659 por PCR (reacción en cadena de la polimerasa)-amplificación del ADN genómico de LM, codificando el fragmento de ADN los primeros 420 aminoácidos de LLO junto con las secuencias reguladoras corriente arriba y el promotor, después ligando el fragmento en pUC19. El fragmento de ADN que codifica el antígeno NP se amplificó por PCR, usando el plásmido pAPR501, proporcionado por el Dr. Peter Palese, como una plantilla, y se ligó en pUC19 como una fusión de traducción dentro del marco corriente abajo del fragmento de LLO. Después, la proteína de fusión se subclonó en pAM401, un vector lanzadera capaz de replicar tanto en bacterias gram-negativas como gram-positivas (Wirth R, An FY, Clewell DB. Highly efficient protoplast transformation system for *Streptococcus faecalis* and a new *Escherichia coli*-*S. faecalis* shuttle vector. *J Bacteriol* 165(3): 831-6, 1986). El promotor *hly* y el fragmento génico se generaron usando los cebadores 5'-GGGGCTAGCCCTCCTTTGATTAGTATATTC-3'. (SEQ ID NO: 3) y 5'-CTCCCTCGAGATCATAATTTACTTCATC-3' (SEQ ID NO: 4).

50

A continuación, el plásmido pDP2028 se construyó clonando el gen *prfA* en el sitio Sall de pDP1659. El gen *prfA* se amplificó por PCR usando los siguientes cebadores:

55 5'-GACTACAAGGACGATGACCGACAAGTGATAACCCGGGAT CTAATAAATCCGTTT-3'(SEQ ID NO: 5)
y
5'-CCCGTCCGACCAGCTCTTCTTGGTGAAG-3' (SEQ ID NO: 6).

pGG34 se creó después a partir de pDP2028 y pGG49. pGG49 contiene una inserción que consiste en el promotor

hly, un gen que codifica un fragmento de LLO N-terminal con HIV gp70, y el gen de *Listeria* prfA. pGG49 se digirió con NheI y Sall para eliminar la inserción, que se ligó a pDPP2028 digerido con XbaI y Sall para producir pGG34.

Después, pGG55 se generó a partir de pGG34 como se indica a continuación: El gen E7 del virus del papiloma humano se amplificó por PCR usando los cebadores 5'-GGCTCGAGCATGGAGATACACC-3' (SEQ ID NO: 1) y 5'-GGGGACTAGTTTATGGTTTCTGAGAACA-3' (SEQ ID NO: 2), se digirió con XhoI y SpeI (New England Biolabs, Beverly, MA), y se ligó a pGG34 digerido de forma similar, fusionando de este modo el gen E7 al gen hly que se sitúa corriente arriba de XhoI. El plásmido resultante es pGG55 que contiene un cassette multigénico de hly, el antígeno E7 y prfA. El promotor hly impulsa la expresión de los primeros 441 aminoácidos del producto génico hly, LLO, que se une por el sitio XhoI al gen E7. Mediante la eliminación del extremo C hemolítico de LLO, la actividad hemolítica de la proteína de fusión se neutraliza. El factor de transcripción pluripotente, prfA, también se induce en pGG-55 con su expresión impulsada por su promotor natural.

Generación de GG-L74

Se creó GG-L74 a partir de la cepa de *Listeria* 10403S por intercambio alélico doble en el dominio orfZ, usando un plásmido lanzadera sensible a la temperatura, como se describe en Gunn y col. (2001, J. Immunology 167: 6471-6479). Se generó GG-L74 introduciendo un cassette de expresión que contenía el gen de fusión E7 de hly en el dominio orfZ del genoma de *L. monocytogenes*. El promotor hly impulsa la expresión de los primeros 441 aminoácidos del producto génico hly, LLO, que se une, por el sitio XhoI al gen E7. El resultado es un gen de fusión E7 hly que se transcribió y se secretó como LLO-E7. El gen E7 hly se ligó al vector lanzadera pKSV7 en la orientación inversa para evitar la integración en el gen hly. El plásmido resultante, GG-L74, es un sistema de expresión que incluye el cassette de expresión que se ha descrito previamente insertado en el centro de una secuencia de 1,6 Kb que corresponde al dominio orfX, Y, Z del genoma de *L. monocytogenes*. La cepa de *L. monocytogenes* 10403S se transformó con pGG-74. Los dominios de homología permite la inserción del cassette del gen LLO-E7 en el dominio orfZ mediante recombinación homóloga como se describe en Gunn y col. (2001, J. Immunology 167: 6471-6479). Los clones se exploraron para verificar la integración del cassette del gen LLO-E7 en el dominio orfZ.

Diseño experimental

Se implantaron por vía subcutánea 2×10^5 TC-1 (ATCC, Manassas, VA) en ratones ($n = 8$) y se dejaron crecer durante aproximadamente 7 días, después de lo cual los tumores fueron palpables. TC1 es una línea celular epitelial de C57BL/6 que se inmortalizó con HPV E6 y E7 y se transformó con ratas activadas, lo que forma tumores tras la implantación subcutánea. Los ratones se inmunizaron con la cepa de *Listeria* apropiada los días 7 y 14 tras la implantación de las células tumorales. También se incluyó un grupo de control no inmunizado (sin tratar). El crecimiento tumoral se midió con calibres electrónicos.

RESULTADOS

Se evaluaron dos vectores vacunales de *Listeria*, cada uno expresando una fusión de un fragmento de LLO no hemolítica con respecto al antígeno E7 del virus del papiloma humano a partir de una construcción episomal (GG-L55) o el cromosoma de *Listeria* (GG-L74) para verificar la capacidad de inducir inmunidad a los tumores, prevenir la tumorigénesis e inhibir el crecimiento tumoral en animales. GG-L55 y GGL74 tienen una DL_{50} en ratones de 10^9 y 10^6 UFC, respectivamente. Las células TC-1 se implantaron por vía subcutánea en ratones para crecer hasta que los tumores fueron palpables (aproximadamente 5 mm de tamaño). Después, los ratones se inmunizaron con una 0,1 DL_{50} de GG-L55, GG-L74, o 0,001 DL_{50} de GG-L55 (para determinar el efecto de la carga de inmunización).

El día 28 después de la inyección de las células tumorales TC-1, cinco de los ocho animales que recibieron GG-L55 no tenían tumor y permanecieron así hasta el final del estudio. Cada uno de los animales sin tratar y los animales inmunizados con GG-L74 tenía tumores grandes. A los animales que recibieron la dosis menor de GG-L55 les crecieron tumores también, pero estos eran significativamente menores que los del grupo inmunizado con GG-L74 (figura 1).

Por lo tanto, las construcciones de antígeno expresadas de un plásmido confieren una respuesta inmune más fuerte y más protectora que las construcciones de antígeno expresadas a partir del cromosoma de *Listeria*.

EJEMPLO 2

UN PLÁSMIDO QUE CONTIENE UNA ENZIMA DE METABOLISMO AMINOACÍDICO EN LUGAR DE UN GEN DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS SE RETIENE EN E. COLI Y LM TANTO *IN VITRO* COMO *IN VIVO*

MATERIALES Y MÉTODOS EXPERIMENTALES

5

Construcción del plásmido pTV3 sin el factor de resistencia a antibióticos

Construcción del cassette p60-dal. La primera etapa en la construcción del vector sin gen de resistencia a antibióticos fue la construcción de una fusión de un promotor p60 truncado con respecto al gen dal. El gen alanina racemasa (dal) de LM (cebador directo: 5'-CCA TGG TGA CAG GCT GGC ATC-3'; SEQ ID NO: 8) (cebador inverso: 5'-GCT AGC CTA ATG GAT GTA TTT TCT AGG-3'; SEQ ID NO: 9) y una secuencia de promotor p60 mínima (cebador directo: 5'-TTA ATT AAC AAA TAG TTG GTA TAG TCC-3'; SEQ ID No: 22) (cebador inverso: 5'-GAC GAT GCC AGC CTG TCA CCA TGG AAA ACT CCT CTC-3'; SEQ ID No: 23) se aislaron por amplificación por PCR del genoma de la cepa de LM 10403S. Los cebadores introdujeron un sitio *PacI* corriente arriba de la secuencia p60, un sitio *NheI* corriente debajo de la secuencia dal (sitios de restricción en negrita), y una secuencia solapante dal (las primeras 18 pb) corriente abajo del promotor p60 para la fusión posterior de p60 y dal mediante una extensión de solapamiento de empalme (SOE)-PCR. La secuencia del promotor p60 truncado fue:

CAAATAGTTGGTATAGTCCTCTTTAGCCTTTGGAGTATTATCTCATCATTGTTTTT
TAGGTGAAAACCTGGTAAACTTAGTATTATCAATATAAAAATTAATTCTCAAATACT
TAATTACGTACTGGGATTTTCTGAAAAAAGAGAGGAGTTTTCC (SEQ ID NO: 7, Kohler y col., J Bacteriol 173: 4668-74, 1991). Usando SOE-PCR, los productos de PCR p60 y dal se fusionaron y se clonaron en el vector de clonación pCR2.1 (Invitrogen, La Jolla, CA).

Eliminación de los genes de resistencia a antibióticos de pGG55. La estrategia de clonación posterior para la eliminación de los genes Cloranfenicol acetiltransferasa (CAT) de pGG55 y la introducción del cassette p60-dal también dieron como resultado de forma intermitente la eliminación de la región de replicación gram-positiva (*oriRep*; Brantl y col., Nucleic Acid Res 18: 4783-4790, 1990). Para introducir de nuevo el *oriRep* gram-positivo, el *oriRep* se amplificó por PCR partir de pGG55, usando un cebador 5' que añadió un sitio *NarI*/*EheI* corriente arriba de la secuencia (GGCGCCACTAACTCAACGCTAGTAG, SEQ ID NO: 10) y un cebador 3' que añadió un sitio *NheI* corriente debajo de la secuencia (GCTAGCCAGCAAAGAAAACAAACACG, SEQ ID NO: 11). El producto de PCR se clonó en el vector de clonación pCR2.1 y la secuencia se verificó.

Con el fin de incorporar la secuencia p60-dal en el vector pGG55, el cassette de expresión p60-dal se eliminó de pCR-p60dal por la digestión doble de *PacI*/*NheI*. La región de replicación para la bacteria gram-positiva en pGG55 se amplificó a partir de pCR-*oriRep* por PCR (cebador 1, 5'-GTC GAC GGT CAC CGG CGC CAC TAA CTC AAC GCT AGT AG-3'; SEQ ID No: 20); (cebador 2, 5'-TTA ATT AAG CTA GCC AGC AAA GAA AAA CAA ACA CG-3'; SEQ ID No: 21) para introducir sitios de restricción adicionales para *EheI* y *NheI*. El producto de PCR se ligó a pCR2.1-TOPO (Invitrogen, Carlsbad, Calif.), y la secuencia se verificó. La región de replicación se eliminó por la digestión de *EheI*/*NheI*, y el vector pGG55 se digirió doblemente con *EheI* y *NheI*, eliminando ambos genes CAT del plásmido simultáneamente. Las dos inserciones, p60-dal y *oriRep*, y el fragmento pGG55 se ligaron juntos, produciendo pTV3.

Preparación de ADN para PCR en tiempo real

Se preparó ADN de *Listeria* total usando el kit Masterpure Total DNA (Epicentre, Madison, WI). En resumen, se cultivaron *Listeria* durante 24 horas a 37 °C y se agitaron a 250 rpm en 25 ml de caldo Luria-Bertoni (LB). Las células bacterianas se granularon por centrifugación, se suspendieron de nuevo en PBS complementado con 5 mg/ml de lisozima y se incubaron durante 20 minutos a 37 °C, después de lo cual se aisló el ADN.

Para obtener ADN diana convencional para PCR en tiempo real, el gen LLO-E7 se amplificó por PCR a partir de pGG55 (5'-ATGAAAAAATAATGCTAGTTTTTATTAC-3' (SEQ ID NO: 12); 5'-GCGGCCGCTTAATGATGATGATGATGATGTGGTTTCTG AGAACAGATG-3' (SEQ ID NO: 13)) y se clonó en el vector pETbluel (Novagen, San Diego, CA). De forma análoga, el amplicón *plcA* se clonó en pCR2.1. Se transformaron *E. coli* con pET-LLOE7 y pCR-*plcA*, respectivamente, y el ADN plasmídico purificado se preparó para su uso en PCR en tiempo real.

PCR en tiempo real

Se diseñaron conjuntos de cebador-sonda Taqman (Applied Biosystems, Foster City, CA) usando el software ABI

PrimerExpress (Applied Biosystems) con E7 con una diana plasmídica, usando los siguientes cebadores: 5'-GCAAGTGTGACTCTACGCTTCG-3' (SEQ ID NO: 14); 5'-TGCCCATTAACAGGTCTTCCA-3' (SEQ ID NO: 15); 5'-FAM-TGCGTA CAAAGCACACACGTAGACATTCGTAC-TAMRA-3' (SEQ ID NO: 16) y el gen de una copia *plcA* (TGACATCGTTTGTGTTTGAGCTAG -3' (SEQ ID NO: 17), 5'-GCAGCGCTCTCTATACCAGGTAG-3' (SEQ ID NO: 18); 5'-TET-TTAATGTCCATGTTA TGTCTCCGTTATAGCTCATCGTA-TAMRA-3 ; SEQ ID NO: 19) como una diana genómica de *Listeria*.

Se mezclaron el cebador 0,4 μ M y la sonda 0,05 mM con perlas PuRE Taq RTG PCR (Amersham, Piscataway, NJ) como se recomienda por el fabricante. Se prepararon curvas convencionales para cada diana con ADN plasmídico purificado, pET-LLOE7 y pCR-*plcA* (patrón interno) y se usaron para calcular el número de copias génicas en muestras desconocidas. Se calcularon las relaciones medias de las copias E7/copias *plcA* en base a las curvas convencionales y se calibraron dividiendo los resultados para Lmdd-TV3 y Lm-LLOE7 con los resultados de Lm-E7, una cepa de *Listeria* con una única copia del gen E7 integrado en el genoma. Todas las muestras se realizaron por triplicado en cada ensayo qPCR que se repitió tres veces. La variación entre las muestras se analizó mediante ANOVA de dos vías usando el software KyPlot. Los resultados se consideraron estadísticamente significativos si $p < 0,05$.

Mediciones de crecimiento

Las bacterias crecieron a 37 °C, con agitación a 250 rpm en medio Luria Bertani (LB) +/- 100 microgramos (μ g/ml de D-alanina y/o 37 μ g/ml de cloranfenicol. El inóculo de partida se ajustó en base a las mediciones de OD₆₀₀ nm para ser iguales en todas las cepas.

RESULTADOS

Se utilizó un sistema de complementación auxótrofo en base a D-alanina racemasa para mediar la retención plasmídica en LM sin el uso de un gen de resistencia a antibióticos. La cepa de *E. coli* MB2159 es un mutante deficiente en *alr* (-)/*dadX* (-) que no es capaz de sintetizar D-alanina racemasa. De forma análoga, la cepa de *Listeria* Lm *dal*(-)/*dat*(-) (Lmdd) no es capaz de sintetizar D-alanina racemasa debido a las deleciones parciales de los genes *dal* y *dat*. El plásmido pGG55, que se basa en el vector lanzadera de *E. coli*-*Listeria* pAM401, se modificó eliminando ambos genes CAT y reemplazándolos con un cassette de expresión de p60-*dal* bajo el control del promotor p60 de *Listeria*, como se describe en la sección Métodos (figura 1). El ADN se purificó de varias colonias (figura 2).

Para determinar la estabilidad plasmídica *in vitro*, LM-LLO-E7 y Lmdd(pTV3) se cultivaron durante 70 generaciones en presencia o ausencia de presión selectiva. Las UFC se determinaron diariamente en placas selectivas y no selectivas para cada cultivo. En este sistema, la pérdida plasmídica da como resultado un mayor número de colonias que crecen en placas no selectivas (BHI más D-alanina para Lmdd(pTV3), BHI únicamente para LM-LLO-E7) frente a placas selectivas (BHI únicamente para Lmdd(pTV3), BHI más cloranfenicol para LM-LLO-E7). No se detectó ninguna diferencia en las UFC entre las placas no selectivas y selectivas (figura 3A), lo que indica un mantenimiento estable del plásmido a través de todo el cultivo durante al menos 70 generaciones, cuando se terminó el experimento.

Además, se ensayó la estabilidad plasmídica *in vivo* en ratones C57BL/6 aislando bacterias viables en diferentes momentos después de la inyección. De nuevo, se usaron recuentos de UFC en placas selectivas y no selectivas para determinar el mantenimiento plasmídico entre las bacterias aisladas ((figura 3B). No se detectó ninguna diferencia en las UFC en placas selectivas y no selectivas para cada construcción, lo que indica la presencia estable del plásmido recombinante en todas las bacterias aisladas. Puesto que las bacterias viables Lmdd(pTV3) se aislaron al menos hasta el día 5, la pérdida plasmídica *in vivo* seguida de la eliminación temprana de las bacterias inyectadas puede excluirse como un posible motivo para la baja virulencia observada para las bacterias Lmdd(pTV3) (Ejemplo 3).

En resumen, pTV3 se mantuvo de forma estable en *E. coli*, así como en *Listeria*, tanto *in vitro* como *in vivo*. El crecimiento bacteriano en medio LB que no se complementó con D-alanina adicional indicó que el cassette de expresión de *dal* estaba activo también en *E. coli* gram-negativo. Tanto *E. coli*-pTV3 como Lmdd-pTV3 permanecieron sensibles al cloranfenicol, indicando la eliminación con éxito de ambos genes CAT del plásmido. Las placas representativas se representan en las figuras 4-7.

El número de copias de pTV3 por célula se comparó entre Lm-LLOE7 en presencia de cloranfenicol y Lmdd-TV3 en ausencia de cloranfenicol por PCR en tiempo real de la secuencias E7, tanto en *Listeria* como *E. coli*. Lm-LLOE7

expresa la proteína de fusión LLO/E7 de pGG55. Los números de copias plasmídicas de Lmdd-TV3 y Lm-LLOE7 no difirieron significativamente entre sí, mostrando una retención estable del plásmido pTV3 tanto en *Listeria* como en *E. coli*.

5 Con el fin de verificar la complementación de las funciones bacterianas, las cinéticas de crecimiento *in vitro* se compararon entre Lmdd, Lmdd-TV3 y Lm-LLOE7. Lmdd-TV3, pero no Lmdd no complementado, fue capaz de crecer en medio sin alanina (figura 8). De hecho, Lmdd-TV3 alcanzó una fase de crecimiento logarítmico antes de tanto Lm-LLOE7 como Lmdd complementados con D-alanina exógena. Esta atenuación del crecimiento de Lm-LLOE7 fue debido parcialmente a la carga metabólica de la expresión de CAT. Sin embargo, incluso en ausencia de
10 cloranfenicol, Lm-LLOE7 aún creció más lentamente *in vitro* que Lmdd-TV3.

EJEMPLO 3

LOS PLÁSMIDOS QUE CONTIENEN UNA ENZIMA METABÓLICA NO AUMENTAN LA VIRULENCIA DE LAS BACTERIAS

MATERIALES Y MÉTODOS EXPERIMENTALES

Ensayo de lisis hemolítica

20 Se descongelaron 4×10^9 UFC de *Listeria*, se granularon por centrifugación (1 minuto, 14000 rpm) y se suspendieron de nuevo en 100 μ l de PBS, pH 5,5 con cisteína 1 M. Las bacterias se diluyeron en serie 1:2 y se incubaron durante 45 minutos a 37 °C con el fin de activar la LLO secretada. La sangre de oveja total desfibrinada (Cedarlane, Hornby, Ontario, Canadá) se lavó dos veces con 5 volúmenes de PBS y tres a cuatro veces con
25 6 volúmenes de PBS-Cisteína hasta que el sobrenadante quedó transparente, granulando las células en 3000 x g durante 8 minutos entre etapas de lavado, después se suspendió a una concentración final del 10 % (v/v) en PBS-Cisteína. 100:1 de las células sanguíneas lavadas al 10 % se mezclaron con 100 μ l de suspensión de *Listeria* y se incubaron durante 45 minutos más a 37 °C. Después, las células sanguíneas no lisadas se granularon por centrifugación (10 minutos, 1000 x g). Se transfirieron 100 μ l del sobrenadante en una nueva placa y la OD_{530nm} se
30 determinó y se representó frente la dilución de la muestra.

RESULTADOS

Puesto que la virulencia se une a la función de LLO, se comparó la actividad de lisis hemolítica entre Lmdd-TV3 y
35 Lm-LLOE7. Este ensayo prueba la función de LLO mediante lisis de los glóbulos rojos y puede realizarse con el sobrenadante de cultivo, LLO purificada o células bacterianas. Lmdd-TV3 mostró una mayor lisis hemolítica que Lm-LLOE7.

La virulencia *in vivo* también se midió determinando los valores de DL50, un medio más directo y, por lo tanto,
40 preciso de medición de la virulencia. La DL50 de Lmdd-TV3 ($0,75 \times 10^9$) estaba muy cerca de la de Lm-LLOE7 (1×10^9), lo que muestra que los plásmidos que contienen enzimas metabólicas no aumentan la virulencia de las bacterias.

EJEMPLO 4

LAS CEPAS VACUNALES QUE LLEVAN PLÁSMIDOS QUE CONTIENEN UNA ENZIMA METABÓLICA MEDIAN LA EXPRESIÓN GÉNICA

La expresión antigénica del plásmido que contiene una enzima metabólica se ensayó *in vitro* por transferencia de
50 Western. Al analizar cantidades iguales de proteína total de los sobrenadantes de cultivo bacteriano, los cultivos Lmdd-TV3 contenían aproximadamente el doble de la cantidad de antígeno total que los cultivos de Lm-LLOE7. Esta diferencia puede ser resultado de una mayor carga metabólica total en Lm-LLOE7, debido al mayor tamaño del plásmido (12,8 kB) en comparación con Lmdd-TV3 (7,6 kB).

55 Por lo tanto, pueden usarse enzimas metabólicas en lugar de genes resistentes a antibióticos para medir la retención plasmídica en las bacterias auxótrofas. Además, dichos plásmidos tienen utilidad en la expresión de proteínas heterólogas en las bacterias.

EJEMPLO 5

INDUCCIÓN DE INMUNIDAD ANTI-TUMORAL POR PLÁSMIDOS QUE CONTIENEN UNA ENZIMA METABÓLICA

- 5 La eficacia del plásmido que contiene una enzima metabólica como una vacuna para el cáncer, se determinó en un modelo de regresión tumoral, como se describe en el Ejemplo 1. Se usó el modelo de línea celular TC-1, que está bien caracterizado para el desarrollo de una vacuna para HPV y que permitió una comparación controlada de la regresión de tumores establecidos de tamaño similar después de la inmunización con Lmdd-TV3 o Lm-LLOE7. En dos experimentos separados, la inmunización de ratones con Lmdd-TV3 y Lm-LLOE7 dio como resultado una
- 10 regresión tumoral similar (figura 9) con ninguna diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$) entre los grupos vacunados. Todos los ratones inmunizados aún estaban vivos después de 63 días, mientras que los ratones no inmunizados tuvieron que ser sacrificados cuando sus tumores alcanzaron 20 mm de diámetro. Los ratones curados permanecieron libres de tumor hasta la terminación del experimento.
- 15 Por lo tanto, los plásmidos que contienen una enzima metabólica son eficaces como vacuna para el cáncer terapéutica. Puesto que las respuestas inmunes requeridas para una vacuna para el cáncer terapéutica son más fuertes que las requeridas para una vacuna para el cáncer profiláctica, estos resultados demuestran utilidad también para una vacuna para el cáncer profiláctica.

EJEMPLO 6

LOS PLÁSMIDOS QUE CONTIENEN UNA ENZIMA METABÓLICA INDUCEN LINFOCITOS T INFILTRANTES DE TUMOR ESPECÍFICOS DE ANTÍGENO

MATERIALES Y MÉTODOS EXPERIMENTALES

Análisis de linfocitos T

- Los linfocitos T de bazo y linfocitos T infiltrantes de tumor se analizaron para los marcadores de superficie CD8 y
- 30 CD4 y la especificidad E7 de acuerdo con protocolos convencionales (Gunn y col. (2001; J. Immunol, 167: 6471-6479). Se inmunizaron ip. ratones C57BL/6 7 y 14 días después de la implantación tumoral con Lmdd-TV3 o Lm-LLOE7. Los esplenocitos y tumores se cosecharon 5 días después de la segunda inyección, y se tiñeron a temperatura ambiente con H-2D^b tetrámeros cargados con el péptido E7 (RAHYNIVTF, SEQ ID NO: 19) o un péptido de control (HIV-Gag) en una dilución 1:200. Los tetrámeros se proporcionaron por el National Institute of Allergy and
- 35 Infectious Diseases Tetramer Core Facility and the National Institutes of Health AIDS Research and Reference Reagent Program.

- Se realizó una citometría de flujo de tres colores para CD8 (53-6.7, conjugado con PE), y el tetrámero E7 H-2D^b usando un citómetro de flujo FACSCalibur® con el software CellQuest® (Becton Dickinson, Mountain View, CA). La
- 40 tinción de interferón gamma intracelular (IFN- γ) se realizó en un segundo subconjunto de células. Antes de la tinción de los antígenos de la superficie celular y la producción de IFN, los linfocitos se estimularon *in vitro* mediante cultivo en presencia de oncomensina (BD Biosciences) para acumular el IFN- γ intracelular en el aparato de Golgi. Después del cultivo durante 5 h en RP-10 complementado con interleucina-2 (50 U/ml) y 1 μ l de brefeldina A (monensina) por
- 45 conjugado con ficoeritrina (PharMingen) y MEL-14 conjugado con células que presentan antígeno (ligando anti-CD62). Las células se incluyeron (seleccionaron) en el ligando CD62 bajo para seleccionar células activadas antes de analizarse para verificar las poblaciones de CD8⁺ IFN- γ .

RESULTADOS

- 50 La eficacia anti-tumoral de una vacuna a menudo está unida a su capacidad para inducir linfocitos infiltrantes de tumor específicos de antígeno. Por lo tanto, para caracterizar adicionalmente la eficacia de Lmdd-TV3, los linfocitos T citotóxicos infiltrantes de tumor (CTL) para la especificidad antigénica E7 se analizaron. Tanto Lmdd-TV3 como Lm-LLOE7 inducen un porcentaje significativo de los linfocitos T específicos del tetrámero E7 que infiltran el tumor
- 55 (Tabla 1). No se observó ninguna diferencia significativa en los porcentajes de linfocitos T CD8⁺ productores de IFN- γ en ratones inmunizados con LLO-E7 de *L. monocytogenes* frente a ratones tratados con Lmdd-TV3. Por lo tanto, tanto Lmdd-TV3 como Lm-LLOE7 indujeron CTL específicos de antígeno infiltrantes de tumor que controlaban el crecimiento tumoral.

Tabla 1: A grupos de tres ratones se les inyectó 1×10^5 de células tumorales de TC-1 en una suspensión de matrigel al día. Las células se tiñeron con anticuerpo anti-CD8- y el tetrámero 37 y se sometieron a análisis FACS. Después de la inclusión (selección) de $CD8^+/E7\text{-tetrámero}^+/CD62^-$, se calculó el porcentaje de células $CD8^+/E7\text{-tetrámero}^+/CD62^-$ a partir de células vivas totales.

Grupo	Dosis	$CD8^+$, $E7\text{-tetrámero}^+$, $CD62^-$; Experimento A	$CD8^+$, $E7\text{-tetrámero}^+$, $CD62^-$ Experimento B
Sin tratar	0	8,81	4,86
Lmdd-TV3	$0,75 \times 10^8$	20,72	14,86
Lm-LLOE7	1×10^8	27,43	20,82

5

EJEMPLO 7

INTEGRACIÓN CROMOSÓMICA DE GENES RECOMBINANTES EN BASE A UN SISTEMA DE INTEGRACIÓN DE FAGO

10

Se construye un plásmido lanzadera que contiene (1) un gen de replicación para *E. coli*, (2) un sitio de integración PSA attPP', (3) un gen dal de Listeria bajo el control de su promotor natural, y (4) un gen PSA integrasa bajo el control del promotor p60 de Listeria. El experto apreciará que pueden usarse otros promotores o casetes de expresión policistrónicos para impulsar la expresión de los genes introducidos, en particular el gen dal y el gen PSA integrasa. El gen PSA integrasa y el sitio de integración PSA attPP' de pPL2 (Lauer y col., 2002, J Bacteriol, 2002. 184: 4177-4186) se modifica por PCR para contener sitios de restricción en el extremo 5' y el extremo 3' que son compatibles con la clonación de estos ácidos nucleicos en el plásmido lanzadera pTV3. Durante esta etapa, la región de replicación de *Listeria* de pTV3 se elimina, dando como resultado el plásmido pTV6. Este plásmido contiene funciones de replicación para su amplificación en *E. coli*, un gen dal para la complementación de dal auxótrofo de *E. coli* y *Listeria*, y las funciones de integración (PSA integrasa, sitio attPP') para la integración del plásmido en el genoma de Listeria. El plásmido se amplifica en la cepa dal auxótrofa de la cepa E. MB2159 (Strych y col.), se aísla y posteriormente se electropora en Listeria.

15

20

25 Como alternativa, en lugar de la cepa de LM de tipo salvaje 104035, se usa dal auxótrofo Lmdal(-) drat(-) (Ejemplos previos) como una cepa huésped. Puesto que el plásmido no contiene una región de replicación de *Listeria*, únicamente se seleccionan *Listeria* que contienen una copia que se integra en el genoma tras el crecimiento en el medio LB.

EJEMPLO 8

CREACIÓN DE UN VECTOR LANZADERA GENERAL EN BASE A pTV3

pTV3 se digiere con KasI o Ehel y AatII, eliminando el gen prfA, el gen de fusión LLO-E7, y la mayor parte del promotor LLO. Se introduce un sitio de clonación múltiple que consiste en BamHI, XhoI, XbaI, NotI, SpeI, SmaI y SacI ligando los siguientes oligonucleótidos pareados con respecto a la estructura de vector:

35

5'-CGG ATC CCT CGA GCT CAG AGC GGC CGC ACT AGT CCC GGG GAG CTC G (SEQ ID No: 24).
 5'-TCG ACG AGC TCC CCG GGA CTA GTG CGG CCG CTC TGA GCT CGA GGG ATC CGA CGT (SEQ ID No: 25; los extremos sobresalientes que son compatibles con los sitios de vector restringidos con AatI y Sall están en cursiva).

40

Después, un cassette de antígeno de interés se liga en el sitio de clonación múltiple. Después, el plásmido se usa para crear una cepa vacunal que expresa el antígeno codificado en el mismo.

45

EJEMPLO 9

CREACIÓN DE UN VECTOR LANZADERA GENERAL EN BASE A UN PLÁSMIDO DE EXPRESIÓN

50 El cassette de expresión p60-dal (Ejemplo 2) se introduce en un plásmido de expresión. Por ejemplo, puede usarse un plásmido comercial (por ejemplo, pCR2.1). Posteriormente, los genes de resistencia a antibióticos se eliminan del plásmido. Después, el plásmido se usa para crear una cepa vacunal que expresa el antígeno codificado en el

mismo.

LISTADO DE SECUENCIAS

- 5 <110> The Trustees of the University of Pennsylvania
<120> Métodos para construir vacunas sin resistencia a antibióticos
<130> N1295 EP S3
- 10 <140> EP05808671.1
<141> 2005-08-15
<150> PCT/US05/28895
15 <151> 2004-08-13
<160> 26
<170> PatentIn versión 3.3
- 20 <210> 1
<211> 22
<212> ADN
<213> Artificial
- 25 <220>
<223> Cebador
- 30 <400> 1
ggctcgagca tggagataca cc 22
<210> 2
<211> 28
<212> ADN
35 <213> Artificial
<220>
<223> Cebador
- 40 <400> 2
28 ggggactagt ttatggttc tgagaaca
<210> 3
<211> 31
45 <212> ADN
<213> Artificial
<220>
<223> Cebador
- 50 <400> 3
gggggctagc cctccttga ttagtatatt c 31
<210> 4
55 <211> 28
<212> ADN
<213> Artificial
<220>

<223> Cebador

<400> 4
ctccctcgag atcataatt acttcac 28

5

<210> 5
<211> 55
<212> ADN
<213> Artificial

10 <220>

<223> Cebador

<400> 5
gactacaagg acgatgaccg acaagtgata acccgggatc taataaatc cgftt 55

15

<210> 6
<211> 27
<212> ADN
<213> Artificial

20 <220>

<223> Cebador

<400> 6
27 cccgctgacc agctcttctt ggtgaag

25

<210> 7
<211> 156
<212> ADN
<213> Listeria monocytogenes

30

<400> 7
caaatagttg gtatagtctt ctttagcctt tggagtatta tctcatcatt tgttttttag 60
gtgaaaactg ggtaaaactta gtattatcaa tataaaatta attctcaaat acttaattac 120
gtactgggat ttctgaaaa aagagaggag ttttcc 156

35

<210> 8
<211> 21
<212> ADN
<213> Artificial

40 <220>

<223> Cebador

<400> 8
ccatggtgac aggctggcat c 21

45

<210> 9
<211> 27
<212> ADN
<213> Artificial

50 <220>

<223> Cebador

<400> 9
27 gctagcctaa tggatgtatt ttctagg

5 <210> 10
<211> 25
<212> ADN
<213> Artificial

10 <220>
<223> Cebador

<400> 10
25 ggcgccacta actcaacgctagtag

15 <210> 11
<211> 27
<212> ADN
<213> Artificial

20 <220>
<223> Cebador

<400> 11
27 gctagccagc aaagaaaaac aaacacg

25 <210> 12
<211> 29
<212> ADN
<213> Artificial

30 <220>
<223> Cebador

<400> 12
35 atgaaaaaaaa taatgctagt ttttattac 29

40 <210> 13
<211> 48
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador

45 <400> 13
48 gcggccgctt aatgatgatg atgatgatgt ggtttctgag aacagatg

50 <210> 14
<211> 22
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador

55 <400> 14
22 gcaagtgatga ctctacgctt cg

<210> 15

<211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial
 5 <220>
 <223> Cebador
 <400> 15
 10 tgccattaa caggtctcc a 21
 <210> 16
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Artificial
 15 <220>
 <223> Cebador
 <400> 16
 20 tgcgtacaaa gcacacacgt agacattcgt ac 32
 <210> 17
 <211> 24
 <212> ADN
 25 <213> Artificial
 <220>
 <223> Cebador
 30 <400> 17
 24 tgacatcgtt tggtttgag ctag
 <210> 18
 <211> 23
 <212> ADN
 35 <213> Artificial
 <220>
 <223> Cebador
 40 <400> 18
 gcagcgtct ctataccagg tac 23
 <210> 19
 <211> 38
 <212> ADN
 <213> Artificial
 45 <220>
 <223> Cebador
 50 <400> 19
 38 ttaatgtcca tggatgtct ccgttatagc tcatogta
 55 <210> 20
 <211> 38
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
<223> Cebador

5 <400> 20
38 gtcgacggtc accggcgcca ctaactcaac gctagtag

<210> 21
<211> 33
10 <212> ADN

<213> Artificial
<220>

15 <223> Cebador

<400> 21
ttaaattaagc tagccagcaa agaaaaacaa aca 33

20 <210> 22
<211> 27
<212> ADN
<213> Artificial

25 <220>
<223> Cebador

<400> 22
27 ttaaattaaca aatagttggt atagtcc

30 <210> 23
<211> 36
<212> ADN
<213> Artificial

35 <220>
<223> Cebador

<400> 23
40 gacgatgcca gcctgtcacc atggaaaact cctctc 36

<210> 24
<211> 46
<212> ADN
45 <213> Artificial

<220>
<223> Cebador

50 <400> 24
46 cggatccctc gagctcagag cggccgcact agtcccgggg agctcg

<210> 25
<211> 54
55 <212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador

ES 2 543 079 T3

<400> 25
54 tcgacgagct ccccgggact agtgcggccg ctctgagctc gagggatccg acgt

5 <210> 26
<211> 9
<212> PRT
<213> Virus del papiloma humano

10 <400> 26
Arg Ala His Tyr Asn Ile Val Thr Phe
1 5

REIVINDICACIONES

1. Un método de diseño de una cepa vacunal recombinante de *Listeria* para expresar un antígeno heterólogo, comprendiendo el procedimiento:
- 5 poner en contacto una cepa de *Listeria* auxótrofa para la síntesis de D-alanina que comprende una mutación en un gen D-alanina racemasa y en un gen D-aminoácido transferasa en dicho cromosoma de *Listeria* con un plásmido, comprendiendo dicho plásmido:
- 10 una primera secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido que comprende un antígeno heterólogo, y
una segunda secuencia de ácido nucleico que codifica una D-alanina racemasa,
en el que dicho plásmido no confiere resistencia antibiótica a dicha cepa vacunal auxótrofa de *Listeria*,
- 15 en el que dicha cepa auxótrofa de *Listeria* absorbe dicho plásmido,
en el que dicha D-alanina racemasa complementa dicha mutación en dicho gen D-alanina racemasa de dicha cepa bacteriana de *Listeria*,
en el que dicha cepa auxótrofa de *Listeria* crecerá en ausencia de D-alanina,
- 20 en el que dicho plásmido comprende un gen *prfA*, y
en el que dicha primera secuencia de ácido nucleico se une operativamente a un promotor procarionta, diseñando así una cepa vacunal recombinante de *Listeria* para expresar un antígeno heterólogo.
2. El método de la reivindicación 1, en el que dicho polipéptido es una proteína de fusión que comprende dicho antígeno heterólogo y un polipéptido adicional, en el que dicho polipéptido adicional es un fragmento no hemolítico de una proteína LLO, una secuencia aminoacídica tipo PEST, o una proteína ActA o un fragmento de la misma.
3. El método de la reivindicación 1 o 2, en el que dicha segunda secuencia de ácido nucleico se une operativamente a una secuencia promotora/reguladora.
- 30 4. Una cepa vacunal recombinante auxótrofa de *Listeria* para la síntesis de D-alanina que comprende una mutación en un gen D-alanina racemasa y en un gen D-aminoácido transferasa en dicho cromosoma de *Listeria*, en la que dicha *Listeria* comprende adicionalmente un plásmido, en la que el plásmido comprende:
- 35 una primera secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido, en la que dicho polipéptido comprende un antígeno heterólogo, y
una segunda secuencia de ácido nucleico que codifica una enzima D-alanina racemasa,
en la que dicho plásmido no confiere resistencia antibiótica a dicha cepa vacunal recombinante de *Listeria*,
- 40 en la que dicho gen D-alanina racemasa complementa un gen endógeno D-alanina racemasa que carece de un cromosoma de dicha cepa vacunal recombinante de *Listeria*, en la que dicho plásmido comprende un gen *prfA*, y en la que dicho plásmido se mantiene de forma estable en dicha cepa vacunal recombinante de *Listeria* en ausencia de una selección antibiótica, en la que dicha primera secuencia de ácido nucleico se une operativamente a un promotor procarionta, y en la que dicha cepa auxótrofa de *Listeria* crecerá en ausencia de D-alanina.
- 45 5. La cepa vacunal recombinante de *Listeria* de la reivindicación 4, en la que dicho polipéptido es una proteína de fusión que comprende dicho antígeno de proteína y un polipéptido adicional, en la que dicho polipéptido adicional es un fragmento no hemolítico de una proteína LLO, una secuencia aminoacídica tipo PEST, o una proteína ActA o un fragmento de la misma.
- 50 6. La cepa vacunal recombinante de *Listeria* de la reivindicación 4 o 5, en la que dicha segunda secuencia de ácido nucleico se une operativamente a una secuencia promotora/reguladora.
- 55 7. El método de la reivindicación 1, en el que dicha *Listeria* es útil para inducir una respuesta inmune a linfocitos T citotóxicos (CTL) específicos de antígeno infiltrantes de tumor *in vivo*.
8. La cepa vacunal recombinante de *Listeria* de la reivindicación 4, en la que dicha *Listeria* es útil para inducir una respuesta inmune a linfocitos T citotóxicos (CTL) específicos de antígeno infiltrantes de tumor *in vivo*.

9. Una cepa vacunal recombinante de *Listeria* obtenida de acuerdo con el método de cualquiera de las reivindicaciones 1-3 para su uso como un medicamento.

5 10. Una cepa vacunal recombinante de *Listeria* de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 4-6 para su uso como un medicamento.

11. Una cepa vacunal recombinante de *Listeria* obtenida de acuerdo con el método de cualquiera de las reivindicaciones 1-3 para su uso en el tratamiento o prevención del cáncer en un sujeto induciendo una respuesta
10 inmune a linfocitos T citotóxicos (CTL) específicos de antígeno infiltrantes de tumor *in vivo*.

12. Una cepa vacunal recombinante de *Listeria* de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 4-6 para su uso en el tratamiento o prevención del cáncer en un sujeto induciendo una respuesta inmune a linfocitos T citotóxicos (CTL) específicos de antígeno infiltrantes de tumor *in vivo*.

15

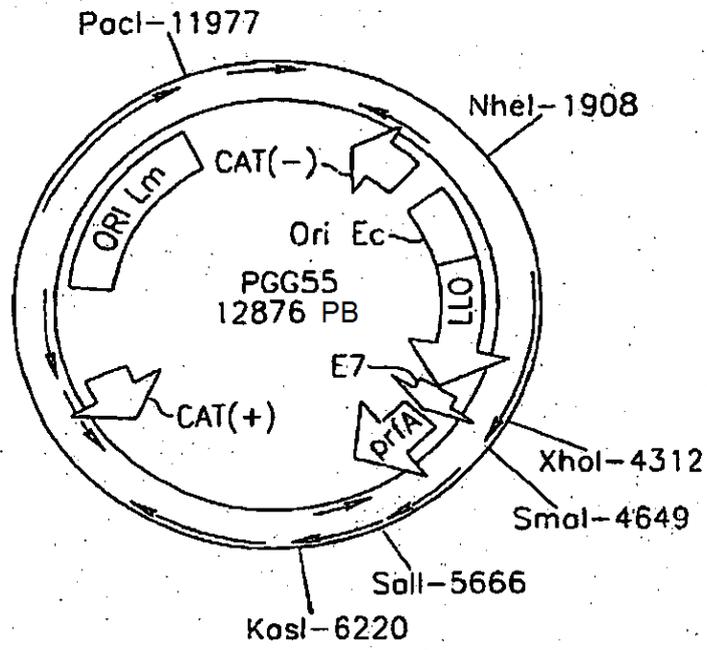


FIG.1A

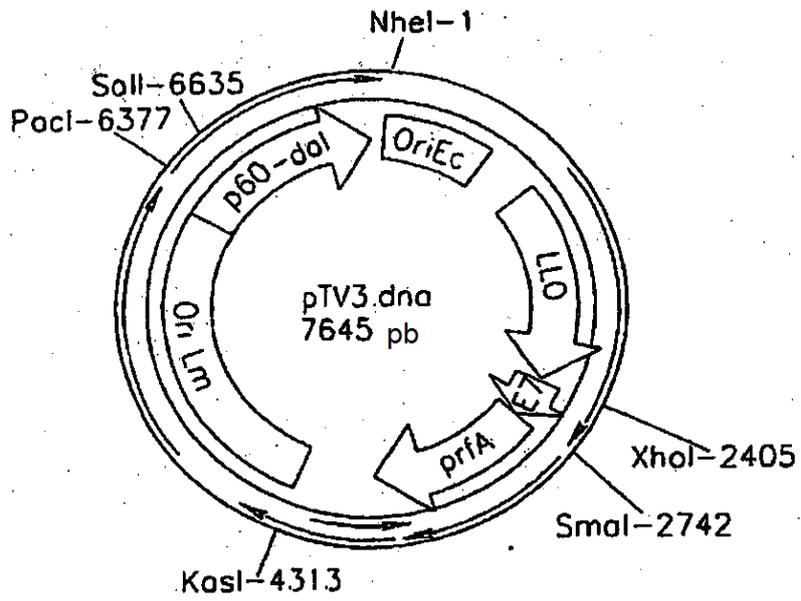


FIG.1B

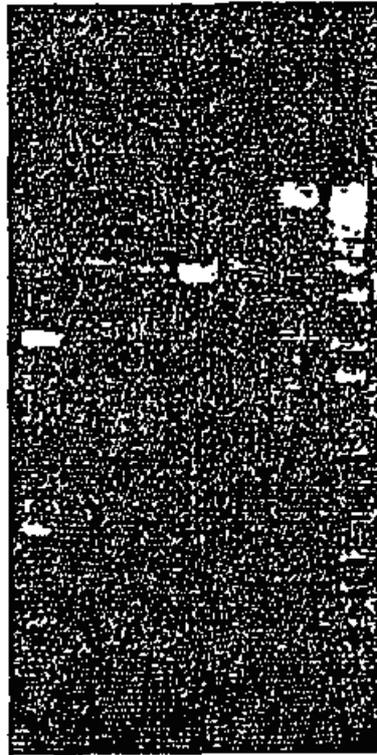


Figura 2

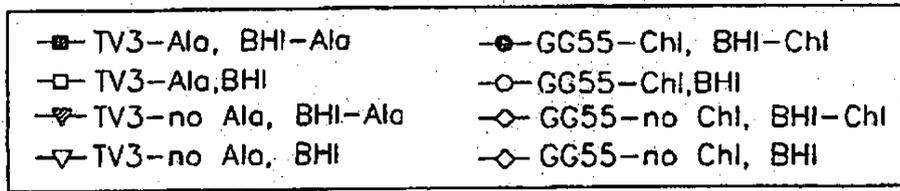
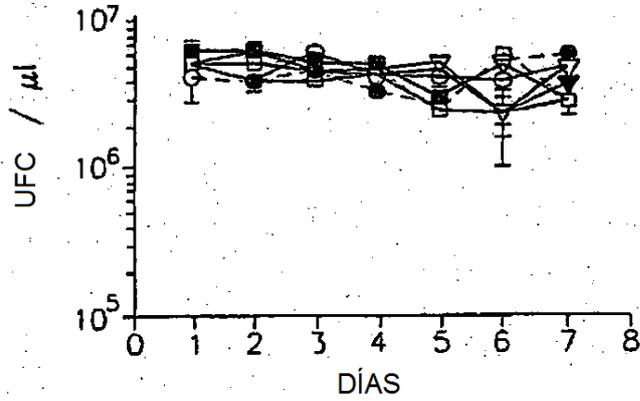


FIG. 3A

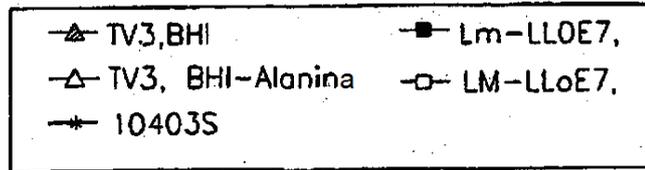
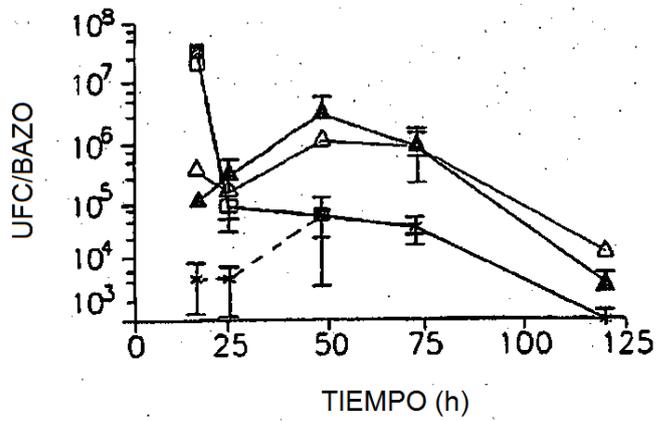


FIG. 3B

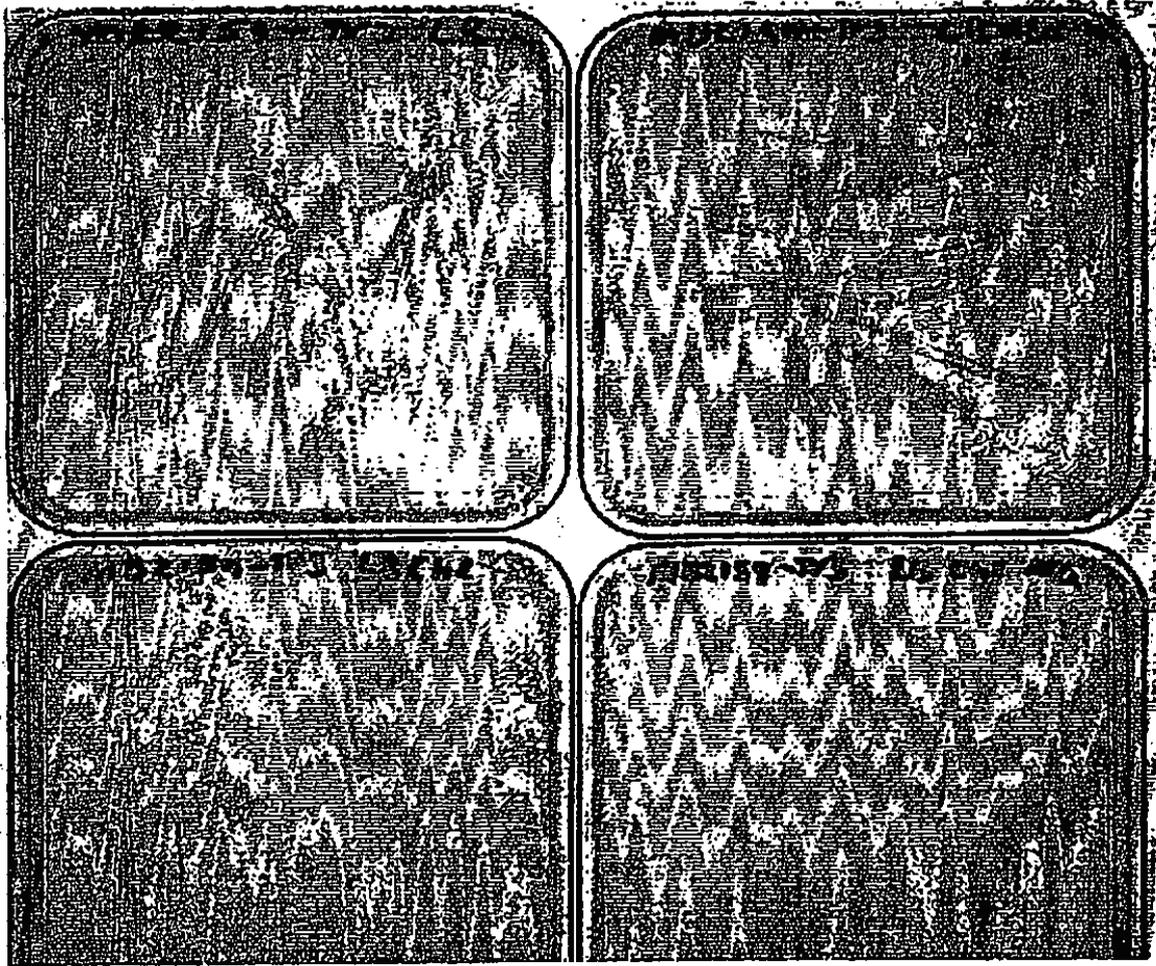


Figura 4

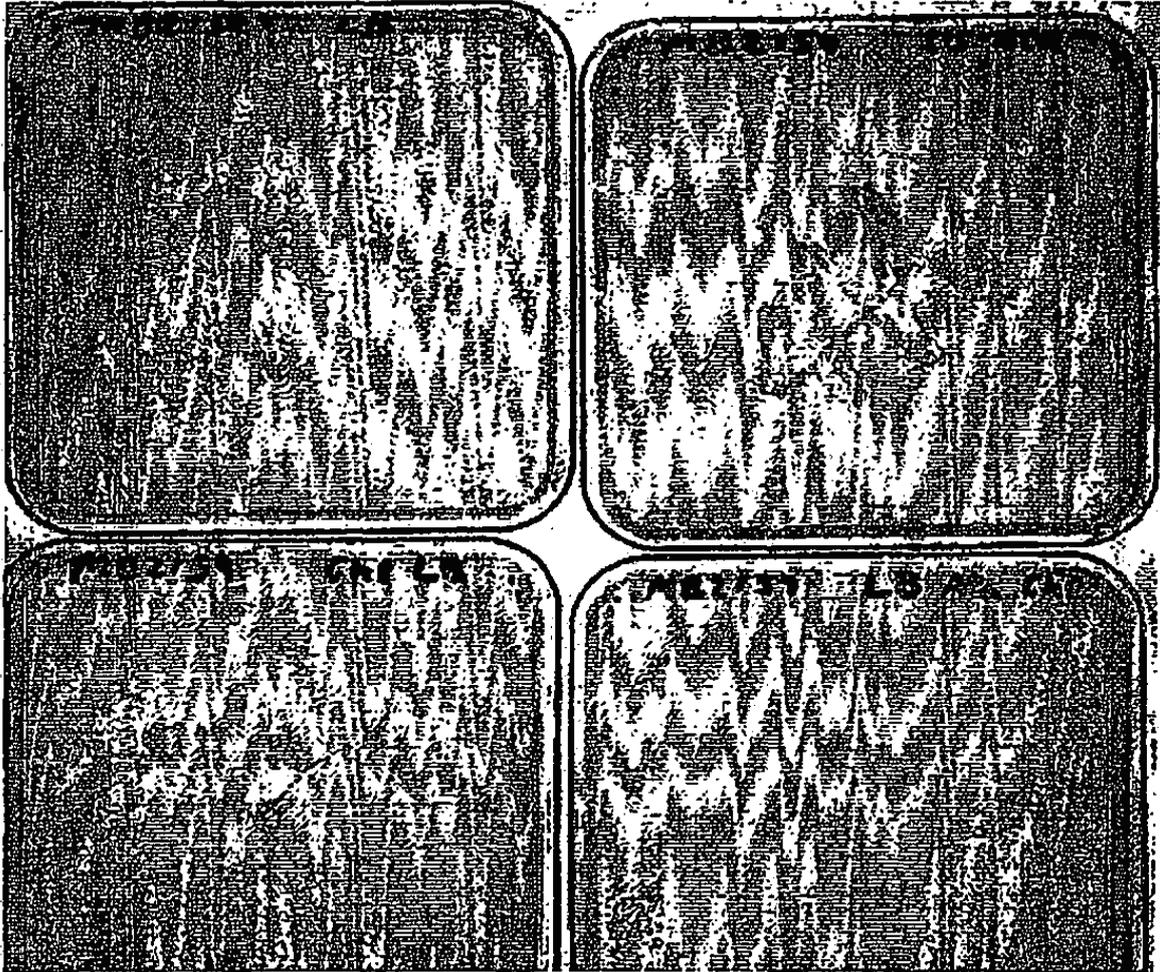


Figura 5

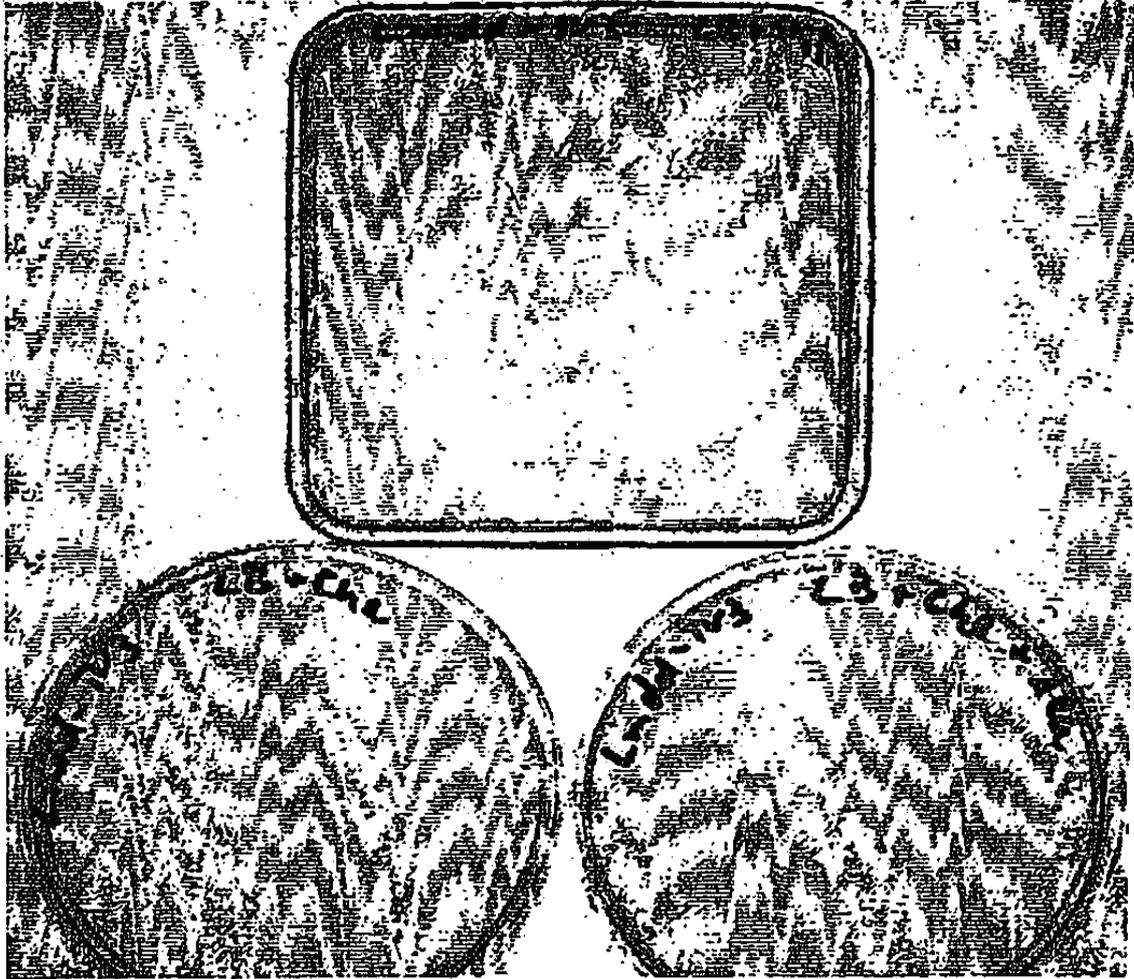


Figura 6

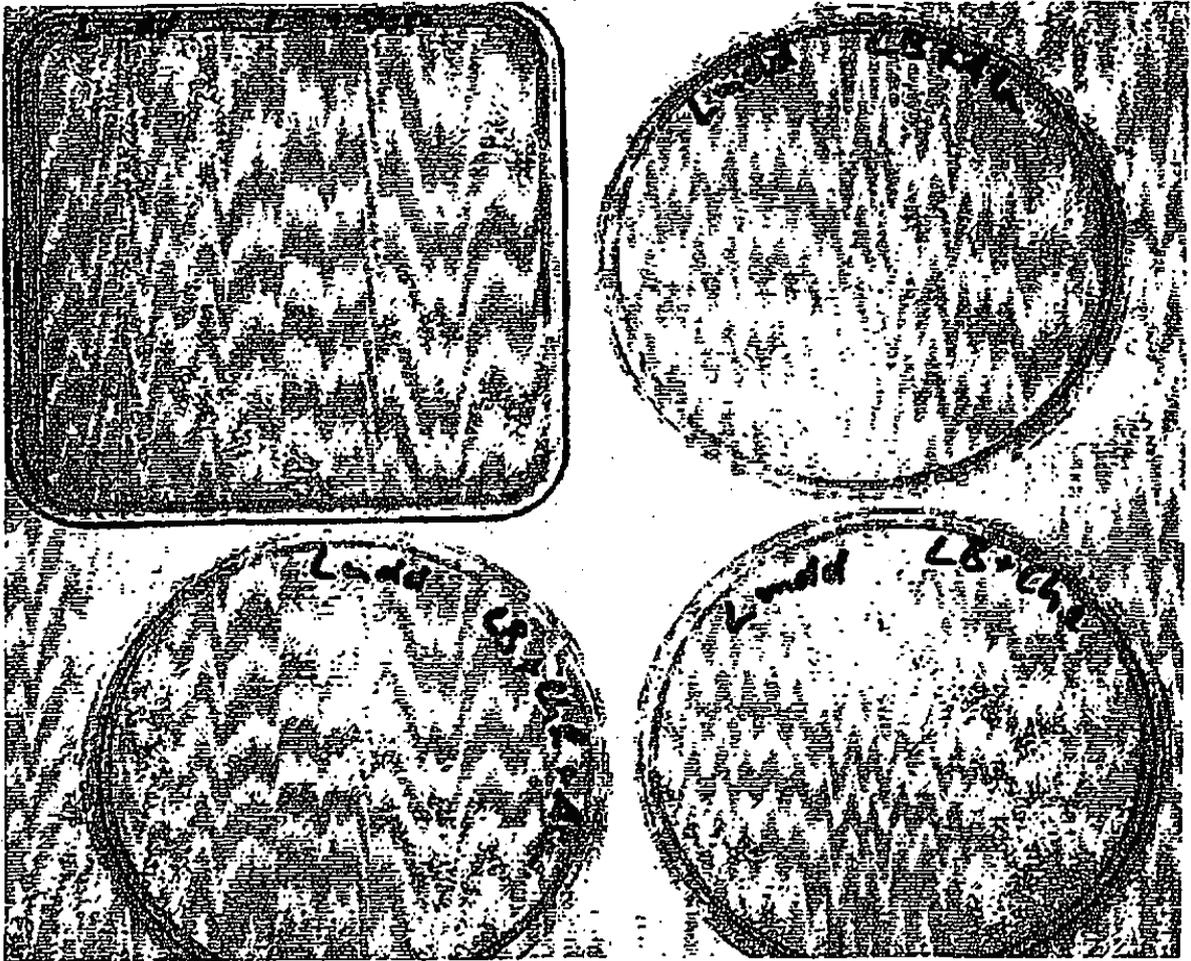


Figura 7

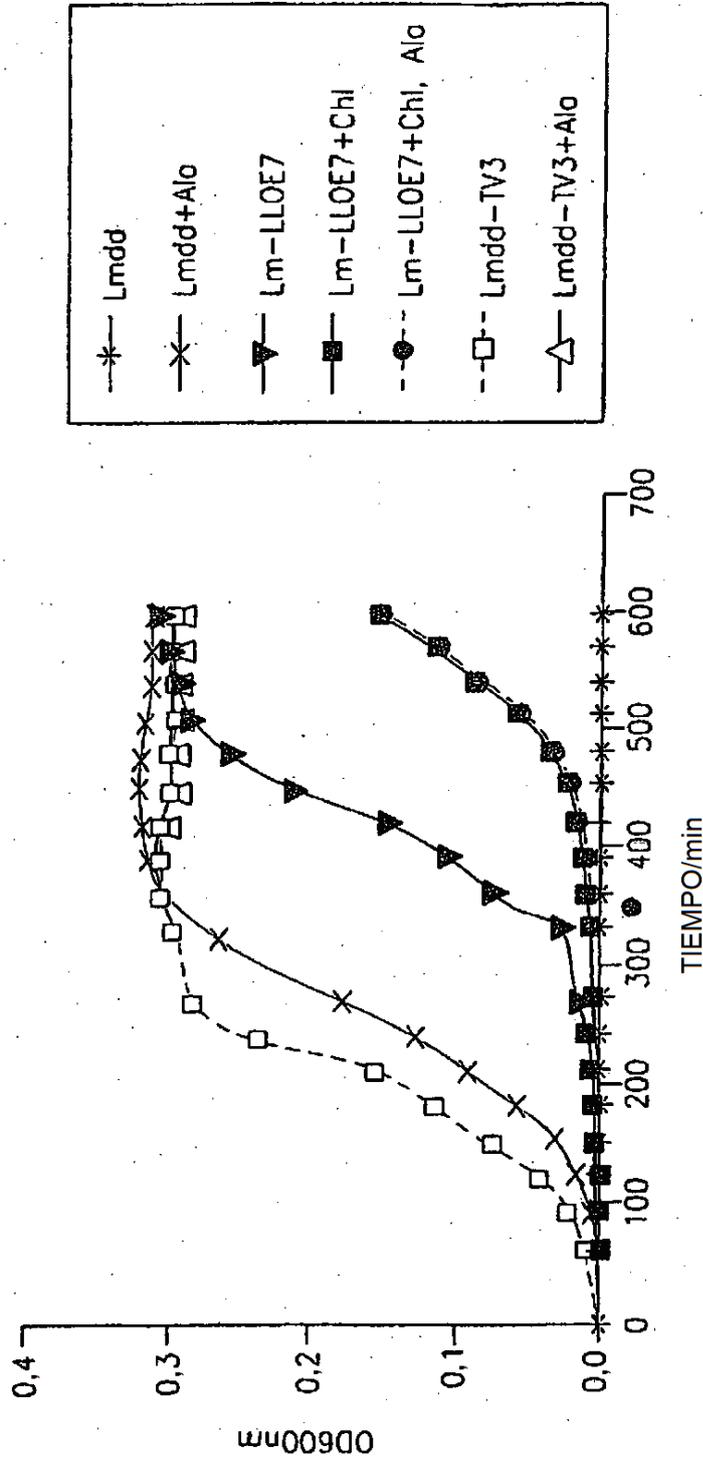
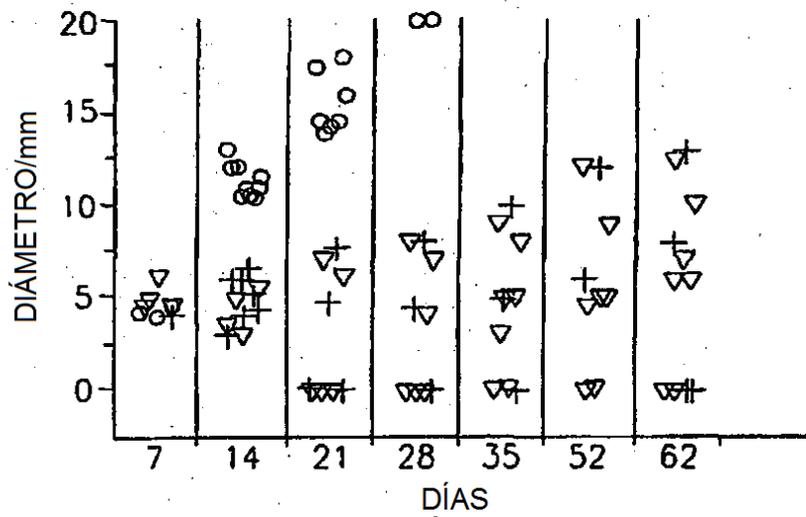
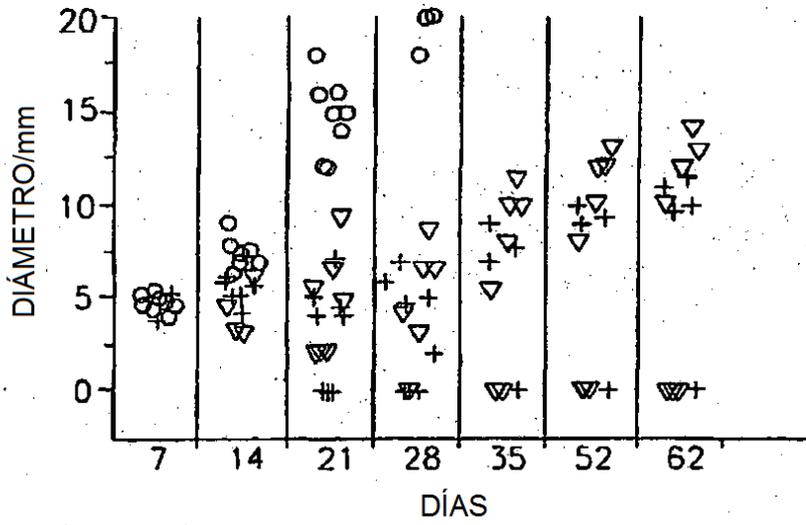


FIG.8



○ SIN TRĀTAR ▽ LMDD-TV3 + LM-LLOE7

FIG.9