

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 609 925**

51 Int. Cl.:

C07K 14/195 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61K 39/42 (2006.01)

C12N 15/09 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.06.2009** **PCT/US2009/048085**

87 Fecha y número de publicación internacional: **21.01.2010** **WO10008782**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.06.2009** **E 09798450 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.11.2016** **EP 2307049**

54 Título: **Proteínas de fusión con LLO no hemolítica y métodos para utilizar las mismas**

30 Prioridad:

23.06.2008 US 213696

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
25.04.2017

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**PATERSON, YVONNE y
MACIAG, PAULO**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 609 925 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

Proteínas de fusión con LLO no hemolítica y métodos para utilizar las mismas

5 Campo de la invención

La presente invención proporciona proteínas o péptidos recombinantes que comprenden una proteína listeriolisina O mutada (LLO) o un fragmento de esta, que comprende una sustitución del dominio de unión al colesterol con un péptido antigénico, proteínas o péptidos de fusión que comprenden los mismos, moléculas de nucleótidos que codifican los mismos, y vectores de vacunas que comprenden o codifican los mismos. La presente invención proporciona, además, las proteínas, péptidos, moléculas de nucleótidos, y vectores de vacunas recombinantes de la presente invención para usar en la inducción de una respuesta inmunológica al péptido antigénico.

15 Antecedentes de la invención

La estimulación de una respuesta inmunológica depende de la presencia de antígenos reconocidos como extraños por el sistema inmunológico del huésped. Los antígenos bacterianos tales como *Salmonella enterica* y BCG de *Mycobacterium bovis* permanecen en el fagosoma y estimulan las células T CD4⁺ por medio de la presentación de antígenos a través de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad clase II. Por el contrario, los antígenos bacterianos tales como *Listeria monocytogenes* salen del fagosoma hacia el citoplasma. El escape fagolisosómico de *L. monocytogenes* es un mecanismo único, que facilita la presentación de antígenos de *Listeria* por el complejo mayor de histocompatibilidad clase I. Este escape depende de la citolisina activada por sulfidrilo, formadora de poros, la listeriolisina O (LLO).

El documento núm. WO 2008/008311 describe el uso de una proteína LLO mutada no hemolítica y una proteína antigénica de interés fusionada a la proteína LLO mutada no hemolítica, o embebida dentro de esta, para inducir una respuesta inmunológica contra la proteína antigénica de interés.

Desde hace mucho tiempo existe una necesidad de desarrollar composiciones y métodos para mejorar la inmunogenicidad de antígenos, especialmente antígenos útiles en la prevención y el tratamiento de tumores y patógenos intracelulares.

Resumen de la invención

La presente invención proporciona una proteína recombinante que comprende una proteína de listeriolisina O (LLO), en donde dicha proteína LLO comprende una mutación dentro del dominio de unión al colesterol (CBD) que se ubica en los residuos 483-493 de dicha proteína LLO como se expone en la sec. con núm. de ident.: 37, en donde dicha mutación consiste en una sustitución de los residuos de aminoácidos en las posiciones 484-492 como se expone en la sec. con núm. de ident.: 37 con un péptido diferente de LLO de 8-50 residuos de aminoácidos que comprende una porción inmunogénica de un péptido antigénico, en donde dicho péptido antigénico es un antígeno E7 del virus del papiloma humano (HPV), un antígeno E6 de HPV, un antígeno NY-ESO-1, un receptor de células B (BCR), un antígeno prostático específico (PSA), un antígeno de células madre prostáticas (PSCA), un antígeno de la enzima quimiotrófica del estrato córneo (SCCE), antígeno 1 del tumor de Wilms (WT-1), telomerasa transcriptasa inversa humana (hTERT), proteinasa 3, proteína 2 relacionada con tirosinasa (TRP2), antígeno de alto peso molecular asociado a melanoma (HMW-MAA), sarcoma sinovial X (SSX)-2, antígeno carcinoembrionario (CEA), MAGE-A, receptor alfa de la interleucina 13 (IL13-R alfa), anhidrasa carbónica IX (CAIX), survivina, GP100 o testisina; y en donde dicha proteína recombinante muestra una reducción de más de 100 veces en su actividad hemolítica con respecto a la LLO de tipo silvestre de la sec. con núm. de ident.: 37.

En una modalidad, la proteína LLO mutada comprende una delección de la secuencia del péptido señal de esta. En otra modalidad, la proteína LLO mutada comprende la secuencia del péptido señal de esta.

En una modalidad, el antígeno E7 de HPV es un antígeno E7 de HPV-16 o un antígeno E7 de HPV-18. En una modalidad, el péptido antigénico comprende un epítipo de E7 de HPV. En una modalidad, el antígeno E6 de HPV es un antígeno E6 de HPV-16 o un antígeno E6 de HPV-18.

En otra modalidad, la presente invención proporciona una vacuna que comprende la proteína recombinante y un adyuvante. En otra modalidad, el adyuvante comprende una proteína del factor estimulante de colonias de granulocitos/macrófagos (GM-CSF), una molécula de nucleótidos que codifica una proteína GM-CSF, saponina QS21, monofosforil lípido A, o un oligonucleótido que contiene CpG no metilado.

En otra modalidad, la presente invención proporciona un vector de vacuna recombinante que codifica la proteína recombinante. En otra modalidad, la presente invención proporciona una molécula de nucleótidos que codifica la proteína recombinante. En otra modalidad, la presente invención proporciona una vacuna que comprende la molécula de nucleótidos. En otra modalidad, la presente invención proporciona una cepa de *Listeria* recombinante que comprende la proteína o el péptido recombinantes.

La presente invención proporciona la proteína recombinante, o la molécula de nucleótidos, o el vector de vacuna recombinante, o la cepa de *Listeria* recombinante de la invención para usar como un medicamento.

5 La presente invención proporciona una proteína recombinante, o una molécula de nucleótidos, o un vector de vacuna recombinante, o una cepa de *Listeria* recombinante de la invención, en donde el péptido antigénico es un péptido E7 de HPV o un péptido E6 de HPV, para usar en la inducción de una respuesta inmunológica al péptido antigénico E7 de HPV o E6 de HPV en un sujeto.

10 La presente invención proporciona una proteína recombinante, o una molécula de nucleótidos, o un vector de vacuna recombinante, o una cepa de *Listeria* recombinante de la invención, en donde el péptido antigénico es un péptido NY-ESO-1, para usar en el tratamiento, inhibición, supresión, inducción de la regresión, reducción de la incidencia de un tumor que expresa NY-ESO-1, o la protección contra este, en un sujeto.

15 En otra modalidad, el tumor que expresa NY-ESO-1 es un tumor de melanoma ovárico o un tumor de cáncer de pulmón.

20 La presente invención proporciona una proteína recombinante, o una molécula de nucleótidos, o un vector de vacuna recombinante, o una cepa de *Listeria* recombinante de la invención, en donde el péptido antigénico es un péptido E7 de HPV, para usar en el tratamiento, inhibición, supresión, inducción de la regresión, reducción de la incidencia de un tumor que expresa E7 de HPV, o la protección contra este, en un sujeto.

En otra modalidad, el tumor que expresa E7 de HPV se selecciona de un tumor de cáncer cervical y un tumor de cáncer de cabeza y cuello.

25 La presente invención proporciona una proteína recombinante, o una molécula de nucleótidos, o un vector de vacuna recombinante, o una cepa de *Listeria* recombinante de la invención, en donde el péptido antigénico es un BCR, para usar en el tratamiento, inhibición, supresión, inducción de la regresión, reducción de la incidencia de un linfoma que expresa BCR, o la protección contra este, en un sujeto.

30 Breve descripción de las figuras

Figura 1A-B. Estrategia de mutagénesis SOE. La disminución/reducción de la virulencia de LLO se logró mediante la mutación del 4to dominio de LLO. Este dominio contiene un sitio de unión al colesterol que le permite su unión a las membranas donde forma oligómeros para formar poros.

35 Figura 2. Expresión de proteínas LLO mutantes por tinción de Coomassie (A) y transferencia de Western (B).

Figura 3. Actividad hemolítica de proteínas LLO mutantes (mutLLO y ctLLO) a pH 5,5 (A) y 7,4 (B).

40 Figura 4. La capacidad de rLLO detox+rE7 conjugados químicamente y rLLO + rE7 mezclados entre sí para afectar el crecimiento de TC-1.

Figura 5. La capacidad de rE7 y proteína rLLO para afectar el crecimiento de TC-1.

45 Figura 6. La capacidad de LLOE7 detoxificada recombinante (rDTLLO-E7; secuencia completa) y rDTLLO-E7 (quimera) para afectar el crecimiento de TC-1.

Figura 7. Regresión del tumor de TC-1 después de la inmunización con rE7, rLLO, rLLO+E7 y rDTLLO-E7.

50 Figura 8. Regresión del tumor de TC-1 después de la inmunización con la quimera rDTLLO.

Figura 9. Regresión del tumor de TC-1 después de la inmunización con rE7, rDTLLO, rDTLLO+rE7, y rDTLLO-E7.

Figura 10. Regresión del tumor de TC-1 inmunizado con ActA-E7 y proteína E7.

55 Figura 11. Regresión del tumor de TC-1 inmunizado con ActA+E7 y proteína E7.

Figura 12. Regresión del tumor de TC-1 inmunizado con ActA y proteína E7.

60 Figura 13. DetoxLLO induce la expresión de ARNm de citocinas por los macrófagos de la médula ósea (BM). Las BMDC 8e5 del día 7 se descongelaron durante la noche a 37 °C en medio RF10. A continuación, las BMDC se centrifugaron y se resuspendieron en 1 ml de medio RF10 fresco a 37 °C durante 1 hr. Las BMDC se trataron con 40 mcg/ml de LLOE7 y los equivalentes molares de E7 y LLO (o con PBS como control negativo o 1 mcg/ml de LPS como control positivo). Después de 2 y 24 hrs, las células se recolectaron por centrifugación y los medios se guardaron para el ensayo ELISA. El ARN se extrajo de las células y se convirtió a ADNc. El ADNc se sometió

65 después a análisis de qPCR con los iniciadores para diferentes citocinas.

Figura 14. LLO detox induce la secreción de citocinas por los macrófagos de BM. El mismo protocolo de tratamiento que el descrito para la Figura 13, excepto que el medio se sometió al análisis de ELISA después de los tratamientos.

5 Figura 15. LLO detox regula positivamente los marcadores de maduración de las DC, CD86, CD40, y MHCII en los grupos de LLO, LLO+E7 y LLOE7.

Figura 16. Translocación nuclear de NF-kappaB después de la estimulación con Dt-LLO. La línea celular de macrófagos J774 se usó como sistema modelo para las células presentadoras de antígenos (APC). Se sembraron 5 x 10⁵ células por pocillo (placa de 6 pocillos) en un volumen total de 1 ml. Las células se tiñeron con anti-NF-kB (P65) - FITC (fluorescencia verde) y DAPI para el núcleo (fluorescencia azul). En B, D, y F, las células se tiñeron, además, después de 24 horas con anticuerpo anti-CD11b-PE (M1/170, eBioscience). La micrografía fluorescente se muestra a un aumento de 40X. NF-kappaB se ubica en el citoplasma después del tratamiento de las células con los medios solos (sin activación) (A). Las células tratadas con los medios demuestran una débil tinción para Cd11b (B). Después de la estimulación durante la noche (24 hr) con Dt-LLO (30 mcg), NF-kappaB se movió del citoplasma hacia el núcleo (C) y existe un aumento en la tinción de CD11b (D). De manera similar, después de la estimulación durante la noche (24 hr) con LPS (10 mcg/ml, control positivo), NF-kappaB se translocó al núcleo (E), lo cual es más discernible con el halo producido por el aumento de la tinción de CD11b+ de la membrana plasmática (F).

20 Descripción detallada de la invención

La presente invención proporciona una proteína recombinante que comprende una proteína de listeriolisina O (LLO), en donde dicha proteína LLO comprende una mutación dentro del dominio de unión al colesterol (CBD) que se ubica en los residuos 483-493 de dicha proteína LLO como se expone en la sec. con núm. de ident.: 37, en donde dicha mutación consiste en una sustitución de los residuos de aminoácidos en las posiciones 484-492 como se expone en la sec. con núm. de ident.: 37 con un péptido diferente de LLO de 8-50 residuos de aminoácidos que comprenden una porción inmunogénica de un péptido antigénico, en donde dicho péptido antigénico es un antígeno E7 del virus del papiloma humano (HPV), un antígeno E6 de HPV, un antígeno NY-ESO-1, un receptor de células B (BCR), un antígeno prostático específico (PSA), antígeno de células madre prostáticas (PSCA), un antígeno de la enzima quimiotrófica del estrato córneo (SCCE), antígeno 1 del tumor de Wilms (WT-1), telomerasa transcriptasa inversa humana (hTERT), proteinasa 3, proteína 2 relacionada con tirosinasa (TRP2), antígeno de alto peso molecular asociado a melanoma (HMW-MAA), sarcoma sinovial X (SSX)-2, antígeno carcinoembrionario (CEA), MAGE-A, receptor alfa de la interleucina 13 (IL13-R alfa), anhidrasa carbónica IX (CAIX), survivina, GP100 o testisina; y en donde dicha proteína recombinante muestra una reducción de más de 100 veces en la actividad hemolítica con respecto a la LLO de tipo silvestre de la sec. con núm. de ident.: 37.

En una modalidad, el polipéptido diferente de LLO es de la misma longitud que la región mutada. En otra modalidad, el polipéptido diferente de LLO es más corto, o en otra modalidad, más largo, que la región mutada.

40 En una modalidad, la sustitución en la proteína LLO es una mutación inactivante con respecto a la actividad hemolítica. Un péptido recombinante de la presente invención muestra una reducción de la actividad hemolítica con relación a la LLO de tipo silvestre. En otra modalidad, el péptido recombinante no es hemolítico.

45 Como se describe en la presente descripción, se creó una proteína LLO mutante en donde los residuos C484, W491, y W492 de LLO se sustituyeron con residuos de alanina (Ejemplo 1). La proteína LLO mutada, mutLLO, pudo expresarse y purificarse en un sistema de expresión de *E. coli* (Ejemplo 3) y mostró una actividad hemolítica sustancialmente reducida con respecto a la LLO de tipo silvestre (Ejemplo 4).

50 Por lo tanto, la región mutada de la proteína LLO de la presente invención comprende los residuos C484, W491, y W492 de la sec. con núm. de ident.: 37.

Además, según se proporciona en la presente descripción, un fragmento del CBD, residuos 484-492, se sustituyó con una secuencia heteróloga de NY-ESO-1 (Ejemplo 2). En otra modalidad, un único péptido puede tener una delección en la secuencia señal y una sustitución en el CBD.

55 La mutación por sustitución de la proteína recombinante de la presente invención, en otra modalidad, es una mutación en donde la región mutada de la proteína LLO se sustituye por un número igual de aa heterólogos. En otra modalidad, se introduce un mayor número de aa heterólogos que el tamaño de la región mutada. En otra modalidad, se introduce un menor número de aa heterólogos que el tamaño de la región mutada.

60 En esta invención, la longitud del péptido diferente de LLO que sustituye la región mutada de la proteína recombinante de la presente invención es de 8-50 aa. En una modalidad, la longitud es de 8-11 aa. En otra modalidad, la longitud es de 9-11 aa. En otra modalidad, la longitud es de 10-11 aa. En otra modalidad, la longitud es de 11-50 aa. En otra modalidad, la longitud es de 12-50 aa. En otra modalidad, la longitud es de 11-15 aa. En otra modalidad, la longitud es de 11-20 aa. En otra modalidad, la longitud es de 11-25 aa. En otra modalidad, la longitud es de 11-30 aa. En otra modalidad, la longitud es de 11-35 aa. En otra modalidad, la longitud es de 11-40 aa. En otra

modalidad, la longitud es de 15-20 aa. En otra modalidad, la longitud es de 15-25 aa. En otra modalidad, la longitud es de 15-30 aa. En otra modalidad, la longitud es de 15-35 aa. En otra modalidad, la longitud es de 15-40 aa. En otra modalidad, la longitud es de 20-25 aa. En otra modalidad, la longitud es de 20-30 aa. En otra modalidad, la longitud es de 20-35 aa. En otra modalidad, la longitud es de 20-40 aa. En otra modalidad, la longitud es de 30-35 aa. En otra modalidad, la longitud es de 30-40 aa.

Cuando se hace referencia a la longitud de un fragmento de LLO en la presente descripción, se incluye la secuencia señal. Por lo tanto, la numeración de la primera cisteína en el CBD es 484, y el número total de residuos de aa es 529.

Como se describe en la presente descripción, se creó una proteína LLO mutante en donde los residuos C484, W491, y W492 de LLO se sustituyeron con un epítipo de CTL del antígeno NY-ESO-1 (Ejemplo 2). La proteína LLO mutada, mutLLO, pudo expresarse y purificarse en un sistema de expresión de *E. coli* (Ejemplo 3) y mostró una actividad hemolítica sustancialmente reducida con respecto a la LLO de tipo silvestre (Ejemplo 4).

En otra modalidad, la proteína LLO mutada de la presente invención que comprende una delección interna tiene la longitud completa excepto por la delección interna. En esta invención, la delección interna de la proteína LLO comprende los residuos C484, W491, y W492. Específicamente, en esta invención, la delección interna consiste en los residuos 484-492 del CBD de la sec. con núm. de ident.: 37.

"Hemolítica" se refiere, en otra modalidad, a la capacidad de lisar una célula eucariota. En otra modalidad, la célula eucariota es un glóbulo rojo. En otra modalidad, la célula eucariota es cualquier otro tipo de célula eucariota conocida en la técnica. En otra modalidad, la actividad hemolítica se mide a un pH ácido. En otra modalidad, la actividad hemolítica se mide a pH fisiológico. En otra modalidad, la actividad hemolítica se mide a pH 5,5. En otra modalidad, la actividad hemolítica se mide a pH 7,4. En otra modalidad, la actividad hemolítica se mide a cualquier otro pH conocido en la técnica.

En otra modalidad, una proteína o polipéptido recombinantes de los métodos y las composiciones de la presente invención muestran una reducción de más de 100 veces en la actividad hemolítica con respecto a la LLO de tipo silvestre. En otra modalidad, la reducción es de más de 90 veces. En otra modalidad, la reducción es de más de 120 veces. En otra modalidad, la reducción es de más de 150 veces. En otra modalidad, la reducción es de más de 200 veces. En otra modalidad, la reducción es de más de 250 veces. En otra modalidad, la reducción es de más de 300 veces. En otra modalidad, la reducción es de más de 400 veces. En otra modalidad, la reducción es de más de 500 veces. En otra modalidad, la reducción es de más de 600 veces. En otra modalidad, la reducción es de más de 800 veces. En otra modalidad, la reducción es de más de 1000 veces. En otra modalidad, la reducción es de más de 1200 veces. En otra modalidad, la reducción es de más de 1500 veces. En otra modalidad, la reducción es de más de 2000 veces. En otra modalidad, la reducción es de más de 3000 veces. En otra modalidad, la reducción es de más de 5000 veces.

En otra modalidad, la reducción es de al menos 120 veces. En otra modalidad, la reducción es de al menos 150 veces. En otra modalidad, la reducción es de al menos 200 veces. En otra modalidad, la reducción es de al menos 250 veces. En otra modalidad, la reducción es de al menos 300 veces. En otra modalidad, la reducción es de al menos 400 veces. En otra modalidad, la reducción es de al menos 500 veces. En otra modalidad, la reducción es de al menos 600 veces. En otra modalidad, la reducción es de al menos 800 veces. En otra modalidad, la reducción es de al menos 1000 veces. En otra modalidad, la reducción es de al menos 1200 veces. En otra modalidad, la reducción es de al menos 1500 veces. En otra modalidad, la reducción es de al menos 2000 veces. En otra modalidad, la reducción es de al menos 3000 veces. En otra modalidad, la reducción es de al menos 5000 veces.

Los métodos para determinar la actividad hemolítica se conocen bien en la técnica, y se describen, por ejemplo, en los Ejemplos de la presente descripción, y en Portnoy DA y otros (J Exp Med Vol 167:1459-1471, 1988) y Dancz CE y otros (J Bacteriol. 184: 5935-5945, 2002).

Una "mutación inactivante" con respecto a la actividad hemolítica se refiere, en otra modalidad, a una mutación que anula una actividad hemolítica detectable. En otra modalidad, el término se refiere a una mutación que anula la actividad hemolítica a pH 5,5. En otra modalidad, el término se refiere a una mutación que anula la actividad hemolítica a pH 7,4. En otra modalidad, el término se refiere a una mutación que reduce significativamente la actividad hemolítica a pH 5,5. En otra modalidad, el término se refiere a una mutación que reduce significativamente la actividad hemolítica a pH 7,4. En otra modalidad, el término se refiere a una mutación que reduce significativamente la actividad hemolítica a pH 5,5. En otra modalidad, el término se refiere a cualquier otro tipo de mutación inactivante con respecto a la actividad hemolítica.

La secuencia del dominio de LLO de unión al colesterol se expone en la sec. con núm. de ident.: 18.

En otra modalidad, la proteína LLO mutada de la presente invención comprende el péptido señal de esta. En otra modalidad, la proteína LLO mutada o fragmento de esta comprende un péptido señal de una proteína LLO de tipo silvestre. En otra modalidad, el péptido señal es una cadena peptídica corta (3-60 aminoácidos de longitud) que

dirige el transporte postraduccional de una proteína. En otra modalidad, los péptidos señal son, además, señales de dirección, secuencias señal, péptidos de tránsito, o señales de localización. En otra modalidad, las secuencias de aminoácidos de los péptidos señal dirigen las proteínas a determinados organelos tales como el núcleo, matriz mitocondrial, retículo endoplásmico, cloroplasto, apoplasto o peroxisoma. En otra modalidad, la proteína LLO mutada contiene una secuencia señal de una proteína LLO de tipo silvestre. En otra modalidad, la proteína LLO mutada carece de un péptido señal. En otra modalidad, la proteína LLO mutada carece de una secuencia señal. En otra modalidad, el péptido señal no se modifica con respecto a la proteína LLO de tipo silvestre a partir de la cual se originó la proteína LLO mutada o un fragmento de esta. En otra modalidad, el péptido señal está en el extremo N terminal de la proteína o el polipéptido recombinantes.

Como se describe en la presente descripción, la proteína LLO mutada de la presente invención comprende una secuencia peptídica similar a PEST. En otra modalidad, la secuencia peptídica similar a PEST es una secuencia peptídica de LLO similar a PEST. En otra modalidad, la secuencia de aminoácidos de la secuencia peptídica similar a PEST se expone en la sec. con núm. de ident.: 63.

Las secuencias PEST son secuencias ricas en prolina (P), ácidos glutámicos (E), serinas (S) y treoninas (T), generalmente, pero no siempre, flanqueadas por grupos que contienen varios aminoácidos cargados positivamente, con cortos tiempos de vida media intracelular (Rogers y otros, 1986, Science 234:364-369). Las secuencias PEST dirigen la proteína a la vía ubiquitina-proteosoma para la degradación (Rechsteiner y Rogers TIBS 1996 21:267-271), que además es una vía usada por las células eucariotas para generar péptidos inmunogénicos que se unen al MHC clase I. Las secuencias PEST son abundantes entre las proteínas eucariotas que producen péptidos inmunogénicos (Realini y otros, FEBS Lett. 1994 348:109-113). Aunque las secuencias PEST se encuentran usualmente en proteínas eucariotas, una secuencia similar a PEST rica en los aminoácidos prolina (P), ácido glutámico (E), serina (S) y treonina (T) se identificó en el amino terminal de la proteína LLO de *Listeria* procariota y demostró ser esencial para la patogenicidad de *L. monocytogenes* (Decatur, A. L. y Portnoy, D. A. Science 2000 290:992-995). La presencia de esta secuencia similar a PEST en LLO dirige la proteína a su destrucción por la maquinaria proteolítica de la célula huésped de manera que una vez que la LLO ha cumplido su función y facilitado el escape de *L. monocytogenes* de la vacuola fagolisosómica, es destruida antes de que dañe las células.

La identificación de secuencias similares a PEST se conoce bien en la técnica, y se describe, por ejemplo, en Rogers S y otros (Amino acid sequences common to rapidly degraded proteins: the PEST hypothesis. Science 1986; 234(4774):364-8) y Rechsteiner M y otros (PEST sequences and regulation by proteolysis. Trends Biochem Sci 1996; 21(7):267-71). Una "secuencia similar a PEST" se refiere, en otra modalidad, a una región rica en residuos de prolina (P), ácido glutámico (E), serina (S), y treonina (T). En otra modalidad, la secuencia similar a PEST está flanqueada por uno o más grupos que contienen varios aminoácidos cargados positivamente. En otra modalidad, la secuencia similar a PEST media la degradación intracelular rápida de las proteínas que la contienen. En otra modalidad, la secuencia similar a PEST se adapta a un algoritmo descrito en Rogers y otros. En otra modalidad, la secuencia similar a PEST se adapta a un algoritmo descrito en Rechsteiner y otros. En otra modalidad, la secuencia similar a PEST contiene uno o más sitios de fosforilación internos, y la fosforilación en estos sitios precede a la degradación de proteínas.

En una modalidad, las secuencias similares a PEST de organismos procariotas se identifican de acuerdo con métodos tales como los que se describen en, por ejemplo, Rechsteiner y Rogers (1996, Trends Biochem. Sci. 21:267-271) para *LM* y en Rogers S y otros (Science 1986; 234(4774):364-8). Alternativamente, pueden identificarse además secuencias de aa similares a PEST a partir de otros organismos procariotas sobre la base de este método. Otros organismos procariotas en donde se esperarían secuencias de aa similares a PEST incluyen, pero sin limitarse a, otras especies de *Listeria*. En una modalidad, la secuencia similar a PEST se adapta a un algoritmo descrito en Rogers y otros. En otra modalidad, la secuencia similar a PEST se adapta a un algoritmo descrito en Rechsteiner y otros. En otra modalidad, la secuencia similar a PEST se identifica mediante el uso del programa de búsqueda de PEST.

En otra modalidad, la identificación de motivos PEST se logra mediante una exploración inicial de los aa cargados positivamente R, H, y K dentro de la secuencia especificada de la proteína. Se cuentan todos los aa entre los flancos cargados positivamente y sólo se consideran además, los motivos que contienen un número de aa igual o mayor que el parámetro de tamaño de la ventana. En otra modalidad, una secuencia similar a PEST debe contener al menos 1 P, 1 D o E, y al menos 1 S o T.

En otra modalidad, la calidad de un motivo PEST se refina por medio de un parámetro de puntuación basado en el enriquecimiento local de aa críticos, así como en la hidrofobicidad del motivo. El enriquecimiento de D, E, P, S y T se expresa en porcentaje de masa (p/p) y se corrige para 1 equivalente de D o E, 1 de P y 1 de S o T. En otra modalidad, el cálculo de hidrofobicidad sigue en principio, el método de J. Kyte y R.F. Doolittle (Kyte, J y Doolittle, RF. J. Mol. Biol. 157, 105 (1982). Para la simplificación de los cálculos, los índices de hidropatía de Kyte-Doolittle, que originalmente se encontraban en el intervalo de -4,5 para arginina a +4,5 para isoleucina, se convierten a números enteros positivos, mediante el uso de la siguiente transformación lineal, que produjo valores de 0 para arginina a 90 para isoleucina.

Índice de hidropatía = 10 * índice de hidropatía de Kyte-Doolittle + 45

En otra modalidad, la hidrofobicidad de un motivo PEST potencial se calcula como la suma sobre los productos del por ciento en moles y el índice de hidrofobicidad para cada especie de aa. La puntuación de PEST deseada se obtiene como la combinación del término de enriquecimiento local y el término de hidrofobicidad como se expresa por la siguiente ecuación:

Puntuación de PEST = 0,55 * DEPST - 0,5 * índice de hidrofobicidad.

En otra modalidad, los términos "secuencia PEST", "secuencia similar a PEST" o "secuencia peptídica similar a PEST" se refieren a un péptido que tiene una puntuación de al menos +5, con el uso del algoritmo anterior. En otra modalidad, el término se refiere a un péptido que tiene una puntuación de al menos 6. En otra modalidad, el péptido tiene una puntuación de al menos 7. En otra modalidad, la puntuación es al menos 8. En otra modalidad, la puntuación es al menos 9. En otra modalidad, la puntuación es al menos 10. En otra modalidad, la puntuación es al menos 11. En otra modalidad, la puntuación es al menos 12. En otra modalidad, la puntuación es al menos 13. En otra modalidad, la puntuación es al menos 14. En otra modalidad, la puntuación es al menos 15. En otra modalidad, la puntuación es al menos 16. En otra modalidad, la puntuación es al menos 17. En otra modalidad, la puntuación es al menos 18. En otra modalidad, la puntuación es al menos 19. En otra modalidad, la puntuación es al menos 20. En otra modalidad, la puntuación es al menos 21. En otra modalidad, la puntuación es al menos 22. En otra modalidad, la puntuación es al menos 23. En otra modalidad, la puntuación es al menos 24. En otra modalidad, la puntuación es al menos 25. En otra modalidad, la puntuación es al menos 26. En otra modalidad, la puntuación es al menos 27. En otra modalidad, la puntuación es al menos 28. En otra modalidad, la puntuación es al menos 29. En otra modalidad, la puntuación es al menos 30. En otra modalidad, la puntuación es al menos 31. En otra modalidad, la puntuación es al menos 32. En otra modalidad, la puntuación es al menos 33. En otra modalidad, la puntuación es al menos 34. En otra modalidad, la puntuación es al menos 35. En otra modalidad, la puntuación es al menos 36. En otra modalidad, la puntuación es al menos 37. En otra modalidad, la puntuación es al menos 38. En otra modalidad, la puntuación es al menos 39. En otra modalidad, la puntuación es al menos 40. En otra modalidad, la puntuación es al menos 41. En otra modalidad, la puntuación es al menos 42. En otra modalidad, la puntuación es al menos 43. En otra modalidad, la puntuación es al menos 44. En otra modalidad, la puntuación es al menos 45.

En otra modalidad, la secuencia similar a PEST se identifica mediante el uso de cualquier otro método o algoritmo conocido en la técnica, por ejemplo, el CaSPredictor (Garay-Malpartida HM, Occhiucci JM, Alves J, Belizario JE. Bioinformatics. Junio 2005;21 Suppl 1:i169-76). En otra modalidad, se usa el siguiente método:

Un índice de PEST se calcula para cada tramo de longitud adecuada (por ejemplo, un tramo de 30-35 aa) mediante la asignación de un valor de 1 a los aa Ser, Thr, Pro, Glu, Asp, Asn, o Gln. El valor del coeficiente (CV) para cada uno de los residuos de PEST es 1 y para cada uno de los otros aa (diferentes de PEST) es 0.

Como se describe en la presente descripción, la respuesta inmunológica a un antígeno puede mejorarse por la fusión del antígeno a una forma truncada no hemolítica de listeriolisina O (Δ LLO). La observación de una mejor inmunidad mediada por células e inmunidad antitumoral de la proteína de fusión es el resultado de la secuencia similar a PEST presente en LLO que dirige el antígeno a su procesamiento.

En esta invención, el péptido diferente de LLO que sustituye la región mutada de la proteína o el polipéptido recombinantes comprende una porción inmunogénica del péptido antigénico de interés. En otra modalidad, el péptido antigénico es un epítipo de linfocitos T citotóxicos (CTL). En otra modalidad, el péptido antigénico es un epítipo de células T CD4⁺. En otra modalidad, el péptido antigénico es cualquier otro tipo de péptido conocido en la técnica.

En otra modalidad, la presente invención proporciona una vacuna que comprende un adyuvante y una proteína o polipéptido recombinantes de la presente invención, en donde un péptido antigénico de interés sustituye la región mutada. En otra modalidad, la presente invención proporciona una composición inmunogénica que comprende la proteína o el polipéptido recombinantes.

En otra modalidad, la presente invención proporciona una molécula de nucleótidos que codifica una proteína o polipéptido recombinantes de la presente invención, en donde un péptido antigénico de interés sustituye la región mutada.

En otra modalidad, la presente invención proporciona una molécula de nucleótidos que codifica una proteína o polipéptido recombinantes de la presente invención.

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

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

En otra modalidad, la presente invención proporciona un vector de vacuna recombinante que codifica una proteína o polipéptido recombinantes de la presente invención.

- En otra modalidad, la presente invención proporciona una cepa de *Listeria* recombinante que comprende una proteína o polipéptido recombinantes de la presente invención. En otra modalidad, la presente invención proporciona una cepa de *Listeria* recombinante que expresa una proteína o polipéptido recombinantes de la presente invención.
- 5 En otra modalidad, la presente invención proporciona una cepa de *Listeria* recombinante que codifica una proteína o polipéptido recombinantes de la presente invención. En otra modalidad, la presente invención proporciona una cepa de *Listeria* recombinante que comprende un nucleótido recombinante que codifica un polipéptido recombinante de la presente invención. En otra modalidad, la cepa de vacuna de *Listeria* es la especie *Listeria monocytogenes* (LM).
- 10 En otra modalidad, la presente invención proporciona una célula que comprende un vector de la presente invención. Los métodos para producir células que comprenden vectores y/o ácidos nucleicos exógenos se conocen bien en la técnica. Ver, por ejemplo, Sambrook y otros (1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York), y en Ausubel y otros (1997, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Nueva York).
- 15 En otra modalidad, la presente invención proporciona una vacuna que comprende una molécula de nucleótidos de la presente invención. En otra modalidad, la presente invención proporciona una composición inmunogénica que comprende la molécula de nucleótidos.
- 20 El adyuvante utilizado en las composiciones de vacunas de la presente invención, en otra modalidad, es una proteína del factor estimulante de colonias de granulocitos/macrófagos (GM-CSF). En otra modalidad, el adyuvante comprende una proteína GM-CSF. En otra modalidad, el adyuvante es una molécula de nucleótidos que codifica al GM-CSF. En otra modalidad, el adyuvante comprende una molécula de nucleótidos que codifica al GM-CSF. En otra modalidad, el adyuvante es saponina QS21. En otra modalidad, el adyuvante comprende saponina QS21. En otra modalidad, el adyuvante es el monofosforil lípido A. En otra modalidad, el adyuvante comprende monofosforil lípido A. En otra modalidad, el adyuvante es SBAS2. En otra modalidad, el adyuvante comprende SBAS2. En otra modalidad, el adyuvante es un oligonucleótido que contiene CpG no metilado. En otra modalidad, el adyuvante comprende un oligonucleótido que contiene CpG no metilado. En otra modalidad, el adyuvante es una citocina estimulante del sistema inmunológico. En otra modalidad, el adyuvante comprende una citocina estimulante del sistema inmunológico. En otra modalidad, el adyuvante es una molécula de nucleótidos que codifica una citocina estimulante del sistema inmunológico. En otra modalidad, el adyuvante comprende una molécula de nucleótidos que codifica una citocina estimulante del sistema inmunológico. En otra modalidad, el adyuvante es o comprende un glucósido pluma. En otra modalidad, el adyuvante es o comprende un mitógeno bacteriano. En otra modalidad, el adyuvante es o comprende una toxina bacteriana. En otra modalidad, el adyuvante es o comprende cualquier otro adyuvante conocido en la técnica.
- 30 La presente invención describe un método para inducir una respuesta inmunológica en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una proteína o polipéptido recombinantes de la presente invención, en donde la proteína o el polipéptido recombinantes contienen un péptido antigénico de interés, lo que induce de esta manera una respuesta inmunológica contra un péptido antigénico de interés.
- 40 La presente solicitud describe, además, un método para inducir una respuesta inmunológica en un sujeto, que comprende administrar al sujeto un vector de vacuna recombinante de la presente invención, en donde el vector de vacuna recombinante comprende o codifica una proteína o polipéptido recombinantes que comprenden un péptido antigénico heterólogo de interés, lo que induce de esta manera una respuesta inmunológica contra el péptido antigénico de interés.
- 45 La presente solicitud describe, además, un método para inducir una respuesta inmunológica en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una cepa de *Listeria* recombinante de la presente invención, en donde la cepa de *Listeria* recombinante comprende o codifica una proteína o polipéptido recombinantes que comprenden un péptido antigénico heterólogo de interés, lo que induce de esta manera una respuesta inmunológica contra el péptido heterólogo de interés.
- 50 La presente invención proporciona la proteína recombinante, o la molécula de nucleótidos, o el vector de vacuna recombinante, o la cepa de *Listeria* recombinante de la invención para usar como un medicamento.
- 55 Como se describe en la presente descripción, un péptido o molécula de nucleótidos de la presente invención pueden administrarse a un sujeto que tiene un linfoma, célula cancerosa, o enfermedad infecciosa que expresa un antígeno objetivo de la presente invención. En otra modalidad, el péptido o molécula de nucleótidos puede administrarse ex vivo a las células de un sujeto. En otra modalidad, el péptido puede administrarse a un donante de linfocitos; después los linfocitos del donante se administran, en otra modalidad, a un sujeto. En otra modalidad, el péptido puede administrarse a un donante de anticuerpos o linfocitos; después el antisuero o los linfocitos del donante se administran, en otra modalidad, a un sujeto.
- 60 La presente solicitud describe un método para producir una proteína o polipéptido recombinantes de la presente invención que comprende la etapa de traducir dicha proteína o polipéptido recombinantes a partir de una molécula
- 65

de nucleótidos que codifica los mismos. En otra modalidad, la presente invención proporciona un producto producido por uno o más de los procesos descritos en la presente descripción.

Como se describe en la presente descripción, el péptido heterólogo de interés puede ser una proteína de longitud completa, que en una modalidad, comprende un péptido antigénico. En una modalidad, la proteína es una proteína NY-ESO-1. En otra modalidad, la proteína es una proteína E7 del virus del papiloma humano (HPV). En otra modalidad, la proteína es una proteína del receptor de células B (BCR). Como se describe en la presente descripción, el péptido heterólogo de interés es un péptido antigénico.

El péptido antigénico de interés en la presente invención es, en otra modalidad, un péptido NY-ESO-1.

En otra modalidad, la presente invención proporciona una molécula de nucleótidos recombinante que codifica un péptido que contiene NY-ESO-1 de la presente invención. En otra modalidad, la presente invención proporciona una composición que comprende una proteína o polipéptido recombinantes, que contienen LLO mutante, de la presente invención, y un péptido NY-ESO-1. En otra modalidad, la presente invención proporciona un vector de vacuna recombinante que codifica un péptido de la presente invención que contiene NY-ESO-1. En otra modalidad, la presente invención proporciona una cepa de *Listeria* recombinante que codifica un péptido de la presente invención que contiene NY-ESO-1.

NY-ESO-1 es un antígeno "de cáncer de testículo" expresado en el cáncer epitelial de ovario (EOC). NY-ESO-1 se expresa en melanoma metastásico, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer esofágico, que en una modalidad, es carcinoma de células escamosas esofágicas, o una combinación de estos. En una modalidad, NY-ESO-1 es uno de los antígenos de cáncer de testículo más inmunogénicos. En otra modalidad NY-ESO-1 es capaz de inducir fuertes respuestas inmunológicas humerales (anticuerpos) y celulares (células T) en pacientes con cánceres que expresan NY-ESO-1 a través de una inducción natural o espontánea por el tumor de los pacientes o después de una vacunación específica mediante el uso de epítopos peptídicos definidos. En otra modalidad, los epítopos peptídicos de NY-ESO-1 se presentan por moléculas MHC clase II. Por lo tanto, en una modalidad, las composiciones y métodos de la presente invención que comprenden NY-ESO-1 son particularmente útiles en la prevención o el tratamiento de los cánceres mencionados anteriormente.

La presente solicitud describe un método para inducir una respuesta inmunológica en un sujeto contra una célula cancerosa que expresa NY-ESO-1, que comprende la etapa de administrar al sujeto un péptido, proteína o polipéptido recombinantes que contienen el antígeno NY-ESO-1, o un vector de vacuna que expresa el antígeno NY-ESO-1, o una molécula de nucleótidos que codifica el antígeno NY-ESO-1, o una cepa de *Listeria* recombinante que expresa el antígeno NY-ESO-1, de la presente invención, lo que induce de esta manera una respuesta inmunológica contra una célula cancerosa que expresa NY-ESO-1. En otra modalidad, la célula cancerosa es una célula de melanoma ovárico. En otra modalidad, la célula cancerosa es una célula de cáncer de pulmón. En otra modalidad, la célula cancerosa es cualquier otra célula cancerosa que exprese NY-ESO-1, conocida en la técnica.

La presente invención proporciona, por lo tanto, una proteína recombinante, o una molécula de nucleótidos, o un vector de vacuna recombinante, o una cepa de *Listeria* recombinante de la invención, en donde el péptido antigénico es un péptido NY-ESO-1, para usar en el tratamiento, inhibición, supresión, inducción de la regresión, reducción de la incidencia de un tumor que expresa NY-ESO-1, o la protección contra este, en un sujeto.

En una modalidad, el tumor es un tumor de melanoma ovárico. En otra modalidad, el tumor es un tumor de cáncer de pulmón. En otra modalidad, el tumor es cualquier otro tumor que exprese NY-ESO-1 conocido en la técnica.

La presente solicitud describe, además, un método para inducir una respuesta inmunológica contra un epítipo de NY-ESO-1, que comprende la etapa de administrar al sujeto un péptido, proteína o polipéptido recombinantes de la presente invención que contienen el antígeno NY-ESO-1, lo que induce de esta manera una respuesta inmunológica contra un epítipo de NY-ESO-1.

Como se describe en la presente descripción, la presente solicitud proporciona un método para inducir una respuesta inmunológica contra un antígeno NY-ESO-1, que comprende la etapa de administrar al sujeto un péptido, proteína o polipéptido recombinantes de la presente invención que contienen dicho antígeno NY-ESO-1, lo que induce de esta manera una respuesta inmunológica contra un epítipo de NY-ESO-1.

En una modalidad, un epítipo de NY-ESO-1 para usar en la presente invención es ASGPGGGAPR: 53-62 (A31), ARGPE SRL: 80-88 (Cw6), LAMPFATPM: 92-100 (Cw3), MPFATPMEA: 94-102 (B35, B51), TVSGNILTR: 127-136 (A68), TVSGNILT: 127-135 (Cw15), SLLMWITQC: 157-165 (A2; Ejemplo 2), u otro epítipo de NY-ESO-1 conocido en la técnica.

En la presente descripción se describe además un método para inducir una respuesta inmunológica contra una célula objetivo que expresa NY-ESO-1, que comprende la etapa de administrar al sujeto un péptido, proteína o polipéptido recombinantes de la presente invención que contienen el antígeno NY-ESO-1, lo que induce de esta manera una respuesta inmunológica contra una célula objetivo que expresa NY-ESO-1. En otra modalidad, la célula

objetivo es una célula de melanoma ovárico. En otra modalidad, la célula objetivo es una célula de cáncer de pulmón. En otra modalidad, la célula objetivo es cualquier otra célula que exprese NY-ESO-1, conocida en la técnica.

El tumor o célula cancerosa objetivo que expresan NY-ESO-1 pueden ser un tumor o célula de un cáncer pulmonar no microcítico (NSCLC). En otra modalidad, la célula cancerosa que expresa NY-ESO-1 es una célula o tumor de adenocarcinoma pulmonar. En otra modalidad, la célula cancerosa que expresa NY-ESO-1 es una célula o tumor de carcinoma bronquioloalveolar (BAC). En otra modalidad, la célula cancerosa que expresa NY-ESO-1 es una célula o tumor de un adenocarcinoma con características bronquioloalveolares (AdenoBAC). En otra modalidad, la célula cancerosa o tumor que expresan NY-ESO-1 es de un carcinoma de células escamosas del pulmón.

El péptido NY-ESO-1 puede ser un péptido de una proteína NY-ESO-1, en donde la secuencia de la proteína es:

MQAEGRTGGSTGDADGPGGPGIPDGPNGAGGPGGAGATGGRGPRGAGAA
 RASGPGGGAPRPHGGAASGLNGCCRCGARGPESRLLEFYLA MPFATPMEAE LARR
 SLAQDAPPLVPVGVLLKEFTVSGNILTIRLTAA DHRQLQLSISSCLQLSLLMWITQCF LPVFLAQPPSGQRR
 (sec. con núm. de ident.: 1; núm. de registro del GenBank NM_001327). En otra modalidad, la proteína NY-ESO-1 es un homólogo de la sec. con núm. de ident.: 1. En otra modalidad, la proteína NY-ESO-1 es una variante de la sec. con núm. de ident.: 1. En otra modalidad, la proteína NY-ESO-1 es un isómero de la sec. con núm. de ident.: 1. En otra modalidad, la proteína NY-ESO-1 es un fragmento de la sec. con núm. de ident.: 1. En otra modalidad, la proteína NY-ESO-1 es un fragmento de un homólogo de la sec. con núm. de ident.: 1. En otra modalidad, la proteína NY-ESO-1 es un fragmento de una variante de la sec. con núm. de ident.: 1. En otra modalidad, la proteína NY-ESO-1 es un fragmento de un isómero de la sec. con núm. de ident.: 1.

En otra modalidad, el péptido NY-ESO-1 de la presente invención se origina de cualquier otra proteína NY-ESO-1 conocida en la técnica. En otra modalidad, el antígeno NY-ESO-1 es un péptido que tiene la secuencia: SLLMWITQC (sec. con núm. de ident.: 2). En otra modalidad, la secuencia es SLLMWITQCFL (sec. con núm. de ident.: 3). En otra modalidad, la secuencia es SLLMWITQCFLP (sec. con núm. de ident.: 4). En otra modalidad, la secuencia es SLLMWITQCFLPV (sec. con núm. de ident.: 5). En otra modalidad, la secuencia es SLLMWITQCFLPVF (sec. con núm. de ident.: 6). En otra modalidad, la secuencia es SLLMWITQCFLPVFL (sec. con núm. de ident.: 7). En otra modalidad, la secuencia es WITQCFLPVFLAQPPSGQRR (sec. con núm. de ident.: 8). En otra modalidad, la secuencia es YLA MPFATPMEAE LARRSLA (sec. con núm. de ident.: 9). En otra modalidad, la secuencia es ASGPGGGAPR (sec. con núm. de ident.: 10). En otra modalidad, la secuencia es MPFATPMEA (sec. con núm. de ident.: 11). En otra modalidad, la secuencia es LAMPFATPM (sec. con núm. de ident.: 12). En otra modalidad, la secuencia es ARGPESRL (sec. con núm. de ident.: 13). En otra modalidad, la secuencia es SLLMWITQCF (sec. con núm. de ident.: 14). En otra modalidad, la secuencia es SLLMWITQV (sec. con núm. de ident.: 15). En una modalidad, el antígeno NY-ESO-1 es un péptido que comprende las posiciones 157-165 del péptido NY-ESO-1 de tipo silvestre. En otra modalidad, el antígeno NY-ESO-1 es un péptido que comprende las posiciones 53-62 del péptido NY-ESO-1 de tipo silvestre. En otra modalidad, el antígeno NY-ESO-1 es un péptido que comprende las posiciones 94-102 del péptido NY-ESO-1 de tipo silvestre. En otra modalidad, el antígeno NY-ESO-1 es un péptido que comprende las posiciones 92-100 del péptido NY-ESO-1 de tipo silvestre. En otra modalidad, el antígeno NY-ESO-1 es un péptido que comprende las posiciones 80-88 del péptido NY-ESO-1 de tipo silvestre. En otra modalidad, el antígeno NY-ESO-1 es un péptido que comprende las posiciones 158-166 del péptido NY-ESO-1 de tipo silvestre. En otra modalidad, el antígeno NY-ESO-1 es una variante de un péptido NY-ESO-1 de tipo silvestre. Un ejemplo de una variante es SLLMWITQV (sec. con núm. de ident.: 16).

En otra modalidad, el péptido antigénico utilizado en la presente invención es un péptido E7 del virus del papiloma humano (HPV). En otra modalidad, el péptido antigénico es una proteína E7 completa. En otra modalidad, el péptido antigénico es un fragmento de una proteína E7.

Las proteínas E6 y E7 son dos de siete proteínas tempranas no estructurales, algunas de las cuales desempeñan un papel en la replicación viral (E1, E2, E4) y/o en la maduración del virus (E4). En otra modalidad, las proteínas E6 y E7 son oncoproteínas que son críticas para la replicación viral, así como para la inmortalización y transformación de las células huésped. En una modalidad, las proteínas virales E6 y E7 no se expresan en el epitelio escamoso cervical normal. En otra modalidad, se necesita la expresión de los genes de E6 y E7 en las células madre epiteliales de la mucosa para iniciar y mantener la carcinogénesis cervical. Además y en algunas modalidades, la progresión de las lesiones preneoplásicas a cánceres cervicales invasivos se asocia con un aumento continuo de la expresión de las oncoproteínas E6 y E7. Por lo tanto, en otra modalidad, E6 y E7 se expresan en cánceres cervicales. En otra modalidad, el potencial oncogénico de E6 y E7 puede provenir de sus propiedades de unión a las proteínas de las células huésped. Por ejemplo y en una modalidad, E6 se une a la proteína supresora de tumores p53 lo que conduce a una degradación de la proteína, dependiente de ubiquitina, y, en otra modalidad, E7 se une y promueve la degradación de la proteína de retinoblastoma supresora de tumor (pRb). Por lo tanto, en una modalidad, las composiciones y usos de la presente invención que comprenden E7 de HPV son particularmente útiles en la prevención o el tratamiento de los cánceres mencionados anteriormente.

En otra modalidad, la presente invención proporciona una molécula de nucleótidos recombinante que codifica un péptido que contiene E7, de la presente invención. En otra modalidad, la presente invención proporciona una composición que comprende un péptido, proteína o polipéptido recombinantes que contienen LLO mutante, de la presente invención, y un péptido E7. En otra modalidad, la presente invención proporciona un vector de vacuna recombinante que codifica un péptido que contiene E7, de la presente invención. En otra modalidad, la presente invención proporciona una cepa de *Listeria* recombinante que codifica un péptido que contiene E7, de la presente invención.

En otra modalidad, la presente solicitud describe un método para inducir una respuesta inmunológica en un sujeto contra un epítipo de E7 de HPV, que comprende la etapa de administrar al sujeto el péptido, proteína o polipéptido recombinantes de la presente invención, lo que induce de esta manera una respuesta inmunológica contra un epítipo de E7 de HPV.

En una modalidad, un epítipo de E7 de HPV para usar en la presente invención es TLHEYMLDL: 7-15 (B8), YMLDLQPETT: 11-20 (A2), LLMGTLGIV: 82-90 (A2), TLGIVCPI: 86-93 (A2), u otro epítipo de E7 de HPV conocido en la técnica.

En otra modalidad, la presente invención proporciona una proteína recombinante, o una molécula de nucleótidos, o un vector de vacuna recombinante, o una cepa de *Listeria* recombinante de la invención, en donde el péptido antigénico es un péptido E7 de HPV, para usar en la inducción de una respuesta inmunológica al péptido antigénico E7 de HPV en un sujeto.

La presente solicitud describe, además, un método para inducir una respuesta inmunológica en un sujeto contra una célula objetivo que expresa E7 de HPV, que comprende la etapa de administrar al sujeto un péptido, proteína o polipéptido recombinantes de la presente invención que contienen E7 de HPV, o un nucleótido o un vector de vacuna o una cepa de *Listeria* que codifican el péptido, proteína o polipéptido recombinantes de la invención que contienen E7 de HPV, lo que induce de esta manera una respuesta inmunológica contra una célula objetivo que expresa E7 de HPV. La célula objetivo puede ser una célula de cáncer cervical, o una célula de cáncer de cabeza y cuello, o cualquier otro tipo de célula que exprese E7 de HPV, conocida en la técnica.

La presente invención proporciona una proteína recombinante, o una molécula de nucleótidos, o un vector de vacuna recombinante, o una cepa de *Listeria* recombinante de la invención, en donde el péptido antigénico es un péptido E7 de HPV, para usar en el tratamiento, inhibición, supresión, inducción de la regresión, reducción de la incidencia de un tumor que expresa E7 de HPV, o la protección contra este, en un sujeto.

En una modalidad, el tumor es un tumor cervical. En otra modalidad, el tumor es un tumor de cabeza y cuello. En otra modalidad, el tumor es cualquier otro tipo de tumor que exprese E7 de HPV, conocido en la técnica.

El tumor cervical al que se dirigen las proteínas, nucleótidos, vectores de vacunas o cepas de *Listeria* de la presente invención, en otra modalidad, es un carcinoma de células escamosas. En otra modalidad, el cáncer cervical es un adenocarcinoma. En otra modalidad, el tumor cervical es un carcinoma adenoescamoso. En otra modalidad, el tumor cervical es un carcinoma de células pequeñas. En otra modalidad, el tumor cervical es cualquier otro tipo de tumor cervical conocido en la técnica.

En una modalidad, el tumor al que se dirigen las proteínas, nucleótidos, vectores de vacunas o cepas de *Listeria* de la presente invención es un carcinoma de cabeza y cuello. En otra modalidad, el tumor es un carcinoma anal. En otra modalidad, el tumor es un carcinoma vulvar. En otra modalidad, el tumor es un carcinoma vaginal.

En una modalidad, las proteínas, nucleótidos, vectores de vacunas o cepas de *Listeria* proporcionados en la presente descripción pueden usarse junto con otros métodos para tratar, inhibir, o suprimir un cáncer cervical, que incluyen, *entre otros*, cirugía, radioterapia, quimioterapia, vigilancia, adyuvante (adicional), o una combinación de estos tratamientos.

La proteína E7 que se utiliza (ya sea completa o como la fuente de los fragmentos), en otra modalidad, tiene la secuencia

MHGDTPTLHEYMLDLQPETTDLYCYEQLNDSSEEEDEIDGPAGQAE PDRAHY

NIVTFCKCDSTLR LCVQSTHVDIRTLEDLLMGTLGIVCPICSQKP (sec. con núm. de ident.: 17). En otra modalidad, la proteína E7 es un homólogo de la sec. con núm. de ident.: 17. En otra modalidad, la proteína E7 es una variante de la sec. con núm. de ident.: 17. En otra modalidad, la proteína E7 es un isómero de la sec. con núm. de ident.: 17. En otra modalidad, la proteína E7 es un fragmento de la sec. con núm. de ident.: 17. En otra modalidad, la proteína E7 es un fragmento de un homólogo de la sec. con núm. de ident.: 17. En otra modalidad, la proteína E7 es un fragmento de una variante de la sec. con núm. de ident.: 17. En otra modalidad, la proteína E7 es un fragmento de un isómero de la sec. con núm. de ident.: 17.

En una modalidad, el dominio de LLO de unión al colesterol (ECTGLAWWWWR; sec. con núm. de ident.: 18) se sustituye con un epítipo de E7 (RAHYNIVTF; sec. con núm. de ident.: 19).

En otra modalidad, la secuencia de la proteína E7 es:

MHGP KATLQDIVLHLEPQNEIPVDLLCHEQLSDSEEENDEIDGVNHQHLPARR

AEPQRHTMLCMCKCEARIELVVESSADDLRAFQQLFLNTLSFVCPWCASQQ (sec. con núm. de ident.: 20).

En otra modalidad, la proteína E7 es un homólogo de la sec. con núm. de ident.: 20. En otra modalidad, la proteína E7 es una variante de la sec. con núm. de ident.: 20. En otra modalidad, la proteína E7 es un isómero de la sec. con núm. de ident.: 20. En otra modalidad, la proteína E7 es un fragmento de la sec. con núm. de ident.: 20. En otra modalidad, la proteína E7 es un fragmento de un homólogo de la sec. con núm. de ident.: 20. En otra modalidad, la proteína E7 es un fragmento de una variante de la sec. con núm. de ident.: 20. En otra modalidad, la proteína E7 es un fragmento de un isómero de la sec. con núm. de ident.: 20.

En otra modalidad, la proteína E7 tiene una secuencia que se expone en una de las siguientes entradas del GenBank: M24215, NC_004500, V01116, X62843, o M14119. En otra modalidad, la proteína E7 es un homólogo de una secuencia de una de las entradas anteriores del GenBank. En otra modalidad, la proteína E7 es una variante de una secuencia de una de las entradas anteriores del GenBank. En otra modalidad, la proteína E7 es un isómero de una secuencia de una de las entradas anteriores del GenBank. En otra modalidad, la proteína E7 es un fragmento de una secuencia de una de las entradas anteriores del GenBank. En otra modalidad, la proteína E7 es un fragmento de un homólogo de una secuencia de una de las entradas anteriores del GenBank. En otra modalidad, la proteína E7 es un fragmento de una variante de una secuencia de una de las entradas anteriores del GenBank. En otra modalidad, la proteína E7 es un fragmento de un isómero de una secuencia de una de las entradas anteriores del GenBank.

En una modalidad, el antígeno E7 de HPV16 es un péptido que tiene la secuencia: TLGIVCPI (sec. con núm. de ident.: 21). En otra modalidad, el antígeno E7 de HPV16 es un péptido que tiene la secuencia: LLMGTGLIV (sec. con núm. de ident.: 22). En otra modalidad, el antígeno E7 de HPV16 es un péptido que tiene la secuencia: YMLDLQPETT (sec. con núm. de ident.: 23). En una modalidad, el antígeno E7 de HPV16 es un péptido que comprende las posiciones 86-93 del antígeno E7 de HPV16 de tipo silvestre. En una modalidad, el antígeno E7 de HPV16 es un péptido que comprende las posiciones 82-90 del antígeno E7 de HPV16 de tipo silvestre. En una modalidad, el antígeno E7 de HPV16 es un péptido que comprende las posiciones 11-20 del antígeno E7 de HPV16 de tipo silvestre. En otra modalidad, el antígeno E7 de HPV16 es un péptido que consiste en las posiciones 86-93, 82-90, u 11-20 del antígeno E7 de HPV16 de tipo silvestre. En otra modalidad, el antígeno E7 de HPV16 es una variante de un péptido E7 de HPV16 de tipo silvestre. En otra modalidad, el antígeno E7 de HPV16 es cualquier antígeno E7 de HPV16 descrito en Rensing y otros, J Immunol 1995 154(11):5934-43.

En otra modalidad, el péptido antigénico utilizado en la presente invención es un péptido E6 de HPV. En otra modalidad, el péptido antigénico es una proteína E6 completa. En otra modalidad, el péptido antigénico es un fragmento de una proteína E6.

Por lo tanto, la presente invención proporciona una proteína recombinante, o una molécula de nucleótidos, o un vector de vacuna recombinante, o una cepa de *Listeria* recombinante de la invención, en donde el péptido antigénico es un péptido E6 de HPV, para usar en la inducción de una respuesta inmunológica al péptido antigénico E6 de HPV en un sujeto.

La proteína E6 que se utiliza (ya sea completa o como la fuente de los fragmentos) tiene, en otra modalidad, la secuencia

MHQKRTAMFQDPQERPRKLPQLCTELQTTIHDIILECVYCKQQLLRREVYDFA

FRDLCIVYRDGNPYAVCDKCLKFYISKISEYRHYCYSLYGTTLEQQYNKPLCDLLIRCI

NCQKPLCPEEKQRHLDDKKQRFHNIIRGRWTGRMSCCRSSRTTRRETQL (sec. con núm. de ident.: 24). En otra modalidad, la proteína E6 es un homólogo de la sec. con núm. de ident.: 24. En otra modalidad, la proteína E6 es una variante de la sec. con núm. de ident.: 24. En otra modalidad, la proteína E6 es un isómero de la sec. con núm. de ident.: 24. En otra modalidad, la proteína E6 es un fragmento de la sec. con núm. de ident.: 24. En otra modalidad, la proteína E6 es un fragmento de un homólogo de la sec. con núm. de ident.: 24. En otra modalidad, la proteína E6 es un fragmento de una variante de la sec. con núm. de ident.: 24. En otra modalidad, la proteína E6 es un fragmento de un isómero de la sec. con núm. de ident.: 24.

En otra modalidad, la secuencia de la proteína E6 es:

MARFEDPTRRPYKLPDLCTELNTSLQDIEITCVYCKTVLELTVFEFAFKDLFV

VYRDSIPHAACHKCIDFYSRIRELRHYSDSVYGDITLEKLTNTGLYNLLIRCLRCQKPL

NPAEKLRLHNEKRRFHNIAAGHYRGQCHSCCNRARQERLQRRETQV (sec. con núm. de ident.: 25). En otra modalidad, la proteína E6 es un homólogo de la sec. con núm. de ident.: 25. En otra modalidad, la proteína E6 es una variante de la sec. con núm. de ident.: 25. En otra modalidad, la proteína E6 es un isómero de la

sec. con núm. de ident.: 25. En otra modalidad, la proteína E6 es un fragmento de la sec. con núm. de ident.: 25. En otra modalidad, la proteína E6 es un fragmento de un homólogo de la sec. con núm. de ident.: 25. En otra modalidad, la proteína E6 es un fragmento de una variante de la sec. con núm. de ident.: 25. En otra modalidad, la proteína E6 es un fragmento de un isómero de la sec. con núm. de ident.: 25.

En otra modalidad, la proteína E6 tiene una secuencia que se expone en una de las siguientes entradas del GenBank: M24215, M14119, NC_004500, V01116, X62843, o M14119. En otra modalidad, la proteína E6 es un homólogo de una secuencia de una de las entradas anteriores del GenBank. En otra modalidad, la proteína E6 es una variante de una secuencia de una de las entradas anteriores del GenBank. En otra modalidad, la proteína E6 es un isómero de una secuencia de una de las entradas anteriores del GenBank. En otra modalidad, la proteína E6 es un fragmento de una secuencia de una de las entradas anteriores del GenBank. En otra modalidad, la proteína E6 es un fragmento de un homólogo de una secuencia de una de las entradas anteriores del GenBank. En otra modalidad, la proteína E6 es un fragmento de una variante de una secuencia de una de las entradas anteriores del GenBank. En otra modalidad, la proteína E6 es un fragmento de un isómero de una secuencia de una de las entradas anteriores del GenBank.

El HPV que es la fuente del antígeno heterólogo de los métodos de la presente invención es, en otra modalidad, un HPV 16. En otra modalidad, el HPV es un HPV-18. En otra modalidad, el HPV se selecciona de HPV-16 y HPV-18. En otra modalidad, el HPV es un HPV-31. En otra modalidad, el HPV es un HPV-35. En otra modalidad, el HPV es un HPV-39. En otra modalidad, el HPV es un HPV-45. En otra modalidad, el HPV es un HPV-51. En otra modalidad, el HPV es un HPV-52. En otra modalidad, el HPV es un HPV-58. En otra modalidad, el HPV es un tipo de HPV de alto riesgo. En otra modalidad, el HPV es un tipo de HPV mucosal.

En una modalidad, un factor etiológico muy importante en la génesis del carcinoma cervical es la infección por los papilomavirus humanos (HPV), que, en una modalidad, son virus pequeños de ADN que infectan las células epiteliales de la piel o la mucosa. En una modalidad, las neoplasias malignas relacionadas con el HPV incluyen los cánceres oral, cervical, anogenital, y cervical así como papilomatosis respiratoria. En una modalidad, el HPV expresa seis o siete proteínas no estructurales y dos proteínas estructurales, cada una de las cuales puede servir como un objetivo en los enfoques inmunoprolácticos o inmunoterapéuticos descritos en la presente descripción. En una modalidad, las proteínas de la cápside vírica L1 y L2 son proteínas estructurales tardías. En una modalidad, L1 es la proteína principal de la cápside, cuya secuencia de aminoácidos está muy conservada entre diferentes tipos de HPV.

En otra modalidad, el péptido antigénico de interés utilizado en la presente invención es un idiotipo de BCR.

En una modalidad, los "receptores de células B" o "BCR" son los receptores de la superficie celular de células B para un antígeno específico. En otra modalidad, el BCR está compuesto de una molécula transmembrana de inmunoglobulina asociada con las cadenas Igα e Igβ invariantes en un complejo no covalente. En otra modalidad, la señalización del receptor de células B (BCR) regula varias decisiones del destino de las células B a lo largo del desarrollo. En otra modalidad, la expresión continuada de las subunidades de señalización del BCR es necesaria para la supervivencia de las células B maduras. En otra modalidad, las alteraciones en la señalización del BCR pueden apoyar la linfomagénesis. En una modalidad, las células tienen la proteína CD20 en el exterior de la célula. En otra modalidad, las células B cancerosas portan, además, la proteína CD20. En otra modalidad, CD20 tiene un alto nivel de expresión en al menos el 95 % de los linfomas de células B. En una modalidad, el BCR se expresa en los linfomas de células B. En otra modalidad, el BCR se expresa en linfoma folicular, linfoma de células pequeñas no escindidas, linfoma de zona marginal, linfoma esplénico con linfocitos vellosos, linfoma de células de manto, linfoma de células grandes, linfoma difuso de células grandes, linfoma linfocítico pequeño, linfoma de Burkitt endémico, Linfoma de Burkitt esporádico, linfoma no de Burkitt, tejido linfoide asociado a las mucosas MALT / MALToma (extranodal), linfoma monocitoide de células B (nodal), linfoma inmunoblástico, difuso, de celularidad mixta, linfoma medial primario de células B, linfoma angiocéntrico - células B pulmonares. En otra modalidad, CD20 se expresa en el BCR que se expresa en linfoma folicular, linfoma de células pequeñas no escindidas, linfoma de zona marginal, linfoma esplénico con linfocitos vellosos, linfoma de células de manto, linfoma de células grandes, linfoma difuso de células grandes, linfoma linfocítico pequeño, linfoma de Burkitt endémico, Linfoma de Burkitt esporádico, linfoma no de Burkitt, tejido linfoide asociado a las mucosas MALT / MALToma (extranodal), linfoma monocitoide de células B (nodal), linfoma medial primario de células B, difuso, de celularidad mixta, linfoma angiocéntrico - células B pulmonares. Por lo tanto, en una modalidad, las composiciones y usos médicos de la presente invención que comprenden BCR son particularmente útiles en la prevención o el tratamiento de los cánceres mencionados anteriormente.

En una modalidad, estudios citogenéticos han demostrado que algunos subtipos histológicos e inmunológicos de NHL tienen anomalías cromosómicas con translocaciones recíprocas, que implican frecuentemente genes para el receptor de células B y un oncogén. La linfomagénesis da como resultado una expansión clonal de la célula B transformada, donde cada célula hija expresa el BCR en la superficie celular así como los péptidos derivados del BCR asociados con moléculas MHC clase I y II. El BCR tiene una conformación única formada por las regiones hipervariables de las cadenas pesada y ligera, esto se denomina como el "idiotipo", que es el mismo para cada

célula hija dentro del tumor, y no está presente en cantidades significativas de células normales. Por lo tanto, el idiotype es un antígeno específico del tumor y un objetivo para la terapia de linfomas.

Como se describe en la presente descripción, la presente invención ha producido una proteína de fusión conformacionalmente intacta que comprende una proteína LLO y un idiotype de BCR (sección de Detalles Experimentales en la presente descripción).

La presente solicitud describe un método para inducir una respuesta inmunológica contra un linfoma en un sujeto, que comprende la etapa de administrar al sujeto un péptido, proteína o polipéptido recombinantes que contienen un idiotype de BCR de la presente invención, o una molécula de nucleótidos, vector de vacuna o cepa de *Listeria* que codifican o expresan el péptido, proteína o polipéptido recombinantes que contienen el idiotype de BCR de la presente invención, lo que induce de esta manera una respuesta inmunológica contra un linfoma.

La presente invención proporciona una proteína recombinante, o una molécula de nucleótidos, o un vector de vacuna recombinante, o una cepa de *Listeria* recombinante de la invención, en donde el péptido antigénico es un BCR, para usar en el tratamiento, inhibición, supresión, inducción de la regresión, reducción de la incidencia de un linfoma que expresa BCR, o la protección contra este, en un sujeto.

Como se describe en la sección de Detalles Experimentales en la presente descripción, la fusión de LLO a un antígeno aumenta su inmunogenicidad. Adicionalmente, la administración de proteínas de fusión de la presente invención da como resultado la protección contra un reto tumoral.

Por otra parte, como se describe en la presente descripción, la presente invención ha producido una proteína de fusión conformacionalmente intacta que comprende una proteína LLO y un idiotype de BCR, ha demostrado metodologías precisas y eficaces para el análisis de vacunas contra linfomas en ratón y modelos animales, y ha demostrado la eficacia de las vacunas de la presente invención en la protección contra un linfoma y su superioridad sobre las vacunas actualmente aceptadas contra los linfomas (sección de Detalles Experimentales).

En una modalidad, una vacuna de la presente invención es una composición que tras su administración estimula la producción de anticuerpos o la inmunidad celular contra un antígeno.

En una modalidad, las vacunas se administran como microorganismos muertos o atenuados, mientras en otra modalidad, las vacunas comprenden antígenos naturales o modificados genéticamente. En una modalidad, las vacunas eficaces estimulan el sistema inmunológico para promover el desarrollo de anticuerpos que pueden atacar rápida y eficazmente a las células, microorganismos o virus que producen el antígeno contra el cual se vacunó el sujeto, cuando se producen en el sujeto, lo que prevé de esta manera el desarrollo de la enfermedad.

En una modalidad, una vacuna de la presente invención es profiláctica, mientras que en otra modalidad, una vacuna de la presente invención es terapéutica. En una modalidad, una vacuna profiláctica se administra a una población que es susceptible a desarrollar o contraer una enfermedad o condición particulares, ya sea a través de exposición ambiental o predisposición genética. Tales factores de susceptibilidad dependen de la enfermedad y se conocen bien por los expertos en la técnica. Por ejemplo, la población que comprende fumadores (en una modalidad, cigarrillo, cigarro, pipa, etcétera) se conoce en la técnica por ser susceptible a desarrollar cáncer de pulmón. La población que comprende una mutación en BRCA-1 y BRCA-2 se conoce en la técnica por ser susceptible a cáncer de mama y/o de ovario. La población que comprende polimorfismos de nucleótidos simples (SNP) particulares en el cromosoma 15 dentro de una región que contiene los genes para las subunidades 3 y 5 del receptor alfa de acetilcolina nicotínico, se conoce en la técnica por ser susceptible al cáncer de pulmón. En la técnica se conocen otros factores de susceptibilidad similares, y en una modalidad, se prevé que tales poblaciones susceptibles sean una población para la cual una vacuna profiláctica de la presente invención sería de gran utilidad.

Por lo tanto, las vacunas de la presente invención son eficaces en la inducción de una respuesta inmunológica contra un linfoma, así como en la prevención, tratamiento, e inducción de la remisión de este. Por lo tanto, la presente solicitud describe un método para superar una tolerancia inmunológica a un linfoma en un sujeto, que comprende la etapa de administrar al sujeto un péptido de la presente invención, lo que supera de esta manera una tolerancia inmunológica a un linfoma.

La presente solicitud describe, además, un método para superar una tolerancia inmunológica a un linfoma en un sujeto, que comprende la etapa de administrar al sujeto una molécula de nucleótidos de la presente invención, lo que supera de esta manera una tolerancia inmunológica a un linfoma.

"Tolerancia" se refiere, en otra modalidad, a la carencia de capacidad de respuesta del huésped a un antígeno. En otra modalidad, el término se refiere a la carencia de una capacidad de respuesta detectable del huésped a un antígeno. En otra modalidad, el término se refiere a la carencia de inmunogenicidad de un antígeno en un huésped. En otra modalidad, la tolerancia se mide por la carencia de capacidad de respuesta en un ensayo de muerte de CTL *in vitro*. En otra modalidad, la tolerancia se mide por la carencia de capacidad de respuesta en un ensayo de hipersensibilidad de tipo tardía. En otra modalidad, la tolerancia se mide por la carencia de capacidad de respuesta

en cualquier otro ensayo adecuado conocido en la técnica. En otra modalidad, la tolerancia se determina o se mide como se describe en los Ejemplos de la presente descripción.

"Superar" se refiere, en otra modalidad, a una inversión de la tolerancia por una vacuna. En otra modalidad, el término se refiere a conferir una respuesta inmunológica detectable por una vacuna. En otra modalidad, la superación de la tolerancia inmunológica se determina o se mide como se describe en los Ejemplos de la presente descripción.

Por lo tanto, la presente solicitud describe un método para reducir una incidencia de recaída de un linfoma en un sujeto en remisión del linfoma, que comprende la etapa de administrar al sujeto un péptido o molécula de nucleótidos de la presente invención, lo que reduce de esta manera una incidencia de recaída de un linfoma en un sujeto en remisión del linfoma.

La presente solicitud describe, además, un método para suprimir una formación de un linfoma, que comprende la etapa de administrar un péptido, proteína o polipéptido recombinantes o una molécula de nucleótidos de la presente invención, lo que suprime de esta manera una formación de un linfoma.

La presente solicitud describe, además, un método para inducir una remisión de una enfermedad residual de linfoma de células B, que comprende administrar un péptido o molécula de nucleótidos de la presente invención, lo que induce de esta manera una remisión de una enfermedad residual de linfoma de células B.

La presente solicitud describe, además, un método para eliminar una enfermedad mínima residual de un linfoma de células B, que comprende administrar un péptido o molécula de nucleótidos de la presente invención, lo que elimina de esta manera la enfermedad mínima residual de un linfoma de células B.

La presente solicitud describe, además, un método para reducir el tamaño o volumen de un linfoma de células B, que comprende administrar un péptido o molécula de nucleótidos de la presente invención, lo que reduce de esta manera el tamaño de un linfoma de células B.

En otra modalidad, el linfoma que es un objetivo de las proteínas, nucleótidos, vectores de vacunas o cepas de Listeria de la presente invención es un linfoma no Hodgkin. En otra modalidad, un linfoma es un linfoma de células B. En otra modalidad, un linfoma es un linfoma de bajo grado. En otra modalidad, un linfoma es un NHL de bajo grado. En otra modalidad, un linfoma es una enfermedad residual de uno de los tipos de linfoma anteriores. En otra modalidad, el linfoma es cualquier otro tipo de linfoma conocido en la técnica. En otra modalidad, el linfoma es un linfoma de Burkitt. En otra modalidad, el linfoma es un linfoma folicular. En otra modalidad, el linfoma es un linfoma de zona marginal. En otra modalidad, el linfoma es un linfoma esplénico de zona marginal. En otra modalidad, el linfoma es un linfoma de células de manto. En otra modalidad, el linfoma es un linfoma indolente de células de manto. En otra modalidad, el linfoma es cualquier otro tipo conocido de linfoma que exprese un BCR.

En otra modalidad, las células del tumor al que se dirigen las proteínas, nucleótidos, vectores de vacunas o cepas de Listeria de la presente invención expresan un BCR. En otra modalidad, el tumor se asocia con un BCR. En otra modalidad, el BCR tiene un idiotipo que es característico del tumor. En otra modalidad, el BCR expresado por una célula tumoral es el objetivo de las respuestas inmunológicas inducidas por los métodos y composiciones de la presente invención.

En otra modalidad, el BCR expresado por la célula objetivo es necesario para un fenotipo tumoral. En otra modalidad, el BCR es necesario para la transformación de una célula tumoral. En otra modalidad, las células tumorales que pierden la expresión del BCR pierden su crecimiento incontrolado, invasividad, u otra característica de malignidad.

Las proteínas, nucleótidos, vectores de vacunas o cepas de Listeria aplican igualmente para cualquier BCR de un linfoma no Hodgkin y cualquier idiotipo de este. Las secuencias de BCR se conocen bien en la técnica, y se obtienen fácilmente a partir de muestras de linfomas.

Una secuencia ilustrativa de un precursor de cadena pesada de inmunoglobulina (Ig) de un BCR es:

MKLWLNWIFLVTLNIGIQCEVKLVESGGGLVQPGGSLSLSCAASGFTFTDYY
MSWVRQPPGKALEWLALIRNKANGYTTEYSASVKGRFTISRDNQSILYLQMNALRA
EDSATYYCARDPNYYDGSYEGYFDYWAQGTTLTVSS (sec. con núm. de ident.: 26; núm. de registro del GenBank X14096).

Una secuencia ilustrativa de un precursor de una cadena ligera de Ig de un BCR es:

LLISVTVIVSNGEIVLTQSPPTMAASPGKITITCSASSISSNYLHWYQKPGF
SPKLLIYRTSNLASGVPARFSGSGTSYSLTIGTMEAEDVATYYCQQGSSIPRGVTFG SGTKEIKR (sec. con núm. de ident.: 27; núm. de registro del GenBank X14097).

Otra secuencia ilustrativa de un precursor de una cadena ligera de Ig de un BCR es:

5 GFLISVTVILTNGEIFLTQSPAIIAASPGEKVTITCSASSSVSYMNWYQQKPGSS
PKIWIYGISNLASGVPARFSGSGSGTSFSFTINSMEAEDVATYYCQQRSSYPFTFGSGT
KLEIKRADAAPT VSHLP (sec. con núm. de ident.: 28; núm. de registro del GenBank X14098).

Otra secuencia ilustrativa de un precursor de una cadena ligera de Ig de un BCR es:

10 LLLISVTVIVSNGEIVLTQSPTTMAASPGEKITITCSASSSISSNYLHWYQQKPGF
SPKLLIYRTSNLASGVPARFSGSGSGTSYSLTIGTMEAEDVATYYCQQGSSIPRTFGSG TKLEIKRA (sec. con
núm. de ident.: 29; núm. de registro del GenBank X14099).

Otra secuencia ilustrativa de una cadena pesada de Ig de un BCR es:

15 MEFLSWVFLVAILKGVQCEMQLVESGGGLVQPGESLKLSCAASGFSFSGSTI
HWVRQASGRGLEWVGRSRKADNFMTSYAPSIKGFIIISRDDSSNMLYLQMNNLKT
EDTAVYFCTRNFTSLDSTGNSFGPWGQGLTVTVSSGSASAPTLFPLVS (sec. con núm. de ident.: 30; cadena
pesada de IgM de linfoma folicular humano; núm. de registro del GenBank X70200).

20 Otra secuencia ilustrativa de una cadena pesada de Ig de un BCR es:

25 MEFLSWVFLVAILKGVQCEMQLVESGGGLVQPGESFKLSCAASGFSFSGSTI
HWVRQASGRGLEWVGRSRKADNFMTSYAPSIKGFIIISRDDSSNMMYLQMNNLKN
EDTAVYFCTRNFTSLDSTGNSFGPWGQGLTVTVSSGSASAPTLFPLVS (sec. con núm. de ident.: 31; cadena
pesada de IgM de linfoma folicular humano; núm. de registro del GenBank X70199).

Otra secuencia ilustrativa de una cadena pesada de Ig de un BCR es:

30 MEFLSWVFLVAILKGVQCEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTVSSNY
MSWVRQAPGKGLEWVSVIYSGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAED
TAVYYCARHTVRGGHCAPRHKPSLQERWGNQRQALRS (sec. con núm. de ident.: 32; cadena pesada de
IgM de linfoma folicular humano; núm. de registro del GenBank X70208).

Otra secuencia ilustrativa de una cadena pesada de Ig de un BCR es:

35 MEFLSWVFLVAILKGVQCEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSGSA
MHWVRQASGKGLEWVGHIRDKANSYATTYAASVKGRFTISRDDSKNTAYLQMNSL
KIEDTAVYFCTRNFTSLDSTGNSFGPW (sec. con núm. de ident.: 33; cadena pesada de IgM de linfoma
folicular humano; núm. de registro del GenBank X70207).

Otra secuencia ilustrativa de una cadena ligera de Ig de un BCR es:

45 SELTQDPVVSVALGQTVRITCQGDLSRYYASWYQQKPGQAPVLVIYGNR
PSGIPDRFSGSSSGNTASLTITGAQAEADYYCNSRDSSGNLPLFGGGTKLTVLG (sec. con núm. de ident.:
34; cadena ligera de inmunocitoma linfoplasmacítico/linfoplasmacitoide humano; núm. de registro del
GenBank AAD14088).

Otra secuencia ilustrativa de una cadena ligera de Ig de un BCR es:

50 DIQMTQSPDSLTVSLGERATINCKSSQSILYSSNDKNYLAWYQQKAGQPPKLLI
YWASTRESGVDPDRFSGSGSATDFTLTISSLQAEDVAIYYCQQYYSTPLTFGGGKVEI KR (sec. con núm. de
ident.: 35; cadena ligera de linfoma folicular humano; núm. de registro del GenBank Y09250).

Otra secuencia ilustrativa de una cadena ligera de Ig de un BCR es:

55 DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSISTWLAWYQQKPGKAPKLLIYEASSL
ESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPDFFVYTCQQYNTFSSYTFGQGTKVEIK (sec. con núm. de ident.: 36;
cadena ligera de linfoma esplénico de zona marginal humano; núm. de registro del GenBank AAX93805).

60 Las secuencias de otras cadenas ligeras de Ig de BCR ilustrativas se encuentran en los núms. de registro del
GenBank AAX93769-93802, CAA25477, AAB31509, CAE52829-CAE52832, AAF79132-79143, y otras secuencias
del GenBank.

65 Las secuencias de otras cadenas pesadas de Ig de BCR ilustrativas se encuentran en los núms. de registro del
GenBank CAA73044-73059, AAX93809-AAX93842, AAQ74129, CAC39369, AAB52590-AAB52597, y otras
secuencias del GenBank.

Los métodos para determinar las regiones determinantes de complementariedad (cdr) de un BCR se conocen bien en la técnica. Por ejemplo, la CDR1 de la sec. con núm. de ident.: 26 consiste en los residuos 50-54; la CDR2 consiste en los residuos 66-87; el segmento D consiste en los residuos 120-130; y el segmento J consiste en los residuos 131-145. La CDR1 de la sec. con núm. de ident.: 30 consiste en los residuos 148-162; la FR2 consiste en los residuos 163-204; la CDR2 consiste en los residuos 205-261; la FR3 consiste en los residuos 262-357; la CDR3 consiste en los residuos 358-432; y la CH1 consiste en los residuos 433-473. En otra modalidad, las regiones del marco (regiones diferentes de las cdr) se determinan por homología con regiones del marco conocidas de otras moléculas de inmunoglobulinas de la misma especie.

En otra modalidad, un idiotipo se identifica mediante la determinación de la cdr de un BCR de los métodos y composiciones de la presente invención.

En otra modalidad, se incluye o utiliza un BCR completo en la presente invención. En otra modalidad, se incluye o utiliza un fragmento de un BCR. En otra modalidad, el fragmento de BCR contiene el idiotipo de este. En otra modalidad, el fragmento de BCR contiene un epítipo de célula T. En otra modalidad, el fragmento de BCR contiene un epítipo de anticuerpo. En otra modalidad, el término "antígeno" se usa en la presente descripción para referirse al BCR o fragmento de este que es el objetivo de las respuestas inmunológicas inducidas por las composiciones de la presente invención.

En otra modalidad, el fragmento de un BCR contenido en los péptidos de la presente invención es un fragmento de cadena simple de las regiones variables (scFV) del BCR. En otra modalidad, el fragmento de BCR está conformacionalmente intacto. En otra modalidad, el fragmento de BCR contiene el idiotipo del BCR. En otra modalidad, el idiotipo del BCR está conformacionalmente intacto.

"Idiotipo" se refiere, en otra modalidad, a la estructura formada por la región determinante de complementariedad (cdr) de un BCR. En otra modalidad, el término se refiere a la región única de un BCR. En otra modalidad, el término se refiere al sitio de unión del BCR al antígeno.

"Conformacionalmente intacto" se refiere, en otra modalidad, a una conformación que no se modifica significativamente con respecto a la conformación nativa. En otra modalidad, el término se refiere a la reactividad de un anticuerpo que no se modifica significativamente con respecto a la proteína nativa. En otra modalidad, el término se refiere a la reactividad de un anticuerpo que coincide sustancialmente con la proteína nativa.

En otra modalidad, un péptido utilizado en la presente invención comprende un idiotipo que es homólogo a un idiotipo expresado por células del linfoma. En otra modalidad, el péptido comprende un idiotipo que es idéntico a un idiotipo expresado por células del linfoma.

En otra modalidad, una molécula de nucleótidos utilizada en la presente invención codifica un idiotipo que es homólogo a un idiotipo expresado por células del linfoma. En otra modalidad, la molécula de nucleótidos codifica un idiotipo que es idéntico a un idiotipo expresado por células del linfoma. En otra modalidad, el antígeno tiene una alta homología con el antígeno expresado por la célula tumoral. "Altamente homólogo" se refiere, en otra modalidad, a una homología de más del 90 %. En otra modalidad, el término se refiere a una homología de más del 92 %. En otra modalidad, el término se refiere a una homología de más del 93 %. En otra modalidad, el término se refiere a una homología de más del 94 %. En otra modalidad, el término se refiere a una homología de más del 95 %. En otra modalidad, el término se refiere a una homología de más del 96 %. En otra modalidad, el término se refiere a una homología de más del 97 %. En otra modalidad, el término se refiere a una homología de más del 98 %. En otra modalidad, el término se refiere a una homología de más del 99 %. En otra modalidad, el término se refiere a una homología del 100 %.

En otra modalidad, la enfermedad residual de un linfoma de células B o enfermedad mínima residual de un linfoma de células B tratada con una proteína, nucleótido, vector de vacuna o cepa de *Listeria* de la presente invención es la que queda después de una terapia de citorreducción. Los métodos para la terapia de citorreducción se conocen bien en la técnica, y se describen, por ejemplo, en Winter JN y otros (Low-grade lymphoma. Hematology (Am Soc Hematol Educ Program). 2004;:203-20) y Buske C y otros (Current status and perspective of antibody therapy in follicular lymphoma. Haematologica. Enero 2006;91(1):104-12).

El péptido antigénico heterólogo utilizado en la presente invención es, en otra modalidad, una proteína antigénica. En otra modalidad, el péptido antigénico es un fragmento de una proteína antigénica. En otra modalidad, el péptido antigénico es un péptido inmunogénico que se origina de un tumor. En otra modalidad, el péptido antigénico es un péptido inmunogénico que se origina de una metástasis. En otra modalidad, el péptido antigénico es un péptido inmunogénico que se origina de células cancerosas. En otra modalidad, el péptido antigénico es un péptido inmunogénico proangiogénico.

En una modalidad, el polipéptido antigénico es un antígeno E7 del virus de papiloma humano (E7 de HPV), que en una modalidad, es de HPV16 (en una modalidad, núm. de registro del GenBank AAD33253) y en otra modalidad, de

HPV18 (en una modalidad, núm. de registro del GenBank P06788). En otra modalidad, el polipéptido antigénico es HPV-E6, que en una modalidad, es de HPV16 (en una modalidad, núm. de registro del GenBank AAD33252, AAM51854, AAM51853, o AAB67615) y en otra modalidad, de HPV18 (en una modalidad, núm. de registro del GenBank P06463). En otra modalidad, el polipéptido antigénico es del antígeno prostático específico (PSA) (en una modalidad, núm. de registro del GenBank CAD30844, CAD54617, AAA58802, o NP_001639). En otra modalidad, el polipéptido antigénico es un antígeno de la enzima quimotriptica del estrato córneo (SCCE) (en una modalidad, núm. de registro del GenBank AAK69652, AAK69624, AAG33360, AAF01139, o AAC37551). En otra modalidad, el polipéptido antigénico es el antígeno 1 del tumor de Wilms, que en otra modalidad es la telomerasa de WT-1 (núm. de registro del GenBank P49952, P22561, NP_659032, CAC39220.2, o EAW68222.1). En otra modalidad, el polipéptido antigénico es hTERT o telomerasa (núm. de registro del GenBank NM003219 (variante 1), NM198255 (variante 2), NM 198253 (variante 3), o NM 198254 (variante 4). En otra modalidad, el polipéptido antigénico es la proteinasa 3 (en una modalidad, núm. de registro del GenBank M29142, M75154, M96839, X55668, NM 00277, M96628 o X56606). En otra modalidad, el polipéptido antigénico es la proteína 2 relacionada con tirosinasa (TRP2) (en una modalidad, núm. de registro del GenBank NP_001913, ABI73976, AAP33051, o Q95119). En otra modalidad, el polipéptido antigénico es el antígeno de alto peso molecular asociado a melanoma (HMW-MAA) (en una modalidad, núm. de registro del GenBank NP_001888, AAI28111, o AAQ62842). En otra modalidad, el polipéptido antigénico es testisina (en una modalidad, núm. de registro del GenBank AAF79020, AAF79019, AAG02255, AAK29360, AAD41588, o NP_659206). En otra modalidad, el polipéptido antigénico es el antígeno NY-ESO-1 (en una modalidad, núm. de registro del GenBank CAA05908, P78358, AAB49693, o NP_640343). En otra modalidad, el polipéptido antigénico es PSCA (en una modalidad, núm. de registro del GenBank AAH65183, NP_005663, NP_082492, 043653, o CAB97347). En otra modalidad, el polipéptido antigénico es el receptor alfa de la interleucina (IL) 13 (en una modalidad, núm. de registro del GenBank NP_000631, NP_001551, NP_032382, NP_598751, NP_001003075, o NP_999506). En otra modalidad, el polipéptido antigénico es la anhidrasa carbónica IX (CAIX) (en una modalidad, núm. de registro del GenBank CAI13455, CAI10985, EAW58359, NP_001207, NP_647466, o NP_001101426). En otra modalidad, el polipéptido antigénico es el antígeno carcinoembrionario (CEA) (en una modalidad, núm. de registro del GenBank AAA66186, CAA79884, CAA66955, AAA51966, AAD15250, o AAA51970). En otra modalidad, el polipéptido antigénico es MAGE-A (en una modalidad, núm. de registro del GenBank NP_786885, NP_786884, NP_005352, NP_004979, NP_005358, o NP_005353). En otra modalidad, el polipéptido antigénico es la survivina (en una modalidad, núm. de registro del GenBank AAC51660, AAY15202, ABF60110, NP_001003019, o NP_001082350). En otra modalidad, el polipéptido antigénico es GP100 (en una modalidad, núm. de registro del GenBank AAC60634, YP_655861, o AAB31176). En otra modalidad, el péptido antigénico de la presente invención comprende una porción inmunogénica del polipéptido antigénico.

En otras modalidades, el antígeno se origina de un virus. En otras modalidades descritas en la presente descripción, el antígeno es uno de los siguientes antígenos: los antígenos E6/E7 y HPV 16/18 asociados con cánceres cervicales, NY-ESO-1 (núm. de registro del GenBank U87459), WT-1 (núms. de registro del GenBank NM000378 (variante A), NM024424 (variante B), NM 024425 (variante C), y NM024426 (variante D)), sarcoma sinovial X (SSX)-2; (núm. de registro del GenBank NP_003138, NP_783629, NP_783729, NP_066295), y enzima quimotriptica del estrato córneo (SCCE; núm. de registro del GenBank NM_005046 y NM_139277).

En una modalidad, los métodos para evaluar la producción de una respuesta inmunológica por un sujeto a un antígeno se conocen en la técnica, y en una modalidad, se describen más abajo en la presente descripción en la sección de Ejemplos.

La proteína LLO utilizada para construir las vacunas de la presente invención, en otra modalidad, tiene la secuencia:

```

MKKIMLVFITLILVSLPIAQQTAKDASAFNKENSISSMAPPASPPASPKTPIEKKHAD
IDKYIQGLDYNKNNVLVYHGDVAVTNVPPRKGKDGNEYIVVEKKKKSINQNNADIQ
VVNAISSLTYPGALVKANSELVENQPDVLPVKRDSLTLSDLPGMTNQDNKIVVNA
TKSNVNNVAVNTLVERWNEKYAQAYPNVSAKIDYDDEMAYSESQIAKFGTAFKAV
NNSLNVNFGAISEGKMQEIVISFKQIYNNVNVNEPTRPSRFFGKAVTKEQLQALGVN
AENPPAYISSVAYGRQVYLKLTNSHSTKVKAADFDAVSGKSVSGDVELTNIKNSSSF
KAVIYGGSAKDEVQIIDGNLGLDLRDLKKGATFNRETPGVPIAYTTNFKDNELAVIK
NNSEYIETTSKAYTDGKINIDHSGGYVAQFNISWDEVNYDPEGNEIVQHKNWSENNK
SKLAHFTSSIYLPGNARNINVYAKECTGLAWEWVRTIDDRNLPLVKNRNISIWGTT
LYPKYSNKVDNPIE
(núm. de registro del GenBank P13128; sec. con núm. de ident.: 37; la secuencia de ácido nucleico se
expone en el núm. de registro del GenBank X15127). Los primeros 25 aa de la proteína correspondientes
a esta secuencia son la secuencia señal y se escinden de LLO cuando es secretada por la bacteria. Por lo
tanto, en esta modalidad, la proteína LLO activa de longitud completa es de 504 residuos de longitud. En otra
modalidad, la proteína LLO es un homólogo de la sec. con núm. de ident.: 37. En otra modalidad, la proteína
LLO es una variante de la sec. con núm. de ident.: 37.
```

En otra modalidad, la proteína LLO utilizada para construir las vacunas de los métodos y composiciones de la presente invención, tiene la secuencia que se expone en la sec. con núm. de ident.: 46 (Ejemplo 1 más abajo en la presente descripción). En otra modalidad, la proteína LLO es una variante de la sec. con núm. de ident.: 46.

En otra modalidad, la proteína LLO de la invención utilizada para construir vacunas como las proporcionadas en la presente descripción es una LLO detoxificada (DTLLO). En otra modalidad, la LLO se detoxifica mediante la sustitución de la región de unión al colesterol con un péptido antigénico o epítipo de este. En otra modalidad, la LLO se detoxifica mediante la sustitución de la región de unión al colesterol con el epítipo de E7. En otra modalidad, la LLO se detoxifica mediante la eliminación de la porción de la secuencia señal de LLO. En otra modalidad, DTLLO se usa en fusiones genéticas a los antígenos objetivo para aumentar la inmunogenicidad antigénica. En otra modalidad, detoxLLO se fusiona a un antígeno. En otra modalidad, DTLLO se fusiona a un péptido antigénico como se describe en la presente descripción.

La región de unión al colesterol o dominio de unión al colesterol se conoce como LLO o puede deducirse mediante el uso de métodos conocidos en la técnica (revisado en Alouf, Int J Med Microbiol. Oct 2000;290(4-5):351-6), que incluyen mutagénesis dirigida a un sitio seguido de un ensayo de unión al colesterol o conservación de secuencias de proteínas con funciones similares de unión al colesterol.

En esta invención, la proteína LLO es una ctLLO, que es LLO de longitud completa en la que el CBD se ha sustituido por un péptido antigénico o epítipo de este por medio de una mutación por sustitución.

Además, en la presente descripción se describen ejemplos en los cuales la proteína LLO es una mutLLO. Una mutLLO es una en la cual el CBD se ha mutado, por ejemplo la mutLLO es una en la cual los aminoácidos en el CBD se han mutado, por ejemplo por una mutación puntual, una delección, una inversión, una sustitución, o una combinación de estas. La mutación puede ser cualquier mutación conocida en la técnica, y puede comprender cualquier combinación de delecciones, sustituciones, o mutaciones puntuales en el CBD y/o delecciones de la secuencia señal de LLO. En otra modalidad, la mutación del CBD reduce la actividad hemolítica de LLO. En otra modalidad, el CBD se sustituye por epítopos restringidos a HLA clase I conocidos por usarse como una vacuna. En otra modalidad, la LLO mutada se expresa y purifica a partir de sistemas de expresión de *E. coli*.

Como se describe en la presente descripción, "LLO detox" o "DTLLO" se refieren a una LLO como se describe en la presente descripción con mutaciones puntuales en el dominio de unión al colesterol.

Como se describe en la presente descripción, "fragmento de LLO" o "ΔLLO" se refiere a un fragmento de LLO que comprende el dominio similar a PEST de esta. En otra modalidad, los términos se refieren a un fragmento de LLO que comprende una secuencia PEST.

En otra modalidad, un péptido, proteína o polipéptido recombinantes de la presente invención comprenden además un polipéptido marcador detectable. En otra modalidad, no se incluye un polipéptido marcador detectable. En otras modalidades, el polipéptido marcador es la proteína fluorescente verde (GFP), myc, myc-piruvato quinasa (myc-PK), His₆, proteína de unión a la maltosa (MBP), un polipéptido marcador de hemaglutinina del virus de influenza, un polipéptido marcador flag (FLAG), y un polipéptido marcador de glutatión-S-transferasa (GST). Sin embargo, no debe interpretarse de ninguna manera que la invención se limita a los ácidos nucleicos que codifican los polipéptidos marcadores mencionados anteriormente. En otra modalidad, la presente invención utiliza cualquier secuencia de ácido nucleico que codifique un polipéptido que funcione en una manera sustancialmente similar a estos polipéptidos marcadores.

En otra modalidad, el vector de vacuna recombinante de la presente invención es un plásmido. En otra modalidad, la presente invención proporciona la introducción de una molécula de nucleótidos de la presente invención en una célula. Los métodos para construir y utilizar vectores recombinantes se conocen bien en la técnica y se describen, por ejemplo, en Sambrook y otros (2001, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York), y en Brent y otros (2003, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Nueva York). En otra modalidad, el vector es un vector bacteriano. En otras modalidades, el vector se selecciona de *Salmonella sp.*, *Shigella sp.*, BCG, *L. monocytogenes* y *S. gordonii*. En otra modalidad, las proteínas de fusión se suministran mediante vectores bacterianos recombinantes modificados para escapar de la fusión fagolisosómica y vivir en el citoplasma de la célula. En otra modalidad, el vector es un vector viral. En otras modalidades, el vector se selecciona de Vaccinia, Avipox, Adenovirus, AAV, virus Vaccinia NYVAC, cepa de vaccinia modificada Ankara (MVA), virus del bosque de Semliki, virus de la encefalitis equina venezolana, virus del herpes, y retrovirus. En otra modalidad, el vector es un vector de ADN desnudo. En otra modalidad, el vector es cualquier otro vector conocido en la técnica.

En otra modalidad, un nucleótido de la presente invención se une operativamente a una secuencia promotora/reguladora que conduce la expresión del péptido codificado en las células en las que se introduce el vector. Las secuencias promotoras/reguladoras útiles para conducir la expresión constitutiva de un gen en una célula procariota se conocen bien en la técnica e incluyen, por ejemplo, el promotor de p60 de *Listeria*, el promotor de inIA (codifica internalina), el promotor de hly, y se usa el promotor de ActA. En otra modalidad, se usa cualquier otro promotor de gram positivos. Las secuencias promotoras/reguladoras útiles para dirigir la expresión constitutiva de un gen en una célula eucariota (por ejemplo para una vacuna de ADN) se conocen bien en la técnica e incluyen, pero sin limitarse a, por ejemplo, la secuencia potenciadora inmediata del promotor temprano de citomegalovirus, el promotor temprano de SV40, y el promotor del virus del sarcoma de Rous. En otra modalidad, la expresión inducible y tejido específica del ácido nucleico que codifica un péptido de la presente invención se logra mediante la

introducción de un ácido nucleico que codifica al péptido bajo el control de una secuencia promotora/reguladora inducible o específica del tejido. Los ejemplos de secuencias promotoras/reguladoras específicas de tejidos o inducibles que son útiles para este propósito incluyen, pero no se limitan al promotor inducible LTR del MMTV, y al potenciador/promotor tardío de SV40. En otra modalidad, se utiliza un promotor que se induce en respuesta a agentes inductores tales como metales, glucocorticoides, y similares. Por lo tanto, se comprenderá que la invención incluye el uso de cualquier secuencia promotora/reguladora, que se conozca o no, y que sea capaz de conducir la expresión de la proteína deseada unida operativamente a ella.

En otra modalidad, un péptido de la presente invención activa una APC (por ejemplo una DC), lo que media al menos parte del aumento de su inmunogenicidad. Como se describe en la presente descripción, no es necesario que la LLO inactivada esté unida a la proteína que contiene el idiotipo para mejorar su inmunogenicidad.

Como se describe en la presente descripción, la presente solicitud proporciona un método para mejorar la inmunogenicidad de un antígeno, que comprende fusionar una proteína LLO o fragmento de esta al antígeno. Como demuestran los datos descritos en la presente descripción, fusionar una proteína LLO mutada a un antígeno mejora la inmunogenicidad del antígeno.

En otra modalidad descrita, una proteína de fusión con LLO contiene una secuencia de aa similar a PEST. Como se describe en la presente descripción, se demostró una mejor inmunidad mediada por células para las proteínas de fusión que comprenden un antígeno y LLO que contiene la secuencia de aa similar a PEST KENSISMAPPASPAPKPTIEKKHADEIDK (sec. con núm. de ident.: 63). En otra modalidad, la fusión de un antígeno a una LLO no hemolítica que incluye la secuencia de aa similar a PEST, sec. con núm. de ident.: 1, puede mejorar la inmunidad mediada por células y antitumoral del antígeno.

En otra modalidad, la proteína LLO no hemolítica o un fragmento de esta no necesariamente son las que se exponen exactamente en las secuencias expuestas en la presente descripción, sino que pueden realizarse otras alteraciones, modificaciones, o cambios que retengan las características funcionales de una LLO fusionada a un antígeno como se expone en otra parte de la presente descripción. En otra modalidad, la presente invención utiliza un análogo de una proteína LLO o un fragmento de esta de la presente invención. Los análogos difieren, en otra modalidad, de las proteínas o péptidos de origen natural por diferencias conservadoras de la secuencia de aa o por modificaciones que no afectan la secuencia, o por ambas.

La presente solicitud describe una composición o método en donde aumenta la expresión de citocinas (ver por ejemplo, Ejemplo 9). En una opción, la citocina es TNF-alfa, mientras que en otra opción, la citocina es IL-12, mientras que en otra opción, la citocina es ISG15, mientras que en otra opción, la citocina es una citocina diferente conocida en la técnica. En una opción, el aumento puede ser en la expresión de ARNm de citocinas, mientras que en otra opción, puede ser en la secreción de citocinas, mientras que en otra opción, el aumento puede ser tanto en la expresión de ARNm como en la secreción de citocinas. En otra opción, las composiciones y métodos descritos en la presente descripción pueden aumentar los marcadores de maduración de las células dendríticas, que en una opción, es CD86, en otra opción, CD40, y en otra opción MHCII, en otra opción, otro marcador de la maduración de células dendríticas conocido en la técnica, o, en otra opción, una combinación de estos (ver por ejemplo, Ejemplo 10). En otra opción, las composiciones y métodos descritos en la presente descripción pueden provocar la translocación nuclear de factores de transcripción, que en una opción, es NF-kappa-B (ver por ejemplo, Ejemplo 11), o en otra opción, es un factor de transcripción diferente conocido en la técnica. En otra opción, las composiciones y métodos descritos en la presente descripción pueden provocar una regulación positiva de los marcadores de superficie celular, que en una opción, puede ser CD 11b, que en una opción es Integrina-alfa M (ITGAM); molécula del grupo de diferenciación 11B; receptor del complemento 3A (CR3A); o antígeno de macrófagos 1 (MAC-1)A. En otra opción, un marcador diferente de la superficie celular expresado por células inmunológicas, puede regularse positivamente, como entenderá un experto.

Debe entenderse que, en una modalidad, un componente de las composiciones de la presente invención, tal como en una modalidad, una secuencia de LLO, una secuencia de un dominio de unión al colesterol, o una secuencia de un antígeno, tal como, en una modalidad, un NY-ESO-1, una secuencia de E7, o una secuencia de BCR, puede tener homología con una secuencia específica descrita en la presente descripción. En una modalidad, "homología" se refiere a una identidad de más del 70 %. En otra modalidad, "homología" se refiere a una identidad de más del 72 %. En otra modalidad, "homología" se refiere a una identidad de más del 75 %. En otra modalidad, "homología" se refiere a una identidad de más del 78 %. En otra modalidad, "homología" se refiere a una identidad de más del 80 %. En otra modalidad, "homología" se refiere a una identidad de más del 82 %. En otra modalidad, "homología" se refiere a una identidad de más del 83 %. En otra modalidad, "homología" se refiere a una identidad de más del 85 %. En otra modalidad, "homología" se refiere a una identidad de más del 87 %. En otra modalidad, "homología" se refiere a una identidad de más del 88 %. En otra modalidad, "homología" se refiere a una identidad de más del 90 %. En otra modalidad, "homología" se refiere a una identidad de más del 92 %. En otra modalidad, "homología" se refiere a una identidad de más del 93 %. En otra modalidad, "homología" se refiere a una identidad de más del 95 %. En otra modalidad, "homología" se refiere a una identidad de más del 96 %. En otra modalidad, "homología" se refiere a una identidad de más del 97 %. En otra modalidad, "homología" se refiere a una identidad de más del 98 %.

En otra modalidad, "homología" se refiere a una identidad de más del 99 %. En otra modalidad, "homología" se refiere a una identidad del 100 %.

En otra modalidad de la presente invención, los términos "ácidos nucleicos" o "nucleótido" se refieren a una cadena de al menos dos combinaciones de base-azúcar-fosfato. El término incluye, en una modalidad, ADN y ARN. El término "nucleótidos" se refiere, en una modalidad, a las unidades monoméricas de polímeros de ácidos nucleicos. En una modalidad, el ARN está en la forma de un ARNt (ARN de transferencia), ARNnp (ARN nuclear pequeño), ARNr (ARN ribosomal), ARNm (ARN mensajero), ARN antisentido, ARN inhibidor pequeño (ARNip), micro ARN (miARN) y ribozimas. Se ha descrito el uso de ARNip y miARN (Caudy AA y otros, *Genes & Devel* 16: 2491-96 y las referencias citadas en él). En otras modalidades, el ADN puede estar en forma de ADN plasmídico, ADN viral, ADN lineal, o ADN cromosómico o derivados de estos grupos. Adicionalmente, estas formas de ADN y ARN pueden tener cadenas simples, dobles, triples, o cuádruples. El término incluye, además, en otra modalidad, ácidos nucleicos artificiales que contienen otros tipos de cadenas principales, pero las mismas bases. En una modalidad, el ácido nucleico artificial es un PNA (ácido nucleico peptídico). Los PNA contienen cadenas principales peptídicas y bases de nucleótidos y son capaces de unirse, en una modalidad, tanto a moléculas de ADN como de ARN. En otra modalidad, el nucleótido se modifica con un grupo oxetano. En otra modalidad, el nucleótido se modifica por sustitución de uno o más enlaces fosfodiéster con un enlace fosforotioato. En otra modalidad, el ácido nucleico artificial contiene cualquier otra variante de la cadena principal de fosfato de los ácidos nucleicos nativos conocidos en la técnica. El uso de ácidos nucleicos con fosfotiorato y PNA se conoce por los expertos en la técnica, y se describen 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 el uso de los ácidos nucleicos se conocen por los expertos en la técnica y se describen, 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.

La homología de proteínas y/o péptidos para cualquier secuencia de aa mencionada en la presente descripción se determina, en una modalidad, mediante métodos bien descritos en la técnica, que incluyen análisis de inmunotransferencia, o por medio de análisis de secuencias de aa mediante algoritmos informáticos, con el uso de cualquiera de un número de paquetes informáticos disponibles, a través de métodos establecidos. Algunos de estos paquetes incluyen los paquetes FASTA, BLAST, MPsrch o Scansp, y emplean, en otras modalidades, el uso de, por ejemplo, los algoritmos de Smith y Waterman, y/o alineamientos globales/locales o BLOQUES para el análisis.

"Péptido" se refiere, en otra modalidad, a una cadena de aa conectados con enlaces peptídicos. En una modalidad, un péptido es una cadena corta de aa. En otra modalidad, el término se refiere a una variante de molécula peptídica, que contiene cualquier modificación descrita o mencionada en la presente descripción. En otra modalidad, el término se refiere a una molécula que contiene uno o más motivos introducidos por un agente de entrecruzamiento químico. En otra modalidad, el término se refiere a una molécula mimética de péptidos. En otra modalidad, el término se refiere a cualquier otro tipo de variante de una molécula peptídica conocida en la técnica.

En una modalidad, el término "proteína" o "polipéptido" es una cadena de aminoácidos que comprende múltiples subunidades peptídicas, que incluyen una proteína de longitud completa, oligopéptidos, y fragmentos de estos, en donde los residuos de aminoácidos se unen por enlaces peptídicos covalentes. En una modalidad, una proteína descrita en la presente invención puede ser alternativamente un polipéptido de la presente invención.

Como se usa en la presente descripción en la especificación y en la sección de Ejemplos a continuación, el término "péptido" incluye péptidos nativos (productos de degradación, péptidos sintetizados sintéticamente o péptidos recombinantes) y peptidomiméticos (típicamente, péptidos sintetizados sintéticamente), tales como peptoides y semipeptoides que son análogos de péptidos, que pueden tener, por ejemplo, modificaciones que le dan más estabilidad a los péptidos mientras están en un cuerpo, o más capacidad de penetrar en las células bacterianas. Tales modificaciones incluyen, pero sin limitarse a modificación del N terminal, modificación del C terminal, modificación de los enlaces peptídicos, que incluyen, pero no se limitan a, CH₂-NH, CH₂-S, CH₂-S=O, O=C-NH, CH₂-O, CH₂-CH₂, S=C-NH, CH=CH o CF=CH, modificaciones de la cadena principal, y modificación de residuos. Los métodos para preparar compuestos peptidomiméticos se conocen bien en la técnica y se especifican, por ejemplo, en *Quantitative Drug Design*, C.A. Ramsden Gd., Capítulo 17.2, F. Choplin Pergamon Press (1992). A continuación se proporcionan más detalles al respecto.

Los enlaces peptídicos (-CO-NH-) dentro del péptido pueden sustituirse, por ejemplo, por enlaces N-metilados (-N(CH₃)-CO-), enlaces tipo éster (-C(R)H-C-O-O-C(R)-N-), enlaces cetometileno (-CO-CH₂-), enlaces α-aza (-NH-N(R)-CO-), en donde R es cualquier alquilo, por ejemplo, metilo, enlaces carba (-CH₂-NH-), enlaces hidroxietileno (-CH(OH)-CH₂-), enlaces tioamida (-CS-NH-), doble enlaces olefínicos (-CH=CH-), enlaces retroamida (-NH-CO-), derivados de péptidos (-N(R)-CH₂-CO-), en donde R es la cadena lateral "normal", que se presenta naturalmente en el átomo de carbono.

Estas modificaciones pueden producirse en cualquiera de los enlaces a lo largo de la cadena peptídica e incluso en varios (2-3) al mismo tiempo.

Los aminoácidos aromáticos naturales, Trp, Tir y Fen, pueden sustituirse por ácidos no naturales sintéticos tales como TIC, naftilelanina (Nol), derivados de Fen metilados en el anillo, derivados halogenados de Fen u o-metil-Tir.

Además de lo anterior, los péptidos de la presente invención pueden incluir, además, uno o más aminoácidos modificados o uno o más monómeros que no son aminoácidos (por ejemplo ácidos grasos, carbohidratos complejos, etcétera).

Como se usa en la presente descripción en la especificación y en la sección de reivindicaciones más abajo se entiende que el término "aminoácido" o "aminoácidos" incluye los 20 aminoácidos de origen natural; los aminoácidos frecuentemente modificados postraduccionalmente *in vivo*, que incluyen, por ejemplo, hidroxiprolina, fosfoserina y fosfotreonina; y otros aminoácidos inusuales que incluyen, pero no se limitan a, ácido 2-aminoadípico, hidroxilisina, isodesmosina, norvalina, norleucina y ornitina. Además, el término "aminoácido" incluye D- y L-aminoácidos.

En una modalidad, un aminoácido en las composiciones y para usar en la presente invención puede ser de los aminoácidos de origen natural o aminoácidos no convencionales o modificados, que se conocen en la técnica.

En otra modalidad, el método usado para conjugar la proteína LLO no hemolítica o un fragmento de esta al antígeno es el que se describe en el Ejemplo 11. En otra modalidad, se utiliza otro método conocido en la técnica. Los métodos para la conjugación química de péptidos entre sí se conocen bien en la técnica, y se describen, por ejemplo, en (Biragyn, A y Kwak, LW (2001) Mouse models for lymphoma en "Current Protocols in Immunology" 20.6.1-20.6.30) y (Collawn, J. F. y Paterson, Y. (1989) Preparation of Anti-peptide antibodies. En Current Protocols in Molecular Biology. Suplemento 6. Ed. F.M. Ausubel y otros, Greene Publishing/Wiley 11.14.1 - 11.15.3).

En otra modalidad, la proteína LLO no hemolítica se une al antígeno o fragmento de este por conjugación química. En otra modalidad, la proteína LLO no hemolítica se une al péptido heterólogo por conjugación química. En otra modalidad, se usa el glutaraldehído para la conjugación. En otra modalidad, la conjugación se realiza mediante el uso de cualquier método adecuado conocido en la técnica.

Como se describe en la presente descripción, un péptido de fusión puede sintetizarse mediante el uso de técnicas estándar de síntesis química de péptidos. En otra modalidad, la molécula quimérica se sintetiza como un solo polipéptido contiguo. En otra modalidad, la proteína LLO; y el BCR o un fragmento de este se sintetizan separadamente, después se fusionan por condensación del extremo amino terminal de una molécula con el extremo carboxilo terminal de la otra molécula, lo que forma de esta manera un enlace peptídico. En otra modalidad, la proteína LLO y el antígeno cada uno se condensa con un extremo de una molécula espaciadora peptídica, lo que forma de esta manera una proteína de fusión contigua.

En otra modalidad, las proteínas de fusión de la presente invención se preparan mediante cualquier método adecuado, que incluye, por ejemplo, clonación y restricción de secuencias adecuadas o síntesis química directa mediante los métodos analizados más abajo. En otra modalidad, se clonan subsecuencias y se escinden las subsecuencias apropiadas mediante el uso de enzimas de restricción adecuadas. Después los fragmentos se ligan, en otra modalidad, para producir la secuencia de ADN deseada. En otra modalidad, el ADN que codifica la proteína de fusión se produce mediante el uso de métodos de amplificación del ADN, por ejemplo la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). En primer lugar, los segmentos del ADN nativo a cada lado del nuevo extremo se amplifican separadamente. El extremo 5' de la secuencia amplificada codifica el enlazador del péptido, mientras que el extremo 3' de la otra secuencia amplificada también codifica al enlazador del péptido. Dado que el extremo 5' del primer fragmento es complementario con el extremo 3' del segundo fragmento, los dos fragmentos (después de una purificación parcial, por ejemplo en agarosa LMP) pueden usarse como un molde con superposición en una tercera reacción de PCR. La secuencia amplificada contendrá codones, el segmento en el lado carboxilo del sitio de abertura (que ahora forma la secuencia del amino), el enlazador, y la secuencia en el lado amino del sitio de abertura (que ahora forma la secuencia del carboxilo). El inserto se liga después a un plásmido.

En otra modalidad, un péptido, proteína o polipéptido recombinantes de la presente invención se sintetizan mediante el uso de técnicas estándar de síntesis química de péptidos. En otra modalidad, la molécula quimérica se sintetiza como un solo polipéptido contiguo. En otra modalidad, la proteína LLO no hemolítica o un fragmento de esta; y el antígeno se sintetizan separadamente, después se fusionan por condensación del extremo amino terminal de una molécula con el extremo carboxilo terminal de la otra molécula, lo que forma de esta manera un enlace peptídico. En otra modalidad, la proteína LLO y el antígeno cada uno se condensa con un extremo de una molécula espaciadora peptídica, lo que forma de esta manera una proteína de fusión contigua.

En otra modalidad, los péptidos y proteínas de la presente invención se preparan mediante síntesis de péptidos en fase sólida (SPPS) como se describe por Stewart y otros, en Solid Phase Peptide Synthesis, 2da Edición, 1984, Pierce Chemical Company, Rockford, Ill.; o como se describe por Bodanszky y Bodanszky (The Practice of Peptide Synthesis, 1984, Springer-Verlag, Nueva York). En otra modalidad, un residuo de aa protegido adecuadamente se une a través de su grupo carboxilo a un soporte polimérico derivatizado, insoluble, tal como resina de poliamida o poliestireno reticulado. "Protegido adecuadamente" se refiere a la presencia de grupos protectores tanto en el grupo alfa-amino del aminoácido, como en cualquier grupo funcional de las cadenas laterales. Los grupos protectores de

las cadenas laterales generalmente son estables en los disolventes, los reactivos y las condiciones de reacción usados a través de la síntesis, y pueden eliminarse en condiciones que no afectarán el producto peptídico final. La síntesis por pasos del oligopéptido se lleva a cabo mediante la eliminación del grupo protector en el extremo N del aa inicial, y el acoplamiento a él del extremo carboxilo del próximo aa en la secuencia del péptido deseado. Este aa, además, se protege adecuadamente. El carboxilo del aa entrante puede activarse para reaccionar con el extremo N-terminal del aa unido al soporte mediante la formación de un grupo reactivo tal como la formación de una carbodiimida, un anhídrido de ácido simétrico o un grupo de "éster activo" tal como hidroxibenzotriazol o pentafluorofenil ésteres.

Los ejemplos de métodos de síntesis de péptidos en fase sólida incluyen el método BOC que utiliza terc-butiloxicarbonilo como el grupo protector del amino alfa, y el método FMOC que utiliza 9-fluorenilmetiloxicarbonilo para proteger el amino alfa de los residuos de aa; ambos métodos se conocen bien por los expertos en la técnica.

En otra modalidad, la incorporación de grupos bloqueadores de los extremos N y/o C se logra mediante el uso de protocolos convencionales para los métodos de síntesis de péptidos en fase sólida. Para la incorporación de grupos bloqueadores del extremo C-terminal, por ejemplo, la síntesis del péptido deseado se realiza típicamente mediante el uso de una resina de soporte como fase sólida, que se ha modificado químicamente de manera que la escisión de la resina da como resultado un péptido que tiene el grupo bloqueador deseado en el extremo C-terminal. Para proporcionar péptidos en los que el extremo C-terminal porta un grupo bloqueador amino primario, por ejemplo, la síntesis se realiza mediante el uso de una resina p-metil-benzidrilamina (MBHA) de manera que, cuando se completa la síntesis de péptidos, el tratamiento con ácido fluorhídrico libera el péptido con el grupo amida deseado en el extremo C-terminal. De manera similar, la incorporación de un grupo bloqueador N-metilamina en el extremo C-terminal se logra mediante el uso de una resina de DVB derivatizada a N-metilaminoetilo, que tras el tratamiento con HF libera un péptido que porta un extremo C-terminal N-metilamidado. El bloqueo del extremo C-terminal por esterificación puede lograrse, además, mediante el uso de procedimientos convencionales. Esto implica el uso de una combinación de resina/grupo bloqueador que permita la liberación del péptido de cadena lateral de la resina, para permitir la reacción posterior con el alcohol deseado, para formar la función de éster. El grupo protector FMOC, en combinación con la resina DVB derivatizada con alcohol metoxialcoxibenzílico o un enlazador equivalente, puede usarse para este propósito, donde la escisión del soporte se efectúa por TFA en diclorometano. La esterificación de la función carboxilo activada adecuadamente, por ejemplo con DCC, después puede proceder por adición del alcohol deseado, seguido de desprotección y aislamiento del producto peptídico esterificado.

La incorporación de grupos bloqueadores en el extremo N-terminal puede lograrse mientras el péptido sintetizado todavía está unido a la resina, por ejemplo por tratamiento con un anhídrido y nitrilo adecuados. Para incorporar un grupo bloqueador acetilo en el extremo N-terminal, por ejemplo, el péptido acoplado a la resina puede tratarse con anhídrido acético al 20 % en acetonitrilo. El producto peptídico bloqueado en N después puede escindirse de la resina, desprotegerse y posteriormente aislarse.

En otra modalidad, el análisis de la composición del péptido se realiza para verificar la identidad del péptido producido. En otra modalidad, el análisis de la composición de aa se realiza mediante el uso de espectrometría de masa de alta resolución para determinar el peso molecular del péptido. Alternativamente, o adicionalmente, el contenido de aa del péptido se confirma mediante la hidrólisis del péptido en ácido acuoso, y separación, identificación y cuantificación de los componentes de la mezcla mediante el uso de HPLC, o un analizador de aa. Los secuenciadores de proteínas, que degradan secuencialmente el péptido e identifican los aa en orden, pueden usarse además para determinar definitivamente la secuencia del péptido.

En otra modalidad, antes de su uso, el péptido se purifica para eliminar contaminantes. En otra modalidad, el péptido se purifica de manera que se cumplan los estándares establecidos por las directrices y agencias regulatorias adecuadas. Cualquiera de una serie de procedimientos de purificación convencionales puede usarse para lograr el nivel de pureza necesario, que incluye, por ejemplo, cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) en fase reversa mediante el uso de una columna de sílice alquilado tal como C₄-, C₈- o C₁₈-sílice. Una fase móvil con gradiente de un contenido orgánico creciente se usa generalmente para lograr la purificación, por ejemplo, acetonitrilo en un tampón acuoso, que contiene usualmente una pequeña cantidad de ácido trifluoroacético. La cromatografía de intercambio iónico también puede usarse para separar los péptidos en base a su carga.

La síntesis en fase sólida en la que el aa del extremo C-terminal de la secuencia se une a un soporte insoluble seguido de la adición secuencial de los aa restantes en la secuencia se usa, en otra modalidad, para la síntesis química de los péptidos de esta invención. Las técnicas para la síntesis en fase sólida se describen por Barany y Merrifield en Solid-Phase Peptide Synthesis; pp. 3-284 en The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology. Vol. 2. Special Methods in Peptide Synthesis, Parte A., Merrifield, y otros, J. Am. Chem. Soc., 85: 2149-2156 (1963), y Stewart y otros, Solid Phase Peptide Synthesis, 2da ed. Pierce Chem. Co., Rockford, Ill. (1984).

En otra modalidad, las proteínas de fusión de la presente invención se sintetizan mediante el uso de una metodología de ADN recombinante. En otra modalidad, el ADN que codifica la proteína de fusión de la presente invención se prepara mediante cualquier método adecuado, que incluye, por ejemplo, la clonación y restricción de secuencias adecuadas o la síntesis química directa mediante métodos tales como el método de fosfotriéster de

Narang y otros (1979, Meth. Enzymol. 68: 90-99); el método de fosfodiéster de Brown y otros, (1979, Meth. Enzymol 68: 109-151); el método de dietilfosforamida de Beaucage y otros (1981, Tetra. Lett., 22: 1859-1862); y el método de soporte sólido de la patente de Estados Unidos núm. 4.458.066.

En otra modalidad, los péptidos de la presente invención incorporan residuos de aa que se modifican sin afectar la actividad. En otra modalidad, los extremos terminales se derivatizan para incluir grupos bloqueadores, es decir sustituyentes químicos adecuados para proteger y/o estabilizar los extremos N y C-terminales de una "degradación no deseada", un término que pretende abarcar cualquier tipo de ruptura enzimática, química o bioquímica del compuesto en sus extremos terminales que probablemente afecte la función del compuesto, es decir una degradación secuencial del compuesto en un extremo terminal de este.

En otra modalidad, los grupos bloqueadores incluyen grupos protectores usados convencionalmente en la técnica de la química de péptidos que no afectarán negativamente las actividades *in vivo* del péptido. Por ejemplo, los grupos bloqueadores del extremo N-terminal adecuados pueden introducirse por alquilación o acilación del extremo N-terminal. Los ejemplos de grupos bloqueadores del extremo N-terminal adecuados incluyen grupos alquilo C₁-C₅ ramificados o no ramificados, grupos acilo tales como grupos formilo y acetilo, así como formas sustituidas de estos, tales como el grupo acetamidometilo (Acm). Los análogos de desamino aa también son grupos bloqueadores del extremo N-terminal útiles, y pueden acoplarse al extremo N-terminal del péptido o usarse en lugar del residuo N-terminal. Los grupos bloqueadores del extremo C-terminal adecuados, en donde el grupo carboxilo del extremo C-terminal se incorpora o no, incluyen ésteres, cetonas o amidas. Los grupos alquilo formadores de cetona o éster, particularmente los grupos alquilo inferiores tales como metilo, etilo y propilo, y los grupos amino formadores de amida tales como aminas primarias (--NH₂), y grupos mono- y di-alquilamino tales como metilamino, etilamino, dimetilamino, dietilamino, metiletilamino y similares son ejemplos de grupos bloqueadores del extremo C-terminal. Los análogos de aa descarboxilados tales como agmatina también son grupos bloqueadores del extremo C-terminal útiles y pueden acoplarse al residuo del extremo C-terminal del péptido o pueden usarse en lugar de este. En otra modalidad, los grupos amino y carboxilo libres en los extremos terminales se eliminan totalmente del péptido para producir formas desaminadas y descarboxiladas de este sin afectar la actividad del péptido.

En otra modalidad, se incorporan otras modificaciones sin afectar negativamente la actividad. En otra modalidad, tales modificaciones incluyen, pero sin limitarse a, sustitución de uno o más de los aa en la forma L-isomérica natural con aa D-isoméricos. En otra modalidad, el péptido incluye uno o más residuos de D-aminoácidos, o comprende aa que están todos en la forma D. Se contemplan además las formas retroinversas de los péptidos de conformidad con la presente invención, por ejemplo, los péptidos invertidos en los que todos los aminoácidos se sustituyen con las formas de D-aminoácidos.

En otra modalidad, las sales de adición de ácidos de los péptidos de la presente invención se utilizan como equivalentes funcionales de estos. En otra modalidad, un péptido de conformidad con la presente invención tratado con un ácido inorgánico tal como clorhídrico, bromhídrico, sulfúrico, nítrico, fosfórico, y similares, o un ácido orgánico tal como acético, propiónico, glicólico, pirúvico, oxálico, málico, malónico, succínico, maleico, fumárico, tatárico, cítrico, benzoico, cinámico, mandélico, metanosulfónico, etanosulfónico, p-toluenosulfónico, salicílico y similares, para proporcionar una sal del péptido soluble en agua, es adecuado para usar en la invención.

En otra modalidad, las modificaciones (que no modifican normalmente la secuencia primaria) incluyen la derivatización química de los polipéptidos *in vivo*, o *in vitro*, por ejemplo, acetilación, o carboxilación. Se incluyen, además, modificaciones de glicosilación, por ejemplo, las que se producen por modificación de los patrones de glicosilación de un polipéptido durante su síntesis y procesamiento o en etapas de procesamiento adicionales; por ejemplo, por exposición del polipéptido a enzimas que afectan la glicosilación, por ejemplo, enzimas glicosilantes o desglicosilantes de mamíferos. Se abarcan además secuencias que tienen residuos de aa fosforilados, por ejemplo, fosfotirosina, fosfoserina, o fosfotreonina.

En otra modalidad, los polipéptidos se modifican mediante el uso de técnicas biológicas moleculares comunes para mejorar su resistencia a la degradación proteolítica o para optimizar propiedades de solubilidad o para hacerlos más adecuados como agentes terapéuticos. Los análogos de tales polipéptidos incluyen los que contienen residuos diferentes a los L-aminoácidos de origen natural, por ejemplo, D-aminoácidos o aminoácidos sintéticos de origen no natural. Los péptidos de la invención no se limitan a los productos de cualquiera de los procesos ilustrativos específicos mencionados en la presente descripción.

En la presente descripción se describe además un kit que comprende una proteína LLO no hemolítica o un fragmento de esta, como se describe en la presente descripción, fusionada a un antígeno, un aplicador, y material de instrucción que describe el uso de los métodos descritos en la presente descripción. Aunque los kits modelos se describen más abajo, los contenidos de otros kits útiles serán evidentes para el experto en la técnica a la luz de la presente descripción.

En otra modalidad, la cepa de *Listeria* de la presente invención es una cepa de *Listeria seeligeri* recombinante. En otra modalidad, la cepa de *Listeria* es una cepa de *Listeria grayi* recombinante. En otra modalidad, la cepa de *Listeria* es una cepa de *Listeria ivanovii* recombinante. En otra modalidad, la cepa de *Listeria* es una cepa de *Listeria*

murrayi recombinante. En otra modalidad, la cepa de *Listeria* es una cepa de *Listeria welshimeri* recombinante. En otra modalidad, la cepa de *Listeria* es una cepa recombinante de cualquier otra especie de *Listeria* conocida en la técnica.

5 En otra modalidad, una cepa de *Listeria* recombinante de la presente invención se ha sometido a pases a través de un huésped animal. En otra modalidad, el proceso de pases maximiza la eficacia de la cepa como un vector de vacuna. En otra modalidad, el proceso de pases estabiliza la inmunogenicidad de la cepa de *Listeria*. En otra modalidad, el proceso de pases estabiliza la virulencia de la cepa de *Listeria*. En otra modalidad, el proceso de pases aumenta la inmunogenicidad de la cepa de *Listeria*. En otra modalidad, el proceso de pases aumenta la virulencia de la cepa de *Listeria*. En otra modalidad, el proceso de pases elimina subcepas inestables de la cepa de *Listeria*. En otra modalidad, el proceso de pases reduce la prevalencia de subcepas inestables de la cepa de *Listeria*. En otra modalidad, la cepa de *Listeria* contiene una inserción genómica del gen que codifica un péptido, proteína o polipéptido recombinantes de la presente invención. En otra modalidad, la cepa de *Listeria* porta un plásmido que comprende el gen que codifica un péptido, proteína o polipéptido recombinantes de la presente invención. Los métodos para los pases de una cepa de *Listeria* recombinante a través de un huésped animal se conocen bien en la técnica, y se describen, por ejemplo, en la solicitud de patente de Estados Unidos núm. 2006/0233835. En otra modalidad, el proceso de pases se realiza mediante cualquier otro método conocido en la técnica.

20 En otra modalidad, la cepa de *Listeria* recombinante utilizada en la presente invención se ha almacenado en un banco de células congeladas. En otra modalidad, la cepa de *Listeria* recombinante se ha almacenado en un banco de células liofilizadas. Los métodos para producir, cultivar, y preservar vectores de vacunas de *Listeria* se conocen bien en la técnica, y se describen, por ejemplo, en la Publicación Internacional PCT núm. WO 2007/061848.

25 En una modalidad, las composiciones y usos de la presente invención como se describe en la presente descripción, comprenden elementos o etapas particulares, como se describen en la presente descripción, mientras que en otra modalidad, consisten esencialmente en dichos elementos o etapas, mientras que en otra modalidad, consisten en dichos elementos o etapas. En algunas modalidades, el término "comprenden" se refiere a la inclusión del agente activo indicado, así como la inclusión de otros agentes activos, y vehículos, excipientes, emolientes, estabilizadores farmacéuticamente aceptables, etcétera, como se conocen en la industria farmacéutica. En algunas modalidades, el término "que consiste esencialmente en" se refiere a una composición, cuyo único ingrediente activo es el ingrediente activo indicado, sin embargo, pueden incluirse otros compuestos que son para estabilizar, preservar, etcétera, la formulación, pero no están implicados directamente en el efecto terapéutico del ingrediente activo indicado. En algunas modalidades, el término "que consiste esencialmente en" puede referirse a componentes que facilitan la liberación del ingrediente activo. En algunas modalidades, el término "que consiste" se refiere a una composición, que contiene el ingrediente activo y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptables.

En una modalidad, "tratar" se refiere a un tratamiento terapéutico o medidas preventivas o profilácticas, en donde el objetivo es prevenir o aliviar la afección o trastorno patológicos específicos como se describió anteriormente en la presente descripción. Por lo tanto, en una modalidad, tratar puede incluir afectar directamente o curar, suprimir, inhibir, prevenir, reducir la gravedad de, retrasar la aparición de, reducir los síntomas asociados con la enfermedad, el trastorno o la afección, o una combinación de estos. Por lo tanto, en una modalidad, "tratar" se refiere, *entre otros*, a retrasar la progresión, acelerar la remisión, inducir la remisión, aumentar la remisión, acelerar la recuperación, aumentar la eficacia de, o disminuir la resistencia a agentes terapéuticos alternativos, o una combinación de estos. En una modalidad, "prevenir" se refiere, *entre otros*, a retrasar la aparición de síntomas, prevenir la recaída de una enfermedad, disminuir la cantidad o frecuencia de los episodios de recaída, aumentar la latencia entre los episodios sintomáticos, o una combinación de estos. En una modalidad, "suprimir" o "inhibir", se refiere, *entre otros*, a reducir la gravedad de los síntomas, reducir la gravedad de un episodio agudo, reducir la cantidad de síntomas, reducir la incidencia de los síntomas relacionados con la enfermedad, reducir la latencia de los síntomas, mejorar los síntomas, reducir los síntomas secundarios, reducir las infecciones secundarias, prolongar la supervivencia del paciente, o una combinación de estos.

En una modalidad, "funcional" dentro del significado de la invención, se usa en la presente descripción para referirse a la capacidad innata de una proteína, péptido, ácido nucleico, fragmento o una variante de estos para mostrar una actividad o función biológicas. En una modalidad, tal función biológica es su propiedad de unión a una pareja de interacción, por ejemplo, un receptor asociado a la membrana, y en otra modalidad, su propiedad de trimerización. En el caso de los fragmentos funcionales y las variantes funcionales de la invención, estas funciones biológicas pueden de hecho cambiar, por ejemplo, con respecto a su especificidad o selectividad, pero con retención de la función biológica básica.

En una modalidad, "genéticamente fusionado" como se proporciona en la presente descripción pretende dar como resultado un ADN quimérico que contiene, cada uno en su propia modalidad distinta, un promotor y una secuencia codificante que no se asocian en la naturaleza.

En la medida en que los siguientes Ejemplos no se relacionan con una proteína LLO mutada en la que los aminoácidos 484-492 del CBD se han sustituido con una proteína antigénica diferente de LLO, como se reivindica, estos son Ejemplos comparativos.

5 Sección de detalles experimentales

Materiales y métodos experimentales

Líneas celulares

10 El tumor TC-1 singénico de C57BL/6 se immortalizó con E6 y E7 de HPV-16 y se transformó con el oncogén c-Ha-ras. TC-1 expresa bajos niveles de E6 y E7 y es altamente tumorigénica. TC-1 se cultivó en RPMI 1640, 10 % de FCS, L-glutamina a 2 mM, penicilina a 100 U/ml, estreptomycin a 100 µg/ml, aminoácidos no esenciales a 100 µM, piruvato de sodio a 1 mM, 2-ME a 50 micromolar (mM), G418 a 400 microgramos (mcg)/ml, y 10 % de medio de cultivo 109 de la Colección Nacional de Tipos de Cultivos a 37 ° con 10 % de CO₂. C3 es una célula embrionaria de ratón a partir de ratones C57BL/6, immortalizada con el genoma completo de HPV 16 y transformada con pEJ-ras. EL-4/E7 es el timoma EL-4 transducido de manera retroviral con E7.

20 Cepas y propagación de *L. monocytogenes*

Las cepas de *Listeria* usadas fueron Lm-LLO-E7 (gen de fusión hly-E7 en un sistema de expresión episomal; Figura 1), Lm-E7 (casete del gen E7 de una sola copia integrado en el genoma de *Listeria*), Lm-LLO-NP ("DP-L2028"; gen de fusión hly-NP en un sistema de expresión episomal), y Lm-Gag ("ZY-18"; casete del gen Gag de HIV-1 de una sola copia integrado en el cromosoma). E7 se amplificó por PCR mediante el uso de los iniciadores 5'-GGCTCGAGCATGGAGATACACC-3' (sec. con núm. de ident.: 38; el sitio de XhoI está subrayado) y 5'-GGGGACTAGTTTATGGTTTCTGAGAACA-3' (sec. con núm. de ident.: 39; el sitio de SpeI está subrayado) y se ligó a pCR2.1 (Invitrogen, San Diego, CA). E7 se escindió de pCR2.1 por digestión con XhoI/ SpeI y se ligó a pGG-55. El gen de fusión hly-E7 y el factor de transcripción pluripotencial prfA se clonaron en pAM401, un plásmido lanzadera multicopias (Wirth R y otros, J Bacteriol, 165: 831, 1986), lo que generó pGG-55. El promotor de hly conduce la expresión de los primeros 441 aa del producto génico hly, (que carece del C-terminal hemolítico, referido más abajo como "ΔLLO", y que tiene la secuencia que se expone en la sec. con núm. de ident.: 17), que se une mediante el sitio de XhoI al gen E7, lo que produce un gen de fusión hly-E7 que se transcribe y se secreta como LLO-E7. La transformación de una cepa de *Listeria* prfA negativa, XFL-7 (proporcionada por el Dr. Hao Shen, Universidad de Pensilvania), con pGG-55 se seleccionó para la retención del plásmido *in vivo* (Figuras 1A-B). El promotor de hly y el fragmento génico se generaron mediante el uso de los iniciadores 5'-GGGGGCTAGCCCTCTTTGATTAGTATATTC-3' (sec. con núm. de ident.: 40; el sitio de NheI está subrayado) y 5'-CTCCCTCGAGATCATAATTTACTTCATC-3' (sec. con núm. de ident.: 41; el sitio de XhoI está subrayado). El gen prfA se amplificó por PCR mediante el uso de los iniciadores 5'-GACTACAAGGACGATGACCGACAAGTGATAACCCGGGATCTAAATAAATCCGTT T-3' (sec. con núm. de ident.: 42; el sitio de XbaI está subrayado) y 5'-CCCCTCGACCAGCTCTTCTTGTTGTAAG-3' (sec. con núm. de ident.: 43; el sitio de SalI está subrayado). Lm-E7 se generó mediante la introducción de un casete de expresión que contiene el promotor y la secuencia señal de hly que dirige la expresión y secreción de E7 en el dominio orfZ del genoma de LM. E7 se amplificó por PCR mediante el uso de los iniciadores 5'-GCGGATCCCATGGAGATACACCTAC-3' (sec. con núm. de ident.: 44; el sitio de BamHI está subrayado) y 5'-GCTCTAGATTATGGTTTCTGAG-3' (sec. con núm. de ident.: 45; el sitio de XbaI está subrayado). Después E7 se ligó al vector lanzadera pZY-21. La cepa de LM 10403S se transformó con el plásmido resultante, pZY-21-E7, que incluye un casete de expresión insertado en el medio de una secuencia de 1.6 kb que corresponde al dominio orfX, Y, Z del genoma de LM. La dominio de homología permite la inserción del casete del gen E7 en el dominio orfZ por recombinación homóloga. Los clones se examinaron para determinar la integración del casete del gen E7 en el dominio orfZ. Las bacterias se cultivaron en medio de infusión de cerebro y corazón con cloranfenicol (20 µg/ml) (Lm-LLO-E7 y Lm-LLO-NP) o sin él (Lm-E7 y ZY-18). Las bacterias se congelaron en alícuotas a -80 °C. La expresión se verificó por transferencia tipo Western (Figura 2).

Transferencia tipo Western

55 Las cepas de *Listeria* se cultivaron en medio de Luria-Bertoni a 37 °C y se cosecharon a la misma densidad óptica medida a 600 nm. Los sobrenadantes se precipitaron con TCA y se resuspendieron en tampón de muestra 1x suplementado con NaOH 0,1 N. Cantidades idénticas de cada sedimento celular o cada sobrenadante precipitado con TCA se cargaron en geles de SDS-PAGE con 4-20 % de Tris-glicina (NOVEX, San Diego, CA). Los geles se transfirieron a difluoruro de polivinilideno y se analizaron con una sonda que consistió en un anticuerpo monoclonal (AcM) anti-E7 (Zymed Laboratories, South San Francisco, CA), después se incubaron con Ac secundario anti-ratón conjugado con HRP (Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont, Reino Unido), se revelaron con reactivos de detección ECL de Amersham, y se expusieron a Hyperfilm (Amersham Pharmacia Biotech).

Medición del crecimiento tumoral

65

Los tumores se midieron cada dos días con calibradores que abarcaron los diámetros superficiales mínimo y máximo. La media de estas dos mediciones se representó como el diámetro tumoral promedio en milímetros contra varios puntos de tiempo. Los ratones se sacrificaron cuando el diámetro del tumor alcanzó 20 mm. Las mediciones de los tumores para cada punto de tiempo se muestran sólo para los ratones sobrevivientes.

Efectos de recombinantes de *Listeria* sobre el crecimiento de tumores establecidos

Los ratones C57BL/6 de seis a 8 semanas de edad (Charles River) recibieron 2×10^5 células TC-1 por vía s.c. en el flanco izquierdo. Una semana después de la inoculación del tumor, los tumores habían alcanzado un tamaño palpable de 4-5 mm de diámetro. Grupos de ocho ratones se trataron después con 0.1 LD₅₀ i.p. Lm-LLO-E7 (10^7 UFC), Lm-E7 (10^6 UFC), Lm-LLO-NP (10^7 UFC), o Lm-Gag (5×10^5 UFC) en los días 7 y 14.

Ensayo de liberación de ^{51}Cr

Los ratones C57BL/6, de 6-8 semanas de edad, se inmunizaron por vía i.p. con 0.1 LD₅₀ de Lm-LLO-E7, Lm-E7, Lm-LLO-NP, o Lm-Gag. Diez días después de la inmunización, se extrajeron los bazo. Los esplenocitos se establecieron en cultivo con células TC-1 irradiadas (100:1, esplenocitos:TC-1) como células alimentadoras; se estimularon *in vitro* durante 5 días, después se usaron en un ensayo de liberación de ^{51}Cr estándar, con el uso de los siguientes objetivos: EL-4, EL-4/E7, o EL-4 pulsado con péptido H-2b E7 (RAHYNIVTF) (sec. con núm. de ident.: 19). Las relaciones de las células E:T, obtenidas por triplicado, fueron 80:1, 40:1, 20:1, 10:1, 5:1, y 2.5:1. Después de una incubación de 4 h a 37 °C, las células se sedimentaron, y se retiraron 50 µl del sobrenadante de cada pocillo. Las muestras se analizaron con un contador de centelleo Wallac 1450 (Gaithersburg, MD). El porcentaje de lisis específica se determinó como [(conteos experimentales por minuto - conteos espontáneos por minuto)/(conteos totales por minuto - conteos espontáneos por minuto)] x 100.

Proliferación específica de TC-1

Los ratones C57BL/6 se inmunizaron con 0.1 LD₅₀ y se reforzaron mediante inyección i.p. 20 días más tarde con 1 LD₅₀ de Lm-LLO-E7, Lm-E7, Lm-LLO-NP, o Lm-Gag. Seis días después del refuerzo, se cosecharon los bazo de los ratones inmunizados y vírgenes. Los esplenocitos se establecieron en cultivo a 5×10^5 /pocillo en placas de 96 pocillos de fondo plano con 2.5×10^4 , 1.25×10^4 , 6×10^3 , o 3×10^3 células TC-1 irradiadas/pocillo como una fuente de Ag E7, o sin células TC-1 o con 10 µg/ml de Con A. Las células se sometieron a un pulso 45 h más tarde con 0.5 µCi [^3H]timidina/pocillo. Las placas se cosecharon 18 h más tarde mediante el uso de un recolector Tomtec 96 (Orange, CT), y la proliferación se evaluó con un contador de centelleo Wallac 1450. El cambio en los conteos por minuto se calculó como conteos experimentales por minuto - conteos sin Ag por minuto.

Análisis de citometría de flujo

Los ratones C57BL/6 se inmunizaron por vía intravenosa (i.v.) con 0.1 LD₅₀ de Lm-LLO-E7 o Lm-E7 y se reforzaron 30 días más tarde. La citometría de flujo de tres colores para CD8 (53-6.7, conjugado con PE), ligando de CD62 (CD62L; MEL-14, conjugado con APC), y tetrámero H-2Db E7 se llevó a cabo mediante el uso de un citómetro de flujo FACSCalibur® con el programa informático CellQuest® (Becton Dickinson, Mountain View, CA). Los esplenocitos cosechados 5 días después del refuerzo, se tiñeron a temperatura ambiente (ta) con los tetrámeros H-2Db cargados con el péptido E7 (RAHYNIVTF; sec. con núm. de ident.: 19) o un péptido control (Gag de HIV). Los tetrámeros se usaron a una dilución de 1/200 y se proporcionaron por el Dr. Larry R. Pease (Mayo Clinic, Rochester, MN) y por el Centro de Tetrámeros del Instituto Nacional de Enfermedades Alérgicas e Infecciosas y el Programa de Reactivos de Referencia e Investigación en SIDA de los Institutos Nacionales de Salud. Se analizaron las células tetrámero⁺, CD8⁺, CD62L^{bajo}.

Agotamiento de componentes inmunológicos específicos

Las células CD8⁺, las células CD4⁺ y el IFN se agotaron en los ratones portadores de TC-1 al inyectar a los ratones con 0.5 mg por ratón de AcM: 2.43, GK1.5, o xmg1.2, respectivamente, en los días 6, 7, 8, 10, 12, y 14 después del reto tumoral. Las poblaciones celulares CD4⁺ y CD8⁺ se redujeron en un 99 % (análisis de citometría de flujo). Las células CD25⁺ se agotaron por la inyección i.p. de 0.5 mg/ratón de AcM anti-CD25 (PC61, proporcionado por Andrew J. Caton) en los días 4 y 6. El TGF se agotó por la inyección i.p. del AcM anti-TGF (2G7, proporcionado por H. 1, Levitsky), en ratones portadores de TC-1 en los días 6, 7, 8, 10, 12, 14, 16, 18 y 20. Los ratones se trataron con 10^7 Lm-LLO-E7 o Lm-E7 en el día 7 después del reto tumoral.

Transferencia adoptiva

Los ratones C57BL/6 donantes se inmunizaron y se reforzaron 7 días más tarde con 0.1 LD₅₀ de Lm-E7 o Lm-Gag. Los esplenocitos donantes se recolectaron y se pasaron sobre columnas de lana y nailon para enriquecerlos de células T. Las células T CD8⁺ se agotaron *in vitro* por la incubación con 0.1 µg de AcM 2.43 anti-CD8 durante 30 min a temperatura ambiente. Las células marcadas se trataron después con complemento de conejo. Los esplenocitos donantes eran >60 % de células T CD4⁺ (análisis de citometría de flujo). Los ratones receptores portadores de

tumores TC-1 se inmunizaron con 0,1 LD₅₀ 7 días después del reto tumoral. Los esplenocitos donantes enriquecidos con CD4⁺ (10⁷) se transfirieron 9 días después del reto tumoral a los ratones receptores mediante inyección por vía i.v.

5 Experimento de B16F0-Ova

Se inocularon 24 ratones C57BL/6 con 5 x 10⁵ células B16F0-Ova. En los días 3, 10 y 17, los grupos de 8 ratones se inmunizaron con 0,1 LD₅₀ de Lm-OVA (10⁶ ufc), Lm-LLO-OVA (10⁸ ufc) y ocho animales se dejaron sin tratamiento.

10 Análisis estadístico

Para la comparación de los diámetros de los tumores, se determinó la media y DE del tamaño tumoral para cada grupo, y la significación estadística se determinó mediante la prueba t de Student. p ≤ 0.05 se consideró significativo.

15 Ejemplo 1: Mutagénesis dirigida a un sitio del dominio de LLO de unión al colesterol

La mutagénesis dirigida a un sitio se realizó en LLO para introducir mutaciones puntuales de inactivación en el CBD, mediante la siguiente estrategia. La proteína resultante se denomina “mutLLO”:

20 Subclonación de LLO en pET29b

La secuencia de aminoácidos de LLO de tipo silvestre es:

25 MKKIMLVFITLILVSLPIAQQTEAKDASAFNKENSISVAPPASPPASPKTPIEKK
HADEIDKYIQGLDYNKNNVLVYHGDAVTNPVPRKGYKDGNEYIVVEKKKKKSINQNN
ADIQVNAISSLTYPGALVKANSELVENQPDVLPVKRDSLTLSDLPGMTNQDNKIVV
KNATKSNVNNVNTLVERWNEKYAQAYSNSVSAKIDYDDEMAYSESQIAKFGTAF
KAVNNSLVNFGAISEGKMQEEVISFKQIYYNVNVNEPTRPSRFFGKAVTKEQLQAL
30 GVNAENPPAYISSVAYGRQVYLKLTNSHSTKVKAAFDAAVSGKSVSGDVELTNIK
NSSFKAVIYGGSAGKDEVQIIDGNLGLDLRDLKKGATFNRETPGVPIAYTTNFKDNEL
AVIKNNSEYIETTSKAYTDGKINIDHSGGYVAQFNISWDEVNYDPEGNEIVQHKNWS
ENNKSKLAHFTSSIYLPGNARNINVYAKEECTGLAWEWWRTVIDDRNLPLVKNRNISI
WGTTLYPKYSNKVDNPIE (sec. con núm. de ident.: 46). El péptido señal y el dominio de unión al colesterol
35 (CBD) están subrayados, con 3 residuos críticos en el CBD (C484, W491, y W492) en letras negritas y cursivas.

Una etiqueta His6x (HHHHHH) se añadió a la región C-terminal de LLO. La secuencia de aminoácidos de LLO marcada con His es:

40 MKKIMLVFITLILVSLPIAQQTEAKDASAFNKENSISVAPPASPPASPKTPIEKKHHADEI
DKYIQGLDYNKNNVLVYHGDAVTNPVPRKGYKDGNEYIVVEKKKKKSINQNNADIQV
VNAISSLTYPGALVKANSELVENQPDVLPVKRDSLTLSDLPGMTNQDNKIVVKNAT
45 KSNVNNVNTLVERWNEKYAQAYSNSVSAKIDYDDEMAYSESQIAKFGTAFKAVN
NSLVNFGAISEGKMQEEVISFKQIYYNVNVNEPTRPSRFFGKAVTKEQLQALGVNA
ENPPAYISSVAYGRQVYLKLTNSHSTKVKAAFDAAVSGKSVSGDVELTNIKNSSFK
50 AVIYGGSAGKDEVQIIDGNLGLDLRDLKKGATFNRETPGVPIAYTTNFKDNELAVIKN
NSEYIETTSKAYTDGKINIDHSGGYVAQFNISWDEVNYDPEGNEIVQHKNWSENNKS
KLAHFTSSIYLPGNARNINVYAKEECTGLAWEWWRTVIDDRNLPLVKNRNISIWGTTL
55 YPKYSNKVDNPIEHHHHHH (Sec. con núm. de ident.: 47).

Un gen que codifica una proteína LLO marcada con His se digirió con NdeI/BamHI, y el fragmento NdeI/BamHI se subclonó en el vector de expresión pET29b, entre los sitios NdeI y BamHI. La secuencia del gen que codifica la proteína LLO es:

65 catatgaaggatgcatctgcattcaataaagaaaattcaattcatccgtggcaccaccagcatctccgctgaagtcctaagacgcca
atcgaagaaacacgcggatgaaatcgataagtatacaaggattggattacaataaaacaatgtatttagtataccacggagatgc
agtgcacaaatgtgcgccaagaaaaggttacaaagatggaaatgaatatattgtgtggagaaaaagaagaatccatcaatcaaaata
atgcagacattcaagttgtgaatgcaatttcgagcctaaccctaccaggtgctctcgtataaaagcgaattcggaattagtagaaaatcaacc
agatgttctccctgtaaacgtgattcattaacactcagcattgattgacaggtatgactaatcaagacaataaaatagttgtaaaaaatgc

cactaaatcaaacgttaacaacgcagtaatacattagtgaaagatggaatgaaaaatgctcaagcttattcaaatgtaagtgcacaaa
 attgattatgatgacgaaatggcttacagtgaaacacaattaattgcgaaatttggtacagcatttaaagctgtaataatagcttgaatgtaa
 acttcggcgcaatcagtgaaagggaaaatgaagaagaagtcattagtttaacaaattactataacgtgaatgtaataaacctacaag
 5 acctccagatttttcggcaaacgtgttactaaagagcagttgcaagcgttggtgagtgaaatgcagaaaatcctcctgcatatatctcaagt
 gtggcgtatggccgtcaagttatttgaaattatcaactaattcccatagtactaaagtaaaagctgcttttgatgctgcccgaagcggaaaa
 tctgtctcaggtgatgtagaactaacaataatcatcaaaaattctcctcaaagccgtaattacggagggtccgcaaaagatgaagttca
 aatcatcgacggcaacctcgagacttacgcgatatttgaaaaaaggcgctactttaatcgagaaacaccaggaggtccattgcttat
 10 acaacaacttcctaaaagacaatgaattagctgttattaaaaacaactcagaatattgaaacaactcaaaagcttatacagatggaaa
 aattaacatcgatcactctggaggatagttgctcaattcaacatttctgggatgaagtaaatgatcctgaaggaacgaaattgttca
 acataaaaactggagcgaaaacaataaaagcaagctagctcatttcacatcgctccatctatttgctggtaacgcgagaaatattaatgtt
 acgctaaagaatgcactggttagctgggaatggtggagaaacggtaattgatgaccggaactaccactgtgaaaaatagaaatatct
 catctggggcaccacgctttatccgaaatataagtaataagtagataatccaatcgaaaccaccaccaccactaataaggatcc(sec. con
 15 núm. de ident.: 48). Las secuencias subrayadas son, a partir del comienzo de la secuencia, el sitio de NdeI, el
 sitio de NheI, la región que codifica al CBG, la etiqueta de His 6x, y el sitio de BamHI. Los residuos del CBD
 que van a mutar en la siguiente etapa están en letras negritas y cursivas.

Corte y empalme por extensión del solapamiento (SOE) PCR

Etapa 1: Las reacciones de PCR núm. 1 y núm. 2 se realizaron en el molde pET29b-LLO. La reacción de PCR núm.
 20 1, mediante el uso de los iniciadores núm. 1 y núm. 2, amplificó el fragmento entre el sitio de NheI y el CBD, ambos
 inclusive, lo que introdujo una mutación en el CBD. La reacción de PCR núm. 2, mediante el uso de los iniciadores
 núm. 3 y núm. 4, amplificó el fragmento entre el CBD y el sitio de BamHI, ambos inclusive, lo que introdujo la misma
 mutación en el CBD (Figura 1A).

Ciclo de la reacción de PCR núm. 1: A) 94 °C 2 min 30 s, B) 94 °C 30 s, C) 55 °C 30 s, D) 72 °C 1 min, Repetir las
 25 etapas B a D 29 veces (30 ciclos en total), E) 72 °C 10 min.

Ciclo de la reacción de PCR núm. 2: A) 94 °C 2 min 30 s, B) 94 °C 30 s, C) 60 °C 30 s, D) 72 °C 1 min, Repetir las
 30 etapas B a D 29 veces (30 ciclos en total), E) 72 °C 10 min.

Etapa 2: Los productos de las reacciones de PCR núm. 1 y núm. 2 se mezclaron, se dejaron hibridar (en la región
 que codifica el CBD mutado), y la PCR se realizó con los iniciadores núm. 1 y núm. 4 durante 25 ciclos más (Figura
 1B). Ciclo de la reacción de PCR: A) 94 °C 2 min 30 s, B) 94 °C 30 s, C) 72 °C 1 min, Repetir las etapas B a C 9
 35 veces (10 ciclos en total), Añadir los iniciadores núm. 1 y núm. 4, D) 94 °C 30 s, E) 55 °C 30 s, F) 72 °C 1 min,
 Repetir las etapas D a F 24 veces (25 ciclos en total), G) 72 °C 10 min.

Secuencias de los iniciadores:

Iniciador 1: GCTAGCTCATTTCACATCGT (sec. con núm. de ident.: 49; la secuencia de NheI está
 40 subrayada).

Iniciador 2: TCTTGCAGCTTCCCAAGCTAAACCAAGTGCCTTCTTTAGCGTAAACATTAATATT (sec. con núm.
 45 de ident.: 50; la secuencia que codifica al CBD está subrayada; los codones mutados están en letras negritas
 y cursivas).

Iniciador 3: GAAGCGACTGGTTTAGCTTGGGAAGCTGCAAGAACGGTAATTGATGACCGGAAC (sec. con
 50 núm. de ident.: 51; la secuencia que codifica al CBD está subrayada; los codones mutados están en letras
 negritas y cursivas).

Iniciador 4: GGATCCTTATTAGTGGTGGTGGTGGTGGTTCGATTGG (sec. con núm. de ident.: 52; la
 secuencia de BamHI está subrayada).

La secuencia del CBD de tipo silvestre es ECTGLAWWWR (sec. con núm. de ident.: 18).

La secuencia del CBD mutado es EATGLAWEAAR (sec. con núm. de ident.: 53).

La secuencia del fragmento NheI-BamHI mutado es:

GCTAGCTCATTTCACATCGTCCATCTATTTGCCTGGTAACGCGAGAAATAT
 60 TAATGTTTACGCTAAAGAAGCGACTGGTTTAGCTTGGGAAGCTGCAAGAACGGTA
ATTGATGACCGGAACCTTACCATTGTGAAAAATAGAAATATCTCCATCTGGGGCA
CCACGCTTTATCCGAAATATAGTAATAAAGTAGATAATCCAATCGAACACCACCA
 65 CCACCACCACTAATAAGGATCC (Sec. con núm. de ident.: 54).

Ejemplo 2: Sustitución de una parte del CBD de LLO con un epítipo de CTL

La mutagénesis dirigida a un sitio se realizó en LLO para sustituir 9 aminoácidos (aa) del CBD con un epítipo de CTL del antígeno NY-ESO-1. La secuencia del CBD (sec. con núm. de ident.: 18) se sustituyó con la secuencia ESLLMWITQCR (sec. con núm. de ident.: 55; los residuos mutados están subrayados), que contiene el epítipo restringido a HLA-A2 157-165 de NY-ESO-1, denominado "ctLLO."

La estrategia de subclonación usada fue similar a la del Ejemplo anterior. Los iniciadores usados fueron los siguientes:

Iniciador 1: GCTAGCTCATTTACATCGT (sec. con núm. de ident.: 56; la secuencia de NheI está subrayada).

Iniciador 2: TCTGCACTGGGTGATCCACATCAGCAGGCTTTCTTTAGCGTAAACATTAATATT (sec. con núm. de ident.: 57; la secuencia que codifica al CBD está subrayada; los codones mutados (NY-ESO-1) están en letras negritas y cursivas).

Iniciador 3: GAAAGCCTGCTGATGTGGATCACCCAGTGCAGAACGGTAATTGATGACCGGAAC (sec. con núm. de ident.: 58; la secuencia que codifica al CBD está subrayada; los codones mutados (NY-ESO-1) están en letras negritas y cursivas).

Iniciador 4: GGATCCTTATTAGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTTCGATTGG (sec. con núm. de ident.: 59; la secuencia de BamHI está subrayada).

La secuencia del fragmento NheI/BamHI resultante es la siguiente:

GCTAGCTCATTTACATCGTCCATCTATTTGCCTGGTAACGCGAGAAATATTAAT
TTTACGCTAAAGAAAGCCTGCTGATGTGGATCACCCAGTGCAGAACGGTAATTGA
TGACCGGAACCTTACCACTTGTGAAAAATAGAAATATCTCCATCTGGGGCACCAC
CTTTATCCGAAATATAGTAATAAAGTAGATAATCCAATCGAACACCACCACCAC
ACCACTAATAAGGATCC (Sec. con núm. de ident.: 60).

Ejemplo 3: mutLLO y ctLLO pueden expresarse y purificarse en sistemas de expresión de *E. coli*

Para demostrar que mutLLO y ctLLO pueden expresarse en *E. coli*, se transformaron células de *E. coli* con pET29b y se indujeron con IPTG 0,5 mM, después los lisados celulares se recolectaron 4 horas más tarde y las proteínas totales se separaron en un gel de SDS-PAGE y se sometieron a tinción de Coomassie (Figura 2A) y transferencia de Western anti-LLO, mediante el uso del anticuerpo monoclonal B3-19 (Figura 2B). Por lo tanto, las proteínas LLO que contienen mutaciones puntuales o sustituciones en el CBD pueden expresarse y purificarse en sistemas de expresión de *E. coli*.

Ejemplo 4: mutLLO y ctLLO muestran una reducción significativa en la actividad hemolítica

Materiales y métodos experimentales

Ensayo de hemólisis

1. Las LLO mutada y de tipo silvestre se diluyeron hasta las diluciones indicadas en las Figuras 3A-B en 900 µl de PBS 1x-cisteína (PBS ajustado a pH 5,5 con clorhidrato de cisteína 0,5 M o se ajustó a 7,4). 2. La LLO se activó mediante la incubación a 37 °C durante 30 minutos. 3. Los glóbulos rojos de oveja (200 µl/muestra) se lavaron dos veces en PBS-cisteína y de 3 a 5 veces en PBS 1x hasta que el sobrenadante estuviese relativamente transparente. 4. El sedimento final de los glóbulos rojos de oveja se resuspendió en PBS-cisteína y se añadieron 100 µl de la suspensión celular a los 900 µl de la solución de LLO (solución final al 10 %). 5. Se añadieron 50 µl de glóbulos rojos de oveja a 950 µl de agua + Tween 20 al 10 % (Control positivo para la lisis, contendrá el 50 % de la cantidad de células lisadas con respecto a la cantidad total de células añadidas a los otros tubos; "control al 50 %"). 6. Todos los tubos se mezclaron cuidadosamente y se incubaron a 37 °C durante 45 minutos. 7. Los glóbulos rojos se centrifugaron en una microcentrífuga durante 10 minutos a 1500 rpm. 8. Una alícuota de 200 µl del sobrenadante se transfirió a una placa de ELISA de 96 pocillos y se leyó a 570 nm para medir la concentración de hemoglobina liberada después de la hemólisis, y las muestras se titularon de acuerdo con el control al 50 %.

Resultados

La actividad hemolítica de mutLLO y ctLLO se determinó mediante el uso de un ensayo con glóbulos rojos de oveja. mutLLO mostró una reducción significativa (entre 100 veces y 1000 veces) del título de hemólisis a pH 5,5 (Figura 3A), y una actividad hemolítica indetectable a pH 7,4 (Figura 3B). ctLLO mostró una actividad hemolítica indetectable a cualquier pH (Figuras 3A-B).

Por lo tanto, la mutación puntual (mutLLO) o por sustitución (ctLLO) de los residuos de CBD de LLO, que incluyen C484, W491, y W492, anula o reduce grandemente la actividad hemolítica. Además, la sustitución del CBD con un péptido antigénico heterólogo es un medio eficaz para crear un vehículo inmunogénico de un epítipo heterólogo, con una actividad hemolítica reducida significativamente con respecto a la LLO de tipo silvestre.

Ejemplo 5: Construcción y análisis de vacunas de mutLLO-38c13 BCR y ctLLO-38c13 BCR

Las vacunas de mutLLO-38C13 BCR y ctLLO-38C13 BCR se construyen a partir de ADN que codifica mutLLO, ctLLO, y 38C13 como se describe en la publicación de patente de Estados Unidos núm. 2006-0269561. Las vacunas se analizan como se describe en la publicación de patente de Estados Unidos núm. 2006-0269561, y se encuentra que muestran actividad protectora anti-linfoma.

Ejemplo 6: Construcción y análisis de vacunas de mutLLO-E7 y ctLLO-E7

Las vacunas de mutLLO-E7 y ctLLO-E7 se construyen a partir de ADN que codifica mutLLO, ctLLO, y E7 como se describe en la publicación de patente de Estados Unidos núm. 2006-0269561. Las vacunas se analizan como se describe en la publicación de patente de Estados Unidos núm. 2006-0269561, y muestran actividad protectora antitumoral.

Ejemplo 7: El efecto de la inmunización con LLO detox-E7 en comparación con los controles sobre el crecimiento de TC-1

Preparación de las vacunas.

E7 recombinante y LLO detox que comprende mutaciones o deleciones en el CBD se purificaron en una columna de níquel y el LPS se eliminó en una columna Norgen Proteospin de conformidad con las instrucciones del fabricante. E7 se conjugó químicamente a la LLO mediante la mezcla de 2 mg de LLO detox con 500 µg de E7 y adición de paraformaldehído a una concentración final de 1 %. La mezcla se agitó en un rotador durante 40 minutos a temperatura ambiente y después se dializó a 4°C durante la noche en PBS.

Regresión del tumor

Se establecieron 1×10^5 células TC-1 en el flanco de cada ratón, y en los días 3 y 10, los ratones se inmunizaron por vía subcutánea a lo largo del lomo con 250 µl de PBS que contenía 50 µg de E7, 200 µg de LLO detox mezclados con 50 µg de E7, 250 µg del conjugado DetoxLLO-E7 o PBS solo (virgen).

El efecto de la inmunización con LLO detox conjugada químicamente a E7 y LLO detox + E7 sobre el crecimiento de TC-1

Los ratones se inmunizaron por vía subcutánea a lo largo del lomo con 250 µl de PBS que contenía: E7 (50 µg), DetoxLLO (200 µg) mezclada con E7 (50 µg), conjugado DetoxLLO-E7 (250 µg), o PBS solo (virgen).

Los ratones administrados con LLO-E7 conjugados demostraron un aumento atenuado del tamaño tumoral en comparación con los controles vírgenes. Los ratones administrados con LLO+E7 mezclados también demostraron un aumento atenuado del tamaño tumoral (Figura 4). Mientras todos los animales vírgenes tenían tumores hacia el día 7, 2/8 ratones estaban libres de tumor después de la administración del conjugado DetoxLLO-E7 y 4/8 ratones estaban libres de tumor después de la administración de DetoxLLO mezclada con E7 en el día 49 (Figura 4, Tabla 1).

El efecto de la inmunización con E7 o la proteína LLO sobre el crecimiento de TC-1

Los ratones se inmunizaron por vía subcutánea a lo largo del lomo con 250 µl de PBS que contenía: E7 (50 µg), LLO detox (250 µg) o PBS solo (virgen).

La regresión del tumor no se observó en los ratones que se inmunizaron con LLO detox o E7 de manera separada donde en cada caso respectivo, 0/8 y 1/8 ratones estaban libres de tumor en el día 45 en los grupos LLO y E7, respectivamente. La inmunización con LLO detox, y en mayor medida con E7 retrasaron el tiempo de aparición del tumor (Figura 5).

El efecto de la inmunización con DTLLO fusionada genéticamente a la secuencia completa de E7 y LLO detoxificada mediante la sustitución de la región de unión al colesterol con el epítipo de E7, sobre el crecimiento de TC-1

Los ratones se inmunizaron por vía subcutánea a lo largo del lomo con 250 µl de PBS que contenía: DTLLO-E7 recombinante completa (secuencia completa de E7 fusionada genéticamente a DTLLO; 250 µg), quimera DTLLO-E7 (LLO detoxificada por sustitución de CBD con el epítipo de E7; 250 µg) o PBS solo (virgen).

DTLLO-E7 completa y la quimera DTLLO-E7 retrasaron la aparición de los tumores en comparación con los controles vírgenes (Figura 6). La quimera DTLLO-E7 demostró una mayor inhibición del crecimiento tumoral (8/8 libres de tumor en el día 49 después de la inoculación del tumor) en comparación con DTLLO-E7 completa (5/8 libres de tumor en el día 49 después de la inoculación del tumor; Figura 6 y Tabla 1). Se obtuvieron resultados comparables en experimentos repetidos (Figuras 7-9). Se establecieron 2×10^5 células tumorales TC-1 por vía s.c. en 8 ratones por grupo de vacuna. Los ratones se inmunizaron por vía s.c. con 50 µg de E7, 200 µg de DTLLO, 250 µg de DTLLOE7, o 50 µg de E7 más 200 µg de DTLLO en los días 3 y 10 (Figura 9). Los ratones administrados con DTLLO-E7 conjugados demostraron un aumento atenuado del tamaño tumoral en comparación con los controles vírgenes. Los ratones administrados con DTLLO sola o DTLLO+E7 mezclados también demostraron un aumento atenuado en el tamaño tumoral (Figura 9). Mientras todos los animales vírgenes tenían tumores hacia el día 75, 5/8 ratones tratados con DTLLO+E7 y 7/8 ratones tratados con DTLLOE7 estaban libres de tumor en el día 75 (Figura 9).

Ejemplo 8: Regresión de tumores TC-1 después de la inmunización con ActA, E7, o ActA + E7 mezclados o ActA-E7 fusionados genéticamente

Preparación de las vacunas.

E7 recombinante y ActA recombinante o la proteína de fusión ActA-E7 se purificaron en una columna de níquel y el LPS se eliminó en una columna Norgen Proteospin de conformidad con las instrucciones del fabricante.

Regresión del tumor

Se establecieron 1×10^5 células TC-1 en el flanco de cada ratón, y en los días 6 y 13, los ratones se inmunizaron por vía subcutánea a lo largo del lomo con 250 µl de PBS que contenía E7 (50 µg), ActA (200 µg) mezclada con E7 (50 µg), ActA-E7 fusionados genéticamente (250 µg), o PBS sólo (virgen).

Resultados

Los ratones inmunizados con ActA sola, E7 solo, ActA-E7, o ActA+E7 demostraron un aumento de la latencia hasta la aparición de los tumores en comparación con los controles (Figuras 10-12). Los ratones inmunizados con ActA-E7 (fusionados genéticamente) demostraron una fuerte regresión tumoral, con 7/8 ratones libres de tumor en el día 55 después de la inmunización (Figura 10, Tabla 1). Los ratones inmunizados con ActA+E7 demostraron una regresión tumoral superior en comparación con E7 y los controles vírgenes, con 7/8 ratones libres de tumor en el día 55 después de la inoculación del tumor (Figura 11, Tabla 1). Los ratones inmunizados con ActA sola demostraron una regresión tumoral superior en comparación con los ratones inmunizados con E7 o los controles inyectados con PBS (3/8 ratones libres de tumor después de la inmunización en comparación con ninguno de los ratones en los grupos de E7 o virgen; Figura 12, Tabla 1).

Tabla 1. Resumen de las tasas de ratones libres de tumor: Ejemplos 7-8

Vacuna	Figura	Núm. de ratones libres de tumor	Comentarios
LLO-E7	6	4/8	Conjugados químicamente
LLO + E7	6	2/8	Mezclados
E7	7	1/8	
LLO	7	0/8	
LLO-E7	8	5/8	Fusionados genéticamente
Quimera LLO-E7	8	7/8	Sustituido genéticamente
E7	9	0/8	
LLO	9	0/8	
LLO-E7	9	6/8	Fusionados genéticamente
LLO + E7	9	2/8	Mezclados
Quimera LLO-E7	10	8/8	Sustituido genéticamente
E7	11	0/8	Día 33
LLO	11	0/8	Día 33
LLO-E7	11	8/8	Día 33
LLO + E7	11	6/8	Día 33
Quimera LLO-E7	11	8/8	Día 33
ActA-E7	n/a	7/8	Sistema de expresión anterior
ActA + E7	n/a	4/8	
E7	n/a	0/8	
ActA	n/a	3/8	

Ejemplo 9: DetoxLLO induce la expresión de ARNm de citocinas y la secreción de citocinas por los macrófagos de la médula ósea (BM)

Las BMDC 8e5 del día 7 se descongelaron durante la noche a 37 °C en medio RF10. A continuación, las BMDC se centrifugaron y se resuspendieron en 1 ml de medio RF10 fresco a 37 °C durante 1 hr. Las BMDC se trataron con 40 mcg/ml de LLOE7 y los equivalentes molares de E7 y LLO (o con PBS como control negativo o 1 mcg/ml de LPS como control positivo). Después de 2 y 24 hrs, las células se recolectaron por centrifugación y los medios se guardaron para un ELISA y se analizó la secreción de citocinas. Se extrajo el ARN de las células y se convirtió a ADNc. El ADNc se sometió después a análisis de qPCR con iniciadores para diferentes citocinas, y se evaluaron los niveles de expresión del ARNm de citocinas.

Resultados

DetoxLLO, administrada sola, con E7, o fusionada a E7, indujeron la expresión del ARNm de TNF- α (Figuras 13A-B), IL-12 (Figuras 13C-D), e ISG15 (Figura 13E) por los macrófagos de BM después de 2 horas (Figuras 13A y 13C) y 24 horas (Figuras 13B, 13D, y 13E) en comparación con los controles. De manera similar, la detoxLLO indujo la secreción de TNF- α (Figura 14A) e IL-12 (Figura 14B) por los macrófagos de BM después de 2 y 24 horas.

Ejemplo 10: LLO detox regula positivamente los marcadores de maduración de las células dendríticas

La médula ósea se recolectó de los fémures de ratones C57BL/6 a las 6-8 semanas de edad. Las células de la médula ósea de cuatro ratones se mezclaron, y las células se cultivaron en medio RPMI 1640 que contenía FCS 10 % y penicilina/estreptomicina 100 U/ml en placas de Petri de 100 x 15 mm. Después de 2 h de incubación a 37 °C en 10 % de CO₂, las células no adherentes se eliminaron mediante lavado con medio calentado. Las células adherentes restantes se recolectaron por raspado con un raspador estéril de células. Después de lavar, las células se ajustaron a 0,5 x 10⁶/ml, y se colocaron en una placa de 24 pocillos con GM-CSF murino recombinante a 20 ng/ml (R&D Systems, Minneapolis, MN). El medio se cambió cada 2-3 días. Después de 7 días de cultivo, las células no adherentes se recolectaron, se lavaron, y se usaron en los experimentos.

Estas células dendríticas originadas en la médula ósea (día 7) se sembraron a $2 \times 10^6/\text{ml}$ y después se sometieron a un pulso con E7 (10 mcg/ml), LLO (40 mcg/ml), o LLOE7 (50 mcg/ml) más LLO (40 mcg/ml) durante 16 hr a 37°C , y 5 % de CO_2 . El fenotipo de las DC obtenidas mediante el uso de este protocolo se analizó por análisis de FACS. Las DC se recolectaron después de 16 h como se describió anteriormente. Las células se tiñeron con AcM marcados con APC específicos para CD11c de ratón, o AcM marcados con FITC específicos para MHC clase II, CD40, CD86 de ratón. La IgG de ratón de igual isotipo se usó como un control negativo y se sustrajo del fondo. Las células se incubaron con los AcM durante 30 min a 4°C en la oscuridad. Después de dos lavados con PBS, se añadieron 10 μl de 7AAD (Beckman Coulter, Marseille, Francia) 10 min antes de analizar las células en un citómetro de flujo FACS.

Resultados

La médula ósea se recolectó de los fémures de ratones C57BL/6 a las 6-8 semanas de edad. Después de 7 días de cultivo, las células no adherentes se recolectaron, se lavaron, y se sembraron en placas a $2 \times 10^6/\text{ml}$ y después se sometieron a un pulso con E7 (10 mcg/ml), LLO (40 mcg/ml), o LLOE7 (50 mcg/ml) más LLO (40 mcg/ml) durante 16 hr en 37°C , y 5 % de CO_2 . Las células se tiñeron con AcM marcados con APC específicos para CD11c de ratón, o AcM marcados con FITC específicos para MHC clase II, CD40, CD86 de ratón. La IgG de ratón de igual isotipo se usó como un control negativo y se sustrajo del fondo. Las células se incubaron con los AcM durante 30 min a 4°C en la oscuridad. Después de dos lavados con PBS, se añadieron 10 μl de 7AAD (Beckman Coulter, Marseille, Francia) 10 min antes de analizar las células en un citómetro de flujo FACS. La población de células vivas se muestra como porcentaje de células positivas a CD11c. La administración de detoxLLO (en los grupos LLO, LLO+E7 y LLOE7) reguló positivamente (Figuras 15A-C) en comparación con los controles.

Ejemplo 11: Translocación nuclear de NF-kappa-B después de la estimulación con DT-LLO

La línea celular de macrófagos J774 se usó como sistema modelo para las células presentadoras de antígenos (APC). Se sembraron 5×10^5 células por pocillo (placa de 6 pocillos) en un volumen total de 1 ml. Las células se tiñeron con anti-NF- κB (P65) - FITC (fluorescencia verde) y DAPI para el núcleo (fluorescencia azul). En las Figuras 17B, D, y F, las células también se tiñeron después de 24 horas con anti-CD11B-PE (M1/170, eBioscience), que se expresa en la superficie celular de macrófagos y está implicado en las interacciones adhesivas de las células.

Resultados

NF-kappaB se ubica en el citoplasma después del tratamiento de las células con los medios solos (sin activación) (Figura 16A). Las células tratadas con los medios demuestran una tinción de Cd11b débil (Figura 16B). Después de una estimulación durante la noche (24 hr) con Dt-LLO (30 mcg), NF-kappaB se movió del citoplasma hacia el núcleo (Figura 16C) y hubo un aumento en la tinción de CD11b (Figura 16D). De manera similar, después de la estimulación durante la noche (24 hr) con LPS (10 mcg/ml, control positivo), NF-kappaB se translocó al núcleo (Figura 16E), lo que se enfatiza por el aumento de la tinción de CD11b+ de la membrana plasmática (Figura 16F).

Por lo tanto, en una modalidad, los datos demuestran la capacidad de LLO detox para estimular la inmunidad innata a través de macrófagos y DC.

Listado de secuencias

<110> Los Miembros de la Universidad de Pensilvania

<120> PROTEÍNAS DE FUSIÓN CON LLO NO HEMOLÍTICA Y MÉTODOS PARA UTILIZAR LAS MISMAS

<130> P-7771-PC4

<140> PCT/US09/999999

<141> 2009-06-22

<150> 12/213,696

<151> 2008-06-23

<160> 63

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 180

<212> PRT

<213> Homo sapiens

ES 2 609 925 T3

<400> 1

5	Met	Gln	Ala	Glu	Gly	Arg	Gly	Thr	Gly	Gly	Ser	Thr	Gly	Asp	Ala	Asp	1	5	10	15
	Gly	Pro	Gly	Gly	Pro	Gly	Ile	Pro	Asp	Gly	Pro	Gly	Gly	Asn	Ala	Gly	20	25	30	
10	Gly	Pro	Gly	Glu	Ala	Gly	Ala	Thr	Gly	Gly	Arg	Gly	Pro	Arg	Gly	Ala	35	40	45	
15	Gly	Ala	Ala	Arg	Ala	Ser	Gly	Pro	Gly	Gly	Gly	Ala	Pro	Arg	Gly	Pro	50	55	60	
20	His	Gly	Gly	Ala	Ala	Ser	Gly	Leu	Asn	Gly	Cys	Cys	Arg	Cys	Gly	Ala	65	70	75	80
	Arg	Gly	Pro	Glu	Ser	Arg	Leu	Leu	Glu	Phe	Tyr	Leu	Ala	Met	Pro	Phe	85	90	95	
25	Ala	Thr	Pro	Met	Glu	Ala	Glu	Leu	Ala	Arg	Arg	Ser	Leu	Ala	Gln	Asp	100	105	110	
30	Ala	Pro	Pro	Leu	Pro	Val	Pro	Gly	Val	Leu	Leu	Lys	Glu	Phe	Thr	Val	115	120	125	
	Ser	Gly	Asn	Ile	Leu	Thr	Ile	Arg	Leu	Thr	Ala	Ala	Asp	His	Arg	Gln	130	135	140	
35	Leu	Gln	Leu	Ser	Ile	Ser	Ser	Cys	Leu	Gln	Gln	Leu	Ser	Leu	Leu	Met	145	150	155	160
40	Trp	Ile	Thr	Gln	Cys	Phe	Leu	Pro	Val	Phe	Leu	Ala	Gln	Pro	Pro	Ser	165	170	175	
45	Gly	Gln	Arg	Arg													180			

<210> 2

<211> 9

50 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

55	Ser	Leu	Leu	Met	Trp	Ile	Thr	Gln	Cys	1	5
----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	---	---

<210> 3

<211> 11

60 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

65	Ser	Leu	Leu	Met	Trp	Ile	Thr	Gln	Cys	Phe	Leu	1	5	10
----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	---	---	----

ES 2 609 925 T3

<210> 4
 <211> 12
 <212> PRT
 5 <213> Homo sapiens

 <400> 4

 10 Ser Leu Leu Met Trp Ile Thr Gln Cys Phe Leu Pro
 1 5 10

 <210> 5
 <211> 13
 15 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 <400> 5

 20 Ser Leu Leu Met Trp Ile Thr Gln Cys Phe Leu Pro Val
 1 5 10

 <210> 6
 <211> 14
 25 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 <400> 6

 30 Ser Leu Leu Met Trp Ile Thr Gln Cys Phe Leu Pro Val Phe
 1 5 10

 <210> 7
 <211> 15
 35 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 <400> 7

 40 Ser Leu Leu Met Trp Ile Thr Gln Cys Phe Leu Pro Val Phe Leu
 1 5 10 15

 <210> 8
 <211> 20
 45 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 <400> 8

 50 Trp Ile Thr Gln Cys Phe Leu Pro Val Phe Leu Ala Gln Pro Pro Ser
 1 5 10 15

 Gly Gln Arg Arg
 20
 55
 <210> 9
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 60
 <400> 9

 65

ES 2 609 925 T3

	Tyr	Leu	Ala	Met	Pro	Phe	Ala	Thr	Pro	Met	Glu	Ala	Glu	Leu	Ala	Arg
	1				5					10					15	
5		Arg	Ser	Leu	Ala											
				20												
	<210>	10														
	<211>	10														
10	<212>	PRT														
	<213>	Homo sapiens														
	<400>	10														
15					Ala	Ser	Gly	Pro	Gly	Gly	Gly	Ala	Pro	Arg		
					1				5					10		
	<210>	11														
	<211>	9														
20	<212>	PRT														
	<213>	Homo sapiens														
	<400>	11														
25					Met	Pro	Phe	Ala	Thr	Pro	Met	Glu	Ala			
					1				5							
	<210>	12														
	<211>	9														
30	<212>	PRT														
	<213>	Homo sapiens														
	<400>	12														
35					Leu	Ala	Met	Pro	Phe	Ala	Thr	Pro	Met			
					1				5							
	<210>	13														
	<211>	9														
40	<212>	PRT														
	<213>	Homo sapiens														
	<400>	13														
45					Ala	Arg	Gly	Pro	Glu	Ser	Arg	Leu	Leu			
					1				5							
	<210>	14														
	<211>	9														
50	<212>	PRT														
	<213>	Homo sapiens														
	<400>	14														
55					Leu	Leu	Met	Trp	Ile	Thr	Gln	Cys	Phe			
					1				5							
	<210>	15														
	<211>	9														
60	<212>	PRT														
	<213>	Homo sapiens														
	<400>	15														
65					Ser	Leu	Leu	Met	Trp	Ile	Thr	Gln	Val			
					1				5							

ES 2 609 925 T3

<210> 16
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 5
 <400> 16
 Ser Leu Leu Met Trp Ile Thr Gln Val
 1 5
 10
 <210> 17
 <211> 98
 <212> PRT
 <213> Papilomavirus humano
 15
 <400> 17
 Met His Gly Asp Thr Pro Thr Leu His Glu Tyr Met Leu Asp Leu Gln
 1 5 10 15
 20
 Pro Glu Thr Thr Asp Leu Tyr Cys Tyr Glu Gln Leu Asn Asp Ser Ser
 20 25 30
 25
 Glu Glu Glu Asp Glu Ile Asp Gly Pro Ala Gly Gln Ala Glu Pro Asp
 35 40 45
 30
 Arg Ala His Tyr Asn Ile Val Thr Phe Cys Cys Lys Cys Asp Ser Thr
 50 55 60
 35
 Leu Arg Leu Cys Val Gln Ser Thr His Val Asp Ile Arg Thr Leu Glu
 65 70 75 80
 40
 Asp Leu Leu Met Gly Thr Leu Gly Ile Val Cys Pro Ile Cys Ser Gln
 85 90 95
 45
 Lys Pro
 <210> 18
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Listeria monocytogenes
 <400> 18
 50
 Glu Cys Thr Gly Leu Ala Trp Glu Trp Trp Arg
 1 5 10
 55
 <210> 19
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Papilomavirus humano
 <400> 19
 60
 Arg Ala His Tyr Asn Ile Val Thr Phe
 1 5
 65
 <210> 20
 <211> 105
 <212> PRT
 <213> Papilomavirus humano

ES 2 609 925 T3

<400> 20

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

30 <210> 21
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Papilomavirus humano

35 <400> 21

Thr Leu Gly Ile Val Cys Pro Ile
 1 5

40 <210> 22
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Papilomavirus humano

45 <400> 22

Leu Leu Met Gly Thr Leu Gly Ile Val
 1 5

50 <210> 23
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Papilomavirus humano

55 <400> 23

Tyr Met Leu Asp Leu Gln Pro Glu Thr Thr
 1 5 10

60 <210> 24
 <211> 158
 <212> PRT
 <213> Papilomavirus humano

65 <400> 24

ES 2 609 925 T3

	Met	His	Gln	Lys	Arg	Thr	Ala	Met	Phe	Gln	Asp	Pro	Gln	Glu	Arg	Pro	
	1				5					10					15		
5	Arg	Lys	Leu	Pro	Gln	Leu	Cys	Thr	Glu	Leu	Gln	Thr	Thr	Ile	His	Asp	
				20					25					30			
	Ile	Ile	Leu	Glu	Cys	Val	Tyr	Cys	Lys	Gln	Gln	Leu	Leu	Arg	Arg	Glu	
10			35					40					45				
	Val	Tyr	Asp	Phe	Ala	Phe	Arg	Asp	Leu	Cys	Ile	Val	Tyr	Arg	Asp	Gly	
		50					55					60					
15	Asn	Pro	Tyr	Ala	Val	Cys	Asp	Lys	Cys	Leu	Lys	Phe	Tyr	Ser	Lys	Ile	
	65					70					75					80	
	Ser	Glu	Tyr	Arg	His	Tyr	Cys	Tyr	Ser	Leu	Tyr	Gly	Thr	Thr	Leu	Glu	
20					85					90					95		
	Gln	Gln	Tyr	Asn	Lys	Pro	Leu	Cys	Asp	Leu	Leu	Ile	Arg	Cys	Ile	Asn	
				100					105					110			
25	Cys	Gln	Lys	Pro	Leu	Cys	Pro	Glu	Glu	Lys	Gln	Arg	His	Leu	Asp	Lys	
			115					120					125				
	Lys	Gln	Arg	Phe	His	Asn	Ile	Arg	Gly	Arg	Trp	Thr	Gly	Arg	Cys	Met	
30		130					135					140					
	Ser	Cys	Cys	Arg	Ser	Ser	Arg	Thr	Arg	Arg	Glu	Thr	Gln	Leu			
35	145					150					155						
	<210> 25																
	<211> 158																
	<212> PRT																
40	<213> Papilomavirus humano																
	<400> 25																
	Met	Ala	Arg	Phe	Glu	Asp	Pro	Thr	Arg	Arg	Pro	Tyr	Lys	Leu	Pro	Asp	
45	1				5					10					15		
	Leu	Cys	Thr	Glu	Leu	Asn	Thr	Ser	Leu	Gln	Asp	Ile	Glu	Ile	Thr	Cys	
				20					25					30			
50	Val	Tyr	Cys	Lys	Thr	Val	Leu	Glu	Leu	Thr	Glu	Val	Phe	Glu	Phe	Ala	
			35					40					45				
	Phe	Lys	Asp	Leu	Phe	Val	Val	Tyr	Arg	Asp	Ser	Ile	Pro	His	Ala	Ala	
55		50					55					60					
60																	
65																	

ES 2 609 925 T3

	Cys His Lys Cys Ile Asp Phe Tyr Ser Arg Ile Arg Glu Leu Arg His	65	70	75	80
5	Tyr Ser Asp Ser Val Tyr Gly Asp Thr Leu Glu Lys Leu Thr Asn Thr	85	90	95	
10	Gly Leu Tyr Asn Leu Leu Ile Arg Cys Leu Arg Cys Gln Lys Pro Leu	100	105	110	
15	Asn Pro Ala Glu Lys Leu Arg His Leu Asn Glu Lys Arg Arg Phe His	115	120	125	
20	Asn Ile Ala Gly His Tyr Arg Gly Gln Cys His Ser Cys Cys Asn Arg	130	135	140	
25	Ala Arg Gln Glu Arg Leu Gln Arg Arg Arg Glu Thr Gln Val	145	150	155	
	<210> 26				
	<211> 145				
	<212> PRT				
	<213> Mus musculus				
	<400> 26				
30	Met Lys Leu Trp Leu Asn Trp Ile Phe Leu Val Thr Leu Leu Asn Gly	1	5	10	15
35	Ile Gln Cys Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln	20	25	30	
40	Pro Gly Gly Ser Leu Ser Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe	35	40	45	
45	Thr Asp Tyr Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu	50	55	60	
50	Glu Trp Leu Ala Leu Ile Arg Asn Lys Ala Asn Gly Tyr Thr Thr Glu	65	70	75	80
55	Tyr Ser Ala Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser	85	90	95	
60	Gln Ser Ile Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ala Leu Arg Ala Glu Asp Ser	100	105	110	
65	Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Pro Asn Tyr Tyr Asp Gly Ser Tyr	115	120	125	
	Glu Gly Tyr Phe Asp Tyr Trp Ala Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser	130	135	140	
	Ser	145			
	<210> 27				
	<211> 124				
	<212> PRT				

ES 2 609 925 T3

<213> Mus musculus

<400> 27

```

5      Leu Leu Leu Ile Ser Val Thr Val Ile Val Ser Asn Gly Glu Ile Val
      1              5              10              15

      Leu Thr Gln Ser Pro Thr Thr Met Ala Ala Ser Pro Gly Glu Lys Ile
10      20              25              30

      Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Ile Ser Ser Asn Tyr Leu His
      35              40              45

15      Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Phe Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Arg
      50              55              60

      Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly
20      65              70              75              80

      Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Gly Thr Met Glu Ala Glu Asp
25      85              90              95

      Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Ser Ser Ile Pro Arg Gly Val
      100              105              110

30      Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
      115              120

```

<210> 28

<211> 132

35 <212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 28

```

40      Gly Phe Leu Leu Ile Ser Val Thr Val Ile Leu Thr Asn Gly Glu Ile
      1              5              10              15

      Phe Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Ile Ala Ala Ser Pro Gly Glu Lys
45      20              25              30

      Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Asn Trp
      35              40              45

50      Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Ile Trp Ile Tyr Gly Ile
      50              55              60

      Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser
55      65              70              75              80

      Gly Thr Ser Phe Ser Phe Thr Ile Asn Ser Met Glu Ala Glu Asp Val
60      85              90              95

      Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Ser Tyr Pro Phe Thr Phe Gly
      100              105              110

```

65

ES 2 609 925 T3

	Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val
	115 120 125
5	Ser His Leu Pro
	130
10	<210> 29 <211> 123 <212> PRT <213> Mus musculus
15	<400> 29
	Leu Leu Leu Ile Ser Val Thr Val Ile Val Ser Asn Gly Glu Ile Val
	1 5 10 15
20	Leu Thr Gln Ser Pro Thr Thr Met Ala Ala Ser Pro Gly Glu Lys Ile
	20 25 30
25	Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Ile Ser Ser Asn Tyr Leu His
	35 40 45
30	Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Phe Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Arg
	50 55 60
35	Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly
	65 70 75 80
40	Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Gly Thr Met Glu Ala Glu Asp
	85 90 95
45	Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Ser Ser Ile Pro Arg Thr Phe
	100 105 110
50	Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala
	115 120
55	<210> 30 <211> 157 <212> PRT <213> Homo sapiens
60	<400> 30
	Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Ile Leu Lys Gly
	1 5 10 15
65	Val Gln Cys Glu Met Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
	20 25 30
70	Pro Gly Glu Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Phe
	35 40 45
75	Ser Gly Ser Thr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Ser Gly Arg Gly Leu
	50 55 60

ES 2 609 925 T3

	Glu Trp Val Gly Arg Ser Arg Ser Lys Ala Asp Asn Phe Met Thr Ser	
	65	70 75 80
5	Tyr Ala Pro Ser Ile Lys Gly Lys Phe Ile Ile Ser Arg Asp Asp Ser	
		85 90 95
10	Ser Asn Met Leu Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys Thr Glu Asp Thr	
		100 105 110
15	Ala Val Tyr Phe Cys Thr Arg Asn Phe Thr Ser Leu Asp Ser Thr Gly	
		115 120 125
20	Asn Ser Phe Gly Pro Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser	
		130 135 140
25	Gly Ser Ala Ser Ala Pro Thr Leu Phe Pro Leu Val Ser	
		145 150 155
	<210> 31	
	<211> 157	
	<212> PRT	
	<213> Homo sapiens	
30	<400> 31	
	Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Ile Leu Lys Gly	
	1	5 10 15
35	Val Gln Cys Glu Met Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln	
		20 25 30
40	Pro Gly Glu Ser Phe Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Phe	
		35 40 45
45	Ser Gly Ser Thr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Ser Gly Arg Gly Leu	
		50 55 60
50	Glu Trp Val Gly Arg Ser Arg Ser Lys Ala Asp Asn Phe Met Thr Ser	
		65 70 75 80
55	Tyr Ala Pro Ser Ile Lys Gly Lys Phe Ile Ile Ser Arg Asp Asp Ser	
		85 90 95
60	Ser Asn Met Met Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys Asn Glu Asp Thr	
		100 105 110
65	Ala Val Tyr Phe Cys Thr Arg Asn Phe Thr Ser Leu Asp Ser Thr Gly	
		115 120 125
	Asn Ser Phe Gly Pro Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser	
		130 135 140
	Gly Ser Ala Ser Ala Pro Thr Leu Phe Pro Leu Val Ser	
		145 150 155

ES 2 609 925 T3

<210> 32
 <211> 146
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

<400> 32

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

```

Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Ile Leu Lys Gly
1          5          10          15

Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
          20          25          30

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Val
          35          40          45

Ser Ser Asn Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
          50          55          60

Glu Trp Val Ser Val Ile Tyr Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp
65          70          75          80

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr
          85          90          95

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
          100          105          110

Tyr Cys Ala Arg His Thr Val Arg Gly Gly His Cys Ala Pro Arg His
          115          120          125

Lys Pro Ser Leu Gln Glu Arg Trp Gly Asn Gln Arg Gln Gly Ala Leu
          130          135          140

Arg Ser
145
  
```

<210> 33
 <211> 134
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 33

```

Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Ile Leu Lys Gly
1          5          10          15

Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
          20          25          30

Pro Gly Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
          35          40          45

Ser Gly Ser Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Ser Gly Lys Gly Leu
          50          55          60
  
```

ES 2 609 925 T3

	Glu Trp Val Gly His Ile Arg Asp Lys Ala Asn Ser Tyr Ala Thr Thr	65	70	75	80
5	Tyr Ala Ala Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser	85	90	95	
10	Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Ile Glu Asp Thr	100	105	110	
15	Ala Val Tyr Phe Cys Thr Arg Asn Phe Thr Ser Leu Asp Ser Thr Gly	115	120	125	
20	Asn Ser Phe Gly Pro Trp	130			
25	<210> 34 <211> 108 <212> PRT <213> Homo sapiens <400> 34				
30	Ser Glu Leu Thr Gln Asp Pro Val Val Ser Val Ala Leu Gly Gln Thr	1	5	10	15
35	Val Arg Ile Thr Cys Gln Gly Asp Ser Leu Arg Ser Tyr Tyr Ala Ser	20	25	30	
40	Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr Gly	35	40	45	
45	Lys Asn Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ser	50	55	60	
50	Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Thr Gly Ala Gln Ala Glu Asp	65	70	75	80
55	Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Asn Ser Arg Asp Ser Ser Gly Asn Leu Pro	85	90	95	
60	Leu Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly	100	105		
65	<210> 35 <211> 114 <212> PRT <213> Homo sapiens <400> 35				
60	Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Thr Val Ser Leu Gly	1	5	10	15
65	Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Ile Leu Tyr Ser	20	25	30	

ES 2 609 925 T3

	Ser Asn Asp Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Ala Gly Gln	35	40	45
5	Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val	50	55	60
10	Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Ala Thr Asp Phe Thr Leu Thr	65	70	75
15	Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Ile Tyr Tyr Cys Gln Gln	85	90	95
	Tyr Tyr Ser Thr Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile	100	105	110
20	Lys Arg			
	<210> 36			
	<211> 108			
	<212> PRT			
25	<213> Homo sapiens			
	<400> 36			
30	Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly	1	5	10
	Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Thr Trp	20	25	30
35	Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile	35	40	45
40	Tyr Glu Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly	50	55	60
45	Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro	65	70	75
	Asp Asp Phe Val Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Thr Phe Ser Ser	85	90	95
50	Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys	100	105	
55	<210> 37			
	<211> 529			
	<212> PRT			
	<213> Listeria monocytogenes			
60	<400> 37			
	Met Lys Lys Ile Met Leu Val Phe Ile Thr Leu Ile Leu Val Ser Leu	1	5	10
65	Pro Ile Ala Gln Gln Thr Glu Ala Lys Asp Ala Ser Ala Phe Asn Lys	20	25	30

ES 2 609 925 T3

Glu	Asn	Ser	Ile	Ser	Ser	Met	Ala	Pro	Pro	Ala	Ser	Pro	Pro	Ala	Ser		
		35					40					45					
Pro	Lys	Thr	Pro	Ile	Glu	Lys	Lys	His	Ala	Asp	Glu	Ile	Asp	Lys	Tyr		
	50					55					60						
Ile	Gln	Gly	Leu	Asp	Tyr	Asn	Lys	Asn	Asn	Val	Leu	Val	Tyr	His	Gly		
65					70					75					80		
Asp	Ala	Val	Thr	Asn	Val	Pro	Pro	Arg	Lys	Gly	Tyr	Lys	Asp	Gly	Asn		
				85					90					95			
Glu	Tyr	Ile	Val	Val	Glu	Lys	Lys	Lys	Lys	Ser	Ile	Asn	Gln	Asn	Asn		
			100					105					110				
Ala	Asp	Ile	Gln	Val	Val	Asn	Ala	Ile	Ser	Ser	Leu	Thr	Tyr	Pro	Gly		
		115					120					125					
Ala	Leu	Val	Lys	Ala	Asn	Ser	Glu	Leu	Val	Glu	Asn	Gln	Pro	Asp	Val		
	130					135					140						
Leu	Pro	Val	Lys	Arg	Asp	Ser	Leu	Thr	Leu	Ser	Ile	Asp	Leu	Pro	Gly		
145					150					155					160		
Met	Thr	Asn	Gln	Asp	Asn	Lys	Ile	Val	Val	Lys	Asn	Ala	Thr	Lys	Ser		
				165					170					175			
Asn	Val	Asn	Asn	Ala	Val	Asn	Thr	Leu	Val	Glu	Arg	Trp	Asn	Glu	Lys		
			180					185					190				
Tyr	Ala	Gln	Ala	Tyr	Pro	Asn	Val	Ser	Ala	Lys	Ile	Asp	Tyr	Asp	Asp		
	195					200						205					
Glu	Met	Ala	Tyr	Ser	Glu	Ser	Gln	Leu	Ile	Ala	Lys	Phe	Gly	Thr	Ala		
	210					215					220						
Phe	Lys	Ala	Val	Asn	Asn	Ser	Leu	Asn	Val	Asn	Phe	Gly	Ala	Ile	Ser		
225					230					235					240		
Glu	Gly	Lys	Met	Gln	Glu	Glu	Val	Ile	Ser	Phe	Lys	Gln	Ile	Tyr	Tyr		
				245					250					255			
Asn	Val	Asn	Val	Asn	Glu	Pro	Thr	Arg	Pro	Ser	Arg	Phe	Phe	Gly	Lys		
			260					265					270				
Ala	Val	Thr	Lys	Glu	Gln	Leu	Gln	Ala	Leu	Gly	Val	Asn	Ala	Glu	Asn		
		275					280					285					
Pro	Pro	Ala	Tyr	Ile	Ser	Ser	Val	Ala	Tyr	Gly	Arg	Gln	Val	Tyr	Leu		
	290					295					300						
Lys	Leu	Ser	Thr	Asn	Ser	His	Ser	Thr	Lys	Val	Lys	Ala	Ala	Phe	Asp		
305					310					315					320		
Ala	Ala	Val	Ser	Gly	Lys	Ser	Val	Ser	Gly	Asp	Val	Glu	Leu	Thr	Asn		
				325					330					335			

ES 2 609 925 T3

	Ile Ile Lys Asn Ser Ser Phe Lys Ala Val Ile Tyr Gly Gly Ser Ala	
	340 345 350	
5	Lys Asp Glu Val Gln Ile Ile Asp Gly Asn Leu Gly Asp Leu Arg Asp	
	355 360 365	
10	Ile Leu Lys Lys Gly Ala Thr Phe Asn Arg Glu Thr Pro Gly Val Pro	
	370 375 380	
15	Ile Ala Tyr Thr Thr Asn Phe Leu Lys Asp Asn Glu Leu Ala Val Ile	
	385 390 395 400	
20	Lys Asn Asn Ser Glu Tyr Ile Glu Thr Thr Ser Lys Ala Tyr Thr Asp	
	405 410 415	
25	Gly Lys Ile Asn Ile Asp His Ser Gly Gly Tyr Val Ala Gln Phe Asn	
	420 425 430	
30	Ile Ser Trp Asp Glu Val Asn Tyr Asp Pro Glu Gly Asn Glu Ile Val	
	435 440 445	
35	Gln His Lys Asn Trp Ser Glu Asn Asn Lys Ser Lys Leu Ala His Phe	
	450 455 460	
40	Thr Ser Ser Ile Tyr Leu Pro Gly Asn Ala Arg Asn Ile Asn Val Tyr	
	465 470 475 480	
45	Ala Lys Glu Cys Thr Gly Leu Ala Trp Glu Trp Trp Arg Thr Val Ile	
	485 490 495	
50	Asp Asp Arg Asn Leu Pro Leu Val Lys Asn Arg Asn Ile Ser Ile Trp	
	500 505 510	
55	Gly Thr Thr Leu Tyr Pro Lys Tyr Ser Asn Lys Val Asp Asn Pro Ile	
	515 520 525	
60	Glu	
	<210> 38	
	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
65	<220>	
	<223> Iniciador	
60	<400> 38	
	ggctcgagca tggagataca cc	22
	<210> 39	
	<211> 28	
65	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	

<220>
 <223> Iniciador

 <400> 39
 5 ggggactagt ttatggttc tgagaaca 28

 <210> 40
 <211> 31
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Iniciador

 <400> 40
 15 gggggctagc cctccttga ttagtatatt c 31

 <210> 41
 <211> 28
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Iniciador
 25
 <400> 41
 ctccctcgag atcataattt acttcac 28

 <210> 42
 30 <211> 55
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 35 <223> Iniciador

 <400> 42
 gactacaagg acgatgaccg acaagtata acccgggatc taaataaatc cgttt 55

 <210> 43
 40 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 45 <223> Iniciador

 <400> 43
 50 cccgtcgacc agctcttctt ggtgaag 27

 <210> 44
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 55
 <220>
 <223> Iniciador

 <400> 44
 60 gcggatccca tggagataca cctac 25

 <210> 45
 <211> 22
 <212> ADN
 65 <213> Secuencia artificial

ES 2 609 925 T3

<220>

<223> Iniciador

<400> 45

5 gctctagatt atggtttctg ag 22

<210> 46

<211> 529

<212> PRT

10 <213> Listeria monocytogenes

<400> 46

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

ES 2 609 925 T3

Glu Gly Lys Met Gln Glu Glu Val Ile Ser Phe Lys Gln Ile Tyr Tyr
245 250 255

Asn Val Asn Val Asn Glu Pro Thr Arg Pro Ser Arg Phe Phe Gly Lys
260 265 270

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

Pro Pro Ala Tyr Ile Ser Ser Val Ala Tyr Gly Arg Gln Val Tyr Leu
290 295 300

Lys Leu Ser Thr Asn Ser His Ser Thr Lys Val Lys Ala Ala Phe Asp
305 310 315 320

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

Ile Ile Lys Asn Ser Ser Phe Lys Ala Val Ile Tyr Gly Gly Ser Ala
340 345 350
Lys Asp Glu Val Gln Ile Ile Asp Gly Asn Leu Gly Asp Leu Arg Asp
355 360 365

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

Ile Ala Tyr Thr Thr Asn Phe Leu Lys Asp Asn Glu Leu Ala Val Ile
385 390 395 400

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

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

Ile Ser Trp Asp Glu Val Asn Tyr Asp Pro Glu Gly Asn Glu Ile Val
435 440 445

Gln His Lys Asn Trp Ser Glu Asn Asn Lys Ser Lys Leu Ala His Phe
450 455 460

Thr Ser Ser Ile Tyr Leu Pro Gly Asn Ala Arg Asn Ile Asn Val Tyr
465 470 475 480

Ala Lys Glu Cys Thr Gly Leu Ala Trp Glu Trp Trp Arg Thr Val Ile
485 490 495

Asp Asp Arg Asn Leu Pro Leu Val Lys Asn Arg Asn Ile Ser Ile Trp
500 505 510

Gly Thr Thr Leu Tyr Pro Lys Tyr Ser Asn Lys Val Asp Asn Pro Ile
515 520 525

Glu

ES 2 609 925 T3

<210> 47
 <211> 535
 <212> PRT
 <213> Listeria monocytogenes

5

<400> 47

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

```

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

Pro Ile Ala Gln Gln Thr Glu Ala Lys Asp Ala Ser Ala Phe Asn Lys
20      25      30
Glu Asn Ser Ile Ser Ser Val Ala Pro Pro Ala Ser Pro Pro Ala Ser
35      40      45

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

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

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

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

Ala Asp Ile Gln Val Val Asn Ala Ile Ser Ser Leu Thr Tyr Pro Gly
115     120     125

Ala Leu Val Lys Ala Asn Ser Glu Leu Val Glu Asn Gln Pro Asp Val
130     135     140

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

Met Thr Asn Gln Asp Asn Lys Ile Val Val Lys Asn Ala Thr Lys Ser
165     170     175

Asn Val Asn Asn Ala Val Asn Thr Leu Val Glu Arg Trp Asn Glu Lys
180     185     190

Tyr Ala Gln Ala Tyr Ser Asn Val Ser Ala Lys Ile Asp Tyr Asp Asp
195     200     205

Glu Met Ala Tyr Ser Glu Ser Gln Leu Ile Ala Lys Phe Gly Thr Ala
210     215     220

Phe Lys Ala Val Asn Asn Ser Leu Asn Val Asn Phe Gly Ala Ile Ser
225     230     235     240

Glu Gly Lys Met Gln Glu Glu Val Ile Ser Phe Lys Gln Ile Tyr Tyr
245     250     255

Asn Val Asn Val Asn Glu Pro Thr Arg Pro Ser Arg Phe Phe Gly Lys
260     265     270

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

```

ES 2 609 925 T3

	Pro	Pro	Ala	Tyr	Ile	Ser	Ser	Val	Ala	Tyr	Gly	Arg	Gln	Val	Tyr	Leu	
	290					295					300						
5	Lys	Leu	Ser	Thr	Asn	Ser	His	Ser	Thr	Lys	Val	Lys	Ala	Ala	Phe	Asp	
	305				310					315						320	
10	Ala	Ala	Val	Ser	Gly	Lys	Ser	Val	Ser	Gly	Asp	Val	Glu	Leu	Thr	Asn	
					325					330					335		
	Ile	Ile	Lys	Asn	Ser	Ser	Phe	Lys	Ala	Val	Ile	Tyr	Gly	Gly	Ser	Ala	
				340					345					350			
15	Lys	Asp	Glu	Val	Gln	Ile	Ile	Asp	Gly	Asn	Leu	Gly	Asp	Leu	Arg	Asp	
		355						360					365				
20	Ile	Leu	Lys	Lys	Gly	Ala	Thr	Phe	Asn	Arg	Glu	Thr	Pro	Gly	Val	Pro	
	370						375					380					
	Ile	Ala	Tyr	Thr	Thr	Asn	Phe	Leu	Lys	Asp	Asn	Glu	Leu	Ala	Val	Ile	
	385					390					395					400	
25	Lys	Asn	Asn	Ser	Glu	Tyr	Ile	Glu	Thr	Thr	Ser	Lys	Ala	Tyr	Thr	Asp	
				405					410						415		
30	Gly	Lys	Ile	Asn	Ile	Asp	His	Ser	Gly	Gly	Tyr	Val	Ala	Gln	Phe	Asn	
				420					425					430			
	Ile	Ser	Trp	Asp	Glu	Val	Asn	Tyr	Asp	Pro	Glu	Gly	Asn	Glu	Ile	Val	
		435					440						445				
35	Gln	His	Lys	Asn	Trp	Ser	Glu	Asn	Asn	Lys	Ser	Lys	Leu	Ala	His	Phe	
	450						455					460					
40	Thr	Ser	Ser	Ile	Tyr	Leu	Pro	Gly	Asn	Ala	Arg	Asn	Ile	Asn	Val	Tyr	
	465					470					475					480	
45	Ala	Lys	Glu	Cys	Thr	Gly	Leu	Ala	Trp	Glu	Trp	Trp	Arg	Thr	Val	Ile	
				485						490					495		
	Asp	Asp	Arg	Asn	Leu	Pro	Leu	Val	Lys	Asn	Arg	Asn	Ile	Ser	Ile	Trp	
				500					505					510			
50	Gly	Thr	Thr	Leu	Tyr	Pro	Lys	Tyr	Ser	Asn	Lys	Val	Asp	Asn	Pro	Ile	
		515						520					525				
55	Glu	His	His	His	His	His	His										
	530					535											

<210> 48

<211> 1551

60 <212> ADN

<213> Listeria monocytogenes

<400> 48

65

ES 2 609 925 T3

	catatgaagg atgcatctgc attcaataaa gaaaattcaa tttcatccgt ggcaccacca	60
	gcatctccgc ctgcaagtcc taagacgcca atcgaaaaga aacacgcgga tgaaatcgat	120
5	aagtatatac aaggattgga ttacaataaa aacaatgtat tagtatacca cggagatgca	180
	gtgacaaatg tgccgccaag aaaaggttac aaagatggaa atgaatatat tgttgtggag	240
	aaaaagaaga aatccatcaa tcaaaataat gcagacattc aagttgtgaa tgcaatttcg	300
10	agcctaacct atccaggtgc tctcgtaaaa gcgaattcgg aattagtaga aaatcaacca	360
	gatgttctcc ctgtaaaacg tgattcatta acactcagca ttgatttgcc aggtatgact	420
	aatcaagaca ataaaatagt tgtaaaaaat gccactaaat caaacgttaa caacgcagta	480
15	aatacattag tggaaagatg gaatgaaaaa tatgctcaag cttattcaaa tgtaagtgca	540
	aaaattgatt atgatgacga aatggcttac agtgaatcac aattaattgc gaaatttggg	600
	acagcattta aagctgtaaa taatagcttg aatgtaaact tcggcgcaat cagtgaaggg	660
20	aaaatgcaag aagaagtcac tagttttaaa caaatctact ataacgtgaa tgtaaatgaa	720
	cctacaagac cttccagatt tttcggcaaa gctgttacta aagagcagtt gcaagcgctt	780
25	ggagtgaatg cagaaaatcc tcctgcatat atctcaagtg tggcgtatgg ccgtcaagtt	840
	tatttgaaat tatcaactaa ttcccatagt actaaagtaa aagctgcttt tgatgctgcc	900
	gtaagcggaa aatctgtctc aggtgatgta gaactaaca atatcatcaa aaattcttcc	960
30	ttcaaagccg taatttacgg aggttccgca aaagatgaag ttcaaatcat cgacggcaac	1020
	ctcggagact tacgcgatat tttgaaaaaa ggcgctactt ttaatcgaga aacaccagga	1080
35	gttcccattg cttatacaac aaacttccta aaagacaatg aattagctgt tattaanaac	1140
	aaactcagaat atattgaaac aacttcaaaa gcttatacag atggaaaaat taacatcgat	1200
	cactctggag gatacgttgc tcaattcaac atttcttggg atgaagtaaa ttatgatcct	1260
40	gaaggtaacg aaattgttca acataaaaaac tggagcgaaa acaataaaag caagctagct	1320
	catttcacat cgtccatcta tttgcctggg aacgcgagaa atattaatgt ttacgctaaa	1380
	gaatgcactg gtttagcttg ggaatgggtg agaacggtaa ttgatgaccg gaacttacca	1440
45	cttgtgaaaa atagaaatat ctccatctgg ggcaccacgc tttatccgaa atatagtaat	1500
	aaagtagata atccaatcga acaccaccac caccaccact aataaggatc c	1551

50 <210> 49
<211> 20
<212> ADN
<213> Artificial

55 <220>
<223> Iniciador

<400> 49
gctagctcat ttcacatcgt 20

60 <210> 50
<211> 54
<212> ADN
<213> Artificial

65 <220>

ES 2 609 925 T3

<223> Iniciador

<400> 50
tctgcagct tccaagcta aaccagtcgc tcttagcg taaacattaa tatt 54

5 <210> 51
<211> 54
<212> ADN
<213> Artificial

10 <220>
<223> Iniciador

<400> 51
15 gaagcgactg gtttagcttg ggaagctgca agaacggtaa ttgatgaccg gaac 54

<210> 52
<211> 39
<212> ADN
20 <213> Artificial

<220>
<223> Iniciador

25 <400> 52
ggatcctat tagtggtggt ggtggtggtg ttcgattgg 39

<210> 53
<211> 11
30 <212> PRT
<213> Listeria monocytogenes

<400> 53

35 Glu Ala Thr Gly Leu Ala Trp Glu Ala Ala Arg
1 5 10

<210> 54
<211> 238
40 <212> PRT
<213> Listeria monocytogenes

<400> 54

45 Gly Cys Thr Ala Gly Cys Thr Cys Ala Thr Thr Thr Cys Ala Cys Ala
1 5 10 15

Thr Cys Gly Thr Cys Cys Ala Thr Cys Thr Ala Thr Thr Thr Gly Cys
50 20 25 30

Cys Thr Gly Gly Thr Ala Ala Cys Gly Cys Gly Ala Gly Ala Ala Ala
35 40 45

55 Thr Ala Thr Thr Ala Ala Thr Gly Thr Thr Thr Ala Cys Gly Cys Thr
50 55 60

Ala Ala Ala Gly Ala Ala Gly Cys Gly Ala Cys Thr Gly Gly Thr Thr
60 65 70 75 80

Thr Ala Gly Cys Thr Thr Gly Gly Gly Ala Ala Gly Cys Thr Gly Cys
85 90 95

65

ES 2 609 925 T3

	Ala Ala Gly Ala Ala Cys Gly Gly Thr Ala Ala Thr Thr Gly Ala Thr
	100 105 110
5	Gly Ala Cys Cys Gly Gly Ala Ala Cys Thr Thr Ala Cys Cys Ala Cys
	115 120 125
10	Thr Thr Gly Thr Gly Ala Ala Ala Ala Ala Thr Ala Gly Ala Ala Ala
	130 135 140
15	Thr Ala Thr Cys Thr Cys Cys Ala Thr Cys Thr Gly Gly Gly Gly Cys
	145 150 155 160
20	Ala Cys Cys Ala Cys Gly Cys Thr Thr Thr Ala Thr Cys Cys Gly Ala
	165 170 175
25	Ala Ala Thr Ala Thr Ala Gly Thr Ala Ala Thr Ala Ala Ala Gly Thr
	180 185 190
30	Ala Gly Ala Thr Ala Ala Thr Cys Cys Ala Ala Thr Cys Gly Ala Ala
	195 200 205
35	Cys Ala Cys Cys Ala Cys Cys Ala Cys Cys Ala Cys Cys Ala Cys Cys
	210 215 220
40	Ala Cys Thr Ala Ala Thr Ala Ala Gly Gly Ala Thr Cys Cys
	225 230 235
45	<210> 55 <211> 11 <212>PRT <213> Listeria monocytogenes
50	<400>55
55	Glu Ser Leu Leu Met Trp Ile Thr Gln Cys Arg
	1 5 10
60	<210> 56 <211> 20 <212> PRT <213> Artificial
65	<220> <223> Iniciador <400> 56
70	Gly Cys Thr Ala Gly Cys Thr Cys Ala Thr Thr Thr Cys Ala Cys Ala
	1 5 10 15
75	Thr Cys Gly Thr
	20
80	<210> 57 <211> 54 <212> PRT <213> Artificial

ES 2 609 925 T3

<220>

<223> Iniciador

<400> 57

5 Thr Cys Thr Gly Cys Ala Cys Thr Gly Gly Gly Thr Gly Ala Thr Cys
1 5 10 15

10 Cys Ala Cys Ala Thr Cys Ala Gly Cys Ala Gly Gly Cys Thr Thr Thr
20 25 30

15 Cys Thr Thr Thr Ala Gly Cys Gly Thr Ala Ala Ala Cys Ala Thr Thr
35 40 45

Ala Ala Thr Ala Thr Thr
50

20 <210> 58

<211> 54

<212> PRT

<213> Artificial

25 <220>

<223> Iniciador

<400> 58

30 Gly Ala Ala Ala Gly Cys Cys Thr Gly Cys Thr Gly Ala Thr Gly Thr
1 5 10 15

35 Gly Gly Ala Thr Cys Ala Cys Cys Cys Ala Gly Thr Gly Cys Ala Gly
20 25 30

Ala Ala Cys Gly Gly Thr Ala Ala Thr Thr Gly Ala Thr Gly Ala Cys
35 40 45

40 Cys Gly Gly Ala Ala Cys
50

<210> 59

45 <211> 39

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

50 <223> Iniciador

<400> 59

55 Gly Gly Ala Thr Cys Cys Thr Thr Ala Thr Thr Ala Gly Thr Gly Gly
1 5 10 15

Thr Gly Gly Thr Gly Gly Thr Gly Gly Thr Gly Gly Thr Gly Thr Thr
20 25 30

60 Cys Gly Ala Thr Thr Gly Gly
35

65 <210> 60

<211> 238

ES 2 609 925 T3

<212> PRT

<213> *Listeria monocytogenes*

<400> 60

```

5      Gly Cys Thr Ala Gly Cys Thr Cys Ala Thr Thr Thr Cys Ala Cys Ala
      1      5      10      15

10     Thr Cys Gly Thr Cys Cys Ala Thr Cys Thr Ala Thr Thr Thr Gly Cys
      20      25      30

15     Cys Thr Gly Gly Thr Ala Ala Cys Gly Cys Gly Ala Gly Ala Ala Ala
      35      40      45

20     Thr Ala Thr Thr Ala Ala Thr Gly Thr Thr Thr Ala Cys Gly Cys Thr
      50      55      60

25     Ala Ala Ala Gly Ala Ala Ala Gly Cys Cys Thr Gly Cys Thr Gly Ala
      65      70      75      80

      Thr Gly Thr Gly Gly Ala Thr Cys Ala Cys Cys Cys Ala Gly Thr Gly
      85      90      95

30     Cys Ala Gly Ala Ala Cys Gly Gly Thr Ala Ala Thr Thr Gly Ala Thr
      100     105     110

      Gly Ala Cys Cys Gly Gly Ala Ala Cys Thr Thr Ala Cys Cys Ala Cys
      115     120     125

35     Thr Thr Gly Thr Gly Ala Ala Ala Ala Ala Thr Ala Gly Ala Ala Ala
      130     135     140

      Thr Ala Thr Cys Thr Cys Cys Ala Thr Cys Thr Gly Gly Gly Gly Cys
      145     150     155     160

40     Ala Cys Cys Ala Cys Gly Cys Thr Thr Thr Ala Thr Cys Cys Gly Ala
      165     170     175

45     Ala Ala Thr Ala Thr Ala Gly Thr Ala Ala Thr Ala Ala Ala Gly Thr
      180     185     190

      Ala Gly Ala Thr Ala Ala Thr Cys Cys Ala Ala Thr Cys Gly Ala Ala
      195     200     205

50     Cys Ala Cys Cys Ala Cys Cys Ala Cys Cys Ala Cys Cys Ala Cys Cys
      210     215     220

55     Ala Cys Thr Ala Ala Thr Ala Ala Gly Gly Ala Thr Cys Cys
      225     230     235

```

<210> 61

<211> 810

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 61

65

ES 2 609 925 T3

Gly Cys Cys Cys Ala Gly Cys Cys Gly Cys Cys Ala Thr Gly Cys Cys
 1 5 10 15
 Ala Gly Gly Thr Gly Ala Ala Gly Cys Thr Gly Cys Ala Gly Gly Ala
 20 25 30
 Gly Thr Cys Ala Gly Gly Ala Gly Gly Ala Gly Gly Cys Thr Thr Gly
 35 40 45
 Gly Thr Cys Cys Ala Gly Cys Cys Thr Gly Gly Gly Gly Gly Thr Thr
 50 55 60
 Cys Thr Cys Thr Gly Ala Gly Thr Cys Thr Cys Thr Cys Cys Thr Gly
 65 70 75 80
 Thr Gly Cys Ala Gly Cys Thr Thr Cys Thr Gly Gly Ala Thr Thr Cys
 85 90 95
 Ala Cys Cys Thr Thr Cys Ala Cys Thr Gly Ala Thr Thr Ala Cys Thr
 100 105 110
 Ala Cys Ala Thr Gly Ala Gly Cys Thr Gly Gly Gly Thr Cys Cys Gly
 115 120 125
 Cys Cys Ala Gly Cys Cys Thr Cys Cys Ala Gly Gly Gly Ala Ala Gly
 130 135 140
 Gly Cys Ala Cys Thr Thr Gly Ala Gly Thr Gly Gly Thr Thr Gly Gly
 145 150 155 160
 Cys Thr Thr Thr Gly Ala Thr Thr Ala Gly Ala Ala Ala Cys Ala Ala
 165 170 175
 Ala Gly Cys Thr Ala Ala Thr Gly Gly Thr Thr Ala Cys Ala Cys Ala
 180 185 190
 Gly Ala Gly Thr Ala Cys Ala Gly Thr Gly Cys Ala Thr Cys Thr Gly
 195 200 205
 Thr Gly Ala Ala Gly Gly Gly Thr Cys Gly Gly Thr Thr Cys Ala Cys
 210 215 220
 Cys Ala Thr Cys Thr Cys Cys Ala Gly Ala Gly Ala Thr Ala Ala Thr
 225 230 235 240
 Thr Cys Cys Cys Ala Ala Ala Gly Cys Ala Thr Cys Cys Thr Cys Thr
 245 250 255
 Ala Thr Cys Thr Thr Cys Ala Ala Ala Thr Gly Ala Ala Thr Gly Cys
 260 265 270
 Cys Cys Thr Gly Ala Gly Ala Gly Cys Thr Gly Ala Gly Gly Ala Cys
 275 280 285
 Ala Gly Thr Gly Cys Cys Ala Cys Thr Thr Ala Thr Thr Ala Cys Thr
 290 295 300
 Gly Thr Gly Cys Ala Ala Gly Ala Gly Ala Thr Cys Cys Cys Ala Ala

ES 2 609 925 T3

305		310		315		320
Thr Thr Ala Cys	Thr Thr Ala Cys Gly Ala	Thr Thr Gly Gly Thr Thr Gly Cys				
	325	330				335
Thr Ala Cys Gly	Ala Ala Gly Gly Gly Thr Ala Cys Thr Thr Thr Gly					
	340	345				350
Ala Cys Thr Ala Cys Thr Gly Gly Gly Gly Cys Cys Ala Ala Gly Gly						
	355	360				365
Gly Ala Cys Cys Ala Cys Gly Gly Thr Cys Ala Cys Cys Gly Thr Cys						
	370	375				380
Thr Cys Cys Thr Cys Ala Gly Gly Cys Gly Gly Ala Gly Gly Cys Gly						
	385	390				395
Gly Thr Thr Cys Ala Gly Gly Cys Gly Gly Ala Gly Gly Thr Gly Gly						
	405	410				415
Cys Thr Cys Thr Gly Gly Cys Gly Gly Thr Gly Gly Cys Gly Gly Ala						
	420	425				430
Thr Cys Gly Gly Ala Cys Ala Thr Thr Gly Ala Gly Cys Thr Cys Ala						
	435	440				445
Cys Cys Cys Ala Gly Thr Cys Thr Cys Cys Ala Thr Cys Cys Thr Cys						
	450	455				460
Ala Cys Thr Gly Thr Cys Thr Gly Cys Ala Thr Cys Thr Cys Thr Gly						
	465	470				475
Gly Gly Ala Gly Gly Cys Ala Ala Ala Gly Thr Cys Ala Cys Cys Ala						
	485	490				495
Thr Cys Ala Cys Thr Thr Gly Cys Ala Ala Gly Gly Cys Ala Ala Gly						
	500	505				510
Cys Cys Ala Ala Gly Ala Cys Ala Thr Thr Ala Ala Cys Ala Ala Gly						
	515	520				525
Thr Ala Thr Ala Thr Ala Gly Cys Thr Thr Gly Gly Thr Ala Cys Cys						
	530	535				540
Ala Ala Cys Ala Cys Ala Ala Gly Cys Cys Thr Gly Gly Ala Ala Ala						
	545	550				555
Ala Gly Gly Thr Cys Cys Thr Ala Gly Gly Cys Thr Gly Cys Thr Cys						
	565	570				575
Ala Thr Ala Cys Ala Thr Thr Ala Cys Ala Cys Ala Thr Cys Thr Ala						
	580	585				590
Cys Ala Thr Thr Ala Cys Ala Gly Cys Cys Ala Gly Gly Cys Ala Thr						
	595	600				605

ES 2 609 925 T3

	Cys Cys Cys Ala Thr Cys Ala Ala Gly Gly Thr Thr Cys Ala Gly Thr	
	610 615 620	
5	Gly Gly Ala Ala Gly Thr Gly Gly Gly Thr Cys Thr Gly Gly Gly Ala	
	625 630 635 640	
10	Gly Ala Gly Ala Thr Thr Ala Thr Thr Cys Cys Thr Thr Cys Ala Gly	
	645 650 655	
	Cys Ala Thr Cys Ala Gly Cys Ala Ala Cys Cys Thr Gly Gly Ala Gly	
	660 665 670	
15	Cys Cys Thr Gly Ala Ala Gly Ala Thr Ala Thr Thr Gly Cys Ala Ala	
	675 680 685	
20	Cys Thr Thr Ala Thr Thr Ala Thr Thr Gly Thr Cys Thr Ala Cys Ala	
	690 695 700	
25	Gly Thr Ala Thr Gly Ala Thr Ala Ala Thr Cys Thr Gly Thr Ala Cys	
	705 710 715 720	
	Ala Cys Gly Thr Thr Cys Gly Gly Cys Thr Cys Gly Gly Gly Gly Ala	
	725 730 735	
30	Cys Cys Ala Ala Gly Cys Thr Gly Gly Ala Ala Ala Thr Ala Ala Ala	
	740 745 750	
35	Ala Cys Gly Gly Gly Cys Gly Gly Cys Cys Gly Cys Ala Gly Ala Ala	
	755 760 765	
40	Cys Ala Ala Ala Ala Ala Cys Thr Cys Ala Thr Cys Thr Cys Ala Gly	
	770 775 780	
	Ala Ala Gly Ala Gly Gly Ala Thr Cys Thr Gly Ala Ala Thr Thr Ala	
	785 790 795 800	
45	Ala Thr Ala Ala Gly Ala Ala Thr Thr Cys	
	805 810	
50	<210> 62	
	<211> 285	
	<212> PRT	
	<213> Homo sapiens	
55	<400> 62	
	Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Ala Gly Leu Leu Leu Leu Ala	
	1 5 10 15	
60	Ala Gln Pro Ala Gln Pro Pro Cys Gln Val Lys Leu Gln Glu Ser Gly	
	20 25 30	
65	Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Ser Leu Ser Cys Ala Ala	
	35 40 45	

ES 2 609 925 T3

	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Thr	Asp	Tyr	Tyr	Met	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Pro	
	50						55					60					
5	Pro	Gly	Lys	Ala	Leu	Glu	Trp	Leu	Ala	Leu	Ile	Arg	Asn	Lys	Ala	Asn	
	65					70					75					80	
	Gly	Tyr	Thr	Glu	Tyr	Ser	Ala	Ser	Val	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	
10					85					90					95		
	Arg	Asp	Asn	Ser	Gln	Ser	Ile	Leu	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ala	Leu	Arg	
				100					105					110			
15	Ala	Glu	Asp	Ser	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Asp	Pro	Asn	Tyr	Tyr	
			115					120					125				
20	Asp	Gly	Ser	Tyr	Glu	Gly	Tyr	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	
	130						135					140					
	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	
25	145					150					155					160	
	Gly	Gly	Gly	Ser	Asp	Ile	Glu	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	
					165					170					175		
30	Ala	Ser	Leu	Gly	Gly	Lys	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Lys	Ala	Ser	Gln	Asp	
				180					185					190			
	Ile	Asn	Lys	Tyr	Ile	Ala	Trp	Tyr	Gln	His	Lys	Pro	Gly	Lys	Gly	Pro	
35			195					200					205				
	Arg	Leu	Leu	Ile	His	Tyr	Thr	Ser	Thr	Leu	Gln	Pro	Gly	Ile	Pro	Ser	
40	210						215					220					
	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Arg	Asp	Tyr	Ser	Phe	Ser	Ile	Ser	
	225					230				235						240	
	Asn	Leu	Glu	Pro	Glu	Asp	Ile	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Leu	Gln	Tyr	Asp	
45					245					250					255		
	Asn	Leu	Tyr	Thr	Phe	Gly	Ser	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	Arg	Ala	
50				260					265					270			
	Ala	Ala	Glu	Gln	Lys	Leu	Ile	Ser	Glu	Glu	Asp	Leu	Asn				
			275					280					285				

<210> 63
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> *Listeria monocytogenes*

<400> 63

ES 2 609 925 T3

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

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

REIVINDICACIONES

1. Una proteína recombinante que comprende una proteína listeriolisina O (LLO), en donde dicha proteína LLO comprende una mutación dentro del dominio de unión al colesterol (CBD) que se ubica en los residuos 483-493 de dicha proteína LLO como se expone en la sec. con núm. de ident.: 37, en donde dicha mutación consiste en una sustitución de los residuos de aminoácidos en las posiciones 484-492 como se expone en la sec. con núm. de ident.: 37 con un péptido diferente de LLO de 8-50 residuos de aminoácidos que comprenden una porción inmunogénica de un péptido antigénico, en donde dicho péptido antigénico es un antígeno E7 del virus del papiloma humano (HPV), un antígeno E6 de HPV, un antígeno NY-ESO-1, un receptor de células B (BCR), un antígeno prostático específico (PSA), antígeno de células madre prostáticas (PSCA), un antígeno de la enzima quimiotróptica del estrato córneo (SCCE), antígeno 1 del tumor de Wilms (WT-1), telomerasa transcriptasa inversa humana (hTERT), proteinasa 3, proteína 2 relacionada con tirosinasa (TRP2), antígeno de alto peso molecular asociado a melanoma (HMW-MAA), sarcoma sinovial X (SSX)-2, antígeno carcinoembrionario (CEA), MAGE-A, receptor alfa de la interleucina 13 (IL13-R alfa), anhidrasa carbónica IX (CAIX), survivina, GP100 o testisina; y en donde dicha proteína recombinante muestra una reducción de más de 100 veces en la actividad hemolítica con respecto a la LLO de tipo silvestre de la sec. con núm. de ident.: 37.
2. La proteína recombinante de conformidad con la reivindicación 1, en donde dicha proteína LLO comprende una delección de la secuencia del péptido señal de esta.
3. La proteína recombinante de conformidad con la reivindicación 1, en donde dicha proteína LLO comprende la secuencia del péptido señal de esta.
4. La proteína recombinante de conformidad con la reivindicación 1, en donde dicho antígeno E7 de HPV es un antígeno E7 de HPV-16 o un antígeno E7 de HPV-18.
5. La proteína recombinante de conformidad con la reivindicación 1, en donde dicho péptido antigénico comprende un epítipo de E7 de HPV.
6. La proteína recombinante de conformidad con la reivindicación 1, en donde dicho antígeno E6 de HPV es un antígeno E6 de HPV-16 o un antígeno E6 de HPV-18.
7. Una molécula de nucleótidos que codifica la proteína recombinante de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-6.
8. Un vector de vacuna recombinante que codifica la proteína recombinante de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-6.
9. Una cepa de *Listeria* recombinante que comprende la proteína recombinante de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-6.
10. Una composición de una vacuna que comprende la proteína recombinante de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-6, o la molécula de nucleótidos de conformidad con la reivindicación 7, y un adyuvante.
11. La composición de la vacuna de conformidad con la reivindicación 10, en donde dicho adyuvante comprende una proteína del factor estimulante de colonias de granulocitos/macrófagos (GM-CSF), una molécula de nucleótidos que codifica una proteína GM-CSF, saponina QS21, monofosforil lípido A, o un oligonucleótido que contiene CpG no metilado.
12. La proteína recombinante de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-6, o la molécula de nucleótidos de conformidad con la reivindicación 7, o el vector de vacuna recombinante de conformidad con la reivindicación 8, o la cepa de *Listeria* recombinante de conformidad con la reivindicación 9, para usar como un medicamento.
13. La proteína recombinante de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-6, o la molécula de nucleótidos de conformidad con la reivindicación 7, o el vector de vacuna recombinante de conformidad con la reivindicación 8, o la cepa de *Listeria* recombinante de conformidad con la reivindicación 9, en donde el péptido antigénico es un péptido E7 de HPV o un péptido E6 de HPV, para usar en la inducción de una respuesta inmunológica al péptido antigénico E7 de HPV o E6 de HPV en un sujeto.
14. La proteína recombinante de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-6, o la molécula de nucleótidos de conformidad con la reivindicación 7, o el vector de vacuna recombinante de conformidad con la reivindicación 8, o la cepa de *Listeria* recombinante de conformidad con la reivindicación 9, en donde el péptido antigénico es un péptido E7 de HPV, para usar en el tratamiento, inhibición, supresión, inducción de

la regresión, reducción de la incidencia de un tumor que expresa E7 de HPV, o la protección contra este, en un sujeto.

15. La proteína recombinante, molécula de nucleótidos, vector de vacuna recombinante o cepa de *Listeria* recombinante para usar de conformidad con la reivindicación 14, en donde el tumor que expresa E7 de HPV es un tumor cervical o un tumor de cabeza y cuello.

16. La proteína recombinante de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-3, o la molécula de nucleótidos de conformidad con la reivindicación 7, o el vector de vacuna recombinante de conformidad con la reivindicación 8, o la cepa de *Listeria* recombinante de conformidad con la reivindicación 9, en donde el péptido antigénico es un péptido NY-ESO-1, para usar en el tratamiento, inhibición, supresión, inducción de la regresión, reducción de la incidencia de un tumor que expresa NY-ESO-1, o la protección contra este, en un sujeto.

17. La proteína recombinante, molécula de nucleótidos, vector de vacuna recombinante o cepa de *Listeria* recombinante para usar de conformidad con la reivindicación 16, en donde el tumor que expresa NY-ESO-1 es melanoma ovárico o cáncer de pulmón.

18. La proteína recombinante de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-3, o la molécula de nucleótidos de conformidad con la reivindicación 7, o el vector de vacuna recombinante de conformidad con la reivindicación 8, o la cepa de *Listeria* recombinante de conformidad con la reivindicación 9, en donde el péptido antigénico es un BCR, para usar en el tratamiento, inhibición, supresión, inducción de la regresión, reducción de la incidencia de un linfoma que expresa BCR, o la protección contra este, en un sujeto.

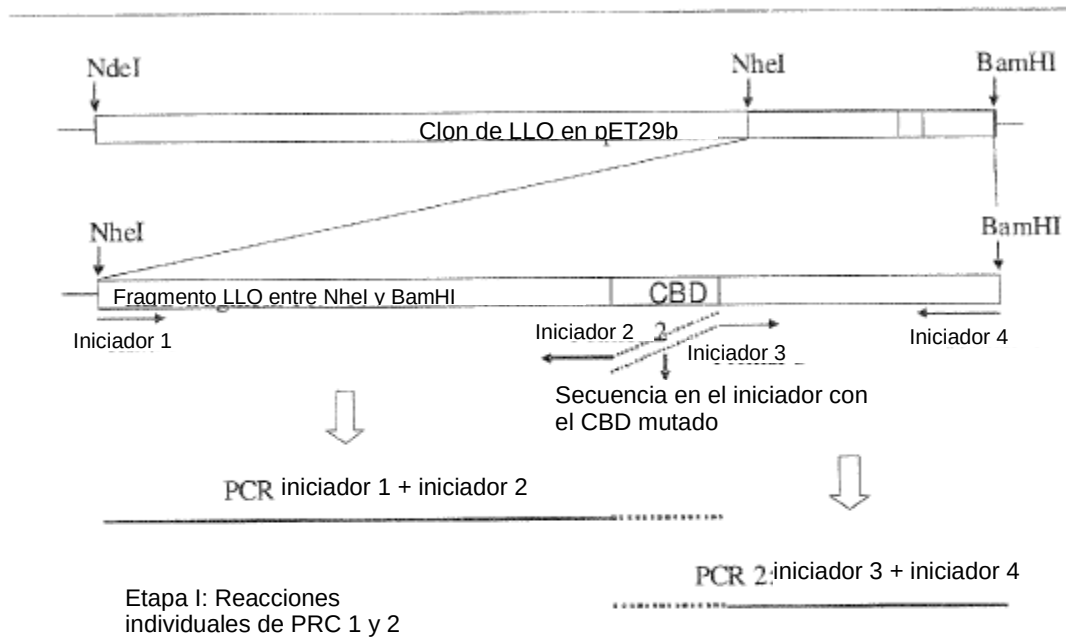
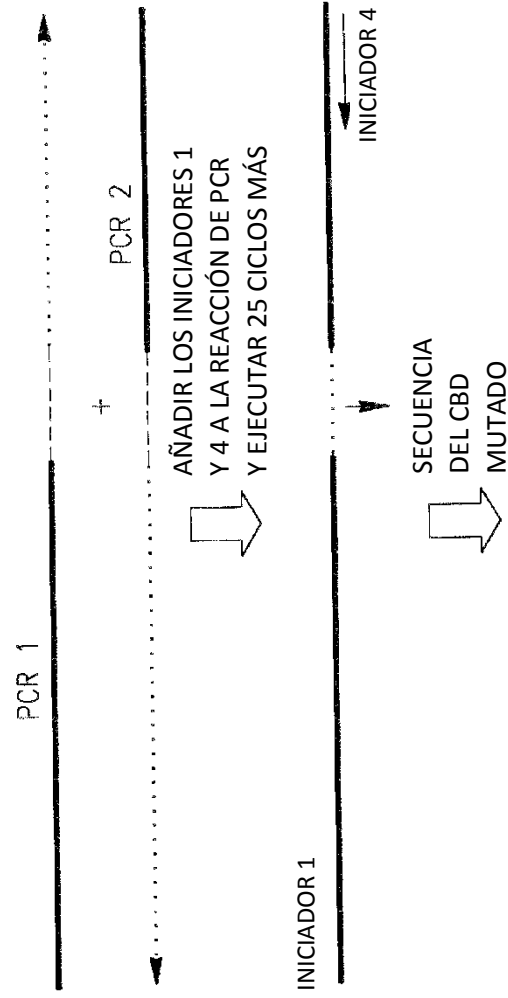


FIG. 1A

ETAPA II: MEZCLAR LOS PRODUCTOS DE LA PCR 1 Y LA PCR 2 Y PERMITIR LA HIBRIDACIÓN DE LA REGIÓN COMPLEMENTARIA (CBD MUTADO) ENTRE LOS PRODUCTOS DE LAS PCR 1 Y 2



CLONAR EL PRODUCTO DE PCR EN EL VECTOR 2.1 DE PCR (INVITROGEN)
VERIFICAR LA SECUENCIA DE LLO Y EL CBD MUTADO

FIG. 1B

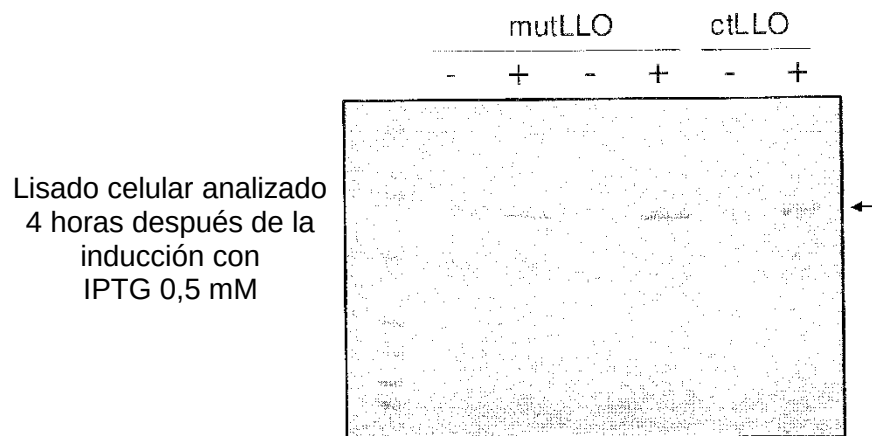
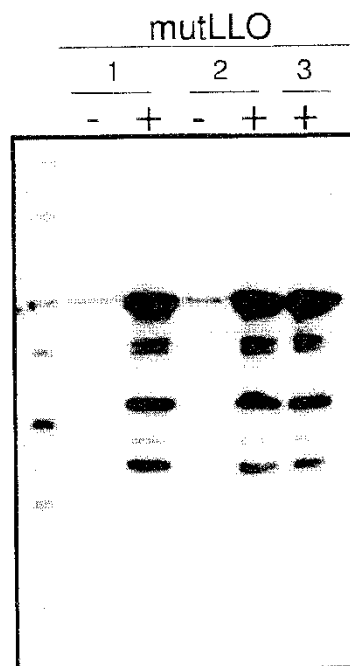


FIG. 2A



Transferencia de Western

AcM anti-LLO B3-19

FIG. 2B

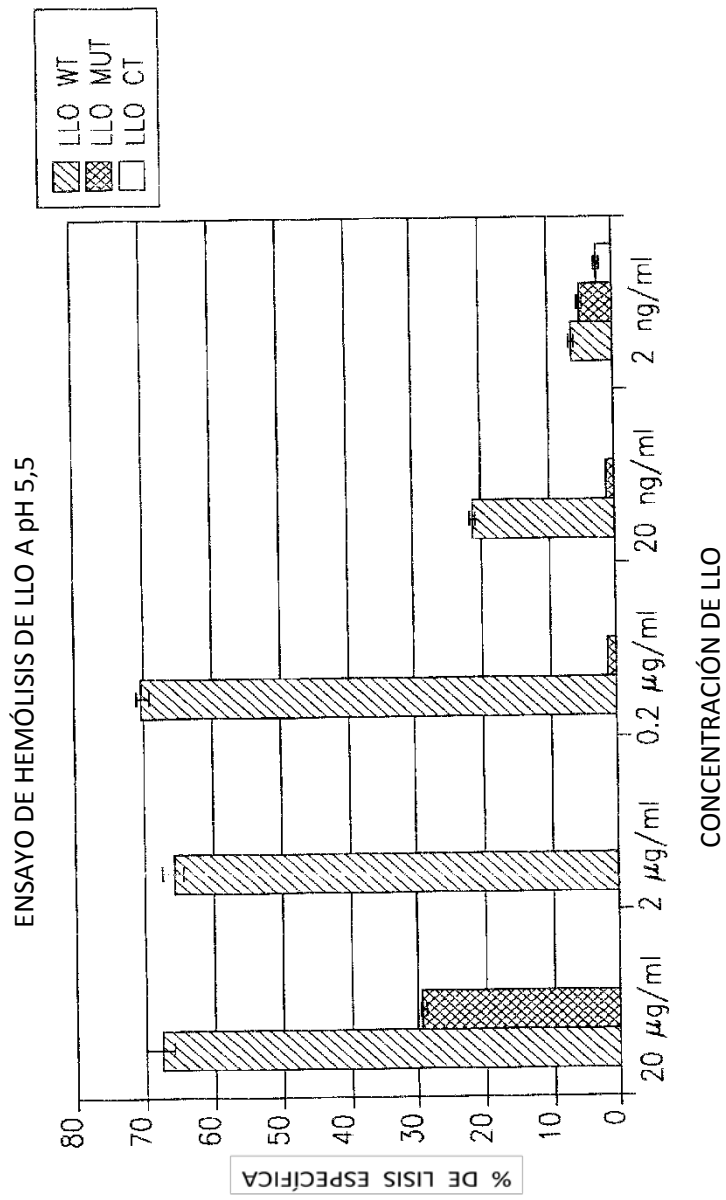


FIG. 3A

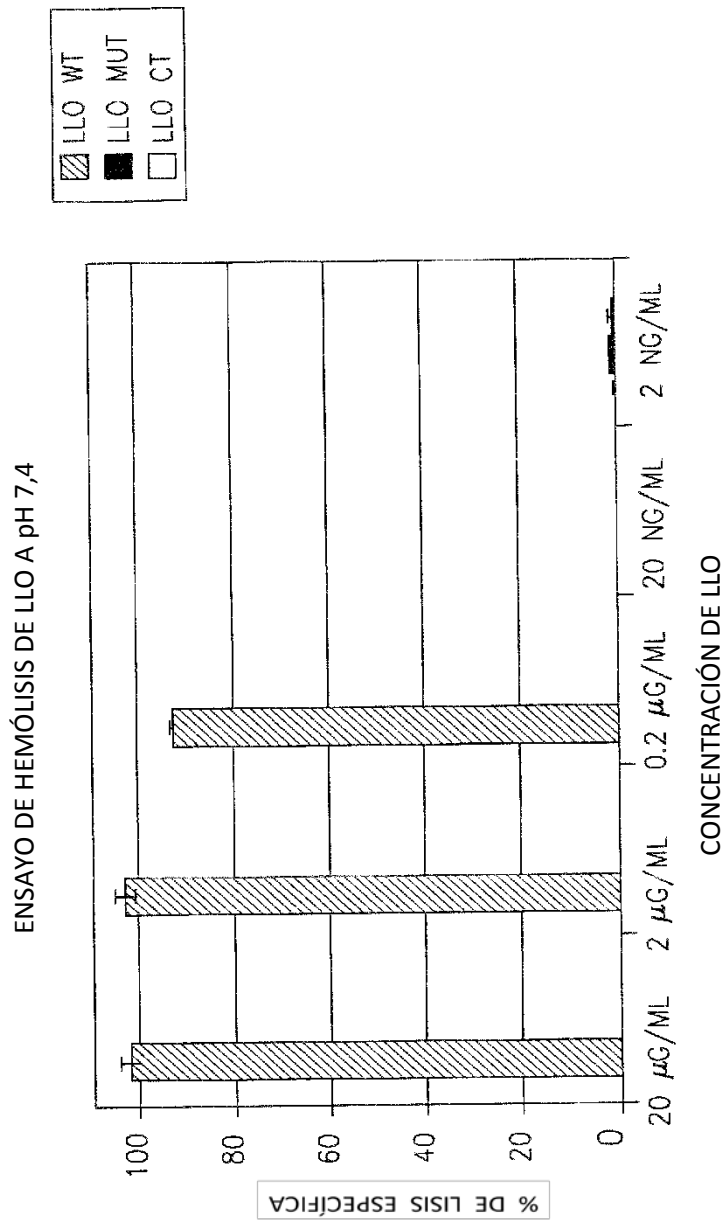


FIG. 3B

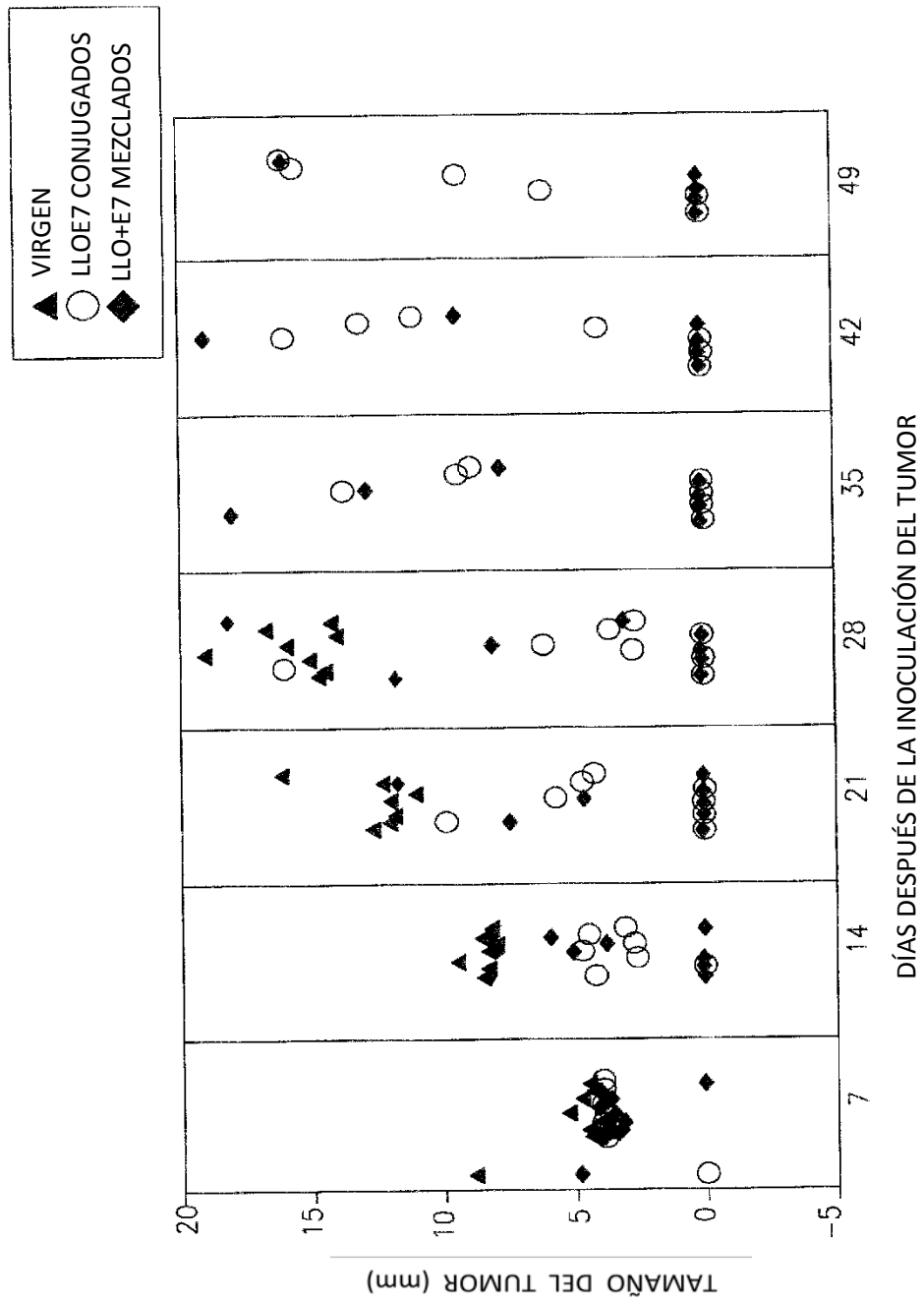
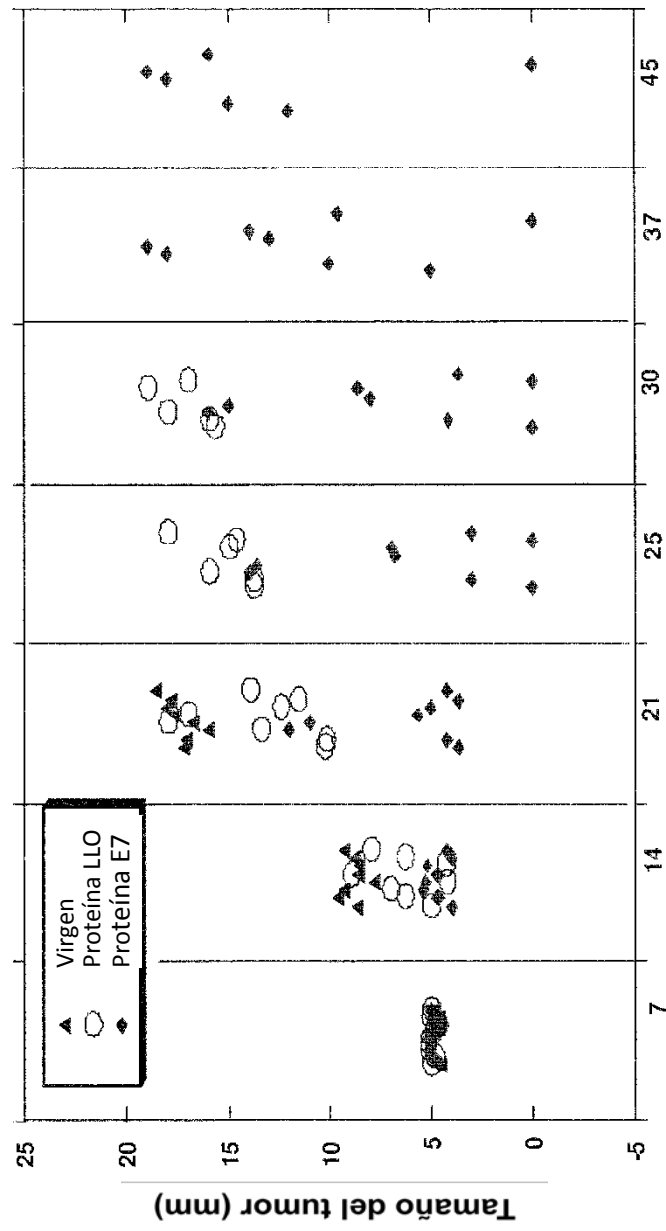


FIG. 4



Días después de la inoculación del tumor

FIG. 5

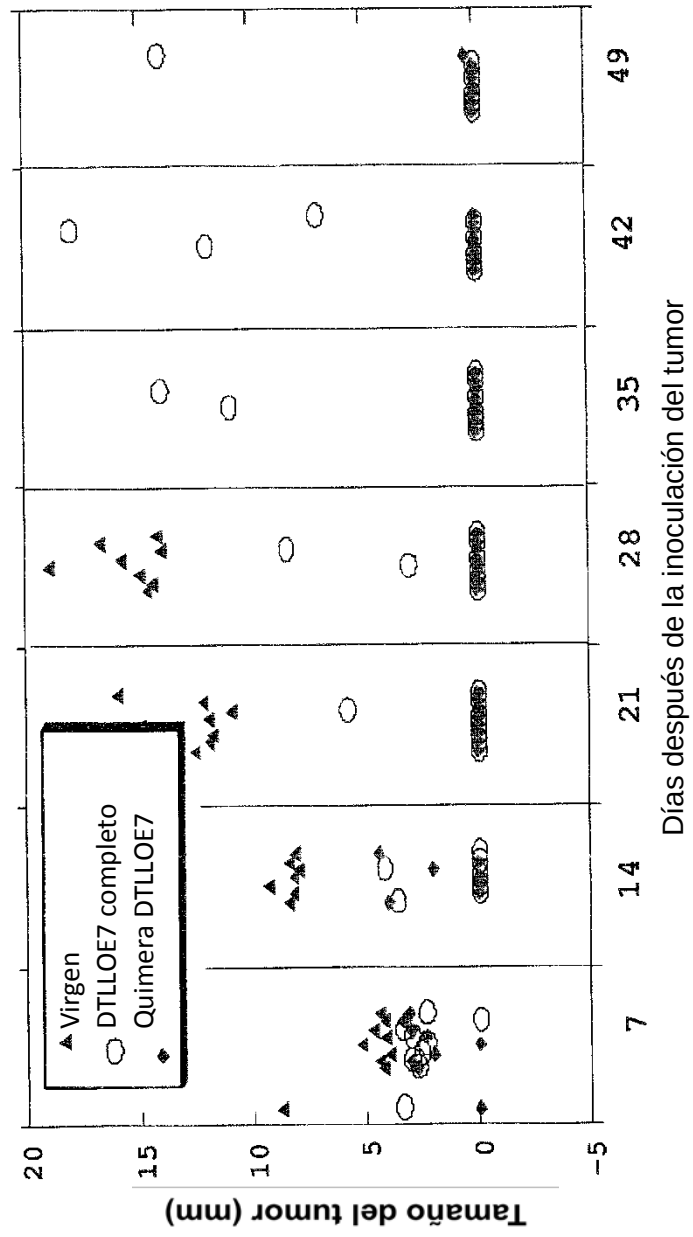


FIG. 6

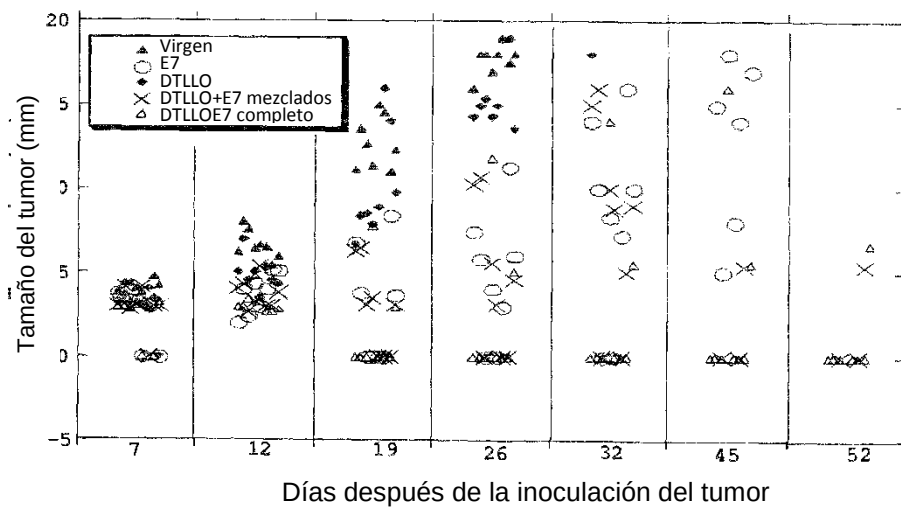


FIG. 7

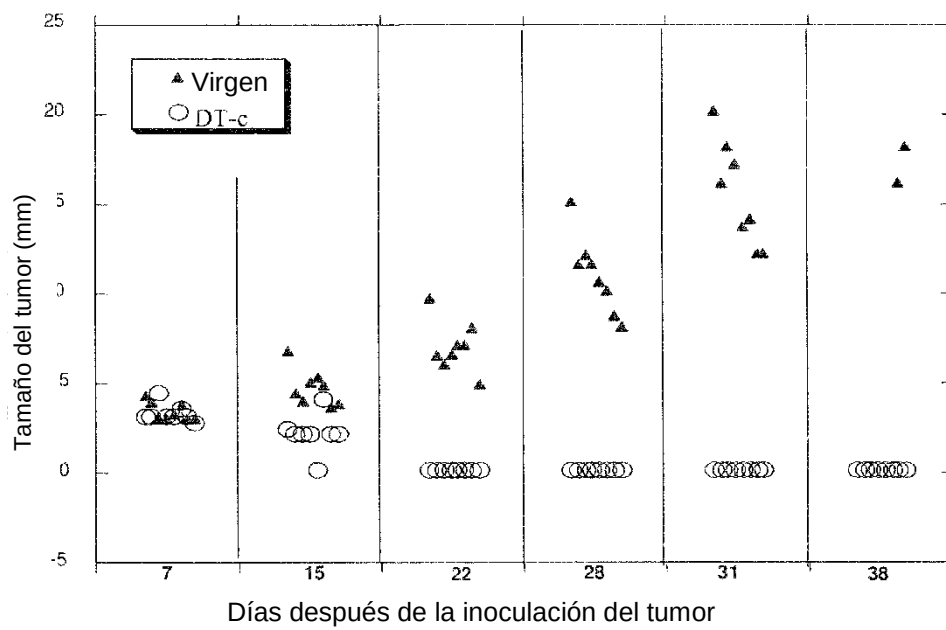


FIG. 8

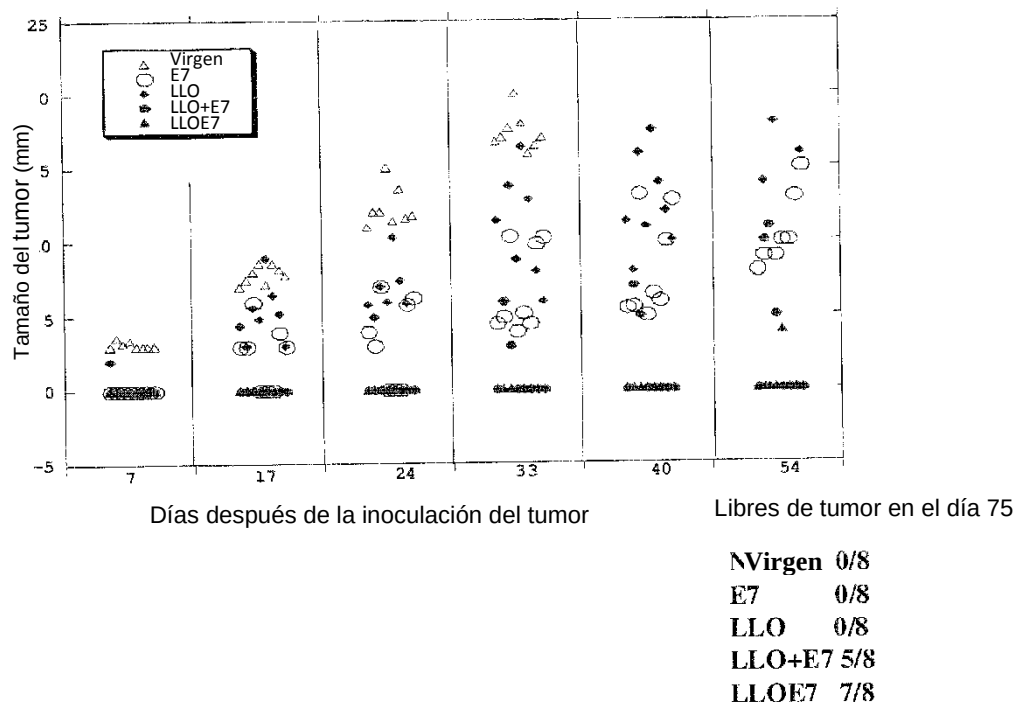


FIG. 9

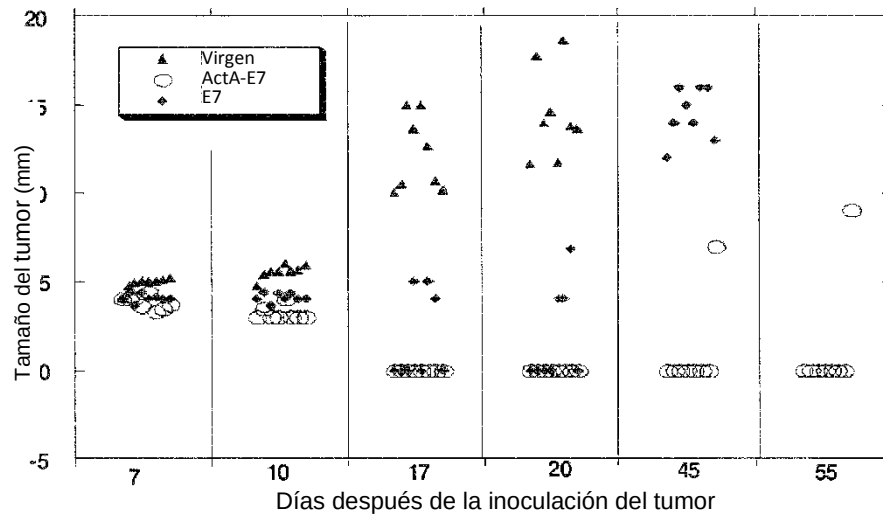


FIG. 10

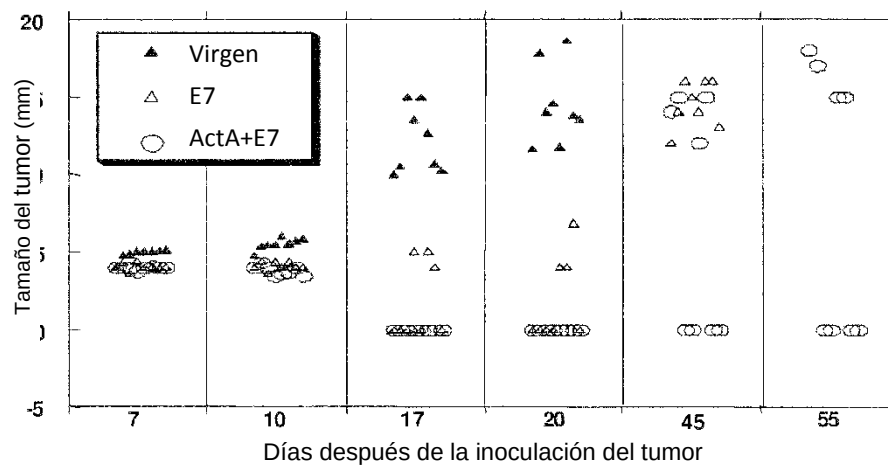


FIG. 11

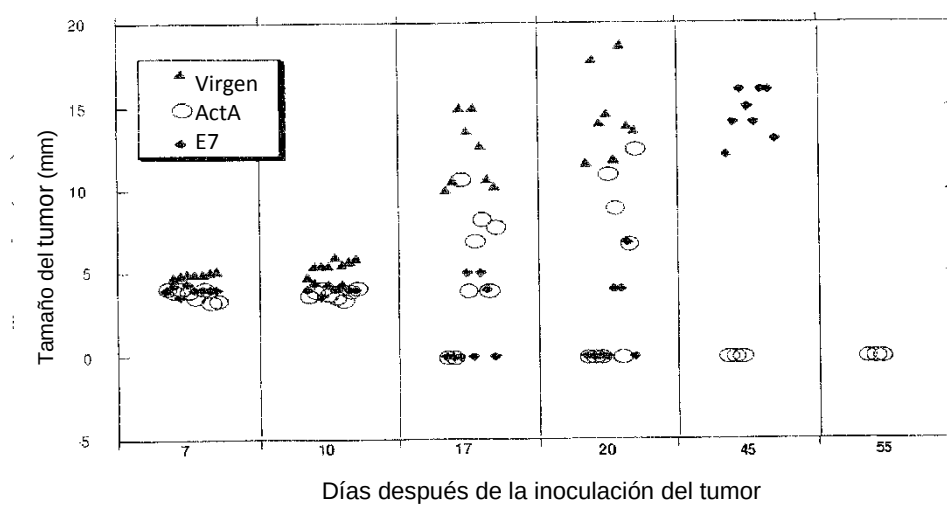


FIG. 12

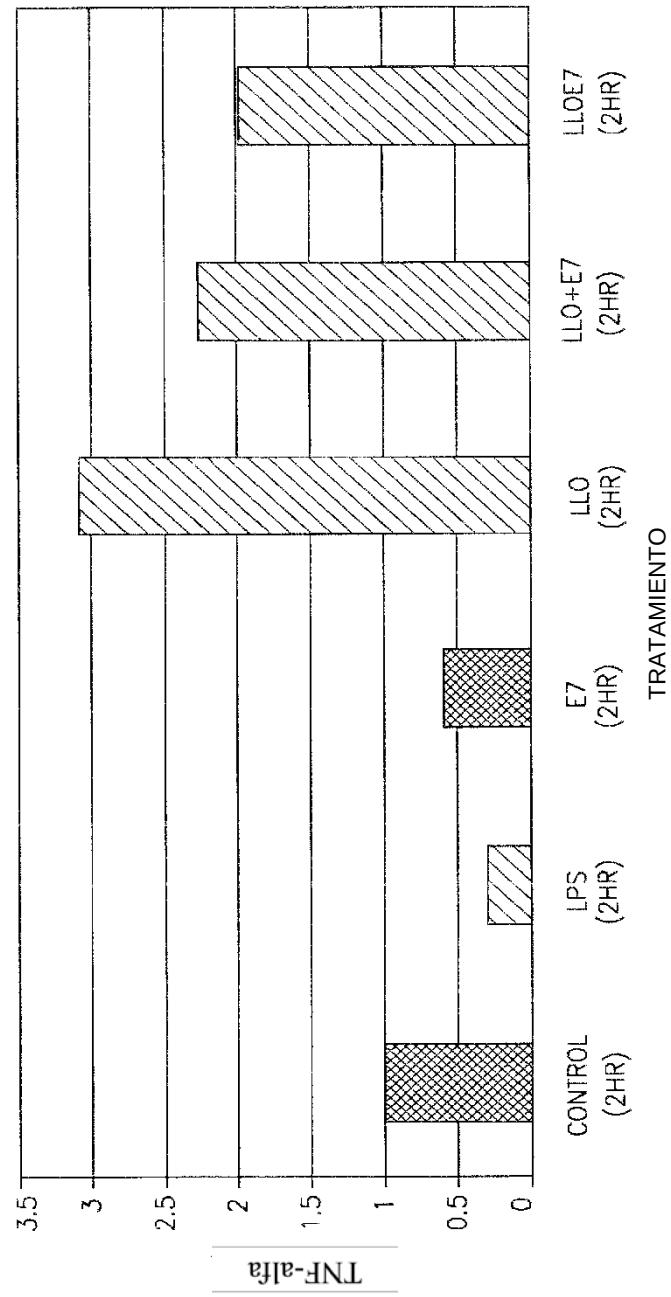


FIG. 13A

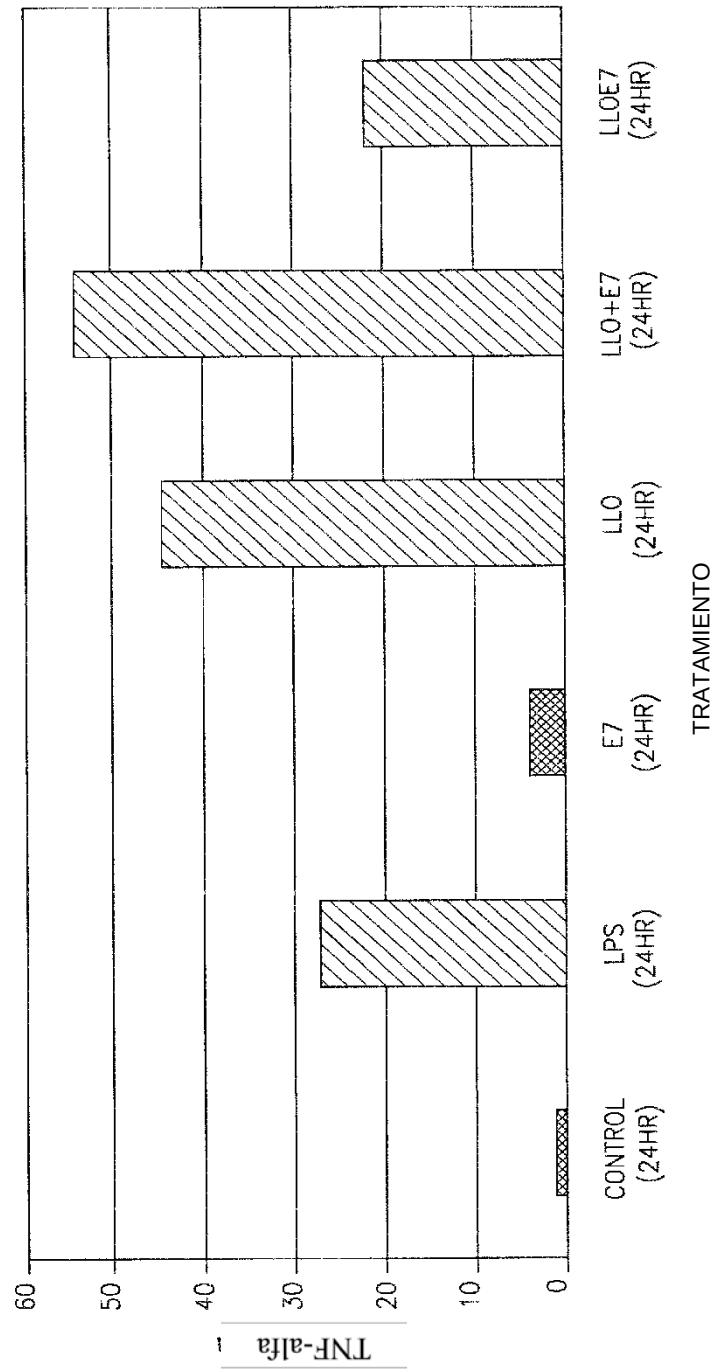


FIG. 13B

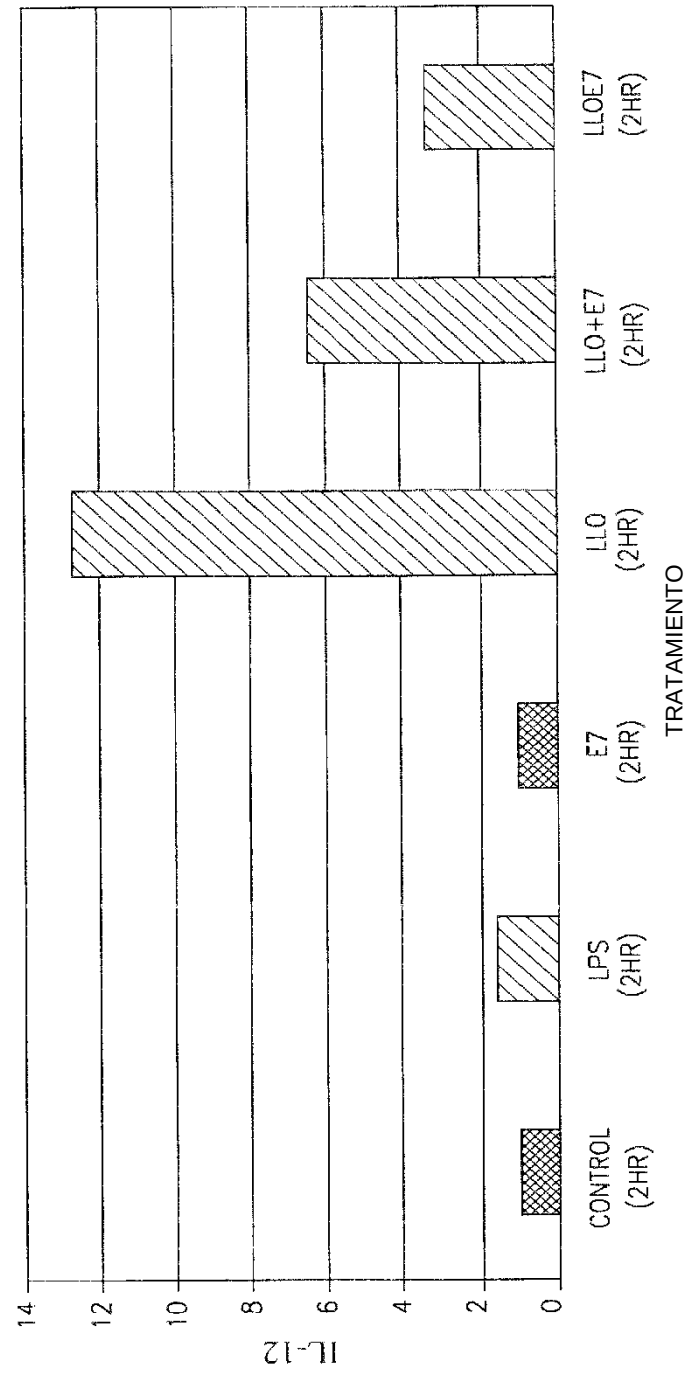
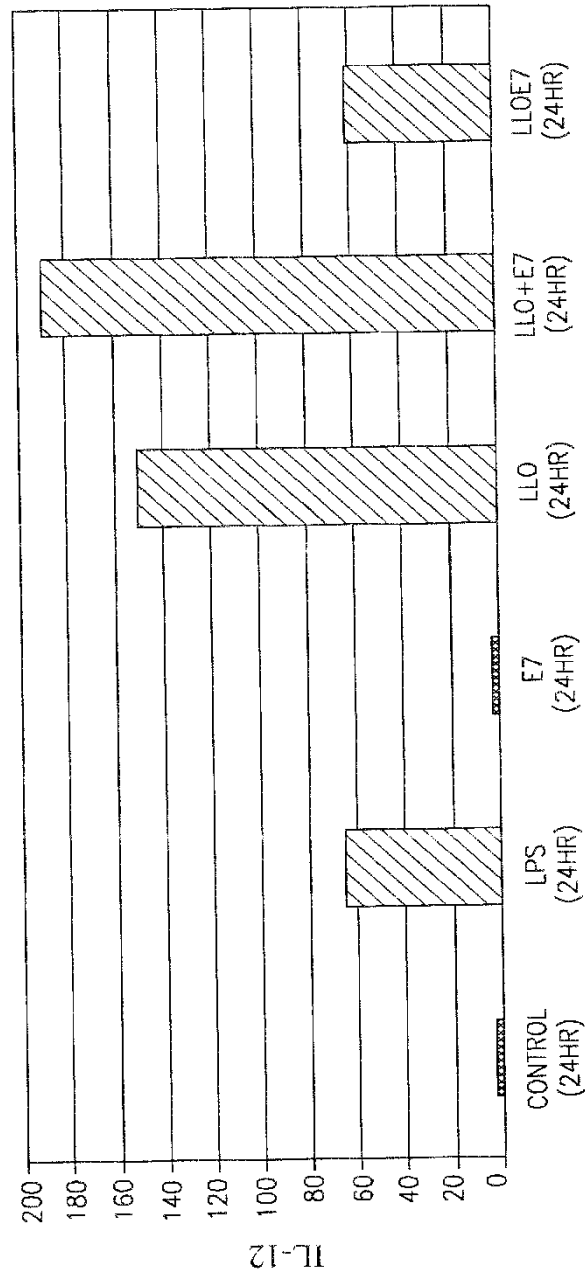


FIG. 13C



TRATAMIENTO

FIG. 13D

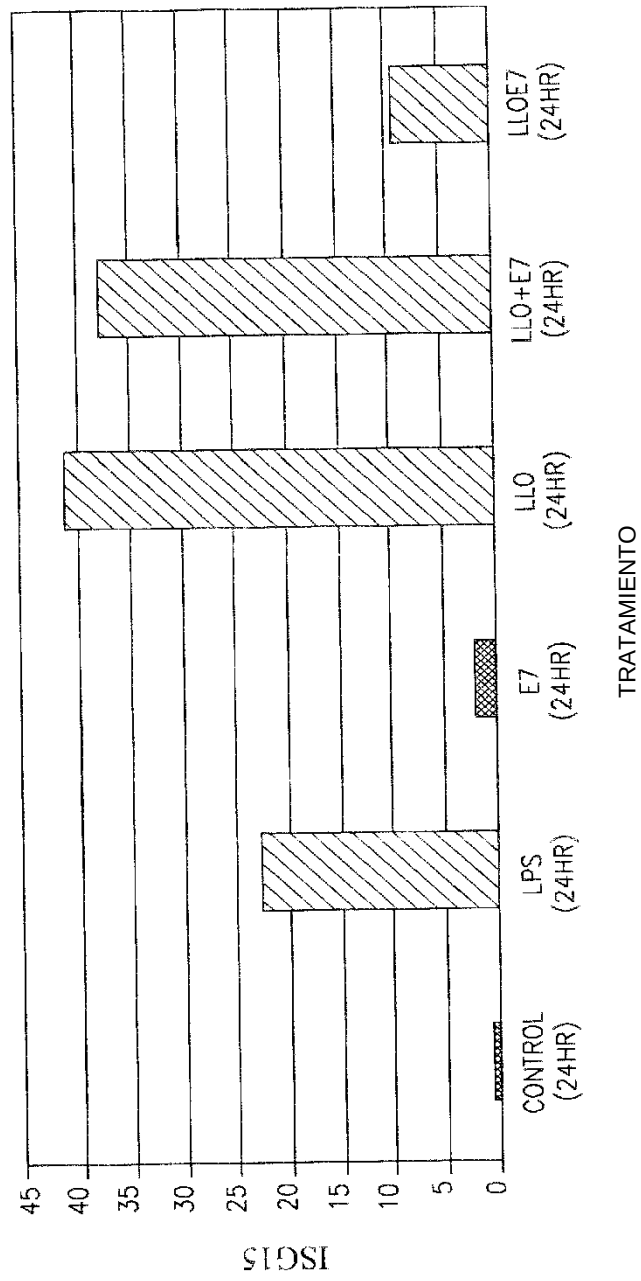
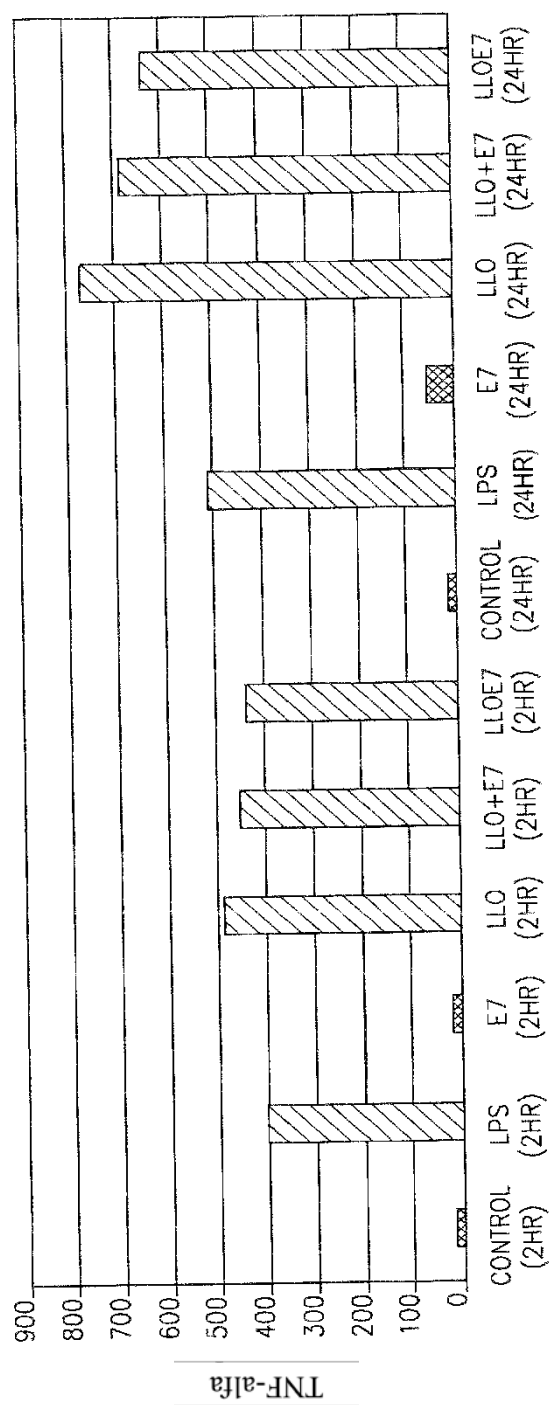


FIG. 13E



TRATAMIENTO

FIG. 14A

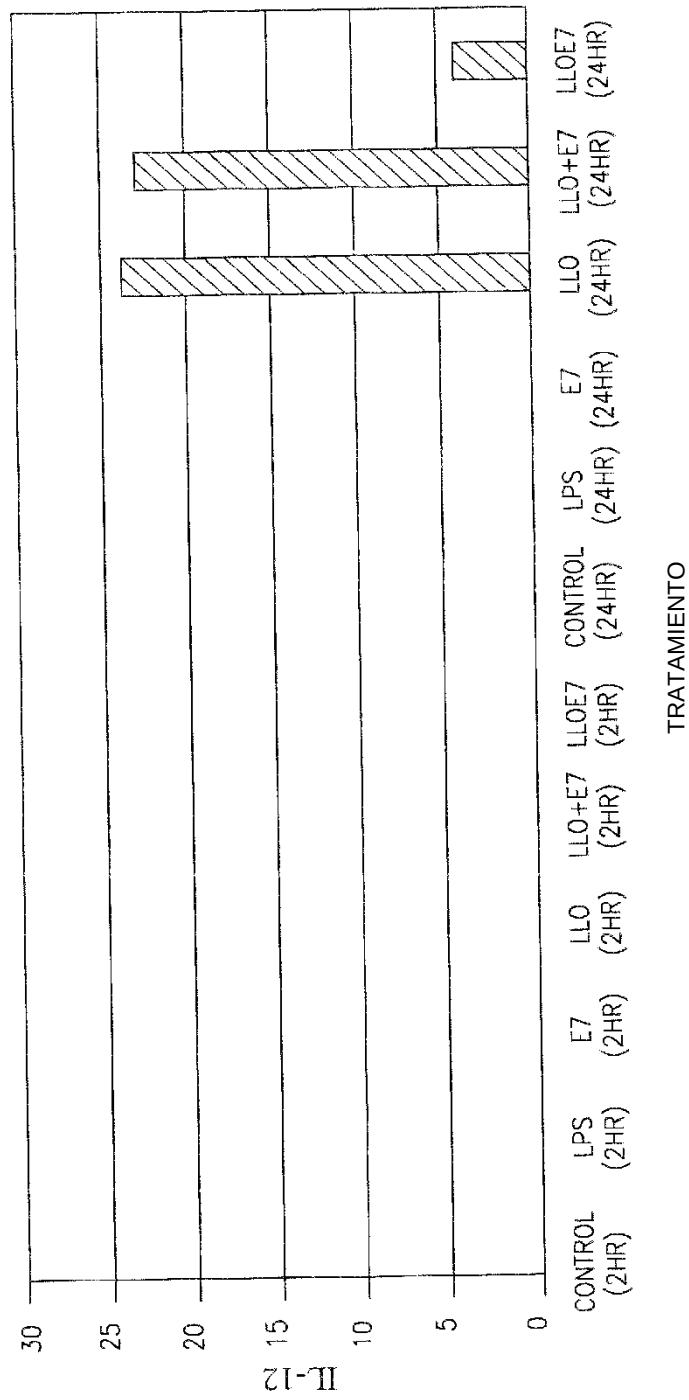


FIG. 14B

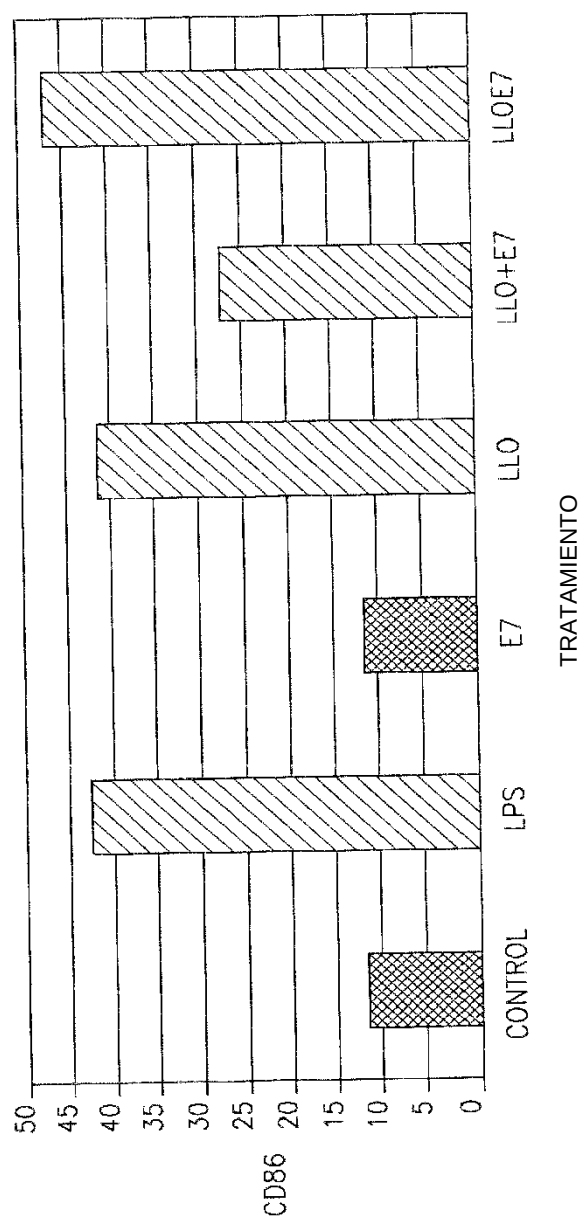


FIG. 15A

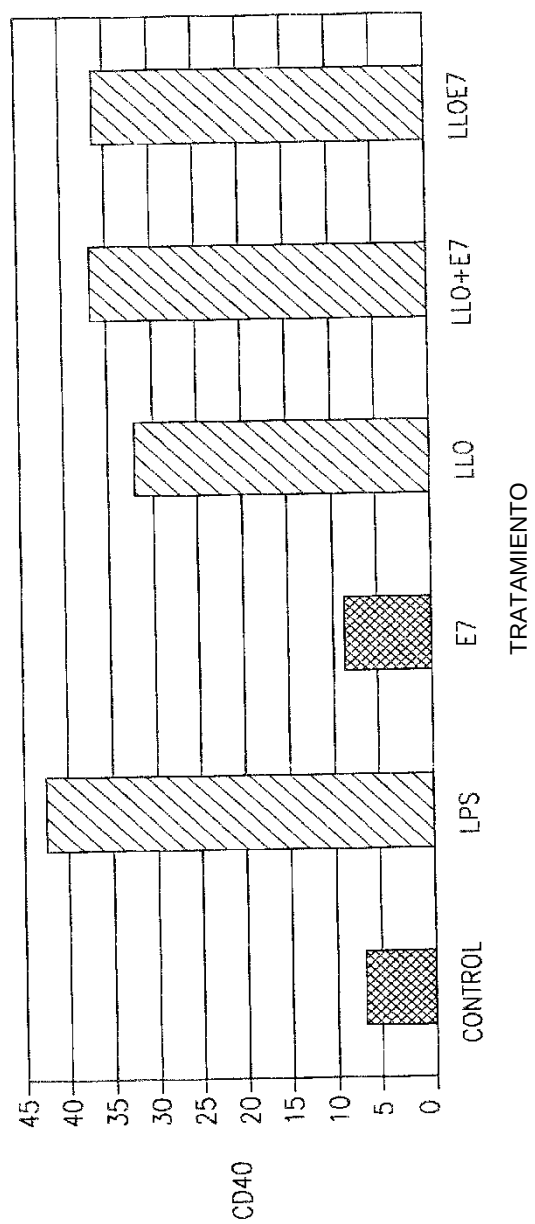


FIG. 15B

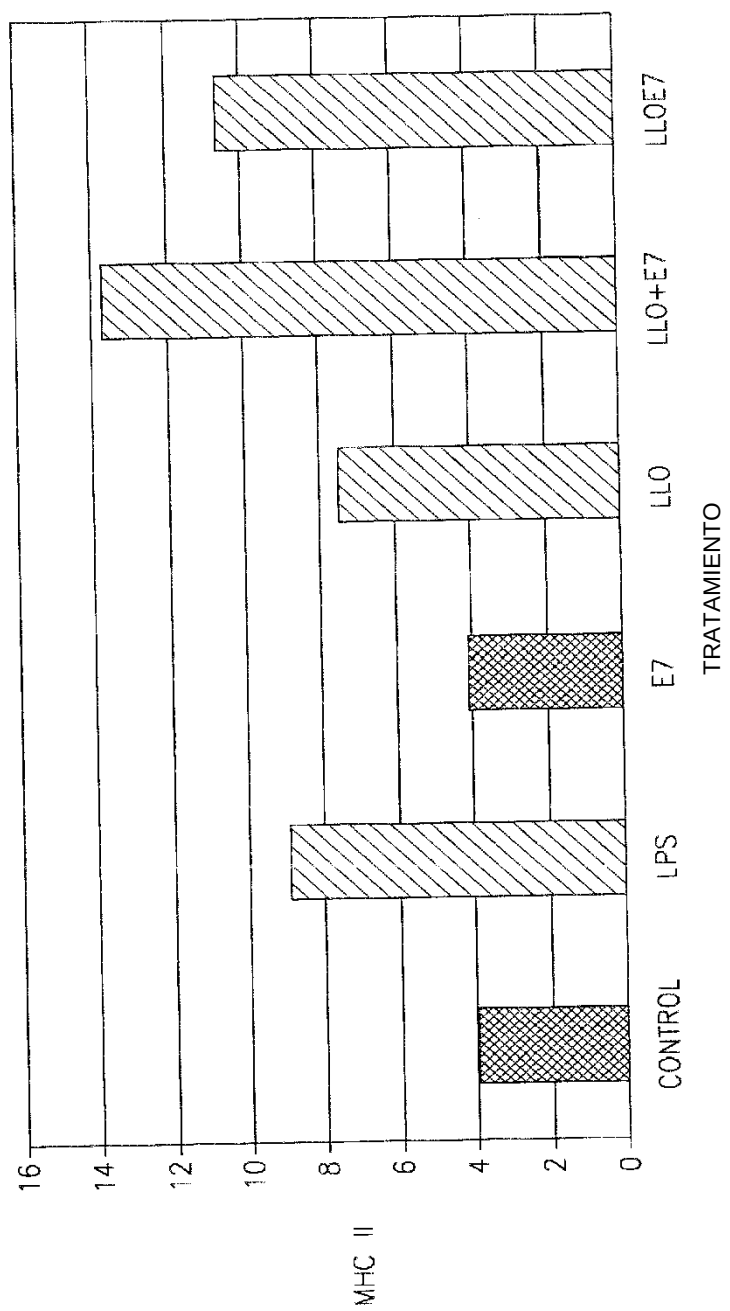


FIG. 15C

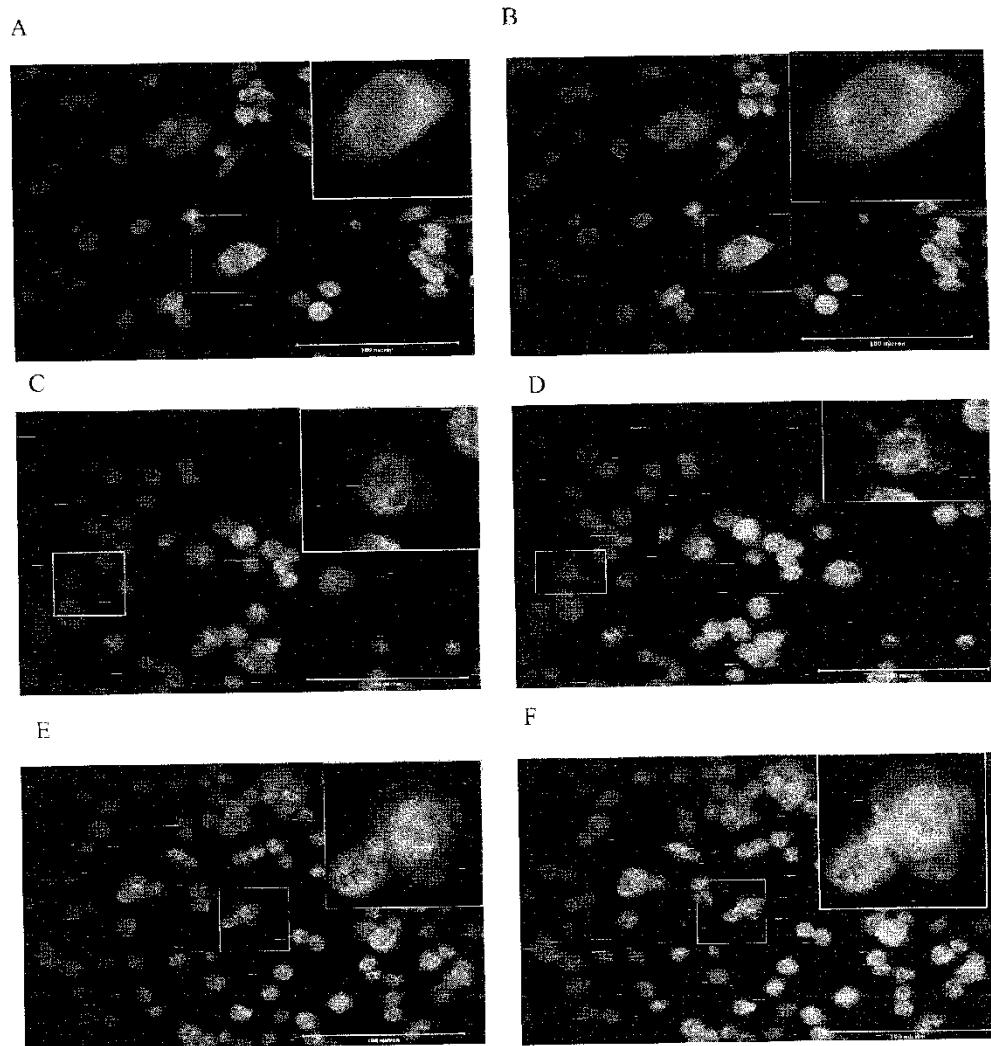


FIG. 16