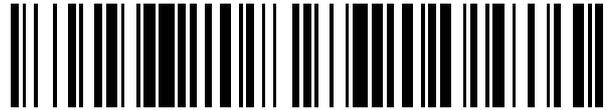


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 566 392**

51 Int. Cl.:

C07K 19/00 (2006.01)
A61K 39/02 (2006.01)
A61K 39/39 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)
A01N 63/00 (2006.01)
C12N 15/62 (2006.01)
A61K 39/09 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.09.2005 E 05811815 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.12.2015 EP 1804831**

54 Título: **Vacunas basadas en Listeria y basadas en LLO**

30 Prioridad:

24.09.2004 US 949667
13.09.2005 US 223945

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
12.04.2016

73 Titular/es:

**THE TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF
PENNSYLVANIA (100.0%)
CENTER FOR TECHNOLOGY TRANSFER 3160
CHESTNUT STREET, SUITE 200
PHILADELPHIA, PA 19104-6283, US**

72 Inventor/es:

**PATERSON, YVONNE y
SINGH, RESHMA**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 566 392 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

Vacunas basadas en *Listeria* y basadas en LLO

5 Campo de la invención

La presente invención proporciona péptidos recombinantes que comprenden un fragmento de la proteína N-terminal de listeriolisina (LLO) fusionado a un fragmento de la proteína Her-2, la cepa de *Listeria* recombinante que comprende la misma, y su uso en el tratamiento de tumores que expresan Her-2.

10

Antecedentes de la invención

Her-2/neu (denominada de ahora en adelante como "Her-2") es una glicoproteína de 185 kDa que es un miembro de la familia de receptores del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) de tirosina cinasas, y consiste de un dominio extracelular, un dominio transmembrana, y un dominio intracelular conocido por estar involucrado en la señalización celular (Bargmann CI y otros, Nature 319: 226, 1986; King CR y otros, Science 229: 974, 1985). Esta se sobreexpresa en el 25 al 40 % de todos los cánceres de mama y además, se sobreexpresa en muchos cánceres de ovarios, pulmón, páncreas, y tracto gastrointestinal. La sobreexpresión de Her-2 se asocia con un crecimiento celular y señalización descontrolados, los cuales contribuyen al desarrollo de los tumores. Los pacientes con cánceres que sobreexpresan Her-2 exhiben la tolerancia aún con respuestas humorales, de células T CD8⁺, y células T CD4⁺ detectables dirigidas contra Her-2.

La *Listeria monocytogenes* es un patógeno intracelular que infecta fundamentalmente a las células presentadoras de antígenos y se ha adaptado a la vida en el citoplasma de estas células. Las células huéspedes, tales como los macrófagos, fagocitan activamente *L. monocytogenes* y la mayor parte de las bacterias se degradan en el fagolisosoma. Algunas de las bacterias escapan al citosol del huésped al perforar la membrana fagosomal mediante la acción de una hemolisina, la listeriolisina O (LLO). Una vez en el citosol, *L. monocytogenes* puede polimerizar la actina del huésped y pasa directamente de célula a célula, así evade adicionalmente al sistema inmune del huésped y resulta en una respuesta despreciable de los anticuerpos a la *L. monocytogenes*.

30

Breve descripción de la invención

Esta invención proporciona un polipéptido recombinante que comprende un fragmento N-terminal de una proteína de listeriolisina (LLO) fusionada a un fragmento de un antígeno de Her-2, en donde el fragmento del antígeno de Her-2 consiste en los aminoácidos 303-501 o 479-655 de la sec. con núm. de ident.: 40, o los aminoácidos 303-501 o 479-652 de la sec. con núm. de ident.: 43, o una secuencia de aminoácidos más de 97 % idéntica a estas, en donde dicha LLO comprende una secuencia PEST, y en donde dicho polipéptido recombinante es capaz de inducir la regresión de células tumorales establecidas que expresan Her-2.

40 En una modalidad, las células T CD8⁺ median la regresión de las células tumorales establecidas que expresan Her-2.

En una modalidad, una respuesta inmune a un epítipo subdominante de Her-2 de células T CD8⁺ media la regresión de las células tumorales establecidas que expresan Her-2.

45 La invención proporciona, además, una molécula de nucleótidos que codifica el polipéptido recombinante; una forma recombinante de *Listeria* que comprende la molécula de nucleótidos; y una cepa recombinante de *L. monocytogenes* que expresa el polipéptido recombinante.

50 La invención proporciona, además, una vacuna que comprende el polipéptido recombinante, o que comprende una molécula de nucleótidos que codifica el polipéptido recombinante, o que comprende la *Listeria* recombinante.

La invención proporciona, además, el polipéptido recombinante, o una forma recombinante de *Listeria* que comprende el polipéptido recombinante, para su uso como un medicamento.

55 Adicionalmente, la invención también proporciona el uso del polipéptido recombinante, o la molécula de nucleótidos que codifica el polipéptido recombinante, o la *Listeria* recombinante, para la preparación de una composición farmacéutica para inducir la regresión de células tumorales establecidas que expresan Her-2 en un sujeto. La invención proporciona, además, el polipéptido recombinante, o la molécula de nucleótidos, o la *Listeria* recombinante para usar en la inducción de la regresión de un tumor establecido que expresa Her-2 en un sujeto.

60

El nucleótido recombinante o polipéptido recombinante pueden estar presentes en la composición farmacéutica en forma de una *Listeria* recombinante que comprende dicho nucleótido recombinante o dicho polipéptido recombinante.

65 En una modalidad, la composición farmacéutica induce una respuesta inmune mediada por células T CD8⁺ contra

células tumorales que expresan Her-2. En una modalidad, la respuesta inmune puede comprender una respuesta inmune a un epítipo subdominante de la proteína Her-2.

Breve descripción de las figuras

- 5
 10
 15
 20
 25
 30
 35
 40
 45
- Figura 1. Representación esquemática de pGG55, usado para construir las vacunas de Lm-ΔLLO-HER-2.
- Figura 2. La *Listeria monocytogenes* recombinante es capaz de secretar cada uno de los fragmentos de Her-2 como una proteína de fusión ΔLLO. (A) Mapa de los fragmentos de Her-2 de rata. (B) Confirmación de la secreción de los péptidos de fusión por transferencia de tipo Western. Marcador (línea 1), Lm-ΔLLO-E7 (línea 2), Lm-ΔLLO-EC1 (línea 3), Lm-ΔLLO-EC2 (línea 4), Lm-ΔLLO-EC3 (línea 5), Lm-ΔLLO-IC1 (línea 6), y Lm-ΔLLO-IC2 (línea 7).
- Figura 3. Cada vacuna de Lm-ΔLLO-Her-2 induce la detención del crecimiento del tumor en tumores NT-2 establecidos. Cada punto de dato representa el promedio de los diámetros más corto y más largo de la superficie tumoral de un ratón en un momento dado. Los ratones se sacrificaron cuando el promedio del diámetro tumoral alcanzó 2,0 cm; las mediciones de los tumores se muestran solamente para los ratones sobrevivientes en un momento dado. Se muestran las figuras representativas de dos experimentos. (A) Lm-ΔLLO-EC1, Lm-ΔLLO-EC2, y Lm-ΔLLO-EC3; (B) Lm-ΔLLO-IC1, y Lm-ΔLLO-IC2.
- Figura 4. Las células T CD8⁺ participan en la estasis del tumor inducida por Her-2. Las mediciones de los tumores se muestran solamente para los ratones sobrevivientes en un momento dado. (A) Lm-ΔLLO-EC1, Lm-ΔLLO-EC2, y Lm-ΔLLO-EC3 con reducción o no de células T CD8⁺. (B) Lm-ΔLLO-IC1 y Lm-ΔLLO-IC2 con reducción o no de las células T CD8⁺.
- Figura 5. Lm-ΔLLO-EC2 induce un aumento de tres veces en las células T CD8⁺ tetrámero⁺. Los ratones FVB/N se inmunizaron con Lm-ΔLLO-EC2 o PBS. Posteriormente, los esplenocitos se tiñeron con un tetrámero H-2^q Her-2, anti-CD8, y anti-CD62L.
- Figura 6. Cada uno de los constructos de vacuna Lm-ΔLLO-Her-2 induce niveles similares de actividad CTL anti-Her-2. A. 3T3 silvestre (control negativo). B. 3T3-neu (Her-2 de longitud completa). Los resultados se muestran como la media de cultivos triplicados, y son representativos de 5 experimentos.
- Figura 7. La entrega por LM y la fusión a ΔLLO aumenta la respuesta inmune antitumoral de las vacunas Her-2. Se representa el diámetro tumoral promedio para cada ratón. Las mediciones de los tumores se muestran solamente para los ratones sobrevivientes en un momento dado. (A) Lm-ΔLLO-EC1 vs. pcADN ΔLLO-EC1 + GM-CSF, (B) pcADN EC1 + GM-CSF vs. pcADN ΔLLO-EC1 + GM-CSF, (C) pcADN neu + GM-CSF vs. pcADN ΔLLO-neu + GM-CSF, (D) pcADN ΔLLO-neu + GM-CSF vs. pcADN ΔLLO-EC1 + GM-CSF, y (E) pcADN neu + GM-CSF vs. pcADN EC1 + GM-CSF.
- Figura 8. La vacuna Lm-ΔLLO-Her-2 ralentiza el crecimiento de los tumores de rata establecidos que expresan Her-2 en ratones transgénicos para Her-2/neu de rata, en los que el Her-2 de rata se expresa como un antígeno propio.
- Figura 9. Las vacunas LLO-Her-2 controlan el crecimiento espontáneo de tumores en ratones transgénicos Her-2/neu.
- Figura 10. Representación esquemática de los fragmentos de Her-2 usados para crear las vacunas LLO-Her-2 humana.

Descripción detallada de la invención

- 50
 55
- Esta invención proporciona un polipéptido recombinante que comprende un fragmento N-terminal de una proteína de listeriolisina (LLO) fusionado a un fragmento de un antígeno de Her-2, en donde el fragmento del antígeno de Her-2 consiste en los aminoácidos 303-501 o 479-655 de la sec. con núm. de ident.: 40, o los aminoácidos 303-501 o 479-652 de la sec. con núm. de ident.: 43, o una secuencia de aminoácidos más de 97 % idéntica a ellas, en donde dicha LLO comprende una secuencia PEST, y en donde dicho polipéptido recombinante es capaz de inducir la regresión de células tumorales establecidas que expresan Her-2.

En una modalidad, las células T CD8⁺ median la regresión de las células tumorales establecidas que expresan Her-2.

- 60
- En una modalidad, una respuesta inmune a un epítipo subdominante de Her-2 de células T CD8⁺ media la regresión de células tumorales establecidas que expresan Her-2.

La invención proporciona, además, una molécula de nucleótidos que codifica el polipéptido recombinante; una forma recombinante de *Listeria* que comprende la molécula de nucleótidos; y una cepa recombinante de *L. monocytogenes* que expresa el polipéptido recombinante.

La invención proporciona, además, una vacuna que comprende el polipéptido recombinante, o que comprende una molécula de nucleótidos que codifica el polipéptido recombinante, o que comprende la *Listeria* recombinante

5 La invención proporciona, además, el polipéptido recombinante, o una forma recombinante de *Listeria* que comprende el polipéptido recombinante, para su uso como un medicamento.

Adicionalmente, la invención proporciona también el uso del polipéptido recombinante, o la molécula de nucleótidos que codifica el polipéptido recombinante, o la *Listeria* recombinante, para la preparación de una composición farmacéutica para inducir la regresión de células tumorales establecidas que expresan Her-2 en un sujeto. La invención proporciona, además, el polipéptido recombinante, o la molécula de nucleótidos, o la *Listeria* recombinante para usar en la inducción de la regresión de un tumor establecido que expresa Her-2 en un sujeto.

15 El nucleótido recombinante o polipéptido recombinante puede estar presente en la composición farmacéutica en forma de una *Listeria* recombinante que comprende dicho nucleótido recombinante o dicho polipéptido recombinante.

En una modalidad, la composición farmacéutica induce una respuesta inmune mediada por células T CD8⁺ contra células tumorales que expresan Her-2. En una modalidad, la respuesta inmune puede comprender una respuesta inmune a un epítipo subdominante de la proteína Her-2.

20 Como se proporcionan en la presente descripción, los resultados de la presente invención demuestran que las composiciones de la presente invención tienen utilidad para inducir la formación de células T específicas por el antígeno (por ejemplo, células T citotóxicas) que reconocen y destruyen las células tumorales, y de ese modo detienen el crecimiento de y reducen las células tumorales y tratan el cáncer resultante (Ejemplos de la presente descripción).

En otra modalidad, la presente invención proporciona un polipéptido recombinante que comprende un fragmento de una proteína Her-2 cuyo fragmento consiste en los AA 303-501 de ella, o los AA 479-655 de ella, o una secuencia de aminoácidos más de 97 % idéntica a ella.

30 En una modalidad, el fragmento de proteína Her-2 es un fragmento de proteína Her-2 humano. En otra modalidad, el fragmento de proteína Her-2 es un fragmento de proteína Her-2 de rata. En otra modalidad, el fragmento de proteína Her-2 es un homólogo de un fragmento de proteína Her-2.

35 En una modalidad, la proteína Her-2 es una proteína Her-2 de rata que tiene la secuencia:

MIIMELAAWCRWGFLLALLPPGIAGTQVCTGTDMLRLPASPETHLDMLRHL YQGCQV VQG
 NLELTYVPANASLSFLQDIQEVQGYMLIAHNQVKRVPLQRLRIVRGTQLFEDKYALAVLDNRD
 40 PQDNVAASTPGRTPPEGLRELQLRSLTEILKGGVLRGNPQLCYQDMVLWKDVFRKNNQLAPV
 DIDTNRSRACPPCAPACKDNHCWGESPEDCQILGTICTSGCARCKGRLPTDCCHEQCAAGCT
 GPKHSDCLACLHFNHSGICELHCPALVTYNTDTFESMHNPEGRYTFGASCVTTCFYNYLSTEV
 GSCTLVCPNNQEVTAEDGTQRCEKCSKPCARVCYGLGMEHLRGARAITSDNVQEFDGCKKI
 45 FGSLAFLPESFDGDPSSGIAPLRPEQLQVFETLEEITGYLYISAWPDSLRDLSVFNLRIRGRILH
 DGAYS LTLQGLGIHSLGLRSLRELGSGLALIHNAHLCFVHTVPWDQLFRNPHQALLHSGNRP
 EEDCGLEGLVCNSLCAHGHCWGPPTQCVNCSHFLRGQECVEECRVWKGLPREYVSDKRCL
 PCHPECQPQNSSETCFGSEADQCAACAHYKDSSSCVARCPGSKPDL SYMPIWKYPDEEGICQ
 50 PCPINCTHSCVDLDERGCPAEQRASPVTFIATVEGVLLFLILVVVVGILIKRRRQKIRKYTMRRL
 LQETELVEPLTPSGAMPNQAQMRILKETELRKVKVLGSGAFGTVYKGIWIPDGENVKIPVAIK
 VLRENTSPKANKEILDEAYVMAGVGSPPYVSRLLGICLTSTVQLVTQLMPYGCLLDHVREHRG
 55 RLGSQDLLNWCVQIAKGMSYLEVRLVHRDLAARNVLVKSPNHVKITDFGLARLLDIDET EY
 HADGGKVPKWMALESILRRRFTHQSDVWSYGVTVWELMTFGAKPYDGIPAREIPDLLEKGE
 RLPQPPICTIDVYIMVKCWMIDSECRPRFREL VSEFSRMARDPQRFVVIQNE DLGPSSPMDST
 FYRSLLEDDDMGDLVDAEEYLVPQQGFFSPDPTPGTGSTAHRHRSSSTRSGGGELTLGLEPS
 60 EEGPPRSLAPSEGAGSDVFDGDLAMGVTKGLQSLSPHDLSP LQRYSEDPTLPLPPETDGYVAP
 LACSPQPEYVNQSEVQPPLTPEGPLPPVRPAGATLERPKT LSPGKNGVVKDVFAFGGAVEN
 PEYLVPREGTASPPHPSPAFSPAFDNLYYWDQNSSEQGPPP

65

5 PSNFEGTPAENPEYLGLDVPV (sec. con núm. de ident.: 40). La sec. con núm. de ident.: 40 se usó para crear los fragmentos en el Ejemplo 1. En otra modalidad, la proteína Her-2 es codificada por la secuencia de ácido nucleico que se expone en la sec. con núm. de ident.: 41.

En otra modalidad, la proteína Her-2 es una proteína Her-2 humana que tiene la secuencia:

10
 MELAALCRWGLLLALLPPGAASTQVCTGDMKLRLPASPETHLDMLRHLYQGCQVVQGNL
 ELTYLPTNASLSFLQDIQEVQGYVLIAHNQRVQVPLQRLRIVRGTQLFEDNYALAVLDNGDP
 15 LNNTPVTGASPGGLRELQLRSLTEILKGGVLIQRNPQLCYQDTILWKDIFHKNNQLALTLID
 TNRSRACHPCSPMCKGSRGWGESSEDCQLTRTVCAAGGCARCKGPLPTDCCHEQCAAGCT
 GPKHSDCLACLHFNHSGICELHCPALVTYNTDTFESMPNPEGRYTFGASCVTACPYNYLSTD
 20 VGSCTLVCPHNLQEVTAEDGTQRCEKCSKPCARVCYGLGMEHLREVRAVTSANIQEFAGCK
 KIFGSLAFLPESFDGDPASNTAPLQPEQLQVFETLEEITGYLYISAWPDSLPLSVFQNLQVIR
 GRILHNGAYSLTLQGLGISWLGLRSLRELGSGLALIHNTHLCFVHTVPWDQLFRNPHQALL
 HTANRPEDECVGEGLAGHQLCARGHCWGPPTQCVNCSQFLRGQECVEECRVLQGLPREY
 25 VNARHCLPCHPECQPQNGSVTCFGPEADQCVACAHYKDPFPCVARCPGKPDLSYMPIWK
 FPDEEGACQPCPINCTHSCVDLDDKGCPAEQRASPLTSIISAVVGILLVVVLGVVFGILIKRRQ
 QKIRKYTMRRLLQETELVEPLTPSGAMPNQAQMRILKETELRKVKVLGSGAFGTVYKGIWIP
 30 DGENVKIPVAIKVLRENTSPKANKEILDEAYVMAGVGSPPYVSRLGICLTSTVQLVTQLMPY
 GCLLDHVRENRRGLGSQDLLNWC MQIAKGMSYLEDVRLVHRDLAARNVLVKSPNHVKITD
 FGLARLLDIDETEYHADGGKVPKWMALESILRRRFTHQSDVWSYGVTVWELMTFGAKPY
 DGIPAREIPDLLEKGERLPQPPICTIDVYIMVKCWMIDSECRPRFRELVSEFSRMARDPQRF
 35 VVIQNE DLGPASPLDSTFYRSLLEDDDMGDLVDAEEYLVPQQGFFCPDPAPGAGGMVHHRH
 RSSSTRSGGGDLTLGLEPSEEEAPRSPLAPSEGAGSDVFDGDLGMGAAKGLQSLPHTDPSPL
 QRYSEDPTVPLPSETDGYVAPLTCSPQPEYVNQPDVVRPQPPSPREGPLPAARPAATLERPKT
 40 LSPGKNGVVKDVFAFGAVENPEYLTQGGAAPQPHPPAFSPAFDNLYYWDQDPPERGAP
 PSTFKGTPAENPEYLGLDVPV (Sec. con núm. de ident.:43)

45 La sec. con núm. de ident.: 43 se usa para crear los fragmentos en el Ejemplo 10. En otra modalidad, la proteína Her-2 es codificada por la secuencia de ácido nucleico que se expone en la sec. con núm. de ident.: 44.

50 En otras modalidades, la proteína Her-2 tiene una secuencia que se expone en el Núm. de acceso al GenBank NM_004448 o NM_001005862. Estas proteínas Her-2 tienen regiones transmembrana (TM) que abarcan los AA 653-675 y 623-645, respectivamente. La proteína Her-2 humana que se expone en la sec. con núm. de ident.: 43 tiene una región TM que abarca 653-676. Así, en otra modalidad, la generación de fragmentos de Her-2 que corresponden a aquellos de la presente invención a partir de variaciones de la sec. con núm. de ident.: 40, tales como estos, requiere ajustes del número de residuos que definen el fragmento, como se describe más abajo.

55 En otras modalidades, la proteína Her-2 es una proteína denominada como "HER-2/neu," "ErbB2," "v-erb-b2," "c-erb-b2," "neu," o "cNeu."

60 En otra modalidad, el fragmento de una proteína Her-2 de las composiciones y usos médicos de la presente invención consiste en los AA 303-501 (EC2; sec. con núm. de ident.: 36) de la proteína Her-2, o una secuencia más de 97 % idéntica a ella. En otra modalidad, el fragmento consiste en los AA 479-655 (EC3; sec. con núm. de ident.: 37) de la proteína Her-2, o una secuencia mayor de 97 % idéntica a ella.

65 Los números e intervalos de los AA enumerados anteriormente se basan en la secuencia de Her-2 de rata, para la cual el dominio TM abarca los residuos 656-689. En otra modalidad, las regiones correspondientes de otras proteínas Her-2 (por ejemplo, proteínas Her-2 de otras especies) se determinan por alineamiento de los dominios

TM de las otras proteínas Her-2 y el ajuste de los intervalos de los AA. Por ejemplo, para la variante 2 del transcrito de Her-2 humano, Núm. de acceso al GenBank NM_001005862, las regiones TM abarcan los AA 623-645. Así, en esta modalidad, la región de esta proteína que corresponde a EC3 es aproximadamente los AA 446-622, determinada al sustraer 33 de los números de los AA lo que explica la diferencia de 33 AA en el borde extracelular del dominio TM. Similarmente, la región de esta proteína correspondiente a IC es 646-1037, determinada al sustraer 44 de los números lo que explica la diferencia de 44 AA en el borde intracelular del dominio TM. Las regiones correspondientes de otras proteínas Her-2 pueden determinarse por alineamiento con los extremos de la proteína.

En otra modalidad, el fragmento de una proteína Her-2 de las composiciones y los usos médicos de la presente invención no incluyen un dominio TM de este. En una modalidad, la omisión del TM permite al fragmento de Her-2 expresarse exitosamente en *Listeria*, debido a la alta hidrofobicidad del TM.

"No incluye" se refiere, en una modalidad, a que no incluye más de 1 aminoácido (AA) de la secuencia señal o dominio TM. En otra modalidad, el término se refiere a que no incluye más de 2 AA. En otras modalidades, el término se refiere a que no incluye más de 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, o 30 AA de la secuencia. En otra modalidad, no se incluye ninguna secuencia. En otra modalidad, no se incluye la mayoría de la secuencia. En otras modalidades, no se incluyen al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16, 18, o 20 AA de la secuencia.

En una modalidad, el fragmento N-terminal de LLO usado en las composiciones y usos médicos de la presente invención, es de una LLO de *Listeria*. En una modalidad, la *Listeria* de la que se deriva la LLO es *Listeria monocytogenes* (LM). En otra modalidad, la *Listeria* es *Listeria ivanovii*. En otra modalidad, la *Listeria* es *Listeria welshimeri*. En otra modalidad, la *Listeria* es *Listeria seeligeri*. En otra modalidad, la proteína LLO es una proteína LLO que no es de *Listeria*.

En otra modalidad, la proteína LLO tiene la secuencia:

```

MKKIMLVFITLILVSLPIAQQTEAKDASAFNKENSISSMAPPASPPASPKTPIEKKHADEIDKYI
QGLDYNKNNVLVYHGDAVTNPPRKGKYGKDGNEYIVVEKKKKSINQNNADIQVVNAISSLT
YPGALVKANSELVENQPDVLPVKRDSLTLSDLPGMTNQDNKIVVKNATKSNVNNAVNTLV
ERWNEKYAQAYPNVSAKIDYDDEMAYSESQLIKFGTAFKAVNNSLNVNFGAISEGKMQE
EVISFKQIYYNVNNEPTRPSRFFGKAVTKEQLQALGVNAENPPAYISSVAYGRQVYLKLT
NSHSTKVKAAFDAAVSGKSVSGDVELTNIUKNSSFKAVIYGGSAKDEVQIIDGNLGDRLDILK
KGATFNRETPGVPIAYTTNFKDNELAVIKNNSEYIETTSKAYTDGKINIDHSGGYVAQFNIS
WDEVNYDPEGNEIVQHKNWSENKSKLAHFTSSIYLPGNARNINVYAKECTGLAWEWVRT
VIDDRNLPLVKNRNISIWGTTLYPKYSNKVDNPIE

```

(Núm. de acceso al GenBank P13128; sec. con núm. de ident.: 34; la secuencia de ácido nucleico se expone en el Núm. de acceso al GenBank X15127; sec. con núm. de ident.: 33). Los primeros 25 aminoácidos de la proproteína correspondientes a esta secuencia son la secuencia señal y se escinden de LLO cuando se secreta por la bacteria. Así, en esta modalidad, la proteína LLO activa de longitud completa tiene 504 residuos de largo. En otras modalidades, la proteína LLO tiene una secuencia que se expone en Núm. de acceso al GenBank DQ054588, DQ054589, AY878649, U25452, o U25452. En otra modalidad, la proteína LLO es un homólogo de una proteína LLO.

En otra modalidad, "LLO truncada" o "ΔLLO" se refiere a un fragmento de LLO que comprende el dominio similar a PEST. En otra modalidad, los términos se refieren a un fragmento de LLO que no contiene el dominio de activación en el amino terminal y no incluye la cistina 484. En otra modalidad, el fragmento de LLO consiste de una secuencia PEST. En otra modalidad, el fragmento de LLO comprende una secuencia PEST. En otra modalidad, el fragmento de LLO consiste de aproximadamente los primeros 441 aminoácidos de la proteína LLO. En otra modalidad, el fragmento de LLO es una forma no hemolítica de la proteína LLO.

En una modalidad, el dominio similar a PEST mencionado anteriormente tiene la secuencia que se expone en sec. con núm. de ident.: 42. En otra modalidad, el dominio similar a PEST es cualquier otro dominio similar a PEST conocido en la técnica.

5 En otra modalidad, el fragmento de LLO consiste en aproximadamente los residuos 1-25. En otra modalidad, el fragmento de LLO consiste en aproximadamente los residuos 1-50. En otra modalidad, el fragmento de LLO consiste en aproximadamente los residuos 1-75. En otra modalidad, el fragmento de LLO consiste en aproximadamente los residuos 1-100. En otra modalidad, el fragmento de LLO consiste en aproximadamente los residuos 1-125. En otra modalidad, el fragmento de LLO consiste en aproximadamente los residuos 1-150. En otra modalidad, el fragmento de LLO consiste en aproximadamente los residuos 1-175. En otra modalidad, el fragmento de LLO consiste en aproximadamente los residuos 1-200. En otra modalidad, el fragmento de LLO consiste en aproximadamente los residuos 1-225. En otra modalidad, el fragmento de LLO consiste en aproximadamente los residuos 1-250. En otra modalidad, el fragmento de LLO consiste en aproximadamente los residuos 1-275. En otra modalidad, el fragmento de LLO consiste en aproximadamente los residuos 1-300. En otra modalidad, el fragmento de LLO consiste en aproximadamente los residuos 1-325. En otra modalidad, el fragmento de LLO consiste en aproximadamente los residuos 1-350. En otra modalidad, el fragmento de LLO consiste en aproximadamente los residuos 1-375. En otra modalidad, el fragmento de LLO consiste en aproximadamente los residuos 1-400. En otra modalidad, el fragmento de LLO consiste en aproximadamente los residuos 1-425.

15 En otra modalidad, la presente invención proporciona una vacuna que comprende un polipéptido recombinante de la presente invención.

20 En otra modalidad, la presente invención proporciona una molécula de nucleótidos que codifica un polipéptido recombinante de la presente invención. En otra modalidad, la presente invención proporciona una vacuna que comprende la molécula de nucleótidos.

25 En otra modalidad, la presente invención proporciona una composición inmunogénica que comprende una molécula de nucleótidos o un polipéptido recombinante de la presente invención.

Además, se describe un vector que comprende una molécula de nucleótidos o polipéptido recombinante de la presente invención.

30 En otra modalidad, la presente invención proporciona una forma recombinante de *Listeria* que comprende una molécula de nucleótidos de la presente invención.

En otra modalidad, la presente invención proporciona una vacuna que comprende una forma recombinante de *Listeria* de la presente invención.

35 Además, se describe un cultivo de una forma recombinante de *Listeria* de la presente invención.

40 En otra modalidad, la *Listeria* de los métodos y composiciones de la presente invención es *L. monocytogenes* (LM). En otra modalidad, la *Listeria* es *Listeria ivanovii*. En otra modalidad, la *Listeria* es *Listeria welshimeri*. En otra modalidad, la *Listeria* es *Listeria seeligeri*.

En la presente descripción se describe que la presente invención actúa por la inducción de una respuesta inmune anti-Her-2 en un sujeto.

45 En una modalidad, la proteína de fusión de las composiciones de la presente invención comprende una secuencia señal LLO de LLO. En otra modalidad, las dos moléculas de la proteína (el fragmento de LLO y el antígeno de Her-2) de unen directamente. En otra modalidad, las dos moléculas se unen por un péptido espaciador corto, que consiste de uno o más aminoácidos. En una modalidad, el espaciador no tiene otra actividad biológica específica que unir las proteínas o preservar alguna distancia mínima u otra relación espacial entre ellas. En otra modalidad, los aminoácidos constituyentes del espaciador se seleccionan para influenciar alguna propiedad de la molécula tal como el plegado, la carga neta, o la hidrofobicidad.

50 Como se describe en la presente descripción, administrar a un sujeto un nucleótido recombinante que codifica un polipéptido recombinante que comprende un fragmento N-terminal de una proteína LLO fusionada a un fragmento de la proteína Her-2, de la invención, induce una respuesta inmune anti-Her-2 en el sujeto.

55 En una modalidad, un polipéptido recombinante o un nucleótido recombinante de la presente invención puede administrarse con una forma recombinante de *Listeria* que comprende el nucleótido recombinante o expresa el polipéptido recombinante. En otra modalidad, puede administrarse con un vector bacteriano diferente, o con un vector viral, o con una vacuna de ADN (por ejemplo, una vacuna de ADN desnudo). En otra modalidad, el polipéptido recombinante de la presente invención puede producirse por vía recombinante, y después administrarse a un sujeto.

60 En otra modalidad, la respuesta inmune provocada por las composiciones de la presente invención comprende una respuesta mediada por células T CD8⁺. En otra modalidad, la respuesta inmune consiste fundamentalmente de una

respuesta mediada por células T CD8⁺. En otra modalidad, el único componente detectable de la respuesta inmune es una respuesta mediada por células T CD8⁺.

5 En otra modalidad, la respuesta inmune provocada por las composiciones de la presente invención comprende una respuesta mediada por células T CD4⁺. En otra modalidad, la respuesta inmune consiste fundamentalmente de una respuesta mediada por células T CD4⁺. En otra modalidad, el único componente detectable de la respuesta inmune es una respuesta mediada por células T CD4⁺. En otra modalidad, la respuesta mediada por células T CD4⁺ se acompaña de una respuesta de anticuerpos medible contra el antígeno. En otra modalidad, la respuesta mediada por células T CD4⁺ no se acompaña de una respuesta de anticuerpos medible contra el antígeno.

10 En otra modalidad, la respuesta inmune provocada por las composiciones de la presente invención comprende una respuesta inmune a un epítipo subdominante del antígeno. En una modalidad, la respuesta inmune no comprende una respuesta inmune a un epítipo subdominante. En una modalidad, la respuesta inmune consiste fundamentalmente de una respuesta inmune a un epítipo subdominante. En otra modalidad, el único componente medible de la respuesta es una respuesta inmune a un epítipo subdominante.

15 Los métodos para medir las respuestas inmunes se conocen bien en la técnica, e incluyen, por ejemplo, medir la supresión del crecimiento tumoral (Ejemplos 2, 5, 8, y 9 de la presente descripción), citometría de flujo (FACS; Ejemplo 3), ensayos de lisis de células objetivo (por ejemplo, ensayo de liberación de cromo; Ejemplos 4 y 6), el uso de tetrámeros, y otros.

20 Además, en la presente descripción se describe un método para impedir el crecimiento de un tumor que expresa Her-2 en un sujeto, que comprende administrar al sujeto un polipéptido recombinante que comprende un fragmento N-terminal de una proteína LLO fusionada a la proteína Her-2 o un fragmento de ella o un nucleótido recombinante que codifica el polipéptido recombinante, o una forma recombinante de *Listeria* que comprende el nucleótido recombinante, por lo cual el sujeto desarrolla una respuesta inmune contra el tumor que expresa Her-2, y de ese modo impide el crecimiento de un tumor que expresa Her-2 en un sujeto.

25 En otra modalidad, la presente invención proporciona un polipéptido recombinante de la invención que comprende el fragmento N-terminal de una proteína LLO fusionado a un fragmento de la proteína Her-2, o un nucleótido recombinante que codifica el polipéptido recombinante, para usar en la reducción de un tumor que expresa Her-2 en un sujeto, por lo cual el sujeto desarrolla una respuesta inmune contra el tumor que expresa Her-2, y de ese modo reduce el tumor que expresa Her-2 en un sujeto.

30 Además, en la presente descripción se describe un método para romper la tolerancia inmune de un sujeto a un tumor que expresa Her-2, que comprende administrar al sujeto un polipéptido recombinante que comprende un fragmento N-terminal de una proteína LLO fusionada a la proteína Her-2 o un fragmento de ella o un nucleótido recombinante que codifica el polipéptido recombinante, o una forma recombinante de *Listeria* que comprende el nucleótido recombinante, por lo cual el sujeto desarrolla una respuesta inmune contra el tumor que expresa Her-2, y de ese modo impide el crecimiento de un tumor que expresa Her-2 en un sujeto.

35 En otra modalidad, la presente invención proporciona una forma recombinante de *Listeria* que comprende un nucleótido recombinante, el nucleótido recombinante codifica el polipéptido de la invención, para usar en la reducción de un tumor que expresa Her-2 en un sujeto, por lo cual el sujeto desarrolla una respuesta inmune contra el tumor que expresa Her-2, y de ese modo reduce el tumor que expresa Her-2 en un sujeto.

40 En la presente descripción se menciona, además, que la presente invención proporciona un método para mejorar la antigenicidad de una proteína Her-2, por la fusión de un nucleótido que codifica un fragmento N-terminal de una proteína LLO a un nucleótido que codifica el fragmento de la proteína Her-2 para crear un nucleótido recombinante con antigenicidad mejorada de una proteína Her-2.

45 En otra modalidad, la respuesta inmune anti-Her-2 provocada por las composiciones de la presente invención comprende una primera respuesta inmune contra un epítipo de la proteína Her-2 que está presente en el fragmento y una segunda respuesta inmune a un epítipo de la proteína Her-2 que no está presente en el fragmento, como detalla más aun la presente descripción más abajo.

50 En la presente descripción se describe un método para romper la tolerancia inmune de un sujeto a un tumor que expresa el antígeno, que comprende administrar a un sujeto un polipéptido recombinante que comprende un fragmento N-terminal de una proteína LLO fusionada a un fragmento del antígeno o un nucleótido recombinante que codifica el polipéptido recombinante, en donde el antígeno tiene uno o más epítopos dominantes de las células T CD8⁺ y en donde el fragmento no contiene ninguno de los epítopos dominantes de las células T CD8⁺, por lo cual el sujeto desarrolla una respuesta inmune contra el tumor que expresa el antígeno, y de este modo rompe la tolerancia inmunológica de un sujeto a un tumor que expresa el antígeno.

65 Además, en la presente descripción se describe un método para romper la tolerancia inmune de un sujeto a un

tumor que expresa el antígeno, que comprende administrar al sujeto una forma recombinante de *Listeria* que comprende un nucleótido recombinante, el nucleótido recombinante codifica un fragmento del antígeno, en donde el antígeno tiene uno o más epítomos dominantes de las células T CD8⁺ y en donde el fragmento no contiene ninguno de los epítomos dominantes de las células T CD8⁺, por medio de lo cual el sujeto monta una respuesta inmune contra el tumor que expresa el antígeno, y de ese modo rompe la tolerancia inmunológica de un sujeto a un tumor que expresa el antígeno.

Además En la presente descripción se describe un método para identificar un epítomo de células T CD8⁺ de un antígeno, que comprende las etapas de (a) fundir una molécula de nucleótido que codifica el antígeno a una molécula de nucleótido que codifica un fragmento N-terminal de una proteína LLO, de ese modo crear un nucleótido recombinante y una proteína de fusión LLO-antígeno; (b) administrar la fusión LLO-antígeno a un sujeto; (c) aislar las células T CD8⁺ del sujeto; y (d) determinar el epítomo reconocido por las células T CD8⁺; y de ese modo identificar un epítomo de célula T CD8⁺ de un antígeno. En una modalidad, el epítomo de las células T CD8⁺ es un epítomo subdominante.

"Epítomo dominante de la célula T CD8⁺", en una modalidad, se refiere a un epítomo que reconocen más del 30 % de las células T CD8⁺ específicas por el antígeno que se provocan por la vacunación, infección, o un crecimiento maligno con una proteína o un patógeno o célula de cáncer que contiene la proteína. En otra modalidad, el término se refiere a un epítomo reconocido por más del 35% de las células T CD8⁺ específicas por el antígeno que se provocan de ese modo. En otra modalidad, el término se refiere a un epítomo reconocido por más del 40 % de las células T CD8⁺ específicas por el antígeno. En otra modalidad, el término se refiere a un epítomo reconocido por más del 45% de las células T CD8⁺ específicas por el antígeno. En otra modalidad, el término se refiere a un epítomo reconocido por más del 50 % de las células T CD8⁺ específicas por el antígeno. En otra modalidad, el término se refiere a un epítomo reconocido por más del 55% de las células T CD8⁺ específicas por el antígeno. En otra modalidad, el término se refiere a un epítomo reconocido por más del 60 % de las células T CD8⁺ específicas por el antígeno. En otra modalidad, el término se refiere a un epítomo reconocido por más del 65% de las células T CD8⁺ específicas por el antígeno. En otra modalidad, el término se refiere a un epítomo reconocido por más del 70 % de las células T CD8⁺ específicas por el antígeno. En otra modalidad, el término se refiere a un epítomo reconocido por más del 75 % de las células T CD8⁺ específicas por el antígeno. En otra modalidad, el término se refiere a un epítomo reconocido por más del 80 % de las células T CD8⁺ específicas por el antígeno. En otra modalidad, el término se refiere a un epítomo reconocido por más del 85 % de las células T CD8⁺ específicas por el antígeno. En otra modalidad, el término se refiere a un epítomo reconocido por más del 90 % de las células T CD8⁺ específicas por el antígeno. En otra modalidad, el término se refiere a un epítomo reconocido por más del 95% de las células T CD8⁺ específicas por el antígeno. En otra modalidad, el término se refiere a un epítomo reconocido por más del 96% de las células T CD8⁺ específicas por el antígeno. En otra modalidad, el término se refiere a un epítomo reconocido por más del 97% de las células T CD8⁺ específicas por el antígeno. En otra modalidad, el término se refiere a un epítomo reconocido por más del 98% de las células T CD8⁺ específicas por el antígeno.

"Epítomo subdominante de la célula T CD8⁺", en una modalidad, se refiere a un epítomo que reconocen menos del 30 % de las células T CD8⁺ específicas por el antígeno que se provocan por la vacunación, infección, o crecimiento maligno con una proteína o un patógeno o célula de cáncer que contiene la proteína. En otra modalidad, el término se refiere a un epítomo reconocido por menos del 28 % de las células T CD8⁺ específicas por el antígeno. En otra modalidad, el término se refiere a un epítomo reconocido por más del 26 % de las células T CD8⁺ específicas por el antígeno. En otra modalidad, el término se refiere a un epítomo reconocido por menos del 24 % de las células T CD8⁺ específicas por el antígeno. En otra modalidad, el término se refiere a un epítomo reconocido por más del 22 % de las células T CD8⁺ específicas por el antígeno. En otra modalidad, el término se refiere a un epítomo reconocido por menos del 20 % de las células T CD8⁺ específicas por el antígeno. En otra modalidad, el término se refiere a un epítomo reconocido por más del 18% de las células T CD8⁺ específicas por el antígeno. En otra modalidad, el término se refiere a un epítomo reconocido por menos del 16 % de las células T CD8⁺ específicas por el antígeno. En otra modalidad, el término se refiere a un epítomo reconocido por más del 14 % de las células T CD8⁺ específicas por el antígeno. En otra modalidad, el término se refiere a un epítomo reconocido por más del 12 % de las células T CD8⁺ específicas por el antígeno. En otra modalidad, el término se refiere a un epítomo reconocido por menos del 10 % de las células T CD8⁺ específicas por el antígeno. En otra modalidad, el término se refiere a un epítomo reconocido por más del 8 % de las células T CD8⁺ específicas por el antígeno. En otra modalidad, el término se refiere a un epítomo reconocido por menos del 6% de las células T CD8⁺ específicas por el antígeno. En otra modalidad, el término se refiere a un epítomo reconocido por menos del 5% de las células T CD8⁺ específicas por el antígeno. En otra modalidad, el término se refiere a un epítomo reconocido por más del 4% de las células T CD8⁺ específicas por el antígeno. En otra modalidad, el término se refiere a un epítomo reconocido por menos del 3% de las células T CD8⁺ específicas por el antígeno. En otra modalidad, el término se refiere a un epítomo reconocido por menos del 2 % de las células T CD8⁺ específicas por el antígeno. En otra modalidad, el término se refiere a un epítomo reconocido por menos del 1% de las células T CD8⁺ específicas por el antígeno. En otra modalidad, el término se refiere a un epítomo reconocido por menos del 0,5 % de las células T CD8⁺ específicas por el antígeno.

En otra modalidad, el "epítomo subdominante" se refiere a un epítomo que no se revela por otros métodos de vacunación. Por ejemplo, Ercolini y otros (J Immunol 2003, 170: 4273-4280) vacunaron sujetos con ambas células

tumorales que expresan neu transfectadas con GM-CSF y vaccinia recombinante que expresa Her-2, todavía encontraron un único epítipo dominante, los AA 420-429. En contraste, el uso de las fusiones Δ LLO-Her-2 en los experimentos descritos en la presente descripción revelaron epítipos adicionales además de los AA 420-429. La entrega de las fusiones con LM recombinante revela todavía más epítipos.

5 En otra modalidad, el epítipo dominante o epítipo subdominante es dominante o subdominante, respectivamente, en el sujeto que se trata. En otra modalidad, el epítipo dominante o epítipo subdominante es dominante o subdominante en una población que se trata.

10 En la presente descripción se describe un método para romper la tolerancia inmune de un sujeto a un tumor que expresa el antígeno, en donde el antígeno se expresa a un nivel detectable en una célula no tumoral del sujeto, que comprende administrar a un sujeto un polipéptido recombinante que comprende un fragmento N-terminal de una proteína LLO fusionada al antígeno o fusionada a un fragmento de este o un nucleótido recombinante que codifica el polipéptido recombinante o una forma recombinante de *Listeria* que comprende el nucleótido recombinante, por lo
15 cual el sujeto desarrolla una respuesta inmune contra el tumor que expresa el antígeno, y de este modo rompe la tolerancia inmunológica de un sujeto a un tumor que expresa el antígeno.

"Niveles detectables" se refiere, en una modalidad, a un nivel detectable por un ensayo estándar. En una modalidad, el ensayo es un ensayo inmunológico. En una modalidad, el ensayo es un inmunoensayo ligado a enzimas (ELISA).
20 En otra modalidad, el ensayo es transferencia de tipo Western (Ejemplo 1). En otra modalidad, el ensayo es FACS (Ejemplo 3). En otra modalidad, un nivel detectable se determina en relación al nivel de fondo del ensayo particular. Los métodos para realizar cada una de estas técnicas se conocen bien por aquellos con experiencia en la técnica.

25 El antígeno, en una modalidad, se expresa a un nivel detectable en una célula no tumoral del sujeto. En otra modalidad, el antígeno se expresa a un nivel detectable en al menos un cierto porcentaje (por ejemplo, 0,01 %, 0,03 %, 0,1 %, 0,3 %, 1 %, 2 %, 3 %, o 5 %) de células no tumorales del sujeto. En una modalidad, "célula no tumoral" se refiere a una célula fuera del cuerpo del tumor. En otra modalidad, "célula no tumoral" se refiere a una célula no maligna. En otra modalidad, "célula no tumoral" se refiere a una célula no transformada. En otra modalidad, la célula no tumoral es una célula somática. En otra modalidad, la célula no tumoral es una célula germinal.

30 Además, en la presente descripción se describe un método para inducir una respuesta inmune a un primer epítipo de un antígeno, en un animal que expresa el antígeno en un tumor o un agente infeccioso, por la vacunación del animal con una vacuna que comprende LLO fusionada a un fragmento del antígeno o una *Listeria* recombinante que expresa un fragmento del antígeno, en donde el fragmento usado en la vacunación no incluye el primer epítipo. En
35 su lugar, el fragmento contiene un segundo epítipo del mismo antígeno, contra el cual el animal monta una respuesta inmune. Una respuesta inmune continua contra el tumor o agente infeccioso resulta en el reconocimiento del primer epítipo por extensión de epítipos, como se muestra en la presente descripción.

40 La respuesta inmune al primer epítipo puede iniciarse al menos 2 semanas después de la etapa de administración o después de la conclusión de la etapa de administración. En otra modalidad, el marco de tiempo es 1 semana, o 10 días o 17 días o 3 semanas o 4 semanas.

45 Como se proporciona en la presente descripción, los resultados de la presente invención, además, demostraron que la vacunación con la LM que expresa el antígeno recombinante induce extensión de epítipos. En otra modalidad, la vacunación con fusiones LLO-antígeno, aún fuera del contexto de LM, induce también la extensión de epítipos.

50 Además, en la presente descripción se describe un método para impedir el crecimiento de un tumor que expresa un antígeno en un sujeto, que comprende administrar al sujeto un polipéptido recombinante que comprende un fragmento N-terminal de una proteína LLO fusionada a un fragmento del antígeno o un nucleótido recombinante que codifica el polipéptido recombinante o una forma recombinante de *Listeria* que comprende el nucleótido recombinante, en donde el antígeno tiene uno o más epítipos dominantes de células T CD8⁺ y en donde el fragmento no contiene ningún epítipo dominante de células T CD8⁺, por lo cual el sujeto desarrolla una respuesta inmune contra el tumor que expresa el antígeno, y de este modo impide el crecimiento de un tumor que expresa un antígeno en un sujeto.

55 En esta invención, el antígeno es una proteína Her-2.

60 En otra modalidad, la presente invención actúa por la supresión de la formación de tumores en el huésped. En otra modalidad, la presente invención actúa por la inducción de la formación de células T CD8⁺ que infiltran el tumor en un huésped que tiene cáncer. En otra modalidad, la presente invención actúa por la inducción de la formación de células T citotóxicas en un huésped que tiene cáncer.

65 En una modalidad de la presente invención, la composición es para la administración de las células del sujeto *ex vivo*; en otra modalidad, la composición es para la administración de las células de un donante *ex vivo*; en otra modalidad, la composición es para administrarse a las células del donante *in vivo*, después, transferirse al sujeto.

En una modalidad, el cáncer tratado por una composición de la presente invención es cáncer de mama. En otra modalidad, el cáncer es un melanoma. En otra modalidad, el cáncer es cáncer de páncreas. En otra modalidad, el cáncer es cáncer de ovario. En otra modalidad, el cáncer es cáncer gástrico. En otra modalidad, el cáncer es cáncer una lesión carcinomatosa del páncreas. En otra modalidad, el cáncer es el adenocarcinoma pulmonar. En otra modalidad, el cáncer es el adenocarcinoma colorrectal. En otra modalidad, el cáncer es el adenocarcinoma pulmonar escamoso. En otra modalidad, el cáncer es adenocarcinoma gástrico. En otra modalidad, el cáncer es un neoplasma epitelial de la superficie del ovario (por ejemplo, una variedad benigna, proliferativa o maligna de este). En otra modalidad, el cáncer es un carcinoma de células escamosas de la cavidad oral. En otra modalidad, el cáncer es carcinoma de pulmón de células no pequeñas. En otra modalidad, el cáncer es un carcinoma del endometrio. En otra modalidad, el cáncer es un cáncer de vejiga. En otra modalidad, el cáncer es un cáncer de una cabeza y cuello. En otra modalidad, el cáncer es un carcinoma de próstata.

En otra modalidad de la presente invención, el sujeto monta una respuesta inmune contra el tumor que expresa el antígeno o el antígeno objetivo, de ese modo media los efectos antitumorales.

En otra modalidad, la presente invención proporciona una composición inmunogénica para usar en el tratamiento del cáncer, composición que comprende una fusión de una LLO truncada a una proteína Her-2. En otra modalidad, la composición inmunogénica comprende una cepa de *Listeria* que expresa la fusión.

En una modalidad, un protocolo de tratamiento de la presente invención es terapéutico.

Además, en la presente descripción se describe que el protocolo de tratamiento puede ser profiláctico. Se describe que las vacunas de la presente invención pueden usarse para proteger a personas en riesgo de cáncer debido a la genética familiar u otras circunstancias que los predisponen a ciertos tipos de cánceres, por ejemplo, cáncer cervical en mujeres cuyos esposos tienen el virus del papiloma. En otra modalidad, las vacunas se usan como una inmunoterapia de cáncer después de la reducción del crecimiento tumoral por cirugía, quimioterapia convencional o tratamiento por radiaciones. Después de tales tratamientos, las vacunas de la presente invención pueden administrarse de manera tal que la respuesta CTL al antígeno tumoral de la vacuna destruya las metástasis remanentes y prolongue la remisión del cáncer. En otra modalidad, las vacunas de la presente invención se usan para provocar la regresión de tumores previamente establecidos y matar las células tumorales existentes.

Varias modalidades de intervalos de dosificación se contemplan por esta invención. En una modalidad, en el caso de vectores de vacuna, la dosificación está en el intervalo de 0,001 LD₅₀/dosis. En otra modalidad, la dosificación es 0,002 LD₅₀/dosis. En otra modalidad la dosificación es 0,003 LD₅₀/dosis. En otra modalidad la dosificación es 0,004 LD₅₀/dosis. En otra modalidad la dosificación es 0,006 LD₅₀/dosis. En otra modalidad la dosificación es 0,008 LD₅₀/dosis. En otra modalidad la dosificación es 0,01 LD₅₀/dosis. En otra modalidad la dosificación es 0,02 LD₅₀/dosis. En otra modalidad la dosificación es 0,03 LD₅₀/dosis. En una modalidad, la dosificación es 0,04 LD₅₀/dosis. En otra modalidad, la dosificación es 0,06 LD₅₀/dosis. En otra modalidad, la dosificación es 0,08 LD₅₀/dosis. En otra modalidad, la dosificación es 0,1 LD₅₀/dosis. En otra modalidad, la dosificación es 0,15 LD₅₀/dosis. En otra modalidad, la dosificación es 0,2 LD₅₀/dosis. En otra modalidad, la dosificación es 0,25 LD₅₀/dosis. En otra modalidad, la dosificación es 0,3 LD₅₀/dosis. En otra modalidad, la dosificación es 0,4 LD₅₀/dosis. En otra modalidad, la dosificación es 0,5 LD₅₀/dosis.

En otra modalidad, la dosificación es 10⁷ bacteria/dosis. En otra modalidad, la dosificación es 1,5 x 10⁷ bacteria/dosis. En otra modalidad, la dosificación es 2 x 10⁷ bacteria/dosis. En otra modalidad, la dosificación es 3 x 10⁷ bacteria/dosis. En otra modalidad, la dosificación es 4 x 10⁷ bacteria/dosis. En otra modalidad, la dosificación es 6 x 10⁷ bacteria/dosis. En otra modalidad, la dosificación es 8 x 10⁷ bacteria/dosis. En otra modalidad, la dosificación es 1 x 10⁸ bacteria/dosis. En otra modalidad, la dosificación es 1,5 x 10⁸ bacteria/dosis. En otra modalidad, la dosificación es 2 x 10⁸ bacteria/dosis. En otra modalidad, la dosificación es 3 x 10⁸ bacteria/dosis. En otra modalidad, la dosificación es 4 x 10⁸ bacteria/dosis. En otra modalidad, la dosificación es 6 x 10⁸ bacteria/dosis. En otra modalidad, la dosificación es 8 x 10⁸ bacteria/dosis. En otra modalidad, la dosificación es 1 x 10⁹ bacteria/dosis. En otra modalidad, la dosificación es 1,5 x 10⁹ bacteria/dosis. En otra modalidad, la dosificación es 2 x 10⁹ bacteria/dosis. En otra modalidad, la dosificación es 3 x 10⁹ bacteria/dosis. En otra modalidad, la dosificación es 5 x 10⁹ bacteria/dosis. En otra modalidad, la dosificación es 6 x 10⁹ bacteria/dosis. En otra modalidad, la dosificación es 8 x 10⁹ bacteria/dosis. En otra modalidad, la dosificación es 1 x 10¹⁰ bacteria/dosis. En otra modalidad, la dosificación es 1,5 x 10¹⁰ bacteria/dosis. En otra modalidad, la dosificación es 2 x 10¹⁰ bacteria/dosis. En otra modalidad, la dosificación es 3 x 10¹⁰ bacteria/dosis. En otra modalidad, la dosificación es 5 x 10¹⁰ bacteria/dosis. En otra modalidad, la dosificación es 6 x 10¹⁰ bacteria/dosis. En otra modalidad, la dosificación es 8 x 10¹⁰ bacteria/dosis. En otra modalidad, la dosificación es 1 x 10¹¹ bacteria/dosis. En otra modalidad, la dosificación es 1,5 x 10¹¹ bacteria/dosis. En otra modalidad, la dosificación es 2 x 10¹¹ bacteria/dosis. En otra modalidad, la dosificación es 3 x 10¹¹ bacteria/dosis. En otra modalidad, la dosificación es 5 x 10¹¹ bacteria/dosis. En otra modalidad, la dosificación es 6 x 10¹¹ bacteria/dosis. En otra modalidad, la dosificación es 8 x 10¹¹ bacteria/dosis.

En otra modalidad, en el caso de polipéptidos recombinantes, la dosificación es 1 mg/dosis. En otra modalidad, la dosificación es 1,5 mg/dosis. En otra modalidad, la dosificación es 2 mg/dosis. En otra modalidad, la dosificación es 3 mg/dosis. En otra modalidad, la dosificación es 4 mg/dosis. En otra modalidad, la dosificación es 6 mg/dosis. En otra modalidad, la dosificación es 8 mg/dosis. En otra modalidad, la dosificación es 10 mg/dosis. En otra modalidad, la dosificación es 15 mg/dosis. En otra modalidad, la dosificación es 20 mg/dosis. En otra modalidad, la dosificación es 30 mg/dosis. En otra modalidad, la dosificación es 40 mg/dosis. En otra modalidad, la dosificación es 60 mg/dosis. En otra modalidad, la dosificación es 80 mg/dosis. En otra modalidad, la dosificación es 100 mg/dosis. En otra modalidad, la dosificación es 150 mg/dosis. En otra modalidad, la dosificación es 200 mg/dosis. En otra modalidad, la dosificación es 300 mg/dosis. En otra modalidad, la dosificación es 400 mg/dosis. En otra modalidad, la dosificación es 600 mg/dosis. En otra modalidad, la dosificación es 800 mg/dosis. En otra modalidad, la dosificación es 1000 mg/dosis.

En una modalidad, una vacuna o composición inmunogénica de la presente invención se administra sola a un sujeto. En otra modalidad, la vacuna o composición inmunogénica se administra junto con otra terapia de cáncer.

La *Listeria* recombinante de las composiciones de la presente invención, en una modalidad, se transforma establemente con un constructo que codifica la proteína de fusión LLO-antígeno de Her2. En una modalidad, el constructo contiene un polienlazador para facilitar la subclonación adicional. Se conocen varias técnicas para producir *Listeria* recombinante.

En una modalidad, el constructo o genes heterólogos se integran en el cromosoma de la *Listeria* por medio del uso de recombinación homóloga. Las técnicas para la recombinación homóloga se conocen bien en la técnica, y se describen, por ejemplo, en Baloglu S, Boyle SM, y otros, Immune responses of mice to vaccinia virus recombinants expressing either *Listeria monocytogenes* partial listeriolysin or *Brucella abortus* ribosomal L7/L12 protein. *Vet Microbiol* 2005, 109(1-2): 11-7; y Jiang LL, SongHH, y otros, Characterization of a mutant *Listeria monocytogenes* strain expressing green fluorescent protein. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 2005, 37(1): 19-24. En otra modalidad, la recombinación homóloga se realiza como se describe en la patente de Estados Unidos núm. 6.855.320. En este caso, una cepa de LM recombinante que expresa E7 se hizo por la integración cromosomal del gen E7 bajo el control del promotor hly y con la inclusión de la secuencia señal hly para garantizar la secreción del producto del gen, lo que produce el recombinante denominado como Lm-AZ/E7. En otra modalidad, se usa un plásmido sensible a la temperatura para seleccionar los recombinantes.

En otra modalidad, el constructo o genes heterólogos se integran en el cromosoma de la *Listeria* por medio del uso de la inserción por transposón. Las técnicas para la inserción por transposón se conocen bien en la técnica, y se describen, *inter alia*, por Sun y otros (*Infection and Immunity* 1990, 58: 3770-3778) en la construcción de DP-L967. La mutagénesis por transposón tiene la ventaja, en otra modalidad, de que puede formarse una mutante por inserción genómica estable, pero la desventaja de que la posición en el genoma donde se inserta el gen foráneo es desconocida.

En otra modalidad, el constructo o gen heterólogo se integra en el cromosoma de la *Listeria* por medio del uso de sitios de integración de fagos (Lauer P, Chow MY y otros, Construction, characterization, and use of two *Listeria monocytogenes* site-specific phage integration vectors. *J Bacteriol* 2002;184(15): 4177-86). En ciertas modalidades de este método, se usa un gen de integrasa y un sitio de unión de un bacteriófago (por ejemplo, U153 o listeriofago PSA) para integrar el gen heterólogo en el sitio de unión correspondiente, que puede ser cualquier sitio adecuado en el genoma (por ejemplo, comK o el extremo 3' del gen de ARNt de Arg). En otra modalidad, profagos endógenos se curan a del sitio de unión que se usó antes de la integración del constructo o gen heterólogo. En otra modalidad, este método resulta en integrantes de una sola copia.

En otra modalidad, el constructo se transporta por la cepa de *Listeria* en un plásmido. La clonación del gen en un vector que contiene prfA y el uso de este plásmido para complementar un mutante de *Listeria* prfA(-) se ha usado para construir DP-L2028. DP-L2028 es la cepa de influenza que expresa NP usada en los experimentos de protección del tumor. Un vector LM que expresa una proteína de fusión que expresa E7 además se construyó mediante esta técnica. Lm-GG/E7 se hizo por la complementación de un mutante de delección prfA con un plásmido que contiene una copia del gen prfA y una copia de E7 fusionada a una forma del gen (hly) de LLO truncada para eliminar la actividad hemolítica de la enzima, como se describe en la Patente de los Estados Unidos Núm. 6.565.852. La LLO funcional se mantiene por el organismo mediante la copia cromosomal endógena de hly.

En otras modalidades, se toma uno de varios enfoques para expresar el antígeno tumoral en *Listeria*. En una modalidad, se genera una proteína de fusión del antígeno tumoral seleccionado y una proteína de *Listeria*, tal como PI-PLC, o un constructo que codifica la misma. En otra modalidad, una secuencia señal de una proteína de *Listeria* secretada, tal como hemolisina o fosfolipasa, se funde al gen que codifica el antígeno. En otra modalidad, el constructo se encuentra en la cepa de *Listeria* de forma episomal. En otra modalidad, el antígeno se expresa a partir de un vector hospedado por la cepa de *Listeria* recombinante.

- 5 En otras modalidades, uno de varios promotores se usa para expresar el antígeno o proteína de fusión que contiene el mismo. En una modalidad, se usa un promotor de LM, por ejemplo, promotores para los genes hly, acta, pica, plcB y mpl, que codifican las proteínas de *Listeria hemolisina*, act A, fosfolipasa específica por fosfatidilinositol, fosfolipasa C, y metaloproteasa, respectivamente.
- 10 Los paneles de antígenos son, en una modalidad, útiles en la inmunoterapia del cáncer para compensar el hecho de que variantes del tumor que pierden el antígeno pueden crecer bajo la presión del sistema inmune (Zhang y otros, *Clin cáncer Res* 1998 4: 2669; Kawashima y otros, *Hum Immunol* 1998 59: 1).
- 15 En otra modalidad, las composiciones de la presente invención usan un homólogo de la secuencia de Her-2 o LLO de la presente invención (por ejemplo, sec. con núm. de ident.: 33, 34, 40, 41, 43, y 44). Los términos "homología," "homólogo" etc, cuando hacen referencia a cualquier proteína o péptido, se refieren en una modalidad, a un porcentaje de residuos de aminoácido en la secuencia candidata que son idénticos a los residuos de un polipéptido nativo correspondiente, después de alinear las secuencias e introducir las brechas, si fuera necesario, para alcanzar el máximo porcentaje de homología, y sin considerar ninguna sustitución conservativa como parte de la secuencia de identidad. Los métodos y programas informáticos para el alineamiento se conocen bien en la técnica.
- 20 En esta invención, "homología" se refiere a la identidad de una secuencia seleccionada de las sec. con núm. de ident.: 33, 34, 40, 41, 43, y 44 de más del 97 %. En otra modalidad, la identidad es mayor que 98 % o mayor que 99 %. En otra modalidad, la identidad es 100 %.
- 25 La homología de la proteína y/o el péptido por cualquier secuencia de aminoácidos enumerado en la presente descripción se determina, en una modalidad, por métodos bien descritos en la técnica, lo que incluye el análisis por inmunorevelado, o mediante análisis por algoritmos matemáticos de las secuencias de aminoácidos, por medio de cualquier número de paquetes de programas disponibles, mediante métodos establecidos. Algunos de estos paquetes pueden incluir paquetes FASTA, BLAST, MPsrch o Scansp, y pueden emplear el uso de algoritmos de Smith y Waterman, y/o alineamientos globales/locales o BLOCKS para el análisis, por ejemplo.
- 30 La homología puede determinarse mediante la determinación de la hibridación de la secuencia candidata, cuyos métodos se describen bien en la técnica (ver, por ejemplo, "Nucleic Acid Hybridization" Hames, B. D., y Higgins S. J., Eds. (1985); Sambrook y otros, 2001, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, N.Y.; y Ausubel y otros, 1989, *Current Protocols in Molecular Biology*, Green Publishing Associates y Wiley Interscience, N.Y). Por ejemplo, los métodos de hibridación pueden llevarse a cabo bajo condiciones moderadas a severas, al complemento de un ADN que codifica un péptido de caspasa nativa. Las condiciones de hibridación son, por ejemplo, la incubación durante la noche a 42 °C en una solución que comprende: 10-20 % formamida, 5 X SSC (150 mM NaCl, 15 mM citrato trisódico), 50 mM fosfato sódico (pH 7. 6), 5 X solución de Denhardt, 10 % sulfato de dextrano, y 20 µg/ml ADN de salmón desnaturalizado, cortado.
- 35 En una modalidad de la presente invención, "ácidos nucleicos" se refiere a una cadena de al menos dos combinaciones de base-azúcar-fosfato. El término incluye, en una modalidad, ADN y ARN. "Nucleótidos" se refiere, en una modalidad, a las unidades monoméricas de polímeros de ácidos nucleicos. El ARN puede estar, en una modalidad, en forma de un ARNt (ARN de transferencia), ARNnp (ARN nuclear pequeño), ARNr (ARN ribosomal), ARNm (ARN mensajero), ARN anti-sentido, ARN inhibidor pequeño (ARNip), micro ARN (miARN) y ribozimas. El uso de ARNip y miARN se ha descrito (Caudy AA y otros, *Genes & Devel* 16: 2491-96 y las referencias se citan en ellas). El ADN puede estar en forma de ADN de plásmido, ADN viral, ADN lineal, o ADN cromosomal o derivados de estos grupos. Adicionalmente, estas formas de ADN y ARN pueden ser de simple, doble, triple o cuádruple cadena. El término además incluye, en otra modalidad, ácidos nucleicos artificiales que pueden contener otros tipos de esqueletos pero las mismas bases. En una modalidad, el ácido nucleico artificial es un PAN (péptido ácido nucleico.). Los PAN contienen esqueletos de péptidos y bases nucleotídicas y son capaces de unirse, en una modalidad, a ambas moléculas de ADN y ARN. En otra modalidad, el nucleótido es oxetano modificado. En otra modalidad, el nucleótido se modifica para el reemplazo de uno o más enlaces fosfodiéster con un enlace fosforotioato. En otra modalidad, el ácido nucleico artificial contiene cualquier otra variante del esqueleto fosfato de ácidos nucleicos nativos conocidos en la técnica. El uso de ácidos nucleicos de fosfotiorato y PAN se conoce por aquellos con experiencia en la técnica, y se describe en, por ejemplo, Neilsen PE, *Curr Opin Struct Biol* 9:353-57; y Raz NK y otros *Biochem Biophys Res Commun.* 297:1075-84. La producción y uso de ácidos nucleicos se conoce por los expertos en la técnica y se describe, por ejemplo, en *Molecular Cloning*, (2001), Sambrook y Russell, eds y *Methods in Enzymology: Methods for molecular cloning in eukaryotic cells* (2003) Purchio y G. C. Fareed.
- 40 En una modalidad de la presente invención, "ácidos nucleicos" se refiere a una cadena de al menos dos combinaciones de base-azúcar-fosfato. El término incluye, en una modalidad, ADN y ARN. "Nucleótidos" se refiere, en una modalidad, a las unidades monoméricas de polímeros de ácidos nucleicos. El ARN puede estar, en una modalidad, en forma de un ARNt (ARN de transferencia), ARNnp (ARN nuclear pequeño), ARNr (ARN ribosomal), ARNm (ARN mensajero), ARN anti-sentido, ARN inhibidor pequeño (ARNip), micro ARN (miARN) y ribozimas. El uso de ARNip y miARN se ha descrito (Caudy AA y otros, *Genes & Devel* 16: 2491-96 y las referencias se citan en ellas). El ADN puede estar en forma de ADN de plásmido, ADN viral, ADN lineal, o ADN cromosomal o derivados de estos grupos. Adicionalmente, estas formas de ADN y ARN pueden ser de simple, doble, triple o cuádruple cadena. El término además incluye, en otra modalidad, ácidos nucleicos artificiales que pueden contener otros tipos de esqueletos pero las mismas bases. En una modalidad, el ácido nucleico artificial es un PAN (péptido ácido nucleico.). Los PAN contienen esqueletos de péptidos y bases nucleotídicas y son capaces de unirse, en una modalidad, a ambas moléculas de ADN y ARN. En otra modalidad, el nucleótido es oxetano modificado. En otra modalidad, el nucleótido se modifica para el reemplazo de uno o más enlaces fosfodiéster con un enlace fosforotioato. En otra modalidad, el ácido nucleico artificial contiene cualquier otra variante del esqueleto fosfato de ácidos nucleicos nativos conocidos en la técnica. El uso de ácidos nucleicos de fosfotiorato y PAN se conoce por aquellos con experiencia en la técnica, y se describe en, por ejemplo, Neilsen PE, *Curr Opin Struct Biol* 9:353-57; y Raz NK y otros *Biochem Biophys Res Commun.* 297:1075-84. La producción y uso de ácidos nucleicos se conoce por los expertos en la técnica y se describe, por ejemplo, en *Molecular Cloning*, (2001), Sambrook y Russell, eds y *Methods in Enzymology: Methods for molecular cloning in eukaryotic cells* (2003) Purchio y G. C. Fareed.
- 45 El ADN puede estar en forma de ADN de plásmido, ADN viral, ADN lineal, o ADN cromosomal o derivados de estos grupos. Adicionalmente, estas formas de ADN y ARN pueden ser de simple, doble, triple o cuádruple cadena. El término además incluye, en otra modalidad, ácidos nucleicos artificiales que pueden contener otros tipos de esqueletos pero las mismas bases. En una modalidad, el ácido nucleico artificial es un PAN (péptido ácido nucleico.). Los PAN contienen esqueletos de péptidos y bases nucleotídicas y son capaces de unirse, en una modalidad, a ambas moléculas de ADN y ARN. En otra modalidad, el nucleótido es oxetano modificado. En otra modalidad, el nucleótido se modifica para el reemplazo de uno o más enlaces fosfodiéster con un enlace fosforotioato. En otra modalidad, el ácido nucleico artificial contiene cualquier otra variante del esqueleto fosfato de ácidos nucleicos nativos conocidos en la técnica. El uso de ácidos nucleicos de fosfotiorato y PAN se conoce por aquellos con experiencia en la técnica, y se describe en, por ejemplo, Neilsen PE, *Curr Opin Struct Biol* 9:353-57; y Raz NK y otros *Biochem Biophys Res Commun.* 297:1075-84. La producción y uso de ácidos nucleicos se conoce por los expertos en la técnica y se describe, por ejemplo, en *Molecular Cloning*, (2001), Sambrook y Russell, eds y *Methods in Enzymology: Methods for molecular cloning in eukaryotic cells* (2003) Purchio y G. C. Fareed.
- 50 En una modalidad de la presente invención, "ácidos nucleicos" se refiere a una cadena de al menos dos combinaciones de base-azúcar-fosfato. El término incluye, en una modalidad, ADN y ARN. "Nucleótidos" se refiere, en una modalidad, a las unidades monoméricas de polímeros de ácidos nucleicos. El ARN puede estar, en una modalidad, en forma de un ARNt (ARN de transferencia), ARNnp (ARN nuclear pequeño), ARNr (ARN ribosomal), ARNm (ARN mensajero), ARN anti-sentido, ARN inhibidor pequeño (ARNip), micro ARN (miARN) y ribozimas. El uso de ARNip y miARN se ha descrito (Caudy AA y otros, *Genes & Devel* 16: 2491-96 y las referencias se citan en ellas). El ADN puede estar en forma de ADN de plásmido, ADN viral, ADN lineal, o ADN cromosomal o derivados de estos grupos. Adicionalmente, estas formas de ADN y ARN pueden ser de simple, doble, triple o cuádruple cadena. El término además incluye, en otra modalidad, ácidos nucleicos artificiales que pueden contener otros tipos de esqueletos pero las mismas bases. En una modalidad, el ácido nucleico artificial es un PAN (péptido ácido nucleico.). Los PAN contienen esqueletos de péptidos y bases nucleotídicas y son capaces de unirse, en una modalidad, a ambas moléculas de ADN y ARN. En otra modalidad, el nucleótido es oxetano modificado. En otra modalidad, el nucleótido se modifica para el reemplazo de uno o más enlaces fosfodiéster con un enlace fosforotioato. En otra modalidad, el ácido nucleico artificial contiene cualquier otra variante del esqueleto fosfato de ácidos nucleicos nativos conocidos en la técnica. El uso de ácidos nucleicos de fosfotiorato y PAN se conoce por aquellos con experiencia en la técnica, y se describe en, por ejemplo, Neilsen PE, *Curr Opin Struct Biol* 9:353-57; y Raz NK y otros *Biochem Biophys Res Commun.* 297:1075-84. La producción y uso de ácidos nucleicos se conoce por los expertos en la técnica y se describe, por ejemplo, en *Molecular Cloning*, (2001), Sambrook y Russell, eds y *Methods in Enzymology: Methods for molecular cloning in eukaryotic cells* (2003) Purchio y G. C. Fareed.
- 55 En una modalidad de la presente invención, "ácidos nucleicos" se refiere a una cadena de al menos dos combinaciones de base-azúcar-fosfato. El término incluye, en una modalidad, ADN y ARN. "Nucleótidos" se refiere, en una modalidad, a las unidades monoméricas de polímeros de ácidos nucleicos. El ARN puede estar, en una modalidad, en forma de un ARNt (ARN de transferencia), ARNnp (ARN nuclear pequeño), ARNr (ARN ribosomal), ARNm (ARN mensajero), ARN anti-sentido, ARN inhibidor pequeño (ARNip), micro ARN (miARN) y ribozimas. El uso de ARNip y miARN se ha descrito (Caudy AA y otros, *Genes & Devel* 16: 2491-96 y las referencias se citan en ellas). El ADN puede estar en forma de ADN de plásmido, ADN viral, ADN lineal, o ADN cromosomal o derivados de estos grupos. Adicionalmente, estas formas de ADN y ARN pueden ser de simple, doble, triple o cuádruple cadena. El término además incluye, en otra modalidad, ácidos nucleicos artificiales que pueden contener otros tipos de esqueletos pero las mismas bases. En una modalidad, el ácido nucleico artificial es un PAN (péptido ácido nucleico.). Los PAN contienen esqueletos de péptidos y bases nucleotídicas y son capaces de unirse, en una modalidad, a ambas moléculas de ADN y ARN. En otra modalidad, el nucleótido es oxetano modificado. En otra modalidad, el nucleótido se modifica para el reemplazo de uno o más enlaces fosfodiéster con un enlace fosforotioato. En otra modalidad, el ácido nucleico artificial contiene cualquier otra variante del esqueleto fosfato de ácidos nucleicos nativos conocidos en la técnica. El uso de ácidos nucleicos de fosfotiorato y PAN se conoce por aquellos con experiencia en la técnica, y se describe en, por ejemplo, Neilsen PE, *Curr Opin Struct Biol* 9:353-57; y Raz NK y otros *Biochem Biophys Res Commun.* 297:1075-84. La producción y uso de ácidos nucleicos se conoce por los expertos en la técnica y se describe, por ejemplo, en *Molecular Cloning*, (2001), Sambrook y Russell, eds y *Methods in Enzymology: Methods for molecular cloning in eukaryotic cells* (2003) Purchio y G. C. Fareed.
- 60 Los términos "poner en contacto" o "administrar," en una modalidad, se refieren a poner en contacto directamente la célula de cáncer o tumor con una composición de la presente invención. En otra modalidad, los términos se refieren a poner en contacto indirectamente la célula de cáncer o tumor con una composición de la presente invención. En otra modalidad, la presente invención incluye tratamientos en los cuales el sujeto se pone en contacto con una composición de la presente invención después de lo que la composición se pone en contacto con la célula de cáncer

o tumor por difusión o por cualquier otro proceso de transporte activo o de transporte pasivo conocido en la técnica por el cual los compuestos circulan dentro del cuerpo.

Composiciones farmacéuticas

En otra modalidad, las composiciones farmacéuticas que contienen vacunas y las composiciones de la presente invención pueden formularse para administrarse a un sujeto por cualquier ruta conocida por una persona con experiencia en la técnica, tal como por vía parenteral, paracanceral, transmucosa, transdérmica, intramuscular, intravenosa, intradérmica, subcutánea, intraperitoneal, intraventricular, intracraneal, intravaginal o intratumoral.

En otra modalidad de la presente invención, las vacunas o composiciones son para administrar por vía oral, y por lo tanto se formulan de una manera adecuada para la administración oral, es decir, como una preparación sólida o líquida. Las formulaciones orales sólidas adecuadas incluyen tabletas, cápsulas, píldoras, gránulos, bolitas y similares. Las formulaciones orales líquidas adecuadas incluyen, soluciones, suspensiones, dispersiones, emulsiones, aceites y similares. En otra modalidad de la presente invención, el ingrediente activo se formula en una cápsula. De acuerdo con esta modalidad, las composiciones de la presente invención comprenden, además del compuesto activo y el portador o diluyente inerte, una cápsula de gelatina dura.

En otra modalidad, las vacunas o composiciones se administran por inyección intravenosa, intraarterial, o intramuscular de una preparación líquida. Las formulaciones líquidas adecuadas incluyen soluciones, suspensiones, dispersiones, emulsiones, aceites y similares. En una modalidad, las composiciones farmacéuticas son para administrar por vía intravenosa y por lo tanto se formulan en una forma adecuada para la administración intravenosa. En otra modalidad, las composiciones farmacéuticas son para administrar por vía intraarterial y por lo tanto se formulan en una forma adecuada para la administración intraarterial. En otra modalidad, las composiciones farmacéuticas son para administrar por vía intramuscular y por lo tanto se formulan en una forma adecuada para la administración intramuscular.

En una modalidad, el término "tratar" se refiere a curar una enfermedad. En otra modalidad, "tratar" se refiere a prevenir una enfermedad. En otra modalidad, "tratar" se refiere a reducir la incidencia de una enfermedad. En otra modalidad, "tratar" se refiere a mejorar los síntomas de una enfermedad. En otra modalidad, "tratar" se refiere a inducir la remisión. En otra modalidad, "tratar" se refiere a ralentizar la progresión de una enfermedad. Los términos "reducir", "suprimir" e "inhibir" se refieren en otra modalidad a la disminuir o reducir.

Dado que los siguientes ejemplos no se relacionan a un polipéptido recombinante que comprende el fragmento N-terminal de la proteína LLO fusionado a un fragmento de un antígeno de Her-2, para inducir la regresión de células tumorales establecidas que expresan Her-2, estos son ejemplos comparativos.

SECCIÓN DE DETALLES EXPERIMENTALES

EJEMPLO 1

GENERACIÓN DE CEPAS DE *L. MONOCYTOGENES* QUE SECRETAN FRAGMENTOS DE LLO FUSIONADOS A FRAGMENTOS DE HER-2

MATERIALES Y MÉTODOS EXPERIMENTALES

Subclonación

pGG-55, el esqueleto del constructo Her-2 de *Listeria* usado en los Ejemplos, se creó a partir de pAM401. pAM401, un vector lanzadera capaz de replicarse tanto en bacterias gram⁺ como gram⁻, contiene un gen de resistencia a cloranfenicol de gram⁺ y un gen de resistencia a tetraciclina de gram⁻ (Wirth, R y otros, J Bacteriol, 165: 831, 1986). Para producir pGG-55, un gen de fusión *hly*- HPV 16 E7 (que incluye el promotor *hly* y la porción de *hly* que codifica los primeros 441 aminoácidos de LLO; denominada más abajo como "ΔLLO") y el gen del factor de transcripción pluripotente, *prfa* (factor regulatorio positivo de la expresión de listeriolisina) se clonaron en pAM401 (Figura 1).

Cada cepa de *L. monocytogenes* (LM) Lm-ΔLLO-EC1, Lm-ΔLLO-EC2, Lm-ΔLLO-EC3, Lm-ΔLLO-IC1, y Lm-ΔLLO-IC2 contiene un plásmido que expresa un fragmento de Her-2 de rata fusionado al gen *Listerial hly*. Los siguientes fragmentos superpuestos de los dominios extracelular e intracelular de Her-2 se clonan en el plásmido pGG-55: pares de bases (pb) 74-994, (Lm-ΔLLO-EC1; que corresponden a los AA 20-326 de Her-2), 923-1519 (Lm-ΔLLO-EC2; que corresponden a los AA 303-501), 1451-1981 (Lm-ΔLLO-EC3; que corresponden a los AA 479-655), 2084-3259 (Lm-ΔLLO-IC1; que corresponden a los AA 690-1081), y 3073-3796 (Lm-ΔLLO-IC2; que corresponden a los AA 1020-1255). Los fragmentos se representan en la Figura 2A. Las LD₅₀ de EC1, EC2, EC3, IC1, y IC2 fueron 1 x 10⁸, 1 x 10⁹, 5 x 10⁸, 1 x 10⁸, y 1 x 10⁸, respectivamente.

Cada fragmento de Her-2 se amplificó por PCR a partir del plásmido pNINA, que contiene el gen Her-2 de rata de

longitud completa, mediante el uso de los siguientes iniciadores. Los sitios de restricción (XhoI en el caso de los iniciadores 5' de EC1, IC1, y IC2 ; SpeI para los iniciadores 3'; y Sall para los iniciadores 5' de EC2 y EC3) se subrayan, y la secuencia etiqueta FLAG en EC2 y EC3 los iniciadores 3' se indican por cursiva:

5 **EC1:** iniciador 5': CACGCGGATGAAATCGATAAGCTCGAGCCCCCGGAATCGCGGGCAC (sec. con núm. de ident.: 1); iniciador 3': CCGGACTAGTGACCTCTTGGTTATTCGGGGACACACC (sec. con núm. de ident.: 2).

10 **EC2:** iniciador 5': CCGGGTCGACTGCCCCTACAACCTACCTGTCTACG (sec. con núm. de ident.: 3); iniciador 3': CCGGACTAGTTTACTTGTATCGTCGTCTTGTAGTCCCCAC TGTGGAGCAGGGCCTG (sec. con núm. de ident.: 4);

15 **EC3:** iniciador 5': CCGGGTCGACTGCTTTGTACACACTGTACCTTGG (sec. con núm. de ident.: 5); iniciador 3': CCGGACTAGTTTACTTGTATCGTCGTCTTGTAGTCC GGGCTGGCTCTCTGCTCTGC (sec. con núm. de ident.: 6);

20 **IC1 :** iniciador 5': CCGGCTCGAGTATACGATGCGTAGGCTGCTGCAGG (sec. con núm. de ident.: 7); 3' primer: CCGGACTAGTAGCCAGTGGAGATCTGGGGGGCCC (sec. con núm. de ident.: 8); **IC2:** iniciador 5': CCGGCTCGAGGGGTGACCTGGTAGACGCTGAAG (sec. con núm. de ident.: 9) Y iniciador 3': CCGGACTAGTTACAGGTACATCCAGGCCTAGG (sec. con núm. de ident.: 10).

25 Los fragmentos se amplificaron por PCR y se clonaron en el sistema de expresión pCR 2,1 (Invitrogen, Carlsbad, CA), y después se cortaron con las enzimas delineadas. El gen E7 se cortó del plásmido pGG-55 mediante el uso de *Xho I* y *Spe I*, después el fragmento Her-2 se fusionó y se ligó en el sitio E7 (los extremos digeridos por *Sal I* son compatibles con los extremos *XhoI*). XFL-7, una cepa de LM negativa a *prfA* (Gunn GR y otros, J Immunol 167: 647, 2001) se transfectó con los plásmidos por electroporación.

Bacterias

30 Las bacterias se cultivaron en medio de infusión cerebro corazón (BD, Sparks, MD) con 50 µg/ml de cloranfenicol y se congelaron en alícuotas de 1 ml a -80°C.

Transferencia de tipo Western

35 Las cepas que expresan ΔLLO-Her-2 crecieron durante la noche a 37°C en medio Luria-Bertani (LB) con 50 microgramos por mililitro (µg/ml) de cloranfenicol. Los sobrenadantes se precipitaron con TCA y se resuspendieron en amortiguador de muestra 1X LDS (Invitrogen, San Diego, CA). 15 microlitros (µl) de cada muestra se cargaron en un gel 4-12 % Bis-Tris SDS-PAGE (Invitrogen, San Diego, CA). Los geles se transfirieron a una membrana Immobilon-P de fluoruro de polivinilideno (Millipore, Billerica, MA) y se revelaron con un suero policlonal de conejo que reconoce los residuos 1-30 de LLO, seguido por un anticuerpo anti-conejo conjugado a HRP (Amersham Pharmacia Biotech, UK).

Análisis estadístico

45 El análisis estadístico se realizó por medio de la prueba de Studen a lo largo de los Ejemplos.

Resultados

50 Se construyeron cinco cepas de LM recombinantes que expresan y secretan fragmentos superpuestos del gen de Her-2 de rata fusionado a la porción N-terminal de la proteína LLO de *L monocytogenes* (Figura 2A). La secuencia señal y el dominio de transmembrana de Her-2 no se incluyeron dentro de los fragmentos debido a su hidrofobicidad y la incapacidad de LM de secretar dominios extremadamente hidrofóbicos. La secreción de cada fragmento de Her-2 se confirmó por transferencia de tipo Western (Figura 2B). Los pesos moleculares de las proteínas Lm-ΔLLO-EC1 Lm-ΔLLO-EC2 Lm-ΔLLO-EC3, Lm-ΔLLO-IC1, y Lm-ΔLLO-IC2 fueron 83, 70, 68, 92,5, y 74-kDa (kilodalton), respectivamente. Las cepas estaban atenuadas en relación a la cepa silvestre 10403S, exhibieron virulencias comparables a Lm-ΔLLO-E7; específicamente 1×10^8 , 5×10^8 , 1×10^9 , 1×10^8 , y 1×10^8 unidades formadoras de colonias (UFC), respectivamente.

EJEMPLO 2

60 **LA VACUNACIÓN CON CONSTRUCTOS LLO-HER-2 DETIENE Y REVIERTE EL CRECIMIENTO DE TUMORES QUE EXPRESAN HER-2**

MATERIALES Y MÉTODOS EXPERIMENTALES

65 **Ratones**

Ratones FVB/N hembras de seis a ocho semanas se adquirieron de Charles River Laboratories (Wilmington, MA).

Líneas celulares

5 La línea celular de tumor NT-2 singénica para FVB/N, derivada de tumores mamarios que se producen espontáneamente en un ratón FVB/N transgénico para Her-2 (Reilly RT y otros, Canc Res 60: 3569, 2000), expresa constitutivamente niveles bajos de Her-2 de rata y es tumorigénica en ratones singénicos silvestres. Las células NT-2 se cultivaron en medio RPMI 1640 con 20 % de FCS, 10,2 mM de HEPES, 2 milimolar (mM) de L-glutamina, 100 micromolar (μ M) de aminoácidos no esenciales, 1 mM de piruvato sódico, 50 U (unidades)/ml de penicilina G, 50 μ g/ml de estreptomycin, 20 μ g/ml de insulina, y 2 μ g/ml de gentamicina a 37° C con 5 % de CO₂.

Condiciones Experimentales

15 Ratones FVB/N de 6-8 semanas (n=8) se inyectaron subcutáneamente en el flanco derecho con 2×10^6 células tumorales NT-2 en 200 μ l de PBS. Siete días después de la inoculación del tumor, se observaron tumores palpables de 4-5 mm, después de lo cual los ratones se inyectaron por vía intraperitoneal con LM recombinante o PBS en los días 7, 14, y 21. El diámetro de superficie más corto y más largo de los tumores se midió cada 2 días con el calibrador. Los ratones se sacrificaron si alcanzaban el punto en el cual el diámetro medio del tumor alcanzaba los 20 mm.

Resultados

25 Las cepas de LM que expresan fusiones Δ LLO-Her-2 se compararon al PBS y a Lm- Δ LLO-E7 (controles negativos) por su capacidad de inducir inmunidad contra y la reducción de tumores compuestos por la línea tumoral de rata que expresa Her-2, NT-2. Los ratones FVB/N se inyectaron con tumores NT-2, y después, en los días 7, 14, y 21 posteriores a la inoculación del tumor, se administraron 0,1 LD₅₀ de LM recombinante o PBS. La inyección de LM que expresa las fusiones Δ LLO-Her-2 detuvo el crecimiento tumoral después de la primera inyección (Figuras 2A y B); la detención del crecimiento tumoral continuó hasta el último momento, más de nueve semanas después de la última vacunación con Her-2. Además, se observó posteriormente una regresión completa del tumor en tres de 8 de los ratones Lm- Δ LLO-EC2 y Lm- Δ LLO-EC3 y 1 de 8 de los ratones Lm- Δ LLO-EC1 y Lm- Δ LLO-IC1. Ratones adicionales a los cinco grupos Δ LLO-Her-2 exhibieron una reducción en el tamaño tumoral. Como se esperaba, los tumores crecieron continuamente en los ratones inyectados con PBS y Lm- Δ LLO-E7.

35 Estos descubrimientos demostraron que las fusiones de un fragmento LLO a Her-2 son capaces de provocar inmunidad contra tumores que expresan Her-2. Estos descubrimientos indican, además, que la inmunidad provocada (a) es suficientemente fuerte para inducir la regresión completa de más del 75 % de los tumores que expresan Her-2 establecidos; y (b) dura más del curso de al menos varios meses.

EJEMPLO 3

LA RESPUESTA INMUNE INDUCIDA POR LA VACUNA LM-LLO-HER-2 INCLUYE CÉLULAS T CD8⁺

MATERIALES Y MÉTODOS EXPERIMENTALES

Reducción de célula T CD8⁺

50 Las células T CD8⁺ se redujeron por la inyección con 0,5 mg del anticuerpo anti-CD8 2.43 (Sarmiento M y otros, J Immunol 125(6): 2665-72, 1980) en los días 6, 7, 8, 11, 14, 17, 20, y 23 después de la inyección del tumor. Las poblaciones de células T CD8⁺ se redujeron en más del 95 % según se midió por el análisis de citometría de flujo en el día 24.

Análisis citométrico de flujo

55 Se realizó citometría de flujo de tres colores para CD8 (53-6,7, conjugado a FITC), ligando CD62 (Mel-14, conjugado a APC) (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA), y tetrámero Her-2 H-2^q (conjugado a PE) mediante el uso del citómetro de flujo FACSCalibur con el programa CellQuest (Becton Dickinson, San Jose, CA). Los tetrámeros, proporcionados por la NIAID Tetramer Core Facility de la Universidad de Emory y el NIH AIDS Research and Reference Reagent Program, se cargaron con un péptido PDSLRLDSVF específico de H-2^q. Los esplenocitos se tiñeron a temperatura ambiente (ta) con el tetrámero durante una hora (hr) a la dilución 1:200, después a 4° C con los anticuerpos anti-CD8 y anti-CD62L durante 30 minutos (min). El subconjunto CD8⁺, CD62L^{inferior} se seleccionó ("encerró"), y los porcentajes de células tetrámero⁺ se compararon mediante el uso del programa FlowJo (Tree Star, Inc, Ashland, OR).

Resultados

5 Para determinar el tipo de célula T que mediaba las respuestas inmunes anti-Her-2 observadas, las células T CD8⁺ de los ratones FVB/N con tumores NT-2 se redujeron, lo que comenzó 1 día antes de la vacunación con vacunas Lm-ΔLLO-Her-2, y después se vacunaron como se describió en el Ejemplo 2. En los ratones CD8⁺ inyectados, cada una de las vacunas Lm-ΔLLO-Her-2 perdió eficacia (Figuras 3A y B); mientras que en los ratones no-reducidos, el crecimiento del tumor se controló, como se observó en el Ejemplo 2.

10 El análisis de tetrámeros se usó a continuación para confirmar los resultados anteriores. Ratones FVB/N de 6-8 semanas que no portaban tumor se inmunizaron ya sea con PBS o 0,1 LD₅₀ Lm-ΔLLO-EC2 y se reactivaron 21 días más tarde. Los esplenocitos se recolectaron 5 días después de la reactivación y se tiñeron con un tetrámero H-2^q específico por el epítipo definido por los aminoácidos 420-429 (PDSLRDLVF). Se observó un aumento de tres veces en las células positivas para el tetrámero en los ratones vacunados con Lm-ΔLLO-EC2 (Figura 5).

15 Estos resultados muestran que las células T CD8⁺ participan en la inmunidad provocada por las vacunas de fusión LLO-Her-2.

EJEMPLO 4

20 **LAS VACUNAS DE FUSIÓN LLO-HER-2 INDUCEN RESPUESTAS INMUNES CONTRA EPÍTOPOS SUBDOMINANTES DE LAS CÉLULAS T CD8⁺**

MATERIALES Y MÉTODOS EXPERIMENTALES

Células

25 Las células NIH 3T3, una línea de fibroblastos de ratón, se obtuvieron de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC). Las NIH 3T3 y todas las células derivadas se cultivaron en DMEM suplementado con 10 % de FCS, 2 mM de L-glutamina, 100 μM de aminoácidos no esenciales, 1 mM de piruvato sódico, 50 U/ml de penicilina G, y 50 μg/ml de estreptomomicina. El medio de cultivo para las líneas 3T3-neu se complementó con 1 mg/ml de G418. Las células se cultivaron a 37° C con 5 % de CO₂.

Líneas 3T3-Her-2

35 En resumen, las células 3T3 silvestres se transdujeron con fragmentos superpuestos del gen Her-2 de rata, lo que creó nueve líneas 3T3 fragmento Her-2, y una línea 3T3 que expresa el Her-2 de rata de longitud completa. Los fragmentos Her-2 se crearon mediante el uso de los siguientes iniciadores de PCR:

40 Fragmento 1 (pb 1-508): 5'-CCGGGCCGAATTCGCAATGATC (sec. con núm. de ident.: 11) y 3'-CCCCGAATTCCTACTGAGGGTCCCACGGATCAA (sec. con núm. de ident.: 12).

Fragmento 2 (pb 458-886): 5'-GACATGAAGTTGCGGCTCCCTAGTCTCACAGAGATCCTGAAG (sec. con núm. de ident.: 13) y 3'-CCCCGAATTCCTACTCAGGGTTGTGCATGGACTC (sec. con núm. de ident.: 14).

45 Fragmento 3 (pb 836-1294): 5'-GACATGAAGTTGCGGCTCCCTGCCCTCGTCACTACAACACA (sec. con núm. de ident.: 15) y 3'-CCCCGAATTCCTAGAGGTCACGGAGACTGTCTGG (sec. con núm. de ident.: 16).

Fragmento 4 (pb 1244-1675): 5'-GACATGAAGTTGCGGCTCCCTATCACAGGTTACCTGTACATC (sec. con núm. de ident.: 17) y 3'-CCCCGAATTCCTACTTCCATACTCGGCACTCCTC (sec. con núm. de ident.: 18).

50 Fragmento 5 (pb 1607-2077): 5'-GACATGAAGTTGCGGCTCCCTACCCAGTGTGTCAACTGCAGT (sec. con núm. de ident.: 19) y 3'-CCCCGGTACCCTAGATCTTCTGTCTCCTTCGTTT (sec. con núm. de ident.: 20).

Fragmento 6 (pb 2009-2476): 5'-GACATGAAGTTGCGGCTCCCTGGCGTCTGCTGTTCTGATC (sec. con núm. de ident.: 21) y 3'-CCCCGGTACCCTAACCTCGGTGTTCTCGGACATG (sec. con núm. de ident.: 22).

55 Fragmento 7 (pb 2405-2872), 5'-GACATGAAGTTGCGGCTCCCTTCCACAGTACAGCTGGTGACA (sec. con núm. de ident.: 23) y 3'-CCCCGGTACCCTAGCAGATTGGAGGCTGAGGTAG (sec. con núm. de ident.: 24).

60 Fragmento 8 (pb 2801-3271), 5'-GACATGAAGTTGCGGCTCCCTGATGGAATCCCAGCCCGGGAG (sec. con núm. de ident.: 25) y 3'-CCCCGGTACCCTACCCTTCCGAGGGAGCCAGTGG (sec. con núm. de ident.: 26).

Fragmento 9 (pb 3203-3796), 5'-GACATGAAGTTGCGGCTCCCTGAGCTGACACTGGGCCTGGAG (sec. con núm. de ident.: 27) y 3'-CCCCGGTACCCTATACAGGTACATCCAGGCCTAG (sec. con núm. de ident.: 28).

65 Fragmentos 1-9 abarcan los aminoácidos 1-165, 148-291, 274-426, 410-553, 531-687, 655-820, 797-952, 929-1085,

1063-1255 de Her-2, respectivamente. Cada fragmento se ligó dentro del vector de transfección de mamíferos pcADN3.1, que contiene un promotor de citomegalovirus (CMV) (Invitrogen, Carlsbad, CA), en el sitio de multiclonación. Los constructos se transfirieron en las células 3T3 mediante el uso de electroporación. (20 µg/1 x 10⁷ células) o Lipofectamina (1,5 µg/3 x 10⁵ células; Life Technologies). Se aislaron varios clones para cada fragmento por dilución limitante. La expresión de los fragmentos Her-2 en los clones se determinó por RT-PCR.

Ensayo de liberación de cromo

Los ratones FVB/N se inmunizaron con 0,1 LD₅₀ de cada una de las vacunas Lm-ΔLLO-Her-2. Los esplenocitos se recolectaron 9 días más tarde y se cultivaron por cuatro días con células tumorales NT-2 irradiadas (20.000 rads) en una relación 100:1 de esplenocitos a células tumorales con 20 U/ml de IL-2 (Roche, Indianapolis, IN). Los esplenocitos se usaron después como células efectoras en un ensayo de liberación de cromo ⁵¹estándar. Las células objetivo se marcaron con cromo 51 (Cr⁵¹) y se cultivaron cuatro por días con los esplenocitos a relaciones efector:objetivo de 200:1, 100:1, 50:1, y 25:1 por triplicado. A continuación de la incubación, 100 µl de sobrenadante se ensayaron para la liberación de Cr⁵¹. El porcentaje de lisis específica se determinó como [(conteos experimentales por minuto - conteos espontáneos por minuto)/(conteos totales por minuto - conteos espontáneos por minuto)] x 100. "Conteos totales por minuto" se refiere al número total de conteos en la población celular objetivo, medidos al lisar las células después del marcaje y el conteo del marcador. En otras palabras, esta es la cantidad de Cr ⁵¹máxima que puede liberarse.

Resultados

Los ensayos de CTL se realizaron para confirmar que cada una de las vacunas Lm-ΔLLO-Her-2 provocan respuestas inmunes de célula T CD8⁺ anti-Her-2. Los ratones se vacunaron con cada una de las vacunas de fusión ΔLLO-Her-2, y los esplenocitos se aislaron y probaron por la capacidad de inducir la lisis, medida por el ensayo de liberación de Cr⁵¹, de células 3T3 transducidas con el Her-2 de longitud completa de rata (B), mediante el uso de células 3T3 silvestres como un control negativo (A). Cada vacuna indujo una respuesta CTL anti-Her-2 CTL, como se evidenció por los niveles significativos de lisis a las relaciones E:O de 200:1 o 100:1. Los esplenocitos de ratones vacunados con PBS, un control negativo adicional, indujeron solamente niveles de fondo de lisis (Figura 6). Estos descubrimientos proporcionan evidencia adicional de que las vacunas de fusión ΔLLO-Her-2 inducen respuestas inmunes CTL anti-Her-2.

Para delinear los epítomos reconocidos por los CTL provocados por cada vacuna, se usó un panel de células 3T3 que expresan cada uno de los 9 fragmentos de Her-2 como células objetivo en el ensayo de lisis descrito anteriormente, a continuación de la vacunación con la vacuna de fusión ΔLLO-Her-2 correspondiente. Cada vacuna provocó una respuesta CTL para al menos un fragmento Her-2. Para varios de los fragmentos Her-2, los niveles de lisis sobre el fondo alcanzaron significación estadística. < 0,05). Basado en una combinación de resultados negativos y positivos, se delinearón las regiones de Her-2 que contienen epítomos subdominantes (Table 1). Así, la vacunación con las vacunas de Lm-ΔLLO-fragmentos de Her-2 revelaron epítomos subdominantes dentro de la proteína Her-2.

Tabla 1 Las regiones de Her-2/neu con epítomos H-2q potenciales, basados en el porcentaje de lisis específica en el ensayo de CTL. El porcentaje (lisis específica - lisis de fondo de esplenocitos de ratones vacunados con PBS) se muestra para las relaciones E:O de 200:1 y 100:1. Los ensayos se realizaron por triplicado, se muestran los resultados de experimentos representativos. *Indica lisis estadísticamente significativa por encima del fondo (p < 0,05).

Cepa LM	Región Neu abarcada	Porcentaje de lisis específica de las células objetivo			Regiones Neu que contienen un epítipo
		200:1	100:1		
Lm-ΔLLO-EC1	20-326	3T3-neu-1	14,3*	0,7	20-148
		3T3-neu-2	0	0	
		3T3-neu-3	6,5*	3,5	291-326
Lm-ΔLLO-EC2	303-501	3T3-neu-3	10,9*	7,4	303-426
		3T3-neu-4	23,8*	8,4*	410-501
Lm-ΔLLO-EC3	479-655	3T3-neu-4	1	0	
		3T3-neu-5	34,4*	25,3*	531-655
Lm-ΔLLO-IC1	690-1081	3T3-neu-6	6,9*	9*	690-797
		3T3-neu-7	0	2,3	
		3T3-neu-8	18,2*	6,4	952-1081
Lm-ΔLLO-IC2	1020-1255	3T3-neu-8	10,3*	8,2*	1020-1085
		3T3-neu-9	16,5	0	1063-1255

EJEMPLO 5

LA FUSIÓN A LLO Y ENTREGA POR LM MEJORA LA INMUNOGENICIDAD DE HER-2

MATERIALES Y MÉTODOS EXPERIMENTALES

Vacunas de ADN

Las vacunas de ADN se construyeron mediante el uso de pcADN 3.1. Her-2 y el fragmento de EC1 se amplificaron por PCR mediante el uso de los siguientes iniciadores:

Her-2 de longitud total, no fusionado Her-2: 5' CCGGGCTAGCATGGTCATCATGGAGCTGGCCGG (sitio *Nhe I* subrayado; sec. con núm. de ident.: 29) y 3' CCGGGATATCTTACTTGTGCATCGTCGTCCTTGTAGTCTCATACAGGTACATCCA GGCC (sitio *EcoRV* site subrayado, etiqueta FLAG en cursiva, codón de terminación en negrita; sec. con núm. de ident.: 30). Los iniciadores 5' anteriores, además, se usaron para amplificar EC1 no fusionado, el iniciador 3' para amplificar ΔLLO - Her-2 de longitud completa.

ΔLLO-Her-2 de longitud completa: 5'CCGGGTCGACATGGTCATCATGGAGCTGGCCGG sitio (*Sal I* subrayado; sec. con núm. de ident.: 31). Este iniciador se usó además para amplificar ΔLLO-EC1.

EC1 no fusionado: 3' CCGGGATATCTTACTTGTGCATCGTCGTCCTTGTAGTCTCAGACCTCTTGGTTAT TCGGGGG (sitio *EcoRV* subrayado, etiqueta FLAG en cursiva, codón de terminación en negrita; (sec. con núm. de ident.: 32). Este iniciador se usó además para amplificar el EC1 no fusionado a ΔLLO.

Los fragmentos se clonaron en el sitio de multiclonación de pcADN3.1, y se usaron para transformar *Escherichia coli*. Las bacterias se cultivaron en medio Luria-Bertani (BD, Sparks, MD) con 50 microgramos por mililitro (μg/ml) de ampicilina.

Experimentos de regresión del tumor

Los experimentos de regresión del tumor se realizaron como se describió en el Ejemplo 2, excepto que se usaron 7×10^5 células NT-2, y las vacunaciones se administraron en los días 3, 10, y 18. Las vacunas de ADN (50 μ g de cada pcADN plásmido + y el plásmido GM-CSF o el GM-CSF solo) se administraron por vía intramuscular y Lm se administró por vía intraperitoneal.

Resultados

Varios factores estuvieron presentes en las vacunas Lm- Δ LLO-Her-2 que pueden haber contribuido al reconocimiento de epítopos subdominantes: (a) la entrega por LM; (b) la fusión del antígeno objetivo a Δ LLO; (c) la ruptura de Her-2 en fragmentos. Para determinar cuál o cuáles de estos factores contribuyeron al reconocimiento de los epítopos subdominantes, como se evidenció por las respuestas inmunes anti-Her-2 mejoradas, los ratones se vacunaron con (a) pcADN3.1-Her-2 de longitud completa (una vacuna de ADN; "pcADN neu"); (b) pcADN 3.1 Δ LLO-Her-2 de longitud completa (pcADN LLO-neu); (c) pcADN 3.1-EC1 (pcADN EC1); (d) pcADN 3.1- Δ LLO-EC1 (pcADN LLO-EC1); o (e) Lm- Δ LLO-EC1, y se realizó un experimento de regresión del tumor. El GM-CSF se incluyó con las vacunas de ADN por su capacidad para mejorar la eficacia de las vacunas de ADN (McKay PF, Barouch DH y otros, Eur J Immunol 2004 abril;34(4): 1011-20.).

Como se representa en la Figura 7A, el mejor control del crecimiento tumoral se observó con Lm- Δ LLO-EC1; 2/8 de los ratones nunca desarrollaron tumores palpables; los tumores regresaron completamente en otros dos; y los otros cuatro ratones exhibieron un crecimiento tumoral más lento (retardado) que los ratones controles falsamente vacunados. En el caso de pcADN Δ LLO-EC1, un ratón nunca desarrolló un tumor, y varios de los otros ratones exhibieron un crecimiento tumoral retardado. La fusión a Δ LLO mejoró la inmunogenicidad de EC1, como se observó por la comparación de pcADN EC1 vs. pcADN Δ LLO-EC1 y pcADN neu vs. pcADN Δ LLO-neu (Figuras 6B-C); las vacunas en las cuales el antígeno no estaba fusionado exhibieron tumores que crecieron a la misma velocidad que los controles falsamente vacunados. Un efecto potenciador por la división de Her-2 en fragmentos más pequeños, en el caso de las fusiones Δ LLO, se observa por la comparación de pcADN Δ LLO-neu vs. pcADN Δ LLO-EC1, en la cual el último grupo exhibió un control del tumor superior (Figura 7D). No se observó ningún efecto para los antígenos no fusionados, según se observa a partir de una comparación de pcADN neu vs. pcADN EC1 (Figura 7E).

EJEMPLO 6**LAS VACUNAS DE ADN LLO-HER-2 INDUCEN RESPUESTAS INMUNES CONTRA EPÍTOPOS SUBDOMINANTES DE CÉLULAS T CD8⁺**

Las respuestas inmunes a las vacunas de ADN se analizaron, además, mediante la medición de la lisis de las células 3T3 transducidas con fragmentos Her-2, como se describe en el Ejemplo 4. Las células T de ratones vacunados con pcADN 3.1- Δ LLO-Her-2 o pcADN 3.1- Δ LLO-EC1 lisaron las células a partir de más grupos de células objetivo 3T3-Her-2 de lo que lo hicieron las vacunas de ADN no fusionadas correspondientes (Tabla 2).

Tabla 2. Las regiones de Her-2/neu con epítopos potenciales en base a las vacunaciones de ADN de ratones FVB silvestres. * indica lisis estadísticamente significativa por encima del fondo ($p < 0,05$). El porcentaje de lisis específica se calculó como $\% = 100 \times ((\text{lisis experimental} - \text{lisis espontánea}) / (\text{lisis total} - \text{lisis espontánea}))$.

	Cepa LM	Región Neu abarcada	Porcentaje de lisis específica de las células objetivo		Regiones Neu que contienen un epítipo			
			200:1	100:1				
5	pcADN neu + GM-CSF	1-1255	3T3-neu-1	17,4*	12,4*	20-148		
			3T3-neu-2	0	0,1			
			3T3-neu-3	0	1,6			
10					3T3-neu-4	23,4*	19,5*	410-479
					3T3-neu-5	0	0,3	
					3T3-neu-6	2,6	0	
15					3T3-neu-7	0	0,6	
					3T3-neu-8	0	1,2	
					3T3-neu-9	0	0,1	
20	pcADN ΔLLO-neu + GM-CSF	1-1255	3T3-neu-1	30,9*	20,5*	20-148		
			3T3-neu-2	0,4	0			
			3T3-neu-3	1,9	1,7			
25					3T3-neu-4	31,2*	25,5*	410-501
					3T3-neu-5	6,4*	6,4	
					3T3-neu-6	0	0	479-531
30					3T3-neu-7	0	2,5	
					3T3-neu-8	0	4	
					3T3-neu-9	21*	15,8*	1085-1255
35	pcADN EC1 + GM-CSF	1-326	3T3-neu-1	7,8	1,9			
			3T3-neu-2	0	2,1			
			3T3-neu-3	8,5*	0		291-326	
40	pcADN ΔLLO-EC1 + GM-CSF	1-326	3T3-neu-1	14,6*	8,5*	20-148		
			3T3-neu-2	0	0,5			
			3T3-neu-3	9,9*	5,1		291-326	

45

Así, la fusión de un fragmento LLO a Her-2 de longitud completa o un fragmento de Her-2 resultó en una ampliación de las regiones reconocidas por los CTLs. En consecuencia, en base a los resultados de los Ejemplos 5-6, epítipos subdominantes de antígenos CD8⁺ pueden revelarse ya sea por (a) la expresión por LM; (b) la fusión del antígeno a un fragmento LLO; o (c) la división del antígeno en fragmentos más pequeños.

50

EJEMPLO 7

LA VACUNACIÓN CON LLO-HER-2 INDUCE LA EXTENSIÓN DE EPÍTOPOS. MATERIALES Y MÉTODOS EXPERIMENTALES.

55

FVB/N se inyectan con tumores NT-2, y después se vacunaron con cada una de las cepas de LM-ΔLLO-fragmento de Her-2, como se describió en el Ejemplo 2, o con vacunas de ADN ΔLLO-fragmento de Her-2, como se describió en el Ejemplo 5. Los linfocitos se aislaron de los ganglios linfáticos del sitio tumoral en varios momentos después de la vacunación. Los epítipos reconocidos por los linfocitos se determinan por un ensayo de lisis, mediante el uso de células 3T3 que expresan cada uno de los 9 fragmentos de Her-2, como se describió en el Ejemplo 4.

60

Resultados

La inducción de la regresión del tumor más de un mes después de la reactivación final contrasta con observaciones mediante el uso de otros tipos de vacunas, y sugiere que el número de células T se expande por extensión de epítomos. Por ejemplo, las células presentadoras de antígeno como las células dendríticas pueden adquirir piezas de las células que mueren, viajar a los ganglios linfáticos, y presentar epítomos de Her-2 que no están presentes en el fragmento de vacuna, lo que resulta en una ampliación de la respuesta de las células T CD8⁺ contra el Her-2. Para confirmar esta conclusión, los ratones se inyectaron con tumores NT-2, y después se vacunaron con cada una de las cepas de LM-ΔLLO-fragmento de Her-2 o vacunas de ADN ΔLLO-fragmento de Her-2. Los linfocitos se aíslan de los ganglios linfáticos del tumor en varios momentos, y se determinan los epítomos reconocidos por los linfocitos. Se observa la aparición de reactividad a epítomos que no están presentes en el fragmento de la vacuna. La ampliación de la respuesta de células T correlaciona aproximadamente con la regresión temporal del tumor.

Este resultado demuestra que la vacunación con LM que expresa el antígeno recombinante induce la extensión de epítomos. Adicionalmente, la vacunación con fusiones LLO-antígeno, aún fuera del contexto de LM, induce también la extensión de epítomos.

EJEMPLO 8

LA VACUNACIÓN CON LLO-HER-2 SUPERA LA TOLERANCIA INMUNOLÓGICA A UN ANTÍGENO PROPIO

MATERIALES Y MÉTODOS EXPERIMENTALES

El Dr. William Muller proporcionó los ratones transgénicos para Her-2/neu de rata. Ratones transgénicos HER-2/neu jóvenes, vírgenes, que no desarrollaban espontáneamente tumores, se inyectaron con 5×10^4 células NT-2. Debido a que el ratón transgénico es profundamente tolerante a HER-2/neu, la mínima dosis requerida para el crecimiento tumoral en el 100 % de los animales es mucho más baja que en los ratones silvestres (Reilly RT, Gottlieb MB y otros, Cancer Res. 2000 julio 1;60(13): 3569-76). Las células NT-2 se inyectaron en el espacio subcutáneo del flanco. Los ratones recibieron 0,1 LD₅₀ de la vacuna de *Listeria* cuando se detectaron tumores palpables de 4-5 mm (típicamente el día 7 después de la implantación del tumor) y semanalmente después de eso, por 4 semanas adicionales.

Resultados

El gen Her-2/neu de rata se diferencia del neu de rata en 5-6 % de los residuos de aminoácidos, y así es inmunogénico en el ratón (Nagata Y, Furugen R y otros, J Immunol. 159: 1336-43). Un ratón transgénico que sobreexpresa Her-2/neu de rata bajo el control transcripcional del promotor y potenciador del virus de tumor mamario de ratón (VTMR) es inmunológicamente tolerante al Her-2/neu de rata. Estos ratones desarrollan espontáneamente cáncer de mama. El promotor VTMR opera también en células hematopoyéticas, lo que produce ratones profundamente tolerantes a HER-2/neu. Así, este ratón se considera un modelo severo para el cáncer de mama humano y en general para tumores que expresan antígenos, tal como Her-2/neu, que se expresan a bajos niveles en el tejido normal (Muller W. J. (1991) Expression of activated oncogenes in the murine mammary gland: transgenic models for human breast cancer. Canc Metastasis Rev 10: 217-27).

Los ratones transgénicos HER-2/neu de 6-8 semanas se inyectaron con células NT-2, y después se inmunizaron con cada una de las vacunas LM-ΔLLO-Her-2, o con PBS o ΔLLO-E7 (controles negativos). Aunque la mayoría de los ratones controles tuvieron que sacrificarse al día 42 debido a su carga tumoral, el crecimiento tumoral se controló en todos los ratones vacunados (Figura 8).

Así, las vacunas de Her-2 basadas en ΔLM-LLO-Her-2 y *Listeria* son capaces de romper la tolerancia a antígenos propios expresados en células tumorales, como se evidenció por su habilidad de inducir la regresión de tumores NT-2 establecidos.

EJEMPLO 9

LAS VACUNAS LLO-HER-2 CONTROLAN EL CRECIMIENTO ESPONTÁNEO DE TUMORES EN RATONES TRANSGÉNICOS HER-2/NEU

MATERIALES Y MÉTODOS EXPERIMENTALES

Las vacunas de ΔLM-LLO-Her-2 se administraron en las siguientes cantidades: Lm-LLO-EC1: 1×10^7 ufc; Lm-Lm-LLO-EC2: 5×10^7 ufc; LLO-EC3: 1×10^8 ufc; Lm-LLO-IC2: 1×10^7 ufc; Lm-LLO-IC1: 1×10^7 .

Resultados

Las vacunas de ΔLM-LLO-Her-2 se evaluaron, además, por su capacidad para prevenir el crecimiento tumoral espontáneo en los ratones transgénicos HER-2/neu. Los ratones transgénicos (n=12 por grupo de vacuna) se

inmunizaron 5 veces con 0,1 LD₅₀ de una de las cepas de vacuna, se comenzó a la edad de 6 semanas y se continuó una vez cada tres semanas. Los ratones se controlaron por la formación de tumores en las glándulas mamarias. En la semana 35, todos los ratones controles (inmunizados con PBS o Lm-LLO-NY-ESO-1) habían desarrollado tumores. En contraste, el 92 % del grupo Lm-LLO-IC1 estaba libre de tumores, así como el 50 % de los ratones Lm-LLO-EC2, Lm-LLO-EC1, y Lm-LLO-IC2, y el 25 % de los ratones inmunizados con Lm-LLO-EC3 (Figura 9).

Estos descubrimientos confirman los resultados del Ejemplo previo, que mostró que las vacunas de Her-2 basadas en ΔLM-LLO-Her-2 y *Listeria* son capaces de romper la tolerancia a antígenos propios.

EJEMPLO 10

GENERACIÓN DE VACUNAS DE LLO-HER-2 QUE CONTIENEN FRAGMENTOS DE LA PROTEÍNA HER-2 HUMANA

Una estrategia similar a la usada para Her-2 de rata (Ejemplo 1) se usó para expresar Her-2/neu humana. El gen HER-2 de longitud completa se dividió en cinco fragmentos, que constituyen fragmentos superpuestos del dominio extracelular, (EC-1, EC-2 y EC-3) y el dominio citoplasmático (IC-1 e IC-2) (Figura 10). Las regiones hidrofóbicas no se incluyeron en el constructo. Estas secuencias se diferencian ligeramente de las secuencias de rata debido a pequeñas diferencias entre las dos secuencias. Los fragmentos humanos correspondientes a los fragmentos de rata fueron 22-326, 303-501, 479-652, 677-1081, y 1020-1255.

Las secuencias HER-2 humanas se aislaron a partir de líneas de cáncer de mama humanas, por ejemplo, SK-BR3 (ATCC) por PCR de transcripción inversa (RT-PCR) mediante el uso de métodos estándar de biología molecular. Por ejemplo, el ARN celular total se aisló mediante el uso del estuche RNeasy Miniprep (Qiagen) y se generó un grupo de ADNc (Titan-One-Tube PCR system®, Roche) mediante el uso de un iniciador oligo-dT. Las secuencias de HER-2 de interés se amplificaron específicamente por la PCR de la segunda etapa mediante el uso de los siguientes iniciadores:

Constructo	Iniciador 5'	Iniciador 3'
EC1	ctcgaggccgagcaccacaagt (sec. con núm. de ident.: 45)	actagtttaatcctctgctgcacctc (sec. con núm. de ident.: 46)
EC2	ctcgagtacctttctacggacgtg (sec. con núm. de ident.: 47)	actagtttactctggccggtggcag (sec. con núm. de ident.: 48)
EC3	ctcgagacgggtgccctgggaccag (sec. con núm. de ident.: 49)	actagtttagacgatggacgtcagag (sec. con núm. de ident.: 50)
IC1	ctcgagctgctcaggaaacggag (sec. con núm. de ident.: 51)	actagtttaagcccctcggagggtg (sec. con núm. de ident.: 52)
IC2	ctcgaggctgaggagtatctg (sec. con núm. de ident.: 53)	actagtttactggcagctccagac (sec. con núm. de ident.: 54)

Se añaden sitios de restricción de XhoI (5') y SpeI (3') para permitir la clonación posterior en el vector de la vacuna de *Listeria*, y se incluye un codón de parada ocre en los iniciadores inversos para terminar la traducción de la proteína de fusión. No hay secuencias XhoI o SpeI localizadas en estos fragmentos del gen HER-2 humano. Los productos de la PCR se purifican (estuche Qiaquick® PCR Purification, Qiagen) y se clonan en el vector intermedio de *E. coli* pCR2.1TOPO® (Invitrogen). Después de la transformación de células TOP 10 (Invitrogen), las colonias que contienen plásmido se identifican por PCR mediante el uso de los iniciadores M13directo y M13inverso (Invitrogen). Se cultiva un clon positivo para cada constructo, se prepara el ADN del plásmido (Qiafilter Midiprep, Qiagen) y se verifica la secuencia del inserto HER-2/neu por secuenciación.

Para introducir las secuencias del antígeno HER-2/neu en el vector de *Listeria*, pLLO-E7 se digiere completamente con XhoI y parcialmente con SpeI, de ese modo se elimina el gen E7. Las secuencias HER-2/neu se digieren con las mismas enzimas, todo lo digerido se separa por electroforesis en gel de agarosa, y las secuencias del vector pLLO-E7 y del inserto HER-2/neu se purifican (Qiaquick). Las secuencias del antígeno HER-2/neu se ligan en pLLO-E7, y

la mezcla de ligazón se transforma en la cepa de *E. coli* MB2159 deficiente en racemasa de d-alanina por electroporación. Las colonias se prueban por PCR para la presencia de la secuencia HER-2/neu y se expanden en medio Luria Broth (LB), y el ADN del plásmido se prepara, y después la secuencia se verifica por digestión de restricción con EcoRI, SmaI, NcoI o con HindIII que produce un patrón de bandas específico para cada constructo. Los plásmidos se transforman en la cepa de *Listeria* Lm(DA-) por electroporación, y los clones individuales se cultivan en medio LB que contiene 50 µg/ml estreptomina. La presencia y secuencia del plásmido se verifica nuevamente por análisis de restricción. La expresión y secreción de la proteína de fusión LLO-HER-2/neu se verifica por transferencia de tipo Western del medio de cultivo precipitado con TCA, mediante el uso de un anticuerpo policlonal específico por la secuencia PEST.

EJEMPLO 11

PRUEBA DE LAS VACUNAS DE LLO-HER-2 QUE CONTIENEN FRAGMENTOS DE LA PROTEÍNA HER-2 HUMANA.

Las cepas LLO- Her-2 humanas se prueban para la inmunogenicidad en ratones y en voluntarios humanos. A continuación, las cepas de vacuna se prueban por su capacidad de proteger ratones contra un reto con células tumorales que expresan Her-2 humana, como se describió en los Ejemplos anteriores. Las cepas exitosas se administran a los humanos que tienen tumores humanos que expresan Her-2, y se prueban para su capacidad de inducir la regresión del tumor. Adicionalmente, las cepas se prueban para su capacidad de proteger a los sujetos humanos en riesgo de desarrollar cáncer que expresan Her-2, debido a factores genéticos o ambientales. Se encontró que las cepas de vacunas eran inmunogénicas y exhibían una actividad antitumoral sustancial.

Reivindicaciones

- 5 **1.** Un polipéptido recombinante que comprende un fragmento N-terminal de una proteína de listeriolisina (LLO) fusionado a un fragmento de un antígeno de Her-2, en donde el fragmento del antígeno de Her-2 consiste en los aminoácidos 303-501 o 479-655 de la sec. con núm. de ident.: 40, o los aminoácidos 303-501 o 479-652 de la sec. con núm. de ident.: 43, o una secuencia de aminoácidos más de 97 % idéntica a ella,
- 10 en donde dicha LLO comprende una secuencia PEST, y en donde dicho polipéptido recombinante es capaz de inducir la regresión de las células tumorales establecidas que expresan Her-2.
- 15 **2.** Una molécula de nucleótidos que codifica el polipéptido recombinante de la reivindicación 1.
- 15 **3.** Una forma recombinante de *Listeria* que comprende la molécula de nucleótidos de la reivindicación 2.
- 15 **4.** Una vacuna que comprende el polipéptido recombinante de la reivindicación 1, la molécula de nucleótidos de la reivindicación 2, o la *Listeria* recombinante de la reivindicación 3.
- 20 **5.** Una cepa recombinante de *L. monocytogenes* que expresa el polipéptido recombinante de la reivindicación 1.
- 25 **6.** Un polipéptido recombinante de la reivindicación 1, o una forma recombinante de *Listeria* que comprende un polipéptido recombinante de la reivindicación 1, para su uso como un medicamento.
- 25 **7.** El polipéptido recombinante de la reivindicación 1, en donde las células T CD8⁺ median la regresión de las células tumorales establecidas que expresan Her-2.
- 30 **8.** El polipéptido recombinante de la reivindicación 1, en donde dicho polipéptido recombinante es capaz de inducir la regresión de células tumorales establecidas, mediada por una respuesta inmune a un epítipo subdominante de Her-2 de células T CD8⁺.
- 35 **9.** Uso del polipéptido recombinante de la reivindicación 1, o el nucleótido de la reivindicación 2, o la *Listeria* de la reivindicación 3, para la preparación de una composición farmacéutica para inducir la regresión de células tumorales establecidas que expresan Her-2 en un sujeto.
- 35 **10.** El uso de la reivindicación 9, en donde el nucleótido recombinante o el polipéptido recombinante está presente en la composición farmacéutica en forma de una *Listeria* recombinante que comprende dicho nucleótido recombinante o dicho polipéptido recombinante.
- 40 **11.** El uso de cualquiera de las reivindicaciones 9 o 10, en donde dicha composición farmacéutica induce una respuesta inmune mediada por células T CD8⁺-contra las células tumorales que expresan Her-2.
- 45 **12.** El uso de la reivindicación 11, en donde la respuesta inmune contra dichas células tumorales que expresan Her-2 comprende una respuesta inmune a un epítipo subdominante de la proteína Her-2.
- 45 **13.** El polipéptido recombinante de la reivindicación 1, o el nucleótido de la reivindicación 2, o la *Listeria* de la reivindicación 3, para usar en la inducción de la regresión de un tumor establecido que expresa Her-2 en un sujeto.
- 50

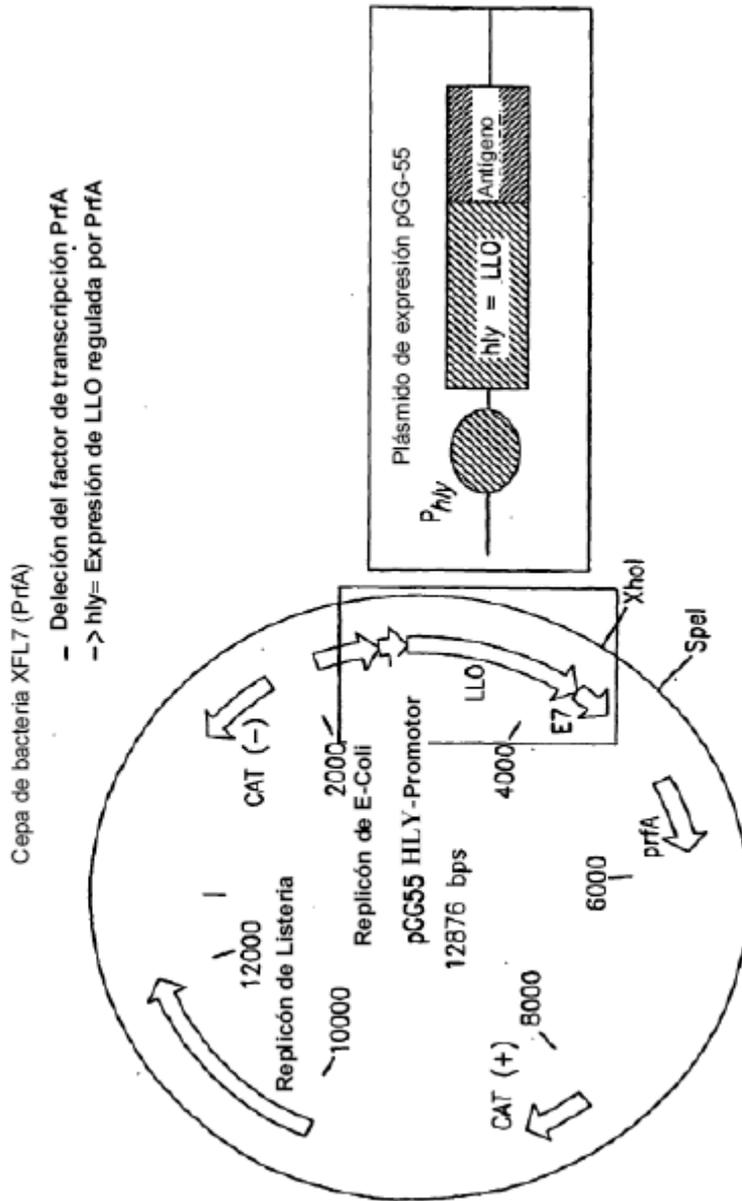


Figura 1

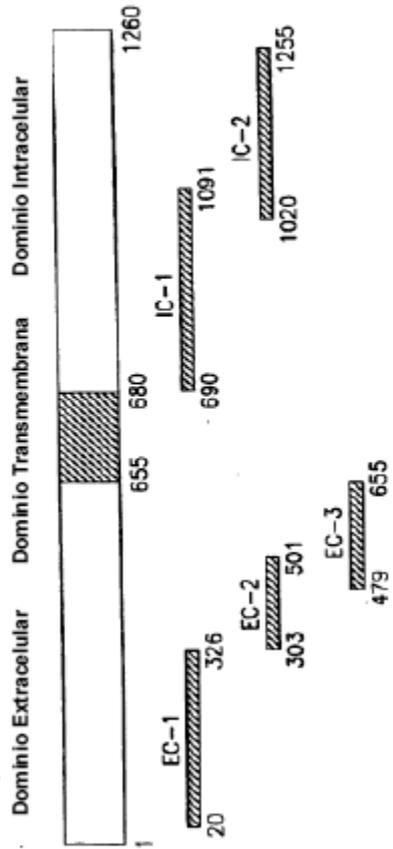


Figura 2A

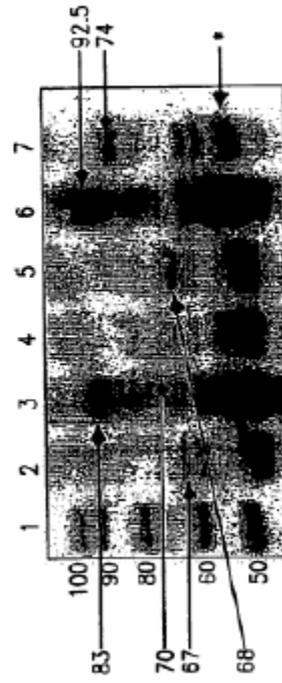


Figura 2B

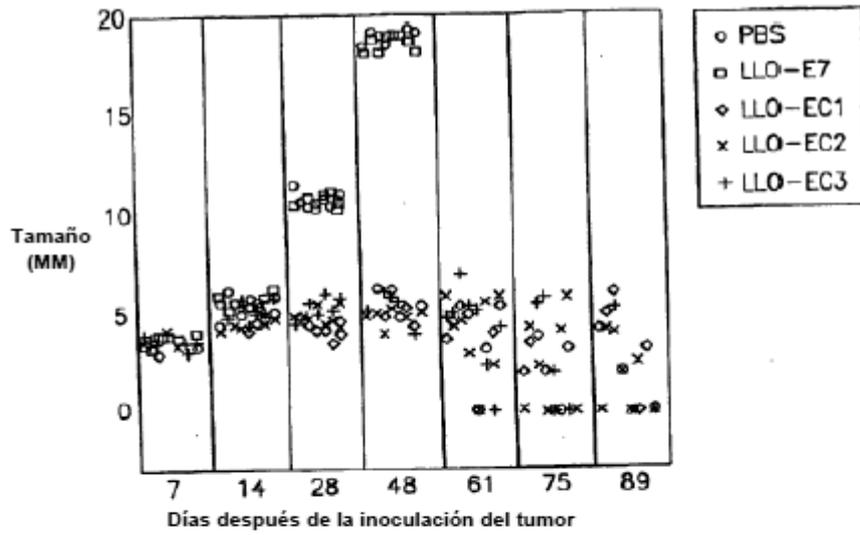


Figura 3A

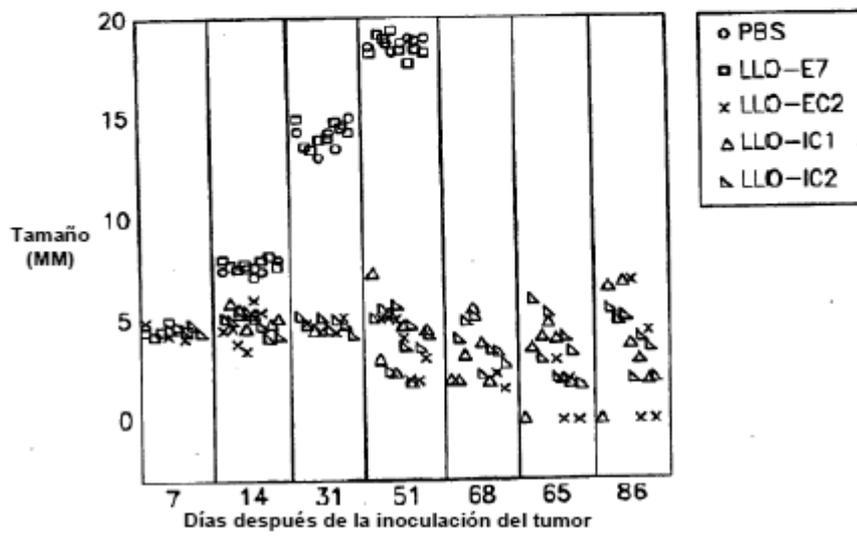


Figura 3B

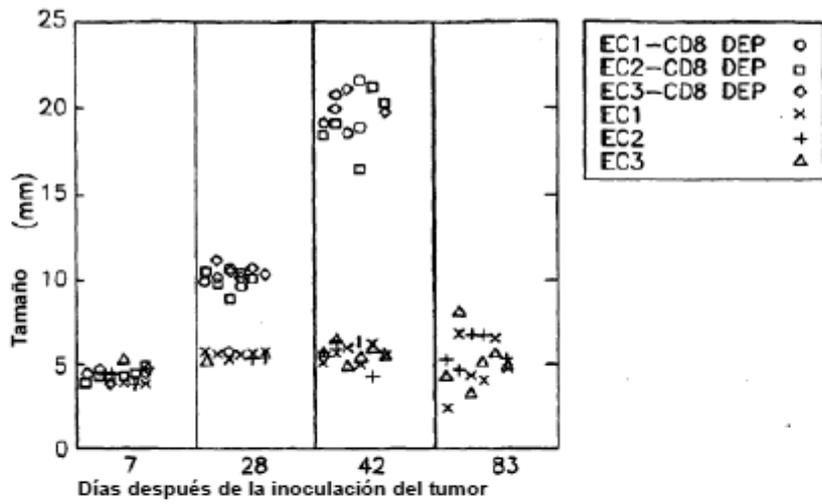


Figura 4A

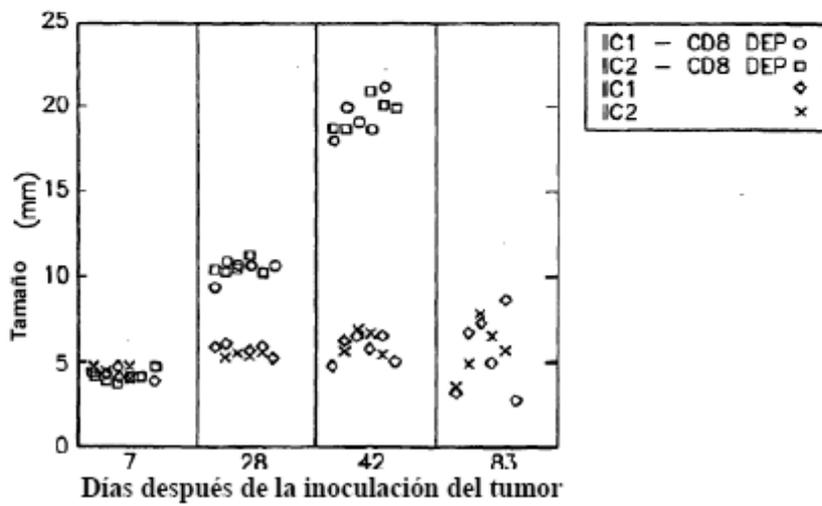


Figura 4B

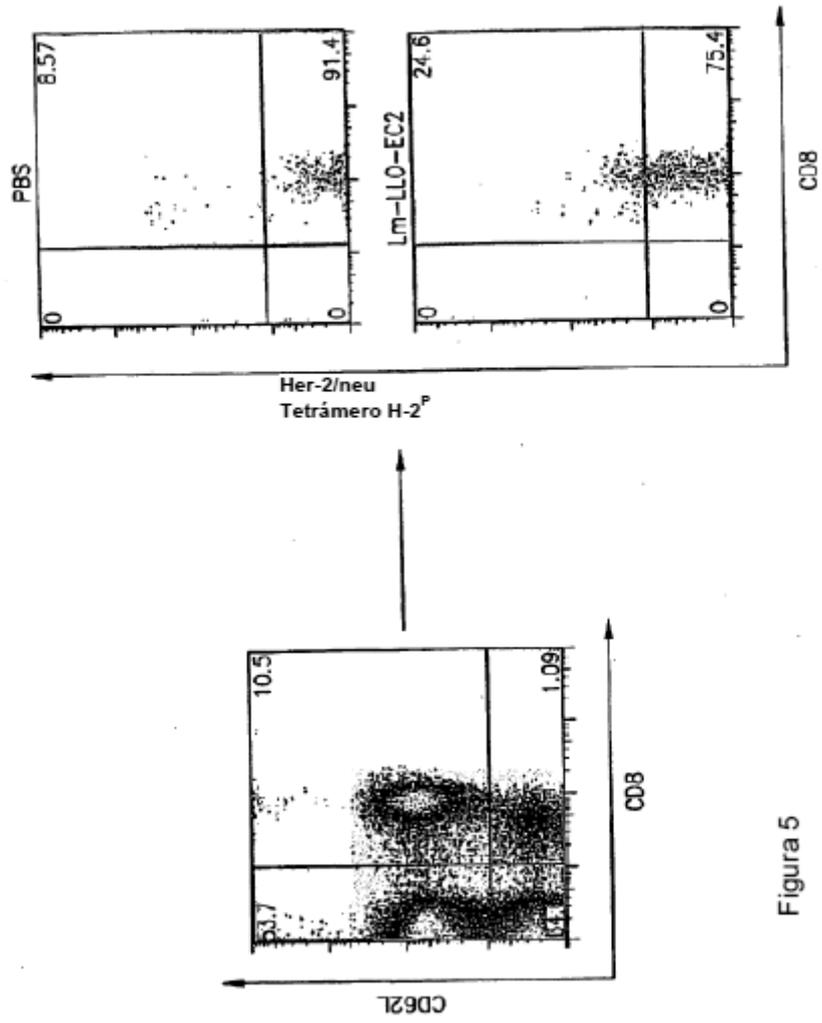


Figura 5

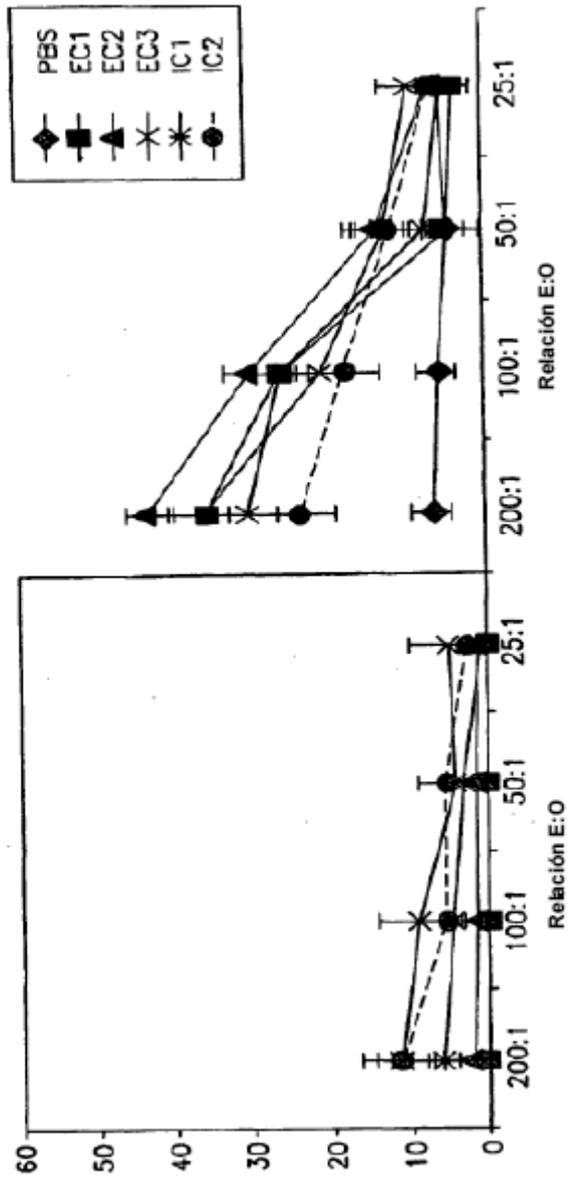


Figura 6

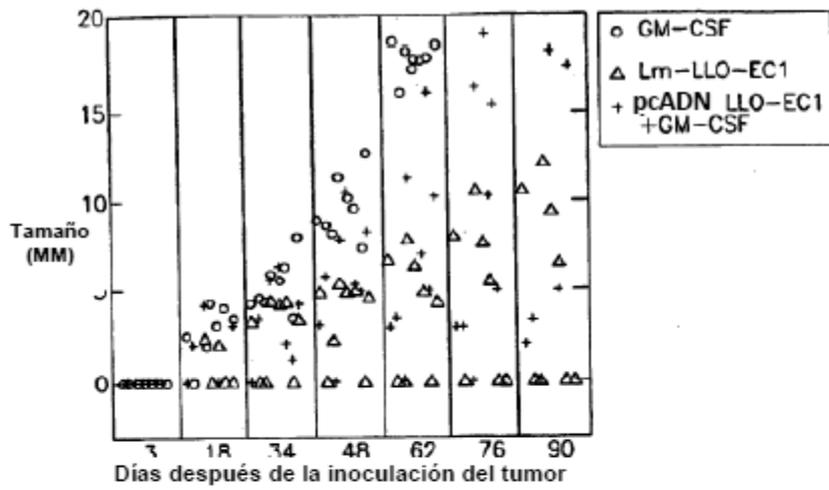


Figura 7A

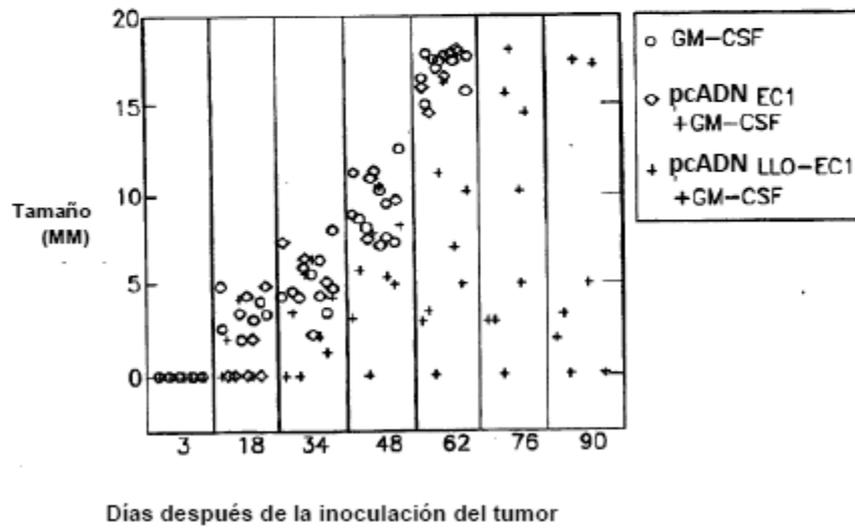


Figura 7B

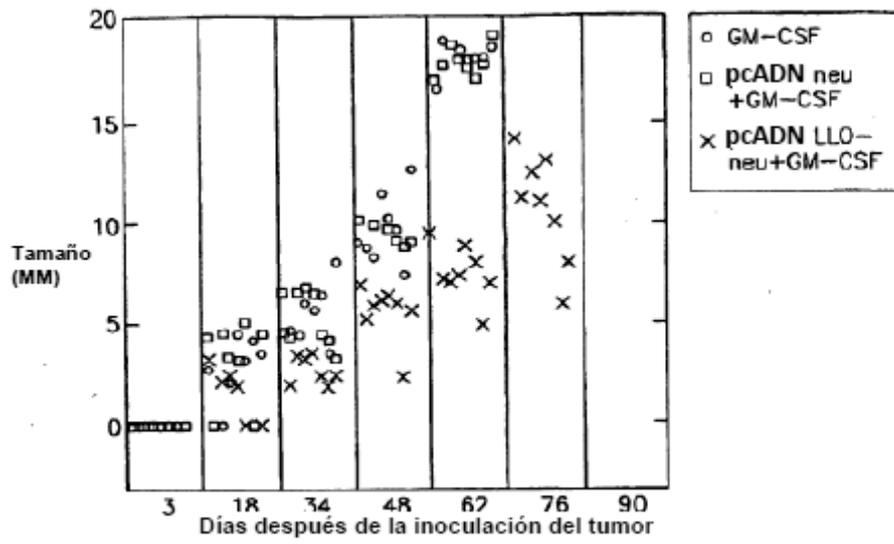


Figura 7C

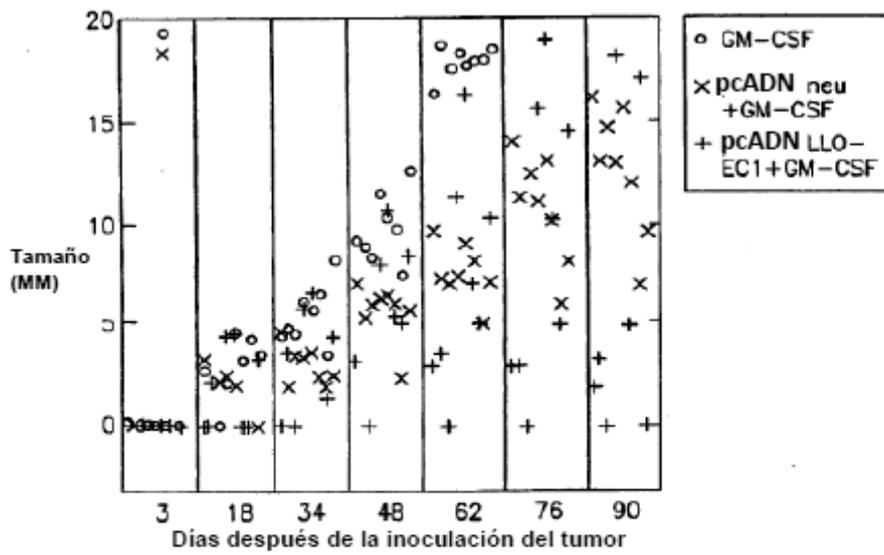


Figura 7D

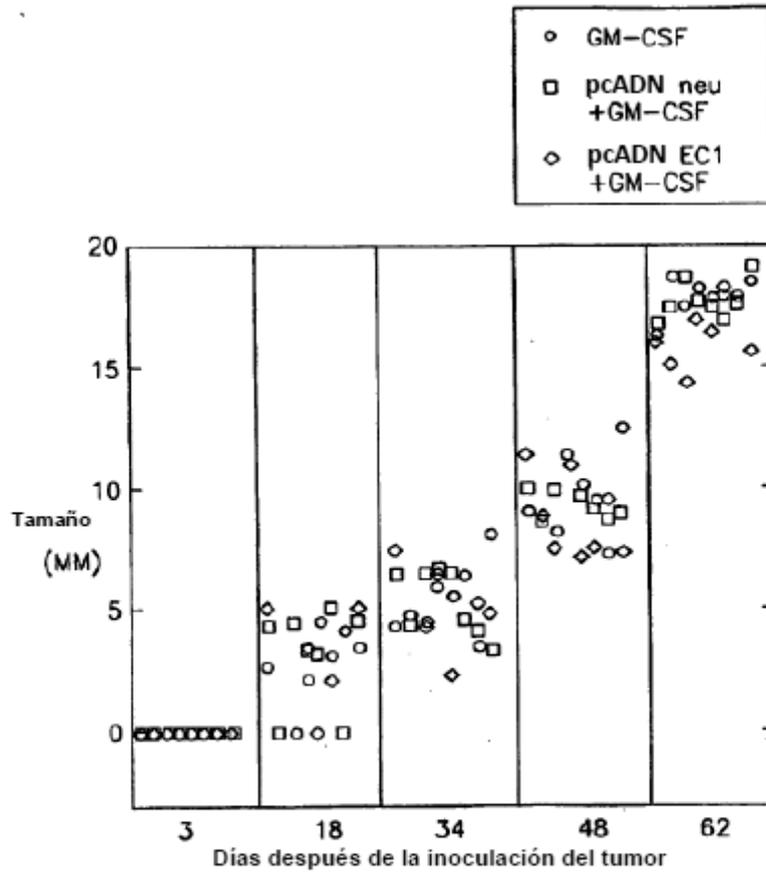


Figura 7E

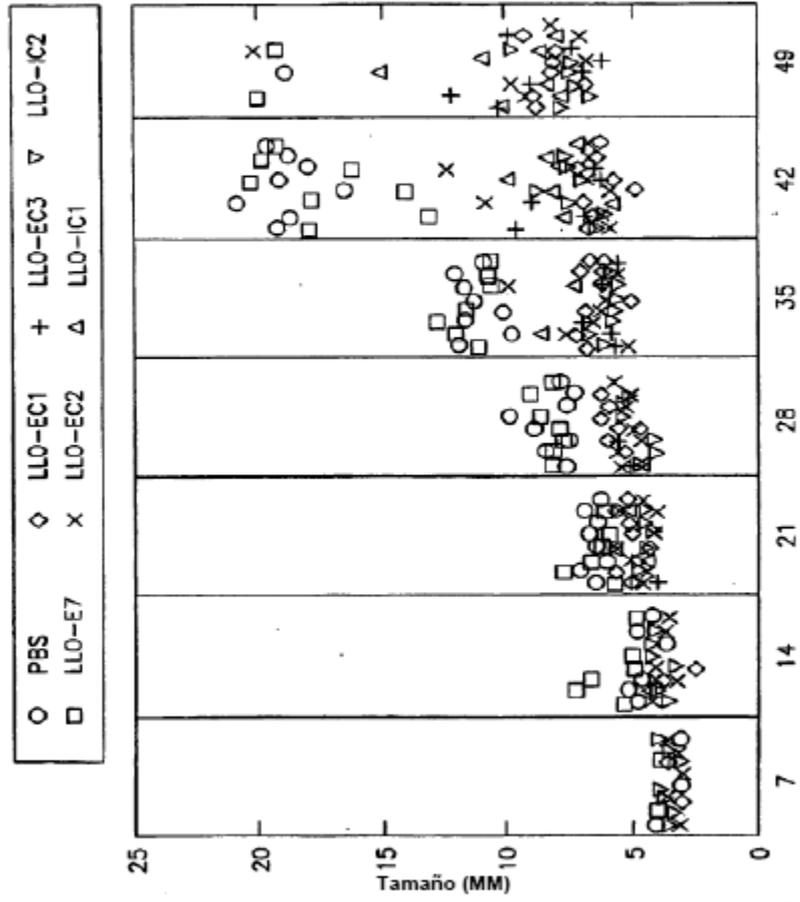


Figura 8

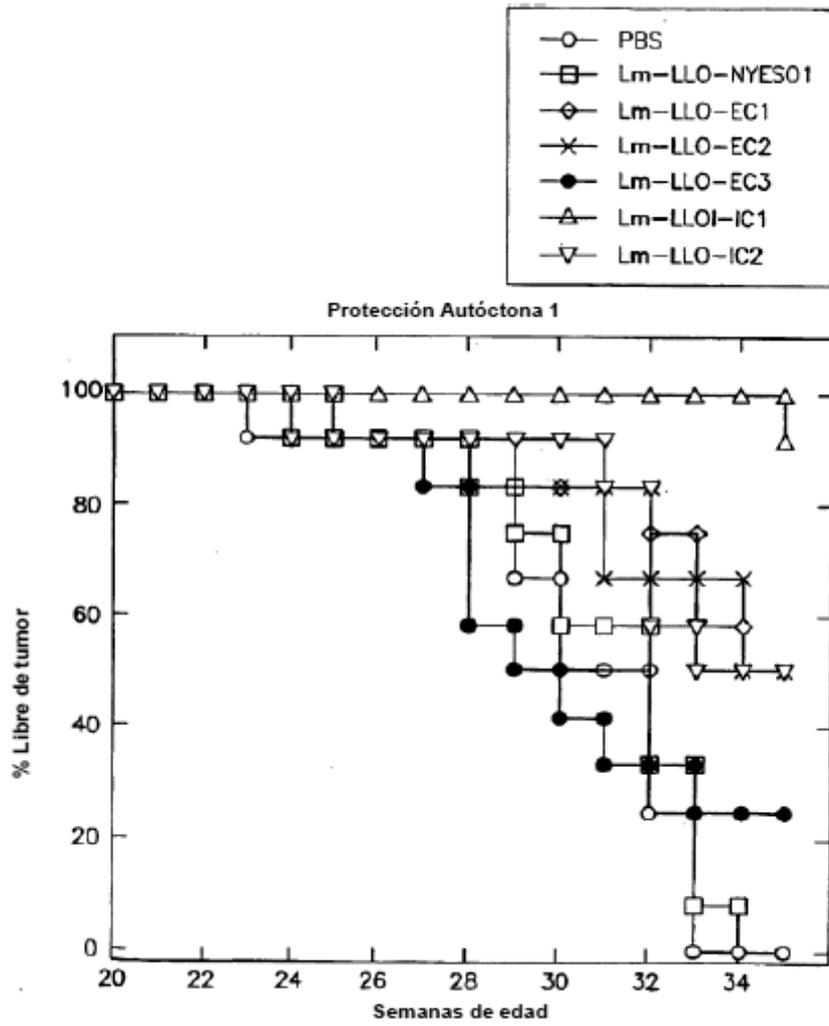


Figura 9

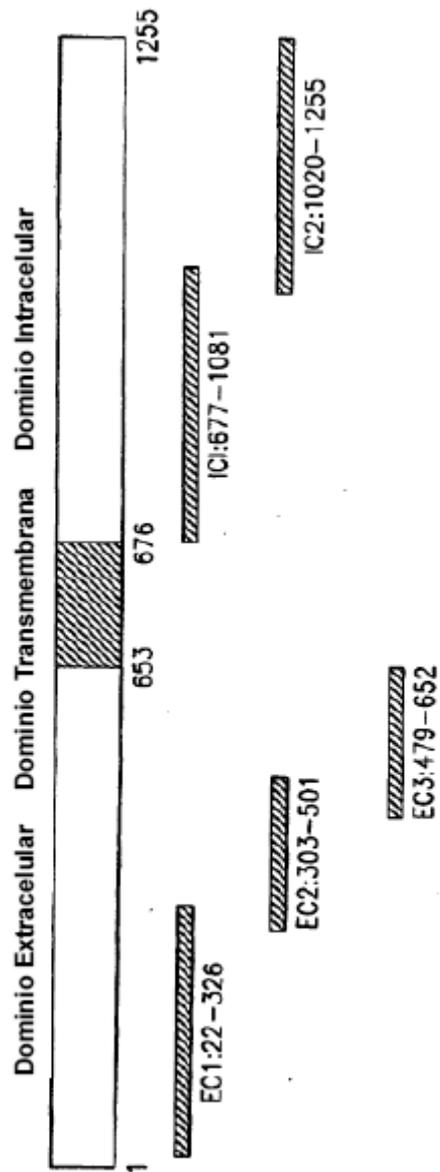


Figura 10