

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 613 630**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/75** (2006.01)

**A61K 35/74** (2015.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.05.2011 PCT/US2011/037602**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **01.12.2011 WO2011149852**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.05.2011 E 11787200 (2)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.10.2016 EP 2576791**

54 Título: **Métodos y composiciones que utilizan Listeria para un tratamiento auxiliar del cáncer**

30 Prioridad:

**23.05.2010 US 347447 P**

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

**25.05.2017**

73 Titular/es:

**ADURO BIOTECH, INC. (100.0%)  
740 Heinz Avenue  
Berkeley, CA 94710, US**

72 Inventor/es:

**DUBENSKY, THOMAS, W.;  
BROCKSTEDT, DIRK, G.;  
LEONG, MEREDITH y  
BAHJAT, KEITH, S.**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

ES 2 613 630 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Métodos y composiciones que utilizan *Listeria* para un tratamiento auxiliar del cáncer

- 5 La presente invención reivindica la prioridad respecto de la solicitud de patente provisional de Estados Unidos 61/347.447 presentada el 23 de mayo de 2010.

## DECLARACIÓN CON RESPECTO A LA INVESTIGACIÓN PATROCINADA CON FONDOS FEDERALES

- 10 El gobierno de los EE.UU. tiene una licencia de uso pagada de esta invención y el derecho, en determinadas circunstancias, para requerir al titular de la patente que la licencie a terceros en términos razonables según lo estipulado en la beca del National Cancer Institute con número NHI 1 K23CA104160-01.

**Antecedentes de la invención**

- 15 Se ha considerado deseable establecer una fuerte inmunidad celular contra patógenos específicos. Las administraciones repetidas con la misma vacuna (refuerzo homólogo) han demostrado su eficacia para reforzar las repuestas humorales. Sin embargo, este enfoque es relativamente ineficaz para reforzar la inmunidad celular ya que la inmunidad anterior al vector tiende a alterar negativamente una presentación de antígeno intensa, y la generación de  
20 señales inflamatorias adecuadas. Un enfoque para evitar este problema ha sido la administración secuencial de vacunas que utilizan distintos sistemas de administración de antígenos (refuerzo heterólogo). Esta estrategia se denomina de "sensibilización-refuerzo".

- A continuación se indican ejemplos de regímenes de sensibilización-refuerzo heterólogos. Los que implican una  
25 sensibilización de ADN incluyen: una sensibilización de ADN: sensibilización de ADN/refuerzo bacteriano (*Listeria*) contra antígenos víricos (Boyer, et al. (2005) *Virology* 333:88-101); un vector de sensibilización de ADN/refuerzo bacteriano (*Bacillus*), contra un antígeno bacteriano (Ferraz, et al. (2004) *Infection Immunity* 72:6945-6950); una sensibilización de ADN/vector de refuerzo vírico, contra antígenos tumorales (Goldberg, et al. (2005) *Clin. Cancer Res.* 11:8114-8121; Smith, et al. (2005) *Int. J. Cancer* 113:259-266); una sensibilización de ADN/refuerzo vírico contra  
30 antígenos víricos (Toussaint, et al. (2005) *Vaccine* 23:5073-5081; Cebere, et al. (2006) *Vaccine* 24:417-425; Coupar, et al. (2006) *Vaccine* 24:1378-1388); una sensibilización de ADN/refuerzo de proteína contra antígenos víricos (Cristillo, et al. (2006) *Virology* 346:151-168; Rasmussen, et al. (2006) *Vaccine* 24:2324-2332); una sensibilización de ADN/refuerzo vírico, contra antígenos de un parásito (Gilbert, et al. (2006) *Vaccine* 24:4554-4561; Webster, et al. (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102:4836-4841); una sensibilización de ADN/refuerzo de proteína con auxiliar,  
35 contra antígenos tumorales (Prud'homme (2005) *J. Gene Med.* 7:3-17); una sensibilización de ADN/refuerzo vírico junto con un refuerzo de proteína, contra antígenos víricos (Stambas, et al. (2005) *Vaccine* 23:2454-2464); y una sensibilización de ADN (nanopartículas)/refuerzo de proteína, contra un antígeno vírico (Castaldello, et al. (2006) *Vaccine* 24:5655-5669).

- 40 Los regímenes de sensibilización-refuerzo heterólogos utilizan composiciones de sensibilización que no implican ADN: refuerzo con células dendríticas (DC)/refuerzo bacteriano (*Listeria*), y sensibilización de CD/refuerzo vírico, contra antígenos bacterianos (Badovinac, et al. (2005) *Nat. Med.* 11:748-756); vector de sensibilización bacteriano (*Salmonella*)/refuerzo de proteína, contra antígenos bacterianos (Vindurampulle, et al. (2004) *Vaccine* 22:3744-3750; Lasaro, et al. (2005) *Vaccine* 23:2430-2438); una sensibilización con proteína y auxiliar/refuerzo de ADN, contra  
45 antígenos víricos (Sugauchi, et al. (2006) *J. Infect. Dis.* 193:563-572; Pal, et al. (2006) *Virology* 348:341-353); una sensibilización con proteína/vector bacteriano (*Salmonella*), contra antígenos víricos (Liu, et al. (2006) *Vaccine* 24:5852-5861); una sensibilización con proteína/refuerzo con vector vírico, contra un antígeno vírico (Peacock, et al. (2004) *J. Virol.* 78:13163-13172); una sensibilización vírico/refuerzo vírico heterólogo, usando diferentes vectores víricos, contra antígenos víricos o antígenos tumorales (Ranasinghe, et al. (2006) *Vaccine* 24:5881-5895; Kaufman, et al. (2004) *J. Clin. Oncol.* 22:2122-2132; Grosenbach, et al. (2001) *Cancer Res.* 61:4497-4505). sensibilización/refuerzo  
50 heterólogo usando vesículas lipídicas, contra antígenos bacterianos (Luijckx, et al. (2006) *Vaccine* 24:1569-1577).

- Un reactivo que es útil para modular el sistema inmunitario es *Listeria* y especialmente *Listeria monocytogenes* (*L. monocytogenes*). *L. monocytogenes* tiene un tropismo natural para el hígado y el bazo y, en cierta medida, otros tejidos tales como el intestino delgado (véase, por ejemplo, Dussurget, et al. (2004) *Ann. Rev. Microbiol.* 58:587-610; Gouin, et al. (2005) *Curr. Opin. Microbiol.* 8:35-45; Cossart (2002) *Int. J. Med. Microbiol.* 291:401-409; Vazquez-Boland, et al. (2001) *Clin. Microbiol. Rev.* 14:584-640; Schluter, et al. (1999) *Immunobiol.* 201:188-195). Cuando la bacteria se encuentra en los intestinos, el paso al torrente sanguíneo está mediado por las proteínas listéricas, tales como ActA e internalina A (véanse, por ejemplo, Manohar, et al. (2001) *Infection Immunity* 69:3542-3549; Lecuit, et al. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101:6152-6157; Lecuit y Cossart (2002) *Trends Mol. Med.* 8:537-542). Una vez que la bacteria entra en una célula hospedadora, el ciclo de vida de *L. monocytogenes* implica escapar del fagolisosoma hacia el citosol. Este ciclo de vida se diferencia del de *Mycobacterium*, que permanece en el interior del fagolisosoma (véase, por ejemplo, Clemens, et al. (2002) *Infection Immunity* 70:5800-5807; Schluter, et al. (1998) *Infect. Immunity* 66:5930-5938; Gutierrez, et al. (2004) *Cell* 119:753-766). La salida de *L. monocytogenes* del fagolisosoma está mediada por las proteínas listéricas, tales como listeriolisina (LLO), PI-PLC y PC-PLC (véase Portnoy, et al. (2002) *J. Cell Biol.* 158:409-414).  
65

A diferencia del enfoque de inmunoterapia anteriormente analizado, en el que la inmunoterapia se utiliza como tratamiento primario, el tratamiento auxiliar se refiere al uso de un tratamiento secundario antes ("neoauxiliar") o después ("auxiliar") de un tratamiento primario tal como cirugía o radiación, donde el tratamiento primario está destinado a eliminar o destruir el tumor primario. A modo de ejemplo, se puede proporcionar terapia auxiliar después de la cirugía cuando se ha eliminado la enfermedad detectable, pero sigue existiendo un riesgo estadístico de recidiva debido a enfermedad oculta. El tratamiento auxiliar sistémico y la radioterapia se proporcionan frecuentemente después de la cirugía para muchos tipos de cáncer, incluidos el cáncer de colon, cáncer de pulmón, cáncer de páncreas, cáncer de mama, cáncer de próstata, y algunos cánceres ginecológicos.

Kim et al., Cancer Research (2009) vol. 69, n.º 14, páginas 5860-5866, describen que una vacuna basada en *Listeria* contra el cáncer de mama metastásico revela un modo de acción doble. El documento WO 2010/040135 describe polipéptidos recombinantes que comprenden listeriolisina fusionada a un antígeno. EL documento WO 2008/094188 describe en dicho documento regímenes de sensibilización-refuerzo y materiales usados. Hassan et al European Journal Of Cancer (2007) vol. 44, n.º 1 páginas 46-53, se refiere a inmunoterapia de cáncer dirigida a mesotelina. Le et al, Clinical Cancer Research (2007), vol. 18, n.º 3, páginas 858-868, describen una vacuna de *Listeria* viva atenuada (ANZ-100) y una vacuna de *Listeria* viva atenuada que expresa mesotelina (CRS-207) para cánceres avanzados. El documento US 2007/207171 se refiere a listeria genomanipulada y métodos de uso de la misma. El documento US 6.051.237 se refiere a inmunoterapia del cáncer específica usando un vector recombinante de vacuna bacteriana.

## Sumario de la invención

La presente invención proporciona una *Listeria* atenuada, metabólicamente activa, que codifica una porción expresable inmunológicamente activa de un antígeno del cáncer para su uso en un método de tratamiento del cáncer mediante terapia auxiliar en un mamífero que padece cáncer, en el que dicho mamífero se trata con dicha *Listeria* como tratamiento auxiliar antes o después de una radioterapia administrada al mamífero para eliminar o destruir las células cancerosas que expresan el antígeno del cáncer, en el que el antígeno del cáncer es todo o parte de mesotelina. La invención se define en las reivindicaciones adjuntas.

Se describen en el presente documento estrategias de tratamiento auxiliar que utilizan bacterias de *Listeria* para el tratamiento secundario del cáncer. Antes o después de que el sujeto haya recibido uno o más tratamientos primarios, se administra una dosis eficaz de una vacuna de *Listeria* que expresa un antígeno relacionado con el cáncer. Se describen en el presente documento kits que contienen la vacuna basada en *Listeria* envasada en recipientes adecuados, y puede incluir instrucciones.

Se describen en el presente documento métodos para el tratamiento auxiliar de un mamífero que padece cáncer, comprendiendo el método administrar al mamífero una cantidad eficaz de una composición que comprende una *Listeria* atenuada metabólicamente activa que codifica una porción expresable inmunológicamente activa de un antígeno del cáncer, donde la administración se proporciona como un tratamiento auxiliar antes o después de un tratamiento primario administrado al mamífero para eliminar o destruir las células cancerosas que expresan el antígeno del cáncer.

Tal como se ha indicado anteriormente, las composiciones descritas en el presente documento se pueden proporcionar como terapia neoauxiliar; sin embargo, en realizaciones preferidas, las composiciones descritas en el presente documento se administran después de un tratamiento primario. En varias realizaciones, el tratamiento primario comprende cirugía para eliminar las células cancerosas del mamífero, radioterapia para destruir las células cancerosas del mamífero, o tanto cirugía como radioterapia.

Como la *Listeria* puede ser un organismo patógeno, y especialmente para los pacientes inmunocomprometidos, es preferible que la etapa de administración comprenda administrar la *Listeria* atenuada metabólicamente activa que codifica una porción expresable inmunológicamente activa de un antígeno del cáncer en múltiples dosis. "Atenuación" se refiere a un proceso mediante el cual una bacteria se modifica para disminuir o eliminar su patogenicidad, pero retiene su capacidad para actuar de manera profiláctica o terapéutica para la enfermedad de interés. La atenuación bacteriana se puede conseguir por diferentes mecanismos. Uno es la introducción de mutaciones en una o más rutas metabólicas, cuya función es esencial para la supervivencia y crecimiento de la bacteria in vivo para causar enfermedades. En el caso de *Listeria*, en determinadas realizaciones, la bacteria se muta para disminuir o evitar la capacidad de crecer y diseminarse intracelularmente. La *Listeria* preferida puede comprender una mutación que inactiva ActA; una mutación que inactiva InlB; o ambos. De manera más preferida, se utiliza en la presente invención una *Listeria* atenuada metabólicamente activa en la que se han eliminado ambos genes naturales ActA e InlB ( $\Delta$ actA $\Delta$ inlB). En determinadas realizaciones, el método utiliza una *Listeria* que está muerta pero metabólicamente activa ("KBMA").

Se proporcionan uno o más ácidos nucleicos que codifican cualquiera de una variedad de antígenos del cáncer para su expresión recombinante mediante las composiciones de la presente divulgación. En determinadas realizaciones, el antígeno del cáncer es todo o parte de mesotelina. Otros agentes adecuados se describen más detalladamente en el presente documento, y pueden depender del tipo de cáncer que se esté tratando y de los antígenos expresados por dicho cáncer. En varias realizaciones, el cáncer tratado se selecciona entre el grupo que consiste en cáncer

pancreático, cáncer de pulmón no microcítico, cáncer de ovario, y mesotelioma. No se pretende que esta lista sea limitante.

5 Además del tratamiento primario, que es preferentemente cirugía o radioterapia, como se describe, las composiciones de la presente divulgación se pueden administrar como parte de un régimen de sensibilización-refuerzo. Por ejemplo, antes de la administración de las composiciones de *Listeria* de la presente invención, el mamífero puede haber recibido anteriormente células procedentes de una línea celular humana que expresan el antígeno del cáncer de interés, en el que dichas células se han modificado de forma recombinante para producir y secretar el factor estimulante de colonias de macrófagos, y en el que dichas células se han modificado mediante radiación para evitar que las células se dividan (es decir, vacuna GVAX®, Cell Genesys, Inc.).

15 Se debe entender que la invención no está limitada en su aplicación a los detalles de la construcción y a las disposiciones de los componentes definidos en la siguiente descripción o ilustrados en los dibujos. La invención admite más realizaciones además de las descritas y que se llevan a la práctica y se realizan de diferentes formas. Asimismo, debe entenderse que la redacción y terminología utilizadas en el presente documento, así como en el resumen, tienen el fin de descripción, y no se deben considerar como una limitación.

20 De este modo, los expertos en la materia apreciarán que la concepción en la que se basa la presente divulgación puede utilizarse fácilmente como base para el diseño de otras estructuras, métodos y sistemas para llevar a cabo los diferentes objetivos de la presente invención. Es importante, por lo tanto, que las reivindicaciones se consideren incluyendo dichas construcciones equivalentes en la medida en que no se aparten del espíritu y alcance de la presente invención.

**Breve descripción de los dibujos**

25 La Fig. 1A es un gráfico que muestra respuestas inmunitarias celulares específicas de OVA frente a un antígeno diana (OVA) resultado de regímenes de sensibilización-refuerzo con *Listeria monocytogenes* y virus Vaccinia que expresa el antígeno. Se muestran las respuestas específicas de OVA en ratones C57BL/6 vacunados con el péptido OVA257-264 (SIINFEKL (SEQ ID NO:1)) en ensayos ICS.

30 La Fig. 1B es un gráfico que muestra respuestas inmunitarias celulares específicas de mesotelina resultantes de regímenes de sensibilización-refuerzo usando *Listeria monocytogenes* y Adenovirus que expresa el antígeno diana (mesotelina humana).

35 La Fig. 2 es un gráfico que muestra respuestas inmunitarias celulares específicas de mesotelina en ratones Balb/c resultantes de regímenes sensibilización-refuerzo con *Listeria monocytogenes*, Adenovirus y virus Vaccinia. También se ilustran regímenes de sensibilización-refuerzo.

40 La Fig. 3A es un gráfico que muestra las respuestas inmunitarias celulares específicas de mesotelina humana en ratones C57BL/6 (transgénicos HLA-A2) resultantes de regímenes de sensibilización-refuerzo usando niveles crecientes de sensibilización con Adenovirus y un nivel constante de refuerzo con *Listeria monocytogenes*. (Los esplenocitos se estimularon con la combinación peptídica de mesotelina.)

45 La Fig. 3B muestra las respuestas inmunitarias celulares específicas de mesotelina en ratones Balb/c resultantes de regímenes de sensibilización-refuerzo usando niveles crecientes de sensibilización con Adenovirus y un nivel constante de refuerzo con *Listeria monocytogenes*. (Los esplenocitos se estimularon con la combinación peptídica de mesotelina.) También se ilustran los regímenes de sensibilización-refuerzo.

50 La Fig. 4A muestra a su izquierda un gráfico que muestra las respuestas inmunitarias celulares específicas de mesotelina humana resultantes de una sensibilización con adenovirus en ratones con una inmunidad ya existente a adenovirus. También se muestra en la FIG. 4A (a la derecha) las respuestas específicas de adenovirus medidas usando el epítipo Hex3 de clase I (un epítipo específicos de específico). También se ilustran los regímenes de sensibilización-refuerzo.

55 La Fig. 4B. es un gráfico que muestra la respuesta inmunitaria celular específica de mesotelina y el título de anticuerpos neutralizantes específicos de adenovirus resultantes de una sensibilización con adenovirus y un refuerzo con *Listeria monocytogenes* en ratones con una inmunidad ya existente a Adenovirus. También se ilustran los regímenes de sensibilización-refuerzo.

60 La Fig. 5 es un gráfico que muestra la respuesta inmunitaria celular específica de AH1 resultante de una sensibilización con GVAX® (CELL GENESYS, INC.) o *Listeria monocytogenes* que codifica AH1 y un refuerzo con GVAX® (CELL GENESYS, INC.) o la *Listeria monocytogenes* que codifica AH1.

65 La Fig. 6A es un gráfico que muestra el porcentaje de respuesta específica de mesotelina<sub>131-139</sub> entre linfocitos T CD8+ resultantes de una sensibilización con células dendríticas pulsadas con el péptido 131-139 de mesotelina o Adenovirus que codifica la mesotelina humana con un refuerzo de *Listeria monocytogenes* que codifica la

mesotelina humana. La sensibilización se realiza el día 0, el refuerzo se realiza el día 8, y los esplenocitos se recogieron el día 13.

5 La Fig. 6B es un gráfico que muestra el número absoluto de linfocitos T CD8+ específicos de mesotelina<sup>131-139</sup> por bazo resultante de una sensibilización con células dendríticas pulsadas con el péptido 131-139 de mesotelina o Adenovirus que codifica la mesotelina humana y un refuerzo con *Listeria monocytogenes* que codifica la mesotelina humana. La sensibilización se realiza el día 0, el refuerzo se realiza el día 8, y los esplenocitos se recogieron el día 13.

10 La Fig. 6C es un gráfico que muestra el porcentaje de respuesta específica de mesotelina<sup>131-139</sup> entre linfocitos T CD8+ resultantes de una sensibilización con células dendríticas pulsadas con el péptido -139 de mesotelina y con un refuerzo realizado con uno de los siguientes agentes que codifican mesotelina: *Listeria monocytogenes*, Adenovirus, o virus Vaccinia.

15 La Fig. 7A es un gráfico que muestra la respuesta inmunitaria específica de mesotelina en esplenocitos de ratón donde la respuesta inmunitaria se evaluó para cada péptido en la biblioteca del péptido mesotelina de ratón. Ratonos Balb/c recibieron una sensibilización con un vector de ADN puro que codifica mesotelina de ratón, y un refuerzo con *Listeria monocytogenes* que codifica mesotelina de ratón.

20 La Fig. 7B es un gráfico que muestra la respuesta inmunitaria específica de mesotelina en esplenocitos de ratón donde la respuesta inmunitaria se evaluó para cada péptido en la biblioteca del péptido mesotelina de ratón. Ratonos Balb/c recibieron una sensibilización con un adenovirus que codifica mesotelina de ratón y un refuerzo con *Listeria monocytogenes* que codifica la mesotelina de ratón. También se ilustran los regímenes de sensibilización-refuerzo.

25 La Fig. 7C es una reproducción en semitonos de una fotografía de los pocillos que muestra los resultados de ensayos elispot donde esplenocitos obtenidos de los ratones (los resultados de estos estudios se muestran en la Fig. 7B) se expusieron al péptido mesotelina con números 278 (SEQ ID NO:2), 279 (SEQ ID NO:3), o 280 (SEQ ID NO:4).

30 La Fig. 8 es un gráfico que muestra las respuestas inmunitarias celulares específicas de OVA resultantes de regímenes de sensibilización-refuerzo con *Listeria monocytogenes* KBMA que codifica OVA como sensibilizador, y como refuerzo *Listeria monocytogenes* KBMA, virus Vaccinia, o *Listeria monocytogenes* "viva". Todos los vectores "de refuerzo" codificaban OVA.

35 La Fig. 9A muestra respuestas de linfocitos T específicas de AH- y AH1/A5 en ratones vacunados.

La Fig. 9A muestra respuestas de linfocitos T específicas de mesotelina en ratones vacunados.

40 La Fig. 9C muestra los datos de supervivencia de ratones vacunados tras un estímulo con tumor CT26.

#### Descripción detallada de la invención

45 La presente invención se refiere a materiales y métodos para suscitar una respuesta inmunitaria a un antígeno diana que no sea un antígeno de *Listeria*. El antígeno diana es, preferentemente, uno asociado con una enfermedad, de tal forma que la respuesta inmunitaria al antígeno diana proporcionará un efecto terapéutico. La presente divulgación proporciona conjuntos de vacuna para el tratamiento auxiliar del cáncer, donde la vacuna basada en *Listeria* es *Listeria* metabólicamente activa que codifica una porción inmunológicamente activa de un antígeno diana que se expresa en el hospedador al que se administra.

50 La presente invención está basada, en parte, en los hallazgos de que numerosos tratamientos primarios contra el cáncer se pueden potenciar mediante el uso auxiliar de vacunas que comprenden *Listeria monocytogenes* atenuada viva que codifica un antígeno relacionado con el cáncer como mesotelina.

55 La práctica de la presente invención empleará, salvo que se indique de otra cosa, técnicas convencionales incluidas las de biología molecular (incluyendo técnicas recombinantes), inmunología, biología celular, bioquímica, y práctica farmacéutica. Dichas técnicas se explican completamente en la bibliografía, por ejemplo, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, segunda edición, (Sam brook et al.); *Methods in Enzymology* (Academic Press, Inc.); *Current Protocols in Molecular Biology* (F.M. Ausubel y col., eds); *Current Protocols in Immunology* (John Wiley & Sons, Inc., N.Y.), *Handbook of Pharmaceutical Excipients* (Rowe et al., Eds); *Vaccines* (Plotkin y Orenstein, 2003); y *Vaccine Protocols* (*Methods in Molecular Medicine*) (Robinsin, Cranage y Hudson, 2003).

#### Definiciones

65 Las abreviaturas utilizadas para indicar una mutación en un gen, o una mutación en una bacteria que comprende el gen, son las siguientes. A modo de ejemplo, la abreviatura "*Listeria*  $\Delta$ actA" significa que una parte del gen actA, o una

parte del mismo, se ha eliminado. El símbolo delta ( $\Delta$ ) significa eliminación. Una abreviatura que incluye un superíndice con un signo menos (*Listeria actA*<sup>-</sup>) significa que el gen *actA* se ha mutado, por ejemplo, mediante delección, mutación puntual, o mutación por cambio de marco, pero sin limitarse a estos tipos de mutaciones. Los exponentes se pueden abreviar, por ejemplo, "3e7" significa  $3 \times 10^7$ .

5 Como se usa en el presente documento, incluidas las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares de palabras tales como "un", "uno", "una", "el" y "la", incluyen sus correspondientes referencias plurales salvo que el contexto dicte claramente otra cosa.

10 "Administración", tal como se aplica a un ser humano, a un mamífero, a un sujeto mamífero, a un animal, a un sujeto veterinario, a un sujeto placebo, a un sujeto de investigación, a un sujeto experimental, a una célula, a un tejido, a un órgano o a un fluido biológico, se refiere, sin limitación, al contacto de un ligando exógeno, reactivo, placebo, molécula pequeña molécula, agente farmacéutico, agente terapéutico, agente diagnóstico, o composición al sujeto, célula, tejido, órgano, o fluido biológico, y similares. "Administración" puede referirse, por ejemplo, a métodos terapéuticos, 15 profilácticos, farmacocinéticos, de investigación, placebo y experimentales. "Administración" a una célula abarca el contacto entre un reactivo y una célula, así como el contacto entre un reactivo y un fluido, donde el fluido está en contacto con la célula. "Administración" también abarca métodos *in vitro* y *ex vivo*, por ejemplo, de una célula, mediante un reactivo, composición de unión, o mediante otra célula. El resultado de una administración se puede evaluar mediante, por ejemplo, aumento del tiempo de supervivencia (por ejemplo, en un trastorno proliferativo que 20 supone una amenaza para la vida), disminución en el tamaño del tumor, disminución en el número de tumores, disminución en la metástasis desde un tejido específico, disminución en la metástasis hacia un tejido específico, disminución en el título de un agente infeccioso, y similares, en comparación con la administración de un placebo o en ausencia de administración. "Tratamiento" abarca una administración de la que se espera una eficacia. "Tratamiento" incluye administraciones preventivas (profilácticas) y terapéuticas.

25 Las "células presentadoras de antígenos" (APC) son las células que utiliza el sistema inmunitario para presentar antígenos a los linfocitos T. Las APC incluyen células dendríticas, monocitos, macrófagos, células de Kupffer de la zona marginal, microglía, células de Langerhans, linfocitos T, y linfocitos B (véase, por ejemplo, Rodríguez-Pinto y Moreno (2005) *Eur. J. Immunol.* 35:1097-1105). Las células dendríticas se producen en al menos dos linajes. El primer 30 linaje abarca pre-DC1, DC1 mielóide, y DC1 maduro. El segundo linaje abarca células progenitoras multipotentes tempranas CD34<sup>++</sup>CD45RA<sup>-</sup>, células CD34<sup>++</sup>CD45RA<sup>+</sup>, células pro-DC2 CD34<sup>++</sup>CD45RA<sup>++</sup>CD4<sup>+</sup> IL-3R $\alpha$ <sup>++</sup>, células pre-DC2 plasmacitoides CD4<sup>+</sup>CD11c<sup>-</sup>, DC2 linfoides humanas derivadas de DC2 plasmacitoides, y DC2 maduras (véase, por ejemplo, Gilliet y Liu (2002) *J. Exp. Med.* 195:695-704; Bauer, et al. (2001) *J. Immunol.* 166:5000-5007; Arpinati, et al. (2000) *Blood* 95:2484-2490; Kadowaki, et al. (2001) *J. Exp. Med.* 194:863-869; Liu (2002) *Human Immunology* 63:1067-1071; McKenna, et al. (2005) *J. Virol.* 79:17-27; O'Neill, et al. (2004) *Blood* 104:2235-2246; Rossi y Young (2005) *J. Immunol.* 175:1373-1381; Banchereau y Palucka (2005) *Nat. Rev. Immunol.* 5:296-306).

"Atenuación" y "atenuado" abarcan una bacteria, virus, parásito, organismos infecciosos, célula tumoral, gen en el organismo infeccioso, y similares, que se modifica para reducir la toxicidad de un hospedador. El hospedador puede 40 ser un hospedador humano o animal, o un órgano, tejido, o célula. La bacteria, para dar un ejemplo no limitativo, se puede atenuar para reducir su unión a una célula hospedadora, para reducir la diseminación desde una célula hospedadora a otra célula hospedadora, para reducir el crecimiento extracelular, o para reducir el crecimiento intracelular en una célula hospedadora. La atenuación se puede evaluar por la medida, por ejemplo, de un indicador de toxicidad, el valor DL<sub>50</sub>, la tasa de aclaramiento desde un órgano, o el índice de competición (véase, por ejemplo, 45 Auerbuch, et al. (2001) *Infect. Immunity* 69:5953-5957). En general, una atenuación da como resultado un aumento en el valor de DL<sub>50</sub> de al menos un 25 %; más generalmente de al menos un 50 %; lo más general de al menos un 100 % (2 veces); normalmente de al menos 5 veces; más normalmente en al menos 10 veces; lo más normalmente en al menos 50 veces; frecuentemente en al menos 100 veces; más frecuentemente en al menos 500 veces; y lo más frecuentemente en al menos 1000 veces; normalmente en al menos 5000 veces; más normalmente en al menos 50 10.000 veces; y lo más normalmente en al menos 50.000 veces; y lo más frecuentemente en al menos 100.000 veces.

"Gen atenuado" abarca un gen que media en la toxicidad, patología, o virulencia, respecto de un hospedador, crece en el interior del hospedador, o sobrevive en el interior del hospedador, donde el gen se muta en una forma que mitiga, reduce, o elimina la toxicidad, patología, o virulencia. "Gen mutado" abarca delecciones, mutaciones puntuales, 55 mutaciones de inserción, y mutaciones con cambio de marco en las regiones reguladoras del gen, regiones de codificación del gen, regiones no de codificación del gen, o cualquier combinación de los mismos.

"Dolencia cancerosa" y "trastorno canceroso" abarca, sin implicar cualquier limitación, un cáncer, un tumor, metástasis, angiogénesis de un tumor, y trastornos precancerosos tales como displasias. Un sujeto mamífero con un 60 cáncer, tumor, dolencia precancerosa, trastorno precanceroso, o trastorno canceroso, y similares, abarca un sujeto mamífero que comprende el cáncer, trastorno precanceroso, o tumor, pero también abarca un sujeto mamífero del que se ha eliminado un tumor, donde el cáncer se ha eliminado aparentemente (por ejemplo, mediante quimioterapia o cirugía o exclusivamente por el sistema inmune del sujeto).

65 "Cantidad eficaz" tal como se usa en el tratamiento abarca, sin limitación, una cantidad que puede mejorar, invertir, mitigar, o prevenir un síntoma o signo de una dolencia médica o trastorno. Salvo que se indique otra cosa, de forma

explícita o de otra manera, una "cantidad eficaz" no está limitada a una cantidad mínima suficiente para mejorar una dolencia, o a una cantidad que dé como resultado una mejora óptima o máxima de la dolencia. "Cantidad eficaz", dentro del contexto de la administración de una sensibilización y/o refuerzo es que ocasiona una respuesta inmunitaria en el mamífero.

5 Un "fluido extracelular" abarca, por ejemplo, suero, plasma, sangre, fluido intersticial, fluido cerebroespinal, fluidos secretados, linfa, bilis, sudor, materia fecal, y orina. Un "fluido extracelular" puede comprender un coloide o una suspensión, por ejemplo, sangre completa.

10 "Crecimiento" de una bacteria Listeria es el término en la técnica de listerias que abarca el crecimiento intracelular de la bacteria Listeria, es decir, el crecimiento en el interior de un hospedador celular tal como una célula de mamífero. Aunque el crecimiento intracelular ("crecimiento") de una bacteria Listeria se puede medir mediante el microscopio óptico, microscopio de fluorescencia, o ensayos de unidades formadoras de colonias (UFC), el crecimiento no está limitado por cualquier técnica de medición. Los parámetros bioquímicos como la cantidad de un antígeno de listeria, secuencia de ácidos nucleicos de listeria, o lípidos específicos de la bacteria Listeria, se pueden utilizar para evaluar el crecimiento. Un gen que media en el crecimiento es uno que media específicamente en el crecimiento intracelular. Un gen que media específicamente en el crecimiento intracelular abarca, pero no se limita a, un gen donde la inactivación del gen reduce la tasa de crecimiento intracelular, pero no reduce de forma detectable reducir la tasa de crecimiento extracelular (por ejemplo, crecimiento en caldo), o un gen donde la inactivación del gen reduce la tasa de crecimiento intracelular en mayor medida de lo que reduce la tasa de crecimiento extracelular. Para proporcionar ejemplos no limitantes, un gen que actúa como mediador en el crecimiento intracelular es aquel cuya delección recorta el crecimiento intracelular en menos del 50 %, en menos del 40 %, en menos del 30 %, en menos del 20 %, o en menos del 10 %, el crecimiento intracelular mostrado por una Listeria de tipo natural. Para proporcionar más ejemplos no limitantes, un gen que media en el crecimiento intracelular comprende aquel cuya delección recorta el crecimiento intracelular en menos del 50 % del crecimiento intracelular de una Listeria de tipo natural, pero solamente recorta el crecimiento extracelular en aproximadamente un 95 %, 90 %, 85 %, o 80 % del descubierto para Listeria de tipo natural. En este contexto, el término "aproximadamente" se refiere a más menos un 5 %.

30 "Muerta pero metabólicamente activa" (KBMA) abarca cualquier bacteria que contiene un genoma modificado, por ejemplo, donde la modificación genómica es suficiente para evitar la formación de colonias, pero donde la modificación genómica es suficiente para evitar o desequilibrar sustancialmente el metabolismo. Una bacteria KBMA no puede formar colonias, por ejemplo, según se puede medir en agar o in vivo en una célula hospedadora. Para proporcionar un ejemplo no limitante, el genoma se puede modificar con un agente de reticulación, tal como psoraleno. Para proporcionar un ejemplo no limitante, una bacteria KBMA cuyo metabolismo no está completamente alterado es aquella cuyo genoma contiene reticulaciones solamente en las regiones intergénicas que no tienen funciones de codificación, estructurales o biológicas. Esto se diferencia de una bacteria "viva" que puede formar una colonia, aunque en algunas realizaciones la bacteria viva puede estar atenuada.

40 "Muestra" se refiere a una muestra de un ser humano, animal, placebo, o muestra en investigación, por ejemplo, una célula, tejido, órgano, fluido, gases, aerosol, suspensión acuosa, coloide, o material coagulado. "Muestra" también se refiere, por ejemplo, a una célula que comprende una muestra de fluido o tejido o una célula separada de una muestra de fluido o tejido. "Muestra" se puede referir también a una célula, tejido, órgano, o fluido que se ha extraído recientemente de un ser humano o animal, o a una célula, tejido, órgano, o un fluido que se procesa o almacena.

45 "Diseminación" de una bacteria abarca la "diseminación de una célula a otra", esto es, la transmisión de la bacteria de una primera célula hospedadora a una segunda célula hospedadora, mediada, en parte, por una vesícula. Las funciones relativas a la diseminación incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo, la formación de una cola de actina, la formación de una extensión de tipo pseudópodo, y la formación de una vacuola de doble membrana.

50 Una "cantidad eficaz" de una "dosis de sensibilizador" o "dosificación de sensibilización" se refiere a la cantidad de antígeno diana que estimula una respuesta inmunitaria que puede medirse en un sujeto mamífero en comparación con la respuesta inmunitaria en el sujeto mamífero en la ausencia de la administración del antígeno.

55 Una "vacuna", tal como se usa en el presente documento, se refiere a una composición que comprende una proteína heteróloga, o que comprende un ácido nucleico que codifica la proteína heteróloga de tal forma que, cuando la vacuna se administra a un mamífero, la proteína heteróloga se expresa en el mamífero con el fin de suscitar una respuesta inmunitaria. Una respuesta inmunitaria puede ser humoral, mediada por células, o ambos.

60 Una "vacuna sensibilizadora" tal como se usa en el presente documento, se refiere a una vacuna que comprende un agente(s) que se administra(n) al sujeto u hospedador en una cantidad eficaz para suscitar una respuesta inmunitaria a un antígeno de interés. Una vacuna sensibilizadora puede codificar el antígeno, y también puede codificar varias citoquinas estimuladoras, como GM-CSF, que actúan para reclutar y activar células presentadoras de antígeno.

65 Una "vacuna de refuerzo" tal como se usa en el presente documento se refiere a una vacuna que comprende un agente que codifica un antígeno que tiene una porción inmunológicamente activa del antígeno diana, y puede incluir el antígeno diana, ser un fragmento del mismo, y/o ser un polipéptido de fusión que contiene al menos una porción

inmunológicamente activa del antígeno diana unida a una región que normalmente no está presente en el antígeno diana. Una "cantidad eficaz" de una "dosis de refuerzo" o "dosificación de refuerzo" se refiere a la cantidad de antígeno que suscita una respuesta inmunitaria frente al antígeno diana tras su administración a un mamífero que previamente ha recibido una dosis de sensibilización del antígeno diana.

5 Un "conjunto vector" o "conjunto vacuna" tal como se usa en el presente documento comprende un vector sensibilizador o vacuna sensibilizadora y un vector de refuerzo o vacuna de refuerzo, donde cada uno de ellos codifica al menos un determinante inmunógeno compartido, un determinante inmunógeno de reacción cruzada, un antígeno compartido, proteína o péptido inmunógeno, o fragmento del mismo.

10 Un "antígeno" se refiere a una molécula que contiene uno o más epítomos (bien lineales, conformacionales o ambos) o determinantes inmunógenos que estimulan el sistema inmunitario de un hospedador, tal como el sistema inmunitario de un mamífero, para realizar una respuesta humoral y/o celular específicas de antígeno. El término se utiliza indistintamente con el término "inmunógeno". Un antígeno puede ser una proteína completa, una proteína truncada, un fragmento de una proteína o un péptido. Los antígenos pueden ser de origen natural, variantes genomanipuladas de la proteína, o se pueden optimizar según el codón para su expresión en un sujeto u hospedador mamífero concreto. En general, un epítomo de linfocitos B incluirá al menos 5 aminoácidos, pero puede ser tan pequeño como 3-4 aminoácidos. Un epítomo de linfocito T, tal como un epítomo CTL, incluirá al menos aproximadamente 7-9 aminoácidos, y un epítomo de linfocitos T auxiliares al menos aproximadamente 12-20 aminoácidos. Normalmente, un epítomo incluirá entre aproximadamente 7 y 15 aminoácidos, tales como, 9, 10, 12 o 15 aminoácidos. El término "antígeno" denota ambas subunidades antigénicas, (es decir, antígenos que son independientes y discretos de un organismo entero con el que está asociado el antígeno en la naturaleza). Los anticuerpos tales como los anticuerpos anti-idiotipo, o sus fragmentos, y los mimotopos peptídicos sintéticos, esto es, péptidos sintéticos que pueden imitar un antígeno o determinante antigénico, y también se incluyen en la definición de antígeno tal como se usa en el presente documento.

25 Para los fines de la presente divulgación, los antígenos pueden proceder de cualquiera de varios virus, bacterias, parásitos y hongos patógenos conocidos. También pueden proceder de cánceres. Además, para los fines de la presente divulgación un "antígeno" se refiere a una proteína que incluye modificaciones, tales como deleciones, adiciones y sustituciones, normalmente de tipo conservativo, en la secuencia de origen natural, siempre que la proteína mantenga la capacidad de suscitara una respuesta inmunitaria, tal como se define en el presente documento.

30 Estas modificaciones pueden ser deliberadas, tales como la mutagénesis dirigida al sitio, o pueden ser accidentales, tales como mediante mutaciones de los hospedadores que producen los antígenos. Los antígenos de la presente divulgación también se pueden optimizar según el codón por métodos conocidos en la materia para su expresión o inmunogenicidad en el hospedador. Como se usa en el presente documento, un determinante inmunógeno de "reacción cruzada" se refiere a un determinante, epítomo, o antígeno que puede suscitara una respuesta inmunitaria a

35 determinantes antigénicos relacionados, pero no idénticos, por ejemplo, un determinante de reacción cruzada para el VIH sería un antígeno capaz de suscitara una respuesta inmunitaria a dos o varios o todos los miembros del antígeno de VIH entre clados.

40 Una "respuesta inmunológica" o "respuesta inmunitaria" a un antígeno, o vector o vacuna o composición que comprende el antígeno, es el desarrollo en un sujeto mamífero de una respuesta inmunitaria humoral y/o celular a un antígeno o antígenos presentes en un conjunto de vector. Una "respuesta inmunitaria celular" es una respuesta mediada por linfocitos T y/o otros glóbulos blancos de la sangre, incluyendo sin limitación linfocitos NK y macrófagos. Los linfocitos T de la presente divulgación incluyen linfocitos T que expresan las subunidades alfa beta del receptor de linfocitos T o el receptor gamma delta de linfocitos T, y pueden ser linfocitos T tanto efectoros como supresores. "Los linfocitos T" o "células T" son linfocitos no productores de anticuerpos que constituyen una parte del brazo mediado por células del sistema inmunitario. Los linfocitos T proceden de linfocitos inmaduros que migran desde la médula ósea al timo, donde experimentan un proceso de maduración bajo la dirección de hormonas tímica. Los linfocitos T maduros se convierten en inmunocompetentes dependiendo de su capacidad para reconocer y unirse a un antígeno específico. La activación de linfocitos T inmunocompetentes se desencadena cuando un antígeno se une a los receptores de la superficie del linfocito. Se sabe que, para generar respuestas de linfocitos T, el antígeno se debe sintetizar en el interior, o introducirse en las células, y procesarse posteriormente en péptidos pequeños mediante el complejo del proteosoma, y translocarse a la ruta de secreción del retículo endoplásmico/complejo de Golgi para una eventual asociación con las proteínas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase I. Las respuestas inmunitarias celulares funcionales incluyen linfocitos T citotóxicos (CTL) específicos de antígeno. Linfocitos T específicos de antígeno, CTL, o linfocitos T citotóxicos, tal como se usa en el presente documento, se refieren a células que tienen especificidad por antígenos péptidos presentados en asociación con proteínas codificadas por el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) o antígenos leucocitarios humanos (HLA) como se denominan dichas proteínas en seres humanos. Los CTL de la presente divulgación incluyen CTL activados que se han activado mediante un antígeno específico en el contexto del MHC; y los CTL de memoria o CTL de recuerdo se refieren a linfocitos T que se han reactivado como resultado de una reexposición al antígeno, así como a un CTL con reactividad cruzada. Los CTL de la presente divulgación incluyen linfocitos T CD4+ y CD8+. Los CTL de la presente divulgación específicos activados estimulan la destrucción y/o la lisis de células del sujeto infectado con el patógeno o célula cancerosa para los que el CTL es específico mediante, entre otras cosas, la secreción de quimioquinas y citoquinas incluyendo sin limitación la proteína inflamatoria de macrófagos 1a (MIP-1a), MIP-1B, y RANTES; y la secreción de factores solubles que suprimen la patología. La inmunidad de la presente divulgación también se refiere a la respuesta específica de antígeno producida por el subconjunto de linfocitos T auxiliares de linfocitos T. Los linfocitos T auxiliares actúan para ayudar a



estimular la función, y centran la actividad de las células efectoras no específicas contra las células que expresan péptidos en asociación con moléculas MHC en su superficie. Una respuesta inmunitaria celular también se refiere a la producción de citoquinas, quimioquina y otras moléculas de ese tipo producidas por los linfocitos T activados y/o otros glóbulos blancos incluidos los derivados de linfocitos T CD4 y CD8 T y linfocitos NK. Una dosis de sensibilización, o dosis de refuerzo, o una composición o vacuna que comprende una dosis de sensibilización o una dosis de refuerzo, que suscita una respuesta inmunitaria celular puede servir para sensibilizar a un sujeto mamífero mediante la presentación del antígeno en asociación con moléculas MHC en la superficie celular. La respuesta inmunitaria mediada por células se dirige a, o cerca de, células que presentan antígenos en su superficie. Además, los linfocitos T específicos de antígeno se pueden generar para permitir la protección futura de un hospedador inmunizado. La capacidad de un antígeno concreto para estimular una respuesta inmunitaria mediada por células se puede determinar mediante numerosos ensayos conocidos en la técnica, tales como ensayos de linfoproliferación (activación linfocitaria), ensayos con linfocitos citotóxicos CTL, o sometiendo a ensayo los linfocitos T específicos del antígeno en un sujeto sensibilizado. Dichos ensayos son bien conocidos en la materia. Véase, por ejemplo, Erickson et al., J. Immunol. (1993) 151:4189-4199; Doe et al., Eur. J. Immunol. (1994) 24:2369-2376. Los métodos para medir la respuesta inmunitaria incluyen la medición de citoquinas intracelulares o la secreción de citoquinas mediante poblaciones de linfocitos T, o mediante la medición linfocitos T específicos de epítipo (por ejemplo, mediante la técnica de los tetrámeros (revisado por McMichael, A. J., y O'Callaghan, C. A., J. Exp. Med. 187(9)1367-1371, 1998; Mcheyzer-Williams, M. G., y col., Immunol. Rev. 150:5-21, 1996; Lalvani, A., y col., J. Exp. Med. 186:859-865, 1997). Una respuesta inmunológica, o respuesta inmunitaria, tal como se usa en el presente documento, abarca una respuesta que estimula la producción de CTL, y/o la producción o activación de linfocitos T auxiliares y/o una respuesta inmunitaria mediada por anticuerpos.

Una "respuesta inmunológica" o "respuesta inmunitaria" tal como se usa en el presente documento abarca al menos uno o más de los siguientes efectos: la producción de anticuerpos mediante linfocitos B; y/o la activación de linfocitos T supresores y/o linfocitos T dirigidos específicamente a un antígeno o antígenos presentes en los vectores, composición o vacuna de interés. En algunas realizaciones, la "respuesta inmunológica" o "respuesta inmunitaria" abarca la inactivación de linfocitos T supresores. Como se usa en el presente documento, una "respuesta inmunitaria potenciada mediante refuerzo" se refiere a la administración de una dosis de refuerzo mediante una vacuna que produce una respuesta inmunitaria mensurable mayor en comparación con la respuesta suscitada por una única administración de las dosis de sensibilización.

Por "farmacéuticamente aceptable" o "farmacológicamente aceptable" se entiende un material que no es indeseable desde el punto de vista biológico, u otro.

Como se usa en el presente documento, el término "kit" se refiere a componentes envasados y/o marcados para su uso con otro, aunque no necesariamente de forma simultánea. Un kit puede contener la vacuna de sensibilización y vacuna de refuerzo en recipientes separados. Un kit también puede incluir los componentes de una vacuna de sensibilización y/o una vacuna de refuerzo en recipientes separados. Un kit también puede incluir instrucciones para combinar los componentes a fin de formular una composición inmunógena adecuada para su administración a un mamífero.

Un "efecto terapéutico" es una disminución de uno o más de los síntomas asociados con una enfermedad para la cual se administra(n) la(s) vacuna(s). Un "efecto profiláctico" es una inhibición de uno o más de los síntomas asociados con la enfermedad para la cual se administra(n) la(s) vacuna(s).

Tal como se usa en el presente documento, "sujeto mamífero" u "hospedador" es cualquier miembro del subfilo *Cordados*, incluidos, sin limitación, los seres humanos y otros primates, incluidos los primates no humanos como los chimpancés y otros simios y especies de monos; animales de granja como vacas, ovejas, cerdos, cabras y caballos; mamíferos domésticos tales como perros y gatos; animales de laboratorio incluidos los roedores como ratones, ratas y cobayas. El término no denota una edad particular. Por lo tanto, se pretende que estén incluidos individuos tanto adultos como recién nacidos.

Tal como se usa en el presente documento, "terapia mediante radiación" o "radioterapia" se refiere al uso médico de radiaciones ionizantes como parte o el tratamiento del cáncer para controlar células malignas. La radioterapia se puede usar con fines curativos, auxiliares, o como tratamiento paliativo. Los tipos adecuados de radioterapia incluyen la radioterapia convencional con haces externos, la radioterapia estereotáctica (por ejemplo, Axesse, Cyberknife, Gamma Knife, Novalis, Primatom, Synergy, X-Knife, TomoTherapy o Trilogy), radioterapia de intensidad modulada, terapia con partículas (por ejemplo, terapia con protones), braquiterapia, administración de radioisótopos, etc. No se pretende que esta lista sea limitante.

Métodos para suscita una respuesta inmunitaria frente a un antígeno diana

La presente divulgación comprende métodos para suscitar una respuesta inmunitaria en un mamífero. Los antígenos diana pueden ser aquellos asociados con una patología, por ejemplo, los identificados como presentes en una célula cancerosa o agente patógeno. Después de un tratamiento del cáncer primario, se administra una vacuna que comprende una *Listeria* atenuada metabólicamente activa que codifica y expresa una porción inmunológicamente

activa del antígeno diana.

1. Antígenos diana

- 5 Se indican en la tabla ejemplos de antígenos diana que se pueden utilizar en los regímenes de tratamiento de la divulgación. El antígeno diana también puede ser un fragmento de polipéptido o un polipéptido de fusión que comprende una porción inmunológicamente activa o los antígenos citados en la tabla.

Tabla 1. Antígenos.

Antígeno	Referencia
<b>Antígenos tumorales</b>	
Mesotelina	N.º registro de GenBank NM_005823; U40434; NM_013404; BC003512 (véanse también, por ejemplo, Hassan, et al. (2004) Clin. Cancer Res. 10:3937-3942; Muminova, et al. (2004) BMC Cancer 4:19; Iacobuzio-Donahue, et al. (2003) Cancer Res. 63:8614-8622).
Proteína 1 asociada al tumor de Wilms (Wt-1), incluida la isoforma A; isoforma B; isoforma C; isoforma D.	WT-1 isoforma A (GenBank Acc. N <sup>ros</sup> NM_000378; NP_000369). WT-1 isoforma B (GenBank Acc. N <sup>ros</sup> NM_024424; NP_077742). WT-1 isoforma C (GenBank Acc. N <sup>ros</sup> NM_024425; NP_077743). WT-1 isoforma D (GenBank Acc. N <sup>ros</sup> NM_024426; NP_077744).
Enzima quimotriptica del estrato córneo (SCCE), y sus variantes.	N.º registro de GenBank NM_005046; NM_139277; AF332583. Véase también, por ejemplo, Bondurant, et al. (2005) Clin. Cancer Res. 11:3446-3454; Santin, et al. (2004) Gynecol. Oncol. 94:283-288; Shigemasa, et al. (2001) Int. J. Gynecol. Cancer 11:454-461; Sepehr, et al. (2001) Oncogene 20:7368-7374.
Proteína A relacionada con la cadena del MHC clase I (MICA); Proteína A relacionada con la cadena del MHC clase I (MICB).	Véase, por ejemplo, Groh, et al. (2005) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102:6461-6466; N.º registro de GenBank N <sup>ros</sup> NM_000247; BC_016929; AY750850; NM_005931.
Gastrina y péptidos derivados de gastrina; receptor gastrina/CCK-2 (también conocido como CCK-B).	Harris, et al. (2004) Cancer Res. 64:5624-5631; Gilliam, et al. (2004) Eur. J. Surg. Oncol. 30:536-543; Laheru y Jaffee (2005) Nature Reviews Cancer 5:459-467.
Glipicano-3 (un antígeno de, por ejemplo, carcinoma hepatocelular y melanoma).	N.º registro de GenBank NM_004484 Nakatsura, et al. (2003) Biochem. Biophys. Res. Commun. 306:16-25; Capurro, et al. (2003) Gastroenterol. 125:89-97; Nakatsura, et al. (2004) Clin. Cancer Res. 10:6612-6621).
Proteína análoga a coactosina.	Nakatsura, et al. (2002) Eur. J. Immunol. 32:826-836; Laheru y Jaffee (2005) Nature Reviews Cancer 5:459-467.
Antígeno prostático de citoblastos (PSCA).	N.º registro de GenBank AF043498; AR026974; AR302232 (véanse también, por ejemplo, Argani, et al. (2001) Cancer Res. 61:4320-4324; Christiansen, et al. (2003) Prostate 55:9-19; Fuessel, et al. (2003) 23:221-228).
Fosfatasa ácida prostática (PAP); antígeno específico de la próstata (PSA); PSM; PSMA.	Small, et al. (2000) J. Clin. Oncol. 18:3894-3903; Altwein y Luboldt (1999) Urol. Int. 63:62-71; Chan, et al. (1999) Prostate 41:99-109; Ito, et al. (2005) Cancer 103:242-250; Schmittgen, et al. (2003) Int. J. Cancer 107:323-329; Millon, et al. (1999) Eur. Urol. 36:278-285.
Antígeno epitelial seis transmembrana de la próstata (STEAP).	Véase, por ejemplo, Machlenkin, et al. (2005) Cancer Res. 65:6435-6442; N.º registro de GenBank NM_018234; NM_001008410; NM_182915; NM_024636; NM_012449; BC011802.
Antígeno 1 del tumor de carcinoma prostático (PCTA-1).	Véase, por ejemplo, Machlenkin, et al. (2005) Cancer Res. 65:6435-6442; N.º registro de GenBank L78132.
Gen 1 inductor del tumor de próstata (PTI-1).	Véase, por ejemplo, Machlenkin, et al. (2005) Cancer Res. 65:6435-6442).
Gen específico de la próstata con homología con el receptor acoplado a proteína G.	Véase, por ejemplo, Machlenkin, et al. (2005) Cancer Res. 65:6435-6442).

ES 2 613 630 T3

Prostasa (y serina proteasa regulada por antrógeno).	Véase, por ejemplo, Machlenkin, et al. (2005) Cancer Res. 65:6435-6442; N.º registro de GenBank BC096178; BC096176; BC096175
Proteinasa 3.	N.º registro de GenBank X55668.
Antígenos de cáncer de testículo, por ejemplo, NY-ESO-1; SCP-1; SSX-1; SSX-2; SSX-4; GAGE, CT7; CT8; CT10; MAGE-1; MAGE-2; MAGE-3; MAGE-4; MAGE-6; LAGE-1.	N.º registro de GenBank NM_001327 (NY-ESO-1) (véanse también, por ejemplo, Li, et al. (2005) Clin. Cancer Res. 11:1809-1814; Chen, et al. (2004) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 101(25):9363-9368; Kubuschok, et al. (2004) Int. J. Cancer. 109:568-575; Scanlan, et al. (2004) Cancer Immun. 4:1; Scanlan, et al. (2002) Cancer Res. 62:4041-4047; Scanlan, et al. (2000) Cancer Lett. 150:155-164; Dalerba, et al. (2001) Int. J. Cancer 93:85-90; Ries, et al. (2005) Int. J. Oncol. 26:817-824.
MAGE-A1; MAGE-A2; MAGE-A3; MAGE-A4; MAGE-A6; MAGE-A9; MAGE-A10; MAGE-A12; GAGE-3/6; NT-SAR-35; BAGE; CA125.	Otte, et al. (2001) Cancer Res. 61:6682-6687; Lee, et al. (2003) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100:2651-2656; Sarcevic, et al. (2003) Oncology 64:443-449; Lin, et al. (2004) Clin. Cancer Res. 10:5708-5716.
GAGE-1; GAGE-2; GAGE-3; GAGE-4; GAGE-5; GAGE-6; GAGE-7; GAGE-8; GAGE-65; GAGE-11; GAGE-13; GAGE-7B.	De Backer, et al. (1999) Cancer Res. 59:3157-3165; Scarcella, et al. (1999) Clin. Cancer Res. 5:335-341.
HIP1R; LMNA; KIAA1416; Seb4D; KNSL6; TRIP4; MBD2; HCAC5; MAGEA3.	Scanlan, et al. (2002) Cancer Res. 62:4041-4047.
Familia de genes DAM, por ejemplo, DAM-1; DAM-6.	Fleishhauer, et al. (1998) Cancer Res. 58:2969-2972.
RCAS1.	Enjoji, et al. (2004) Dig. Dis. Sci. 49:1654-1656.
RU2.	Van Den Eynde, et al. (1999) J. Exp. Med. 190:1793-1800.
CAMEL.	Slager, et al. (2004) J. Immunol. 172:5095-5102; Slager, et al. (2004) Cancer Gene Ther. 11:227-236.
Antígenos asociados con el cáncer de colon, por ejemplo, NY-CO-8; NY-CO-9; NY-CO-13; NY-CO-16; NY-CO-20; NY-CO-38;	Scanlan, et al. (2002) Cancer Res. 62:4041-4047.
NY-CO-45; NY-CO-9/HDAC5; NY-CO-41/MBD2; NY-CO-42/TRIP4; NY-CO-95/KIAA1416; KNSL6; seb4D.	
N-Acetilglucosaminiltransferasa V (GnT-V).	Dosaka-Akita, et al. (2004) Clin. Cancer Res. 10:1773-1779.
Factor de elongación 2 mutado (ELF2M).	Renkvist, et al. (2001) Cancer Immunol Immunother. 50:3-15.
HOM-MEL-40/SSX2	Neumann, et al. (2004) Int. J. Cancer 112:661-668; Scanlan, et al. (2000) Cancer Lett. 150:155-164.
BRDT.	Scanlan, et al. (2000) Cancer Lett. 150:155-164.
SAGE; HAGE.	Sasaki, et al. (2003) Eur. J. Surg. Oncol. 29:900-903.
RAGE.	Véase, por ejemplo, Li, et al. (2004) Am. J. Pathol. 164:1389-1397; Shirasawa, et al. (2004) Genes to Cells 9:165-174.

ES 2 613 630 T3

MUM-1 (melanoma ubicuo mutado); MUM-2; MUM-2 con mutación Arg-Gly; MUM-3.	Gueguen, et al. (1998) J. Immunol. 160:6188-6194; Hirose, et al. (2005) Int. J. Hematol. 81:48-57; Baurain, et al. (2000) J. Immunol. 164:6057-6066; Chiari, et al. (1999) Cancer Res. 59:5785-5792.
Proteína de fusión LDLR/FUT del antígeno del melanoma.	Wang, et al. (1999) J. Exp. Med. 189:1659-1667.
Serie NY-REN de antígenos del cáncer renal.	Scanlan, et al. (2002) Cancer Res. 62:4041-4047; Scanlan, et al. (1999) Cancer Res. 59:456-464.
Serie NY-BR de antígenos del cáncer de mama, por ejemplo, NY-BR-62; NY-BR-75; NY-BR-85; NY-BR-62; NY-BR-85.	Scanlan, et al. (2002) Cancer Res. 62:4041-4047; Scanlan, et al. (2001) Cancer Immunity 1:4.
BRCA-1; BRCA-2.	Stolier, et al. (2004) Breast J. 10:475-480; Nicoletto, et al. (2001) Cancer Treat Rev. 27:295-304.
Proteína de fusión DEK/CAN.	Von Lindern, et al. (1992) Mol. Cell. Biol. 12:1687-1697.
Ras, por ejemplo, ras de tipo natural, ras con mutaciones en el codón 12, 13, 59, o 61, por ejemplo, mutaciones G12C; G12D; G12R; G12S; G12V; G13D; A59T; Q61H. K-RAS; H-RAS; N-RAS.	N.º registro de GenBank N <sup>ros</sup> P01112; P01116; M54969; M54968; P01111; P01112; K00654. Véase también, por ejemplo, N.º registro de GenBank N <sup>ros</sup> M26261; M34904; K01519; K01520; BC006499; NM_006270; NM_002890; NM_004985; NM_033360; NM_176795; NM_005343.
BRAF (una isoforma de RAF).	Tannapfel, et al. (2005) Am. J. Clin. Pathol. 123:256-2601; Tsao y Sober (2005) Dermatol. Clin. 23:323-333.
Antígenos del melanoma, incluidos los antígenos de las células HST-2 de melanoma.	N.º registro de GenBank NM_206956; NM_206955; NM_206954; NM_206953; NM_006115; NM_005367; NM_004988; AY148486; U10340; U10339; M77481. Véase, por ejemplo, Suzuki, et al. (1999) J. Immunol. 163:2783-2791.
Survivina	N.º registro de GenBank AB028869; U75285 (véanse también, por ejemplo, Tsuruma, et al. (2004) J. Translational Med. 2:19 (11 páginas); Pisarev, et al. (2003) Clin. Cancer Res. 9:6523-6533; Siegel, et al. (2003) Br. J. Haematol. 122:911-914; Andersen, et al. (2002) Histol. Histopathol. 17:669-675).
MDM-2	NM_002392; NM_006878 (véanse también, por ejemplo, Mayo, et al. (1997) Cancer Res. 57:5013-5016; Demidenko y Blagosklonny (2004) Cancer Res. 64:3653-3660).
Proteínas de unión a metil-CpG (MeCP2; MBD2).	Muller, et al. (2003) Br. J. Cancer 89:1934-1939; Fang, et al. (2004) World J. Gastroenterol. 10:3394-3398.
NA88-A.	Moreau-Aubry, et al. (2000) J. Exp. Med. 191:1617-1624.
Histona desacetilasas (HDAC), por ejemplo, HDAC5.	Waltregny, et al. (2004) Eur. J. Histochem. 48:273-290; Scanlan, et al. (2002) Cancer Res. 62:4041-4047.
Ciclofilina B (Cyp-B).	Tamura, et al. (2001) Jpn. J. Cancer Res. 92:762-767.
CA 15-3; CA 27.29.	Clinton, et al. (2003) Biomed. Sci. Instrum. 39:408-414.
Proteína de choque térmico Hsp70.	Faure, et al. (2004) Int. J. Cancer 108:863-870.
Familia GAGE/PAGE, por ejemplo, PAGE-1; PAGE-2; PAGE-3; PAGE-4; XAGE-1; XAGE-2; XAGE-3.	Brinkmann, et al. (1999) Cancer Res. 59:1445-1448.

Familias MAGE-A, B, C, y D. MAGE-B5; MAGE-B6; MAGE-C2; MAGE-C3; MAGE-3; MAGE-6.	Lucas, et al. (2000) Int. J. Cancer 87:55-60; Scanlan, et al. (2001) Cancer Immun. 1:4.
Kinesina 2; elemento modulador del factor 1 TATA; proteína tumoral D53; NY	Scanlan, et al. (2001) Cancer Immun. 30:1-4.
Alfa-fetoproteína (AFP)	Grimm, et al. (2000) Gastroenterol. 119:1104-1112.
SART1; SART2; SART3; ART4.	Kumamuru, et al. (2004) Int. J. Cancer 108:686-695; Sasatomi, et al. (2002) Cancer 94:1636-1641; Matsumoto, et al. (1998) Jpn. J. Cancer Res. 89:1292-1295; Tanaka, et al. (2000) Jpn. J. Cancer Res. 91:1177-1184.
Antígeno del melanoma expresado preferentemente (PRAME).	Matsushita, et al. (2003) Leuk. Lymphoma 44:439-444; Oberthuer, et al. (2004) Clin. Cancer Res. 10:4307-4313.
Antígeno carcinoembrionario (CEA), Péptido agonista potenciador CAP1-6D.	N.º registro de GenBank M29540; E03352; X98311; M17303 (véanse también, por ejemplo, Zaremba (1997) Cancer Res. 57:4570-4577; Sarobe, et al. (2004) Curr. Cancer Drug Targets 4:443-454; Tsang, et al. (1997) Clin. Cancer Res. 3:2439-2449; Fong, et al. (2001) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98:8809-8814).
HER-2/neu.	Disis, et al. (2004) J. Clin. Immunol. 24:571-578; Disis y Cheever (1997) Adv. Cancer Res. 71:343-371.
Cdk4; cdk6; p16 (INK4); proteína Rb.	Ghazizadeh, et al. (2005) Respiration 72:68-73; Ericson, et al. (2003) Mol. Cancer Res. 1:654-664.
TEL; AML1; TEL/AML1.	Stams, et al. (2005) Clin. Cancer Res. 11:2974-2980.
Telomerasa (TERT).	Nair, et al. (2000) Nat. Med. 6:1011-1017.
707-AP.	Takahashi, et al. (1997) Clin. Cancer Res. 3:1363-1370.
Anexina, por ejemplo, Anexina II.	Zimmerman, et al. (2004) Virchows Arch. 445:368-374.
BCR/ABL; BCR/ABL p210; BCR/ABL p190; CML-66; CML-28.	Cobaldda, et al. (2000) Blood 95:1007-1013; Hakansson, et al. (2004) Leukemia 18:538-547; Schwartz, et al. (2003) Semin. Hematol. 40:87-96; Lim, et al. (1999) Int. J. Mol. Med. 4:665-667.
BCL2; BLC6; proteína CD 10.	Iqbal, et al. (2004) Am. J. Pathol. 165:159-166.
CDC27 (es un antígeno del melanoma).	Wang, et al. (1999) Science 284:1351-1354.
Proteína espermática 17 (SP17); 14-3-3-zeta; MEMD; KIAA0471; TC21.	Arora, et al. (2005) Mol. Carcinog. 42:97-108.
Proteínas 1 y 2 relacionadas con tirosinasa (TRP-1 y TRP-2).	N.º registro de GenBank NM_001922. (véase también, por ejemplo, Bronte, et al. (2000) Cancer Res. 60:253-258).
Gp100/pmel-17.	N.º registro de GenBank N <sup>ros</sup> AH003567; U31798; U31799;U31807; U31799 (véanse también, por ejemplo, Bronte, et al. (2000) Cancer Res. 60:253-258)
TARP.	Véase, por ejemplo, Clifton, et al. (2004) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101:10166-10171; Virok, et al. (2005) Infection Immunity 73:1939-1946
Proteínas 1 y 2 relacionadas con tirosinasa (TRP-1 y TRP-2).	N.º registro de GenBank NM_001922. (véase también, por ejemplo, Bronte, et al. (2000) Cancer Res. 60:253-258).
Receptor de melanocortina 1 (MC1R); MAGE-31 gp100; tirosinasa;	Salazar-Onfray, et al. (1997) Cancer Res. 57:4348-4355; Reynolds, et al. (1998) J. Immunol. 161:6970-6976; Chang, et al. (2002) Clin. Cancer Res. 8:1021-1032.
Dopacromo tautomerasa (TRP-2); MART-1.	

MUC-1; MUC-2.	Véase, por ejemplo, Davies, et al. (1994) <i>Cancer Lett.</i> 82:179-184; Gambus, et al. (1995) <i>Int. J. Cancer</i> 60:146-148; McCool, et al. (1999) <i>Biochem. J.</i> 341:593-600.
Spas-1.	Solicitud de patente de EE.UU. publicada N.º 20020150588 de Allison, et al.
CASP-8; FLICE; MACH.	Mandrizzato, et al. (1997) <i>J. Exp. Med.</i> 186:785-793.
CEACAM6; CAP-1.	Duxbury, et al. (2004) <i>Biochem. Biophys. Res. Commun.</i> 317:837-843; Morse, et al. (1999) <i>Clin. Cancer Res.</i> 5:1331-1338.
HMGB1 (una proteína y citoquina de unión al ADN)	Brezniceanu, et al. (2003) <i>FASEB J.</i> 17:1295-1297.
ETV6/AML1.	Codrington, et al. (2000) <i>Br. J. Haematol.</i> 111:1071-1079.
Formas naturales y mutantes de poliposis coli adenomatosa (APC); beta-catenina; c-met; p53; E-caderina; ciclooxygenasa-2 (COX-2).	Clements, et al. (2003) <i>Clin. Colorectal Cancer</i> 3:113-120; Gulmann, et al. (2003) <i>Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol.</i> 11:230-237; Jungck, et al. (2004) <i>Int. J. Colorectal Dis.</i> 19:438-445; Wang, et al. (2004) <i>J. Surg. Res.</i> 120:242-248; Abutaily, et al. (2003) <i>J. Pathol.</i> 201:355-362; Liang, et al. (2004) <i>Br. J. Surg.</i> 91:355-361; Shirakawa, et al. (2004) <i>Clin. Cancer Res.</i> 10:4342-4348.
Antígeno del carcinoma de células renales unido mediante el mAB G250.	Mulders, et al. (2003) <i>Urol. Clin. North Am.</i> 30:455-465; Steffens, et al. (1999) <i>Anticancer Res.</i> 19:1197-1200.
EphA2	Véase, por ejemplo, publicación de patente de EE.UU. N.º 2005/0281783 A1; n.º de registro de GenBank NM_004431 (humano); n.º de registro de GenBank NM_010139 (ratón); n.º de registro de GenBank AB038986 (pollo, secuencia parcial); números de registro de GenBank NP_004422, AAH37166, y AAA53375 (humano); números de registro de GenBank NP_034269 (ratón), AAH06954 (ratón), XP_345597 (rata), y BAB63910 (pollo).
<b>Antígenos de <i>Francisella tularensis</i></b>	
<i>Francisella tularensis</i> A y B.	Genoma completo de las subespecies Schu S4 (n. de registro de GenBank. N.º AJ749949); de la subespecie 4 (n. de registro de GenBank. N.º NC_006570). Proteína de la membrana exterior (43 kDa) Bevanger, et al. (1988) <i>J. Clin. Microbiol.</i> 27:922-926; Porsch-Ozcuremez, et al. (2004) <i>Clin. Diagnostic. Lab. Immunol.</i> 11:1008-1015). Los componentes antigénicos de <i>F. tularensis</i> incluyen, por ejemplo, 80 antígenos, incluidas chaperoninas de 10 kDa y 60 kDa (Havlasova, et al. (2002) <i>Proteomics</i> 2:857-86), nucleósido difosfato quinasa, isocitrato deshidrogenasa, proteína Hfq de unión al ARN, la chaperona ClpB (Havlasova, et al. (2005) <i>Proteomics</i> 5:2090-2103). Véase también, por ejemplo, Oyston y Quarry (2005) <i>Antonie Van Leeuwenhoek</i> 87:277-281; Isherwood, et al. (2005) <i>Adv. Drug Deliv. Rev.</i> 57:1403-1414; Biagini, et al.
<b>Antígenos de la malaria</b>	
Proteína del circumsporozoito (CSP); SSP2; HEP17; Ortólogos Exp-1 descubiertos en <i>P. falciparum</i> ; y LSA-1.	Véase, por ejemplo, Haddad, et al. (2004) <i>Infection Immunity</i> 72:1594-1602; Hoffman, et al. (1997) <i>Vaccine</i> 15:842-845; Oliveira-Ferreira y Daniel-Ribeiro (2001) <i>Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro</i> 96:221-227. CSP (véase, por ejemplo, N.º registro de GenBank AB121024). SSP2 (véanse, por ejemplo, N.º registro de GenBank AF249739). LSA-1 (véanse, por ejemplo, N.º registro de GenBank Z30319).
Proteína superficial del eritocito infectado con Ring (RESA); proteína superficial 2 del merozoito (MSP2); Spf66; proteína superficial 1 del merozoito (MSP1); 195A; BVp42.	Véase, por ejemplo, Stirnadel, et al. (2000) <i>Int. J. Epidemiol.</i> 29:579-586; Krzych, et al. (1995) <i>J. Immunol.</i> 155:4072-4077. Véase también, Good, et al. (2004) <i>Immunol. Rev.</i> 201:254-267; Good, et al. (2004) <i>Ann. Rev. Immunol.</i> 23:69-99. MSP2 (véanse, por ejemplo, N.º registro de GenBank X96399; X96397). MSP1 (véanse, por ejemplo, N.º registro de GenBank X03371). RESA (véase, por ejemplo, N.º registro de GenBank X05181; X05182).

ES 2 613 630 T3

Antígeno 1 de la membrana apical (AMA1).	Véase, por ejemplo, , Gupta, et al. (2005) Protein Expr. Purif. 41:186-198. AMA1 (véanse, por ejemplo, N.º registro de GenBank A' 13; AJ494905; AJ490565).
<b>Virus y antígenos víricos</b>	
Hepatitis A	N.º registro de GenBank Nos., por ejemplo, NC_001489; AY644670; X83302; K02990; M14707.
Hepatitis B	Genoma completo (véanse, por ejemplo, N.º registro de GenBank N.ºs AB214516; NC_003977; AB205192; AB205191; AB205190; AJ748098; AB198079; AB198078; AB198076; AB074756).
Hepatitis C	Genoma completo (véanse, por ejemplo, N.º registro de GenBank N.ºs NC_004102; AJ238800; AJ238799; AJ132997; AJ132996; A.1000009. D84263)
Hepatitis D	N.º registro de GenBank Nos, por ejemplo, NC_001653; AB118847; AY261457.
Virus del papiloma humano, incluidos más de 200 subtipos (clasificados en 16 subgrupos), tales como los subtipos de alto riesgo 16, 18, 30, 31, 33, 45.	Véase, por ejemplo, Trimble, et al. (2003) Vaccine 21:4036-4042; Kim, et al. (2004) Gene Ther. 11:1011-1018; Simon, et al. (2003) Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol. 109:219-223; Jung, et al. (2004) J. Microbiol. 42:255-266; Damasus-Awatai y Freeman-Wang (2003) Curr. Opin. Obstet. Gynecol. 15:473-477; Jansen y Shaw (2004) Annu. Rev. Med. 55:319-331; Roden y Wu (2003) Expert Rev. Vaccines 2:495-516; de Villiers, et al. (2004) Virology 324:17-24; Hussain y Paterson (2005) Cancer Immunol. Immunother. 54:577-586; Molijn, et al. (2005) J. Clin. Virol. 32 (Supl. 1) S43-S51. N.º registro de GenBank N.ºs AY686584; AY686583; AY686582; NC_006169; NC_006168; NC_006164; NC_001355; NC_001349; NC_005351; NC_001596).
<b>Virus y antígenos víricos</b>	
Virus linfotrófico de los linfocitos T humanos (HTLV) tipos I y II, incluidos el HTLV tipo I subtipos Cosmopolitan, África Central, y Austro-Melanesio, y el HTLV tipo II subtipos lia, lib, lic, y lid.	Véase, por ejemplo, Capdepon, et al. (2005) AIDS Res. Hum. Retrovirus 21:28-42; Bhigjee, et al. (1999) AIDS Res. Hum. Retrovirus 15:1229-1233; Vandamme, et al. (1998) J. Virol. 72:4327-4340; Vallejo, et al. (1996) J. Acquir. Immune Defic. Syndr. Hum. Retrovirol. 13:384-391. HTLV tipo I (véanse, por ejemplo, N.º registro de GenBank N.ºs AY563954; AY563953. HTLV tipo II (véanse, por ejemplo, N.º registro de GenBank N.ºs L03561; Y13051; AF139382).
Coronaviridae,	Véase, por ejemplo, Brian y Baric (2005) Curr. Top. Microbiol. Immunol.
incluidos Coronavirus, tales como SARS-coronavirus (SARS-CoV), y Torovirus.	287:1-30; Gonzalez, et al. (2003) Arch. Virol. 148:2207-2235; Smits, et al. (2003) J. Virol. 77:9567-9577; Jamieson, et al. (1998) J. Infect. Dis. 178:1263-1269 (n.º registro de GenBank N.ºs AY348314; NC_004718; AY394850).
Virus de la rubeola.	N.º registro de GenBank N.ºs NC_001545; AF435866.
Virus de las paperas, incluidos los genotipos A, C, D, G, H, e I.	Véase, por ejemplo, Orvell, et al. (2002) J. Gen. Virol. 83:2489-2496. Véase, por ejemplo, N.º registro de GenBank N.ºs AY681495; NC_002200; AY685921; AF201473.
Virus Coxsackie A incluidos los serotipos 1, 11, 13, 15, 17, 18, 19, 20, 21,22, y 24 (también conocido como Enterovirus humano C; HEV-C).	Véase, por ejemplo, Brown, et al. (2003) J. Virol. 77:8973-8984. N.º registro de GenBank N.ºs AY421768; AY790926; X67706.
Virus Coxsackie B, incluidos los subtipos 1-6.	Véase, por ejemplo, Ahn, et al. (2005) J. Med. Virol. 75:290-294; Patel, et al. (2004) J. Virol. Methods 120:167-172; Rezig, et al. (2004) J. Med. Virol. 72:268-274. N.º registro de GenBank X05690.

ES 2 613 630 T3

<p>Enterovirus humano incluido, por ejemplo, enterovirus humano A (HEV-A, CAV2 a CAV8, CAV10, CAV12, CAV14, CAV16, y EV71) y también incluido HEV-B (CAV9, CBV1 a CBV6, E1 a E7, E9, E11 a E21, E24 a E27, E29 a E33, y EV69 y E73), así como HEV.</p>	<p>Véase, por ejemplo, Oberste, et al. (2004) J. Virol. 78:855-867. Enterovirus humano A (n.º de registro de GenBank N<sup>ros</sup> NC_001612); enterovirus humano B (NC_001472); enterovirus humano C (NC_001428); enterovirus humano D (NC_001430). Enterovirus simio A (n.º de registro de GenBank NC_003988).</p>
<p>Poliovirus incluido PV1, PV2, y PV3.</p>	<p>Véase, por ejemplo, He, et al. (2003) J. Virol. 77:4827-4835; Hahsido, et al. (1999) Microbiol. Immunol. 43:73-77. N.º registro de GenBank AJ132961 (tipo 1); AY278550 (tipo 2); X04468 (tipo 3).</p>
<p>Virus de la encefalitis vírica, incluida la encefalitis equina, la encefalitis equina venezolana (VEE) (incluidos los subtipos IA, IB, IC, ID, IIIC, IIID), la encefalitis equina oriental (EEE), la encefalitis equina occidental (WEE), la encefalitis de St. Louis, Murray Valley (Australiana)</p>	<p>Véase, por ejemplo, Hoke (2005) Mil. Med. 170:92-105; Estrada-Franco, et al. (2004) Emerg. Infect. Dis. 10:2113-2121; Das, et al. (2004) Antiviral Res. 64:85-92; Aguilar, et al. (2004) Emerg. Infect. Dis. 10:880-888; Weaver, et al. (2004) Arch. Virol. Supl. 18:43-64; Weaver, et al. (2004) Annu. Rev. Entomol. 49:141-174. la encefalitis equina oriental (n.º de registro de GenBank NC_003899; AY722102); la encefalitis equina occidental (NC_003908).</p>
<p>Encefalitis, la encefalitis japonesa, y la encefalitis transmitida por pulgas.</p>	
<p>Virus del herpes humano, incluido el citomegalovirus (CMV), virus de Epstein-Barr (VEB), virus del herpes humano 1 (VHH-1, 1)HHV-2, HHV-3, HHV-4, HHV-5, HHV-6, HHV-7, HHV-8, virus del herpes B, virus de herpes simple tipos 1 y 2 (HSV-1, HSV-2) 3), y virus de la varicela zóster virus (VZV).</p>	<p>Véase, por ejemplo, Studahl, et al. (2000) Scand. J. Infect. Dis. 32:237-248; Padilla, et al. (2003) J. Med. Virol. 70 (Supl. 1) S103-S110; Jainkittivong y Langlais (1998) Oral Surg. Oral Med. 85:399-403. Números de registro de GenBank NC_001806 (herpesvirus 1); NC_001798 (herpesvirus 2); X04370 y NC_001348 (herpesvirus 3); NC_001345 (herpesvirus 4); NC_001347 (herpesvirus 5); X83413 y NC_000898 (herpesvirus 6); NC_001716 (herpesvirus 7). Los herpesvirus tipos 6 y 7 (HHV-6; HHV-7) se divulgan en, por ejemplo, Padilla, et al. (2003) J. Med. Virol. 70 (Supl. 1)S103-S110. El herpesvirus humano 8 (HHV-8), incluidos los subtipos A-E, se divulgan en, por ejemplo, Treurnicht, et al. (2002) J. Med. Virol. 66:235-240.</p>
<p>VIH-1 incluido el grupo M (incluidos los subtipos A a J) y el grupo O (incluido cualquier subtipo distinguible) (VIH-2, incluidos los subtipos A-E.</p>	<p>Véase, por ejemplo, Smith, et al. (1998) J. Med. Virol. 56:264-268. Véase también, por ejemplo, N.º registro de GenBank N<sup>ros</sup> DQ054367; NC_001802; AY968312; DQ011180; DQ011179; DQ011178; DQ011177; AY588971; AY588970; AY781127; AY781126; AY970950; AY970949; AY970948; X61240; AJ006287; AJ508597; y AJ508596.</p>
<p>virus de Epstein-Barr (VEB), incluidos los subtipos A y B.</p>	<p>Véase, por ejemplo, Peh, et al. (2002) Pathology 34:446-450. Virus Epstein-Barr cepa B95-8 (n.º registro de GenBank V01555).</p>
<p>Reovirus, incluidos los serotipos y la cepas 1, 2, y 3, tipo 1 Lang, tipo 2 Jones, y tipo 3 Dearing.</p>	<p>Véase, por ejemplo, Barthold, et al. (1993) Lab. Anim. Sci. 43:425-430; Roner, et al. (1995) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:12362-12366; Kedl, et al. (1995) J. Virol. 69:552-559. N.º registro de GenBank K02739 (proteína de la superficie del gen sigma-3).</p>
<p>Los subtipos de citomegalovirus (CMV) incluyen CMV subtipos I-VII.</p>	<p>Véase, por ejemplo, Chern, et al. (1998) J. Infect. Dis. 178:1149-1153; Vilas Boas, et al. (2003) J. Med. Virol. 71:404-407; Trincado, et al. (2000) J. Med. Virol. 61:481-487. N.º registro de GenBank X17403.</p>
<p>Rinovirus, incluidos todos los serotipos.</p>	<p>Rinovirus humano 2 (n.º de registro de GenBank X02316); Rinovirus humano B (n.º de registro de GenBank NC_001490); Rinovirus humano 89 (n.º de registro de GenBank NC_001617); Rinovirus humano 39 (n.º de registro de GenBank AY751783).</p>
<p>Adenovirus, incluidos todos los serotipos.</p>	<p>AY803294; NC_004001; AC_000019; AC_000018; AC_000017; AC_000015; AC_000008; AC_000007; AC_000006; AC_000005; AY737798; AY737797; NC_003266; NC_002067; AY594256; AY594254; AY875648; AJ854486; AY163756; AY594255; AY594253; NC_001460; NC_001405; AY598970; AY458656; AY487947; NC_001454; AF534906; AY45969; AY128640; L19443; AY339865; AF532578.</p>



Virus varicela zóster,	Véase, por ejemplo, Loparev, et al. (2004) J. Virol. 78:8349-8358; Carr, et al.
Incluidos las cepas y los genotipos Oka, Dumas, Europeo, Japonés, y Mosaic.	(2004) J. Med. Virol. 73:131-136; Takayama y Takayama (2004) J. Clin. Virol. 29:113-119.
Filovirus, incluido el virus de Marburg y el virus Ébola, y cepas tales como Ébola-Sudan (EBO-S), Ébola-Zaire (EBO-Z), y Ébola-Reston (EBO-R).	Véase, por ejemplo, Geisbert y Jahrling (1995) Virus Res. 39:129-150; Hutchinson, et al. (2001) J. Med. Virol. 65:561-566. virus de (véanse, por ejemplo, N.º registro de GenBank NC_001608). virus Ébola (véanse, por ejemplo, N.º registro de GenBank N <sup>ros</sup> NC_006432; AY769362; NC_002549; AF272001; AF086833).
Arenavirus, incluido el virus de la coriomeningitis linfocítica including lymphocytic choriomeningitis (LCM), virus de Lassa, virus de Junin, y virus de Machupo.	virus de Junin, segmento S (n.º de registro de GenBank Acc. N.º NC_005081); virus de Junin, segmento L (n.º de registro de GenBank Acc. N.º NC_005080).
Viurus de la rabia.	Véase, por ejemplo, N.º registro de GenBank N <sup>ros</sup> NC_001542; AY956319; AY705373; AF499686; AB128149; AB085828; AB009663.
<b>Virus y antígenos víricos</b>	
Arbovirus, incluido el virus del Nilo occidental, virus del Dengue 1 a 4, virus de la fiebre de la garrapata de Colorado, virus de Sindbis, Togaviridae, Flaviviridae, Bunyaviridae, Reoviridae, Rhabdoviridae, Orthomyxoviridae, y similares.	Virus Dengue tipo 1 (véase, por ejemplo, N.º registro de GenBank N <sup>ros</sup> AB 195673; AY762084). Virus Dengue tipo 2 (véase, por ejemplo, N.º registro de GenBank N <sup>ros</sup> NC_001474; AY702040; AY702039; AY702037). Virus Dengue tipo 3 (véase, por ejemplo, N.º registro de GenBank N <sup>ros</sup> AY923865; AT858043). Virus Dengue tipo 4 (véase, por ejemplo, N.º registro de GenBank N <sup>ros</sup> AY947539; AY947539; AF326573). Virus de Sindbis (véanse, por ejemplo, N.º registro de GenBank N <sup>ros</sup> NC_001547; AF429428; J02363; AF103728). Virus del Nilo occidental (véanse, por ejemplo, N.º registro de GenBank N <sup>ros</sup> NC_001563; AY603654).
Virus de la viruela, incluido el ortopoxvirus (virus de la varicela, virus de la viruela de mono, virus vaccinia, virus de la viruela bovina), yatapoxvirus (virus tanapox, virus Yaba del tumor del mono), parapoxvirus, y molluscipoxvirus.	Virus viriola (véanse, por ejemplo, N.º registro de GenBank N <sup>ros</sup> NC_001611; Y16780; X72086; X69198).
Fiebre amarilla.	Véase, por ejemplo, N.º registro de GenBank NC_002031; AY640589; X03700.
Hantavirus, incluidos los serotipos Hantaan (HTN), Seul (SEO), Dobrava (DOB), Sin Nombre (SN), Puumala (PUU), y Saaremaa análogo a Dobrava (SAAV).	Véase, por ejemplo, Elgh, et al. (1997) J. Clin. Microbiol. 35:1122-1130; Sjolander, et al. (2002) Epidemiol. Infect. 128:99-103; Zeier, et al. (2005) Virus Genes 30:157-180. N.º registro de GenBank NC_005222 y NC_005219 (Hantavirus). Véase también, por ejemplo, N.º registro de GenBank N <sup>ros</sup> NC_005218; NC_005222; NC_005219.
Flavivirus, incluido el virus del dengue, virus de la encefalitis japonesa, virus del Nilo occidental, y virus de la fiebre amarilla.	Véase, por ejemplo, Mukhopadhyay, et al. (2005) Nature Rev. Microbiol. 3:13-22. N.º registro de GenBank NC_001474 y AY702040 (Dengue). N.º registro de GenBank N <sup>ros</sup> NC_001563 y AY603654.
Virus del sarampión.	Véase, por ejemplo, N.º registro de GenBank N <sup>ros</sup> AB040874 y AY486084.
Virus paragripal humano (HPV), incluidos los tipos de HPV 1-56.	Virus paragripal humano 2 (véanse, por ejemplo, N.º registro de GenBank N <sup>ros</sup> AB176531; NC003443). Virus paragripal humano 3 (véanse, por ejemplo, N.º registro de GenBank NC_001796).

Virus de la gripe, incluidos los virus de la gripe tipos A, B, y C.	Nucleocápside de la gripe (véase, por ejemplo, N.º registro de GenBank AY626145). Hemaglutinina de la gripe (véase, por ejemplo, N.º registro de GenBank N.ºs AY627885; AY555153). Neuraminidasa de la gripe (véanse, por ejemplo, N.º registro de GenBank N.ºs AY555151; AY577316). Proteína de la matriz de la gripe 2 (véanse, por ejemplo, N.º registro de GenBank N.ºs AY626144). Proteína básica de la gripe 1 (véanse, por ejemplo, N.º registro de GenBank AY627897). Proteína polimerasa ácida de la gripe (véanse, por ejemplo, N.º registro de GenBank AY627896). Nucleoproteína de la gripe (véanse, por ejemplo, N.º
Virus de la gripe A, subtipos, por ejemplo, virus porcinos (SIV): Gripe A H1N1 y virus de la gripe porcina.	Hemaglutinina H1N1 (n.º registro de GenBank S67220). Proteína de la matriz de la gripe A (n.º registro de GenBank AY700216). Nucleoproteína H5H1 de la gripe A (n.º registro de GenBank AY646426). Hemaglutinina H1N1 (n.º registro de GenBank D00837). Véase también, N.º registro de GenBank N.ºs BD006058; BD006055; BD006052. Véase también, por ejemplo, Wentworth, et al. (1994) J. Virol. 68:2051-2058; Wells, et al. (1991) J.A.M.A. 265:478-481.
Virus sincitial respiratorio (RSV), incluido el subgrupo A y el subgrupo B.	Virus sincitial respiratorio (RSV) (véanse, por ejemplo, N.º registro de GenBank N.ºs AY353550; NC_001803; NC001781).
Rotavirus, incluido el rotavirus humano A a E, rotavirus bovino, rotavirus de mono rhesus, y reordenación RVV-humano.	Segmento 8 del rotavirus C humano (N.º registro de GenBank AJ549087); proteína de la cápside exterior, rotavirus humano cepa G9 (véanse, por ejemplo, N.º registro de GenBank DQ056300); proteína no estructural 4 del rotavirus humano cepa B (véanse, por ejemplo, N.º registro de GenBank AY548957); proteína de la cápside interna principal, rotavirus humano A (véanse, por ejemplo, N.º registro de GenBank AY601554).
Poliomavirus, incluido el virus simio 40 (SV40), virus JC (JCV) y virus BK (BKV).	Véase, por ejemplo, Engels, et al. (2004) J. Infect. Dis. 190:2065-2069; Vilchez y Butel (2004) Clin. Microbiol. Rev. 17:495-508; Shivapurkar, et al. (2004) Cancer Res. 64:3757-3760; Carbone, et al. (2003) Oncogene 2:5173-5180; Barbanti-Brodano, et al. (2004) Virology 318:1-9) (genoma completo de SV40 en, por ejemplo, N.º registro de GenBank N.ºs NC_001669; AF168994; AY271817; AY271816; AY120890; AF345344; AF332562).
Coltivirus, incluido el virus de la fiebre de la garrapata de Colorado, virus Eyach.	Attoui, et al. (1998) J. Gen. Virol. 79:2481-2489. Segmentos del virus Eyach (véanse, por ejemplo, N.º registro de GenBank N.ºs AF282475; AF282472; AF282473; AF282478; AF282476; NC_003707; NC_003702; NC_003703; NC_003704; NC_003705; NC_003696; NC_003697; NC_003698; NC_003699; NC_003701; NC_003706; NC_003700; AF282471; AF282477).
Calcivirus, incluidos los genogrupos Norwalk, grupo Snow Mountain (SMA), y Saaporo.	Virus Snow Mountain (véanse, por ejemplo, N.º registro de GenBank AY134748).
Parvoviridae, incluidos dependovirus, parvovirus (incluido el parvovirus B19), y eritrovirus.	Véase, por ejemplo, Brown (2004) Dev. Biol. (Basel) 118:71-77; Alvarez-Lafuente, et al. (2005) Ann. Rheum. Dis. 64:780-782; Ziyayyan, et al. (2005) Jpn. J. Infect. Dis. 58:95-97; Kaufman, et al. (2005) Virology 332:189-198.

2. Agentes utilizados en enfoques de sensibilización-refuerzo

- 5 En los enfoques de sensibilización-refuerzo, la terapia auxiliar puede comprender administrar al mamífero una dosis eficaz de una vacuna de sensibilización. La vacuna inicial preferentemente no incluye una Listeria metabólicamente activa que codifica el antígeno diana. Dicha vacuna puede contener tanto el propio antígeno diana, por ejemplo, una proteína con o sin un auxiliar, un lisado de células tumorales, una célula tumoral irradiada, una célula presentadora de antígeno pulsada con péptidos del antígeno diana (por ejemplo, una célula dendrítica, o puede contener un agente que proporciona el antígeno diana. Los agentes adecuados que proporcionan un antígeno diana incluyen vectores
- 10 recombinantes, por ejemplo, bacterias, virus, y ADN puro. Los vectores recombinantes se preparan usando técnicas convencionales conocidas en la técnica, e incluyen elementos de control adecuados unidos operativamente con la secuencia de nucleótidos que codifica el antígeno diana. Véase, por ejemplo, Plotkin, et al. (eds.) (2003) Vaccines, 4ª ed., W.B. Saunders, Co., Fila., PA.; Sikora, et al. (eds.) (1996) Tumor Immunology Cambridge University Press, Cambridge, Reino Unido; Hackett y Harn (eds.) Vaccine Adjuvants, Humana Press, Totowa, NJ; Isaacson (eds.) (1992)

Recombinant DNA Vaccines, Marcel Dekker, NY, NY; Morse, et al. (eds.) (2004) Handbook of Cancer Vaccines, Humana Press, Totowa, NJ, Liao, et al. (2005) Cancer Res. 65:9089-9098; Dean (2005) Expert Opin. Drug Deliv. 2:227-236; Arlen, et al. (2003) Expert Rev. Vaccines 2:483-493; De la Cruz, et al. (2003) Vaccine 21:1317-1326; Johansen, et al. (2000) Eur. J. Pharm. Biopharm. 50:413-417; Excler (1998) Vaccine 16:1439-1443; Disis, et al. (1996) J. Immunol. 156:3151-3158). Se han descrito vacunas de péptido (véanse, por ejemplo, McCabe, et al. (1995) Cancer Res. 55:1741-1747; Minev, et al. (1994) Cancer Res. 54:4155-4161; Snyder, et al. (2004) J. Virology 78:7052-7060.

Los vectores derivados de virus incluyen virus, virus modificados, y partículas víricas (véanse, por ejemplo, Tabla 2). Los vectores derivados de virus se pueden administrar directamente a un sujeto mamífero, o se pueden introducir ex vivo dentro de una célula presentadora de antígenos (APC), donde la APC se administra a continuación al sujeto.

Los vectores víricos se pueden basar en, por ejemplo, Togavirus, incluidos alfavirus y flavivirus; alfavirus, tal como el virus Sindbis, Sindbis cepa SAAR86, virus del bosque de Semliki (SFV), la encefalitis equina venezolana (VEE), la encefalitis equina oriental (EEE), la encefalitis equina occidental, virus del Ross River, virus de Sagiyami, virus de O'Nyong-nyong, virus de Highlands J. Flavivirus, tales como el virus de la fiebre amarilla, fiebre amarilla cepa 17D, la encefalitis japonesa, la encefalitis de St. Louis, la encefalitis transmitida por pulgas, virus del dengue, virus del Nilo occidental, virus Kunjin (subtipo del virus del Nilo occidental); arterivirus tal como el virus de la arteritis equina; y rubivirus tales como el virus de la rubeola, herpesvirus, vaccinia Ankara modificada (MVA); vector vírico de la viruela de aves de corral; vector de la viruela aviar; vector del virus vaccinia; vector del virus de la gripe; vector adenovírico, vector del virus del papiloma humano; vector del virus del papiloma bovino, y así sucesivamente. Los vectores víricos pueden estar basados en un ortopoxvirus tal como el virus variola (varicela), virus vaccinia (vacuna de la varicela), cepa Ankara (MVA), o Copenhagen, viruela del camello, viruela del mono, o viruela bovina. Los vectores víricos pueden estar basados en un virus de la viruela de aves de corral, tal como el virus de la gripe aviar o el virus de la viruela de los canarios.

Los vectores adenovíricos y los vectores de virus adenoasociados (AAV) están disponibles, donde los vectores adenovíricos incluyen adenovirus serotipo 5 (adeno5; Ad5), adeno6, adeno11, y adeno35. Se dispone de al menos 51 serotipos de adenovirus humanos, clasificados en seis subgrupos (subgrupos A, B, C, D, E, y F). Las proteínas de adenovirus útiles, por ejemplo, en la evaluación de una respuesta inmunitaria frente a un vector adenovírico "vacío", incluyen la proteína hexón, tal como la proteína hexón 3, proteína de la fibra, y proteína basada en pentona, y se han descrito las respuestas inmunitarias humanas a proteínas adenovíricas (véanse, por ejemplo, Wu, et al. (2002) J. Virol. 76:12775-12782; Mascola (2006) Nature 441:161-162; Roberts, et al. (2006) Nature 441:239-243).

Tabla 2. Vectores de vacuna derivados de virus.

Vectores adenovíricos y vectores de virus adenoasociados (AAV).	Polo y Dubensky (2002) Drug Discovery Today 7:719-727; Xin, et al. (2005) Gene Ther. 12:1769-1777; Morenweiser (2005) Gene Ther. 12 (Supl. 1) S103-S110; Casimiro, et al. (2005) J. Virol. 79:15547-15555; Ferreira, et al. (2005) Gene Ther. 12 Supl. 1:S73-S83; Baez-Astua, et al. (2005) J. Virol. 79:12807-12817; Vanniasinkam y Ertl (2005) Curr. Gene Ther. 5:203-212; Tatsis y Ertl (2004) Mol. Ther. 10:616-629; Santosuosso, et al. (2005) Viral Immunol. 18:283-291; Zhou, et al. (1996) J. Virol. 70:7030-7038; Zhou, et al. (2002) J. Gene Med. 4:498-509.
Virus vaccinia	Kim, et al. (2005) Hum. Gen. Ther. 16:26-34; Kaufman, et al. (2005) J. Clin. Invest. 115:1903-1912; Kaufman, et al. (2004) J. Clin. Oncol. 22:2122-2132; Marshall, et al. (2005) J. Clin. Invest. 23:720-731; Hwang y Sanda (1999) Curr. Opin. Mol. Ther. 1:471-479; Baldwin, et al. (2003) Clin. Cancer Res. 9:5205-5213;
vaccinia Ankara modificada (MVA)	Mackova, et al. (2006) Cancer Immunol. Immunother. 55:39-46; Meyer, et al. (2005) Cancer Immunol. Immunother. 54:453-467; Palmowski, et al. (2002) J. Immunol. 168:4391-4398;
derivado NYVAC de vaccinia	Paoletti (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:11349-11353;
Virus de la viruela, incluida la viruela de las aves de corral, por ejemplo, viruela aviar y viruela de los canarios	Kaufman (2005) J. Clin. Oncol. 23:659-661; Kudo-Saito, et al. (2004) Clin. Cancer Res. 10:1090-1099; Greiner, et al. (2002) Cancer Res. 62:6944-6951; Marshall, et al. (2005) J. Clin. Invest. 23:720-731; Hwang y Sanda (1999) Curr. Opin. Mol. Ther. 1:471-479; Hodge, et al. (1997) Vaccine 15:759-768; Skinner, et al. (2005) Expert Rev. Vaccines 4:63-76; Rosenberg, et al. (2003) Clin. Cancer Res. 9:2973-2980.
Células presentadoras de antígenos transducidas con un vector derivado de virus.	Di Nicola, et al. (2004) Clin. Cancer Res. 10:5381-5390;

Vectores derivados de alfavirus, por ejemplo, virus de Sindbis, virus del bosque de Semlik, y virus de la encefalitis equina venezolana (VEE).	Polo y Dubensky (2002) <i>Drug Discovery Today</i> 7:719-727; Polo, et al. (1999) <i>Proc. Natl. Acad. Sci. USA</i> 96:4598-4603; Schlesinger (2001) <i>Expert Opin. Biol. Ther.</i> 1:177-191; Pan, et al. (2005) <i>Proc. Natl. Acad. Sci. USA</i> 102:11581-11588; Lundstrom (2003) <i>Expert Rev. Vaccines</i> 2:447-459; Shafferman, et al. (1996) <i>Adv. Exp. Med. Biol.</i> 397:41-47; Yamanaka (2004) <i>Int. J. Oncol.</i> 24:919-923; Atkins, et al. (2004) <i>Curr. Cancer Drug Targets</i> 4:597-607.
Vectores quiméricos derivados de virus, tales como alfavirus quimérico.	Virus Sindbis /virus de la encefalitis equina venezolana (SINV/VEEV) (véanse, por ejemplo, Perri, et al. (2003) <i>J. Virol.</i> 77:10394-10403; Paessler, et al. (2003) <i>J. Virol.</i> 77:9278-9286).
Herpesvirus, incluidos vectores derivados del herpes simplex y del virus de Epstein-Barr	Hellebrand, et al. (2006) <i>Gene Ther.</i> 13:150-162; Lauterbach, et al. (2005) <i>J. Gen. Virol.</i> 86:2401-2410; Zibert, et al. (2005) <i>Gene Ther.</i> 12:1707-1717; Thiry, et al. (2006) <i>Vet. Microbiol.</i> 113:171-177; Trapp, et al. (2005) <i>J. Virol.</i> 79:5445-5454.
Rinovirus	Dollenmaier, et al. (2001) <i>Virology</i> 281:216-230; Arnold, et al. (1996) <i>Intervirology</i> 39:72-78.
Lentivirus	DePolo, et al. (2000) <i>Mol. Ther.</i> 2:218-222; Pellinen, et al. (2004) <i>Int. J. Oncol.</i> 25:1753-1762; Esslinger, et al. (2003) <i>J. Clin. Invest.</i> 111:1673-1681; Kikuchi, et al. (2004) <i>Clin. Cancer Res.</i> 10:1835-1842; Kim, et al. (2005) <i>Hum. Gene Ther.</i> 16:1255-1266.
Vacunas de partículas víricas	Polo y Dubensky (2002) <i>Drug Discovery Today</i> 7:719-727; Cheng, et al. (2002) <i>Hum. Gene Ther.</i> 13:553-568; Lin, et al. (2003) <i>Mol. Ther.</i> 8:559-566; Balasuriya, et al. (2000) <i>J. Virol.</i> 74:10623-10630; Goldberg, et al. (2005) <i>Clin. Cancer Res.</i> 11:8114-8121; Johnston, et al. (2005) <i>Vaccine</i> 23:4969-4979; Quinnan, et al. (2005) <i>J. Virol.</i> 79:3358-3369; Cassetti, et al. (2004) <i>Vaccine</i> 22:520-527; Williamson, et al.

5 Vectores de células presentadoras de antígenos (APC), tal como un vector de células dendríticas (DC), incluyen células que están cargadas con un antígeno, cargadas con un lisato tumoral, o transfectadas con una composición que comprende un ácido nucleico, donde el ácido nucleico puede ser, por ejemplo, un plásmido, ARNm, o un virus. También se pueden usar vacunas de fusión DC/tumor. Véase, por ejemplo, Di Nicola, et al. (2004) *Clin. Cancer Res.* 10:5381-5390; Cerundolo, et al. (2004) *Nature Immunol.* 5:7-10; Parmiani, et al. (2002) *J. Natl. Cancer Inst.* 94:805-818; Kao, et al. (2005) *Immunol. Lett.* 101:154-159; Geiger, et al. (2005) *J. Transl. Med.* 3:29; Osada, et al. (2005) *Cancer Immunol. Immunother.* Nov.5,1-10 [publicación electrónica pendiente de impresión]; Malowany, et al. (2005) *Mol. Ther.* 13:766-775; Morse y Lyerly (2002) *World J. Surg.* 26:819-825; Gabrilovich (2002) *Curr. Opin. Mol. Ther.* 4:454-458; Morse, et al. (2003) *Clin. Breast Cancer* 3 Supl.4:S 164-S 172; Morse, et al. (2002) *Cancer Chemother. Biol. Response Modif.* 20:385-390; Arlen, et al. (2003) *Expert Rev. Vaccines* 2:483-493; Morse y Lyerly (1998) *Expert Opin. Investig. Drugs* 7:1617-1627; Hirschowitz, et al. (2004) *J. Clin. Oncol.* 22:2808-2815; Vasir, et al. (2005) *Br. J. Haematol.* 129:687-700; Koido, et al. (2005) *Gynecol. Oncol.* 99:462-471.

15 Las células tumorales, por ejemplo, células tumorales autólogas y alogénicas, están disponibles como vacunas (Arlen, et al. (2005) *Semin. Oncol.* 32:549-555). Una vacuna también puede comprender una célula tumoral modificada, por ejemplo, un lisado de células tumorales, o una célula tumoral irradiada. La célula tumoral también puede modificarse mediante la incorporación de un ácido nucleico que codifica una molécula tal como una citoquina (GM-CSF, IL-12, IL-15, y similares), un ligando de NKG2D, CD40L, CD80, CD86, y similares (véanse, por ejemplo, Dranoff *Immunol. Rev.* 188:147-154; Jain, et al. (2003) *Ann. Surg. Oncol.* 10:810-820; Borrello y Pardoll (2002) *Cytokine Growth Factor Rev.* 13:185-193; Chen, et al. (2005) *Cancer Immunol. Immunother.* 27:1-11; Kjaergaard, et al. (2005) *J. Neurosurg.* 103:156-164; Tai, et al. (2004) *J. Biomed. Sci.* 11:228-238; Schwaab, et al. (2004) *J. Urol.* 171:1036-1042; Friese, et al. (2003) *Cancer Res.* 63:8996-9006; Briones, et al. (2002) *Cancer Res.* 62:3195-3199; Vieweg y Dannull *Urol. Clin. North Am.* 30:633-643; Mincheff, et al. (2001) *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 39:125-132).

25 Las vacunas pueden incluir vectores de ADN puro y vectores de ARN. Estas vacunas que contienen ácidos nucleicos se pueden administrar mediante una pistola génica, electroporación, fantasmas bacterianos, microesferas, micropartículas, liposomas, nanopartículas policationicas, y similares (véanse, por ejemplo, Donnelly, et al. (1997) *Ann. Rev. Immunol.* 15:617-648; Mincheff, et al. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 39:125-132; Song, et al. (2005) *J. Virol.* 79:9854-9861; Estcourt, et al. (2004) *Immunol. Rev.* 199:144-155).

35 Los reactivos y las metodologías para administrar ácidos nucleicos puros, por ejemplo, mediante una pistola génica, y métodos intradérmicos, intramusculares y de electroporación, están disponibles en la técnica. Las vacunas de ácidos nucleicos pueden comprender un ácido nucleico bloqueado (LNA), donde el LNA permite la unión de un resto funcional al ADN plásmido, y donde el resto funcional puede ser un auxiliar (véanse, por ejemplo, Fensterle, et al. (1999) *J. Immunol.* 163:4510-4518; Strugnell, et al. (1997) *Immunol. Cell Biol.* 75:364-369; Hertoughs, et al. (2003) *Nucleic Acids Res.* 31:5817-5830; Trimble, et al. (2003) *Vaccine* 21:4036-4042; Nishitani, et al. (2000) *Mol. Urol.* 4:47-50; Tuting (1999) *Curr. Opin. Mol. Ther.* 1:216-225). Las vacunas de ácido nucleico se pueden usar combinadas con reactivos

que estimulan la migración de las células dendríticas inmaduras hacia la vacuna, y un reactivo que estimula la migración de las CD maduras hacia el ganglio linfático de drenado donde se produce la sensibilización, donde estos reactivos abarcan MIP-1alfa y Flt3L (véanse, por ejemplo, Kutzler y Weiner (2004) J. Clin. Invest. 114:1241-1244; Sumida, et al. (2004) J. Clin. Invest. 114:1334-1342).

5 Los vectores bacterianos incluyen, por ejemplo, Salmonella, Shigella, Yersinia, Lactobacillus, Streptococcus, bacilo de Calmette-Guerin, bacilo del ántrax y *Escherichia coli*. La bacteria se puede genomanipular para incluir un ácido nucleico que codifica un antígeno recombinante, un antígeno heterólogo, o un antígeno derivado de un tumor, de células cancerosas, o un agente infeccioso. Además, la bacteria se puede modificar para que esté atenuada. En otro  
10 aspecto, la vacuna bacteriana no de listeria puede carecer de cualquier ácido nucleico que codifica un antígeno recombinante (véanse, por ejemplo, Xu, et al. (2003) Vaccine 21:644-648; Pasetti, et al. (2003) J. Virol. 77:5209-5219; Loessner y Weiss (2004) Expert Opin. Biol. Ther. 4:157-168; Grangette, et al. Vaccine 20:3304-3309; Byrd, et al. (2002) Vaccine 20:2197-2205; Edelman, et al. (1999) Vaccine 17:904-914; Domenech, et al. (2005) Microbes and Infection 7:860-866).

15 Las bacterias muertas, pero metabólicamente activas ("KBMA"), y especialmente las Listeria KBMA se pueden preparar a partir de bacterias vivas mediante tratamiento con un agente de reticulación del ADN (por ejemplo, psoraleno) y/o inactivando al menos un gen que media en la reparación del ADN, por ejemplo, un gen de reparación recombinante (por ejemplo, recA) o un gen de reparación de daños por luz ultravioleta (por ejemplo, uvrA, uvrB, uvrAB, uvrC, uvrD, phrA, phrB) (véanse, por ejemplo, la publicación de patente de los Estados Unidos N<sup>os</sup> 2004/0228877 y 2004/0197343 de Dubensky, et al.).

20 Un tipo de Listeria KBMA es Listeria uvrAB genomanipulada para expresar un antígeno heterólogo, donde la bacteria genomanipulada se trata con un agente de reticulación de ácido nucleico, un compuesto de psoraleno, un compuesto de mostaza de nitrógeno, 4'-(4-amino-2-oxa)butil-4,5',8-trimetilpsoraleno, o beta-alanina, N-(acridina-9-il),2-[bis(2-cloroetil)amino]etil éster. Véase también, por ejemplo, la solicitud de patente de los Estados Unidos publicada N.º US 2004/0197343; MODIFIED FREE-LIVING MICROBES, VACCINE COMPOSITIONS AND METHODS OF USE THEREOF, de Dubensky, et al.; Brockstedt, et al (2005) Nature Med. 11:853-860).

25 En algunas realizaciones, la vacuna de sensibilización comprende un agente seleccionado entre el grupo que consiste en un vector del virus vaccinia (VV), un vector de células dendríticas (DC), un vector adenovirico, un vector de ADN desnudo, y GVAX® (CELL GENESYS, INC.).

### 3. Listeria usada en terapia auxiliar

35 En determinadas realizaciones, la invención incluye el uso de una bacteria Listeria, donde la Listeria está atenuada. La atenuación puede ser el resultado de una mutación en uno o más genes que codifican un factor de virulencia, tal como actA, internalina B (inlB), p60 (autolisina), listeriolisina O (LLO; gen hly), fosfatidilcolina fosfolipasa C (PC-PLC), fosfolipasa C específica de fosfatidilinositol (PI-PLC; gen plcA), lipoato proteína ligasa, así como los genes divulgados en ENGINEERED LISTERIA AND METHODS OF USE THEREOF, patente de Estados Unidos con N.º de Serie 11/395.197 (presentada el 30 de marzo de 2006), asignada a Cerus Corporation. Los métodos de la invención incluyen, pero no se limitan a, al uso de una o más de las especies y cepas de listeria identificadas en dicho documento. Por ejemplo, la invención abarca el uso de una bacteria a Listeria que es, o se ha derivado de, Listeria monocytogenes. También son útiles otras especies de Listeria, tales como *L. innocua* que se ha genomanipulado para  
40 expresar uno o más de listeriolisina O (gen hly; LLO), plcA, plcB, u otros genes tales como un gen de la virulencia o un gen que media la entrada en una célula hospedadora (véanse, por ejemplo, Johnson, et al. (2004) Appl. Environ. Microbiol. 70:4256-4266; Slaghuis, et al. (2004) J. Infect. Dis. 189:393-401; Milohanic, et al. (2003) Mol. Microbiol. 47:1613-1625). Las cepas atenuadas de Listeria adecuadas par su uso en las vacunas de refuerzo de la invención se pueden preparar como se describe en los documentos PCT/US2004/003429 y PCT/US2004/044080.

50 Los ejemplos no limitantes de Listeria atenuada se describen, por ejemplo, en las siguientes publicaciones de patente: publicación de patente de EE.UU. N.º 2004/0228877; publicación de patente de EE.UU. N.º 2004/0197343; y la publicación de patente de EE.UU. N.º 2005/0249748. También se proporcionan ejemplos no limitativos, por ejemplo, en la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos n.º 11/395.197, presentada el 30 de marzo de 2006;

### 4. Composiciones de vacuna

55 Además de los agentes anteriormente descritos, las composiciones de vacuna de la divulgación pueden comprender además varios excipientes, auxiliares, portadores, sustancias auxiliares, agentes moduladores, y similares. Un transportador, que está opcionalmente presente, es una molécula que por sí misma no induce la producción de anticuerpos perjudiciales para el individuo que recibe la composición. Los transportadores adecuados son de forma típica macromoléculas grandes de metabolismo lento tales como proteínas, polisacáridos, ácido poliláctico, ácidos poliglicólicos, aminoácidos poliméricos, copolímeros de aminoácido, agregados lípidos (tales como gotículas de aceite o liposomas), y partículas de virus inactivos. Los ejemplos de transportadores en forma de partículas incluyen los derivados de polímeros de poli(metacrilato de metilo), así como micropartículas derivadas de poli(láctidos) y poli(láctido-co-glicólidos), conocido como PLG. Véase, por ejemplo, Jeffery et al., Pharm. Res. (1993) 10:362-368;

McGee J P, et al., J Microencapsul. 14(2):197-210, 1997; O'Hagan D T, et al., Vaccine 11(2):149-54, 1993. Dichos transportadores son bien conocidos de los expertos en la técnica. Adicionalmente, estos transportadores pueden funcionar como agentes inmunoestimulantes ("auxiliars"). Además, el antígeno se puede conjugar con un toxoide bacteriano, tal como un toxoide de difteria, tétanos, cólera, etc., así como toxinas derivadas de E. coli. Dichos auxiliars incluyen, pero no se limitan a: (1) sales de aluminio (alum), tal como hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio, sulfato de aluminio, etc.; (2) formulaciones en emulsión de aceite en agua (con o sin otros agentes inmunoestimulantes específicos tales como péptidos de muramilo (véase más adelante) o componentes de la pared celular bacteriana), tales como por ejemplo (a) MF59 (publicación internacional n.º WO 90/14837), que contiene 5 % de escualeno, 0,5 % de Tween 80, y 0,5 % de Span 85 (que contiene opcionalmente diferentes cantidades de MTP-PE (véanse a continuación), aunque no es necesario) formulado en forma de partículas submicrométricas usando un microfluidizador tal como un microfluidizador Modelo 110Y (Microfluidics, Newton, Mass.), (b) SAF, que contiene 10 % de escualeno, 0,4 % de Tween 80, 5 % de polímero L121 bloqueado con pluronic, y MDP microfluidizado en una emulsión submicrométrica o bien vortizado para generar una emulsión de mayor tamaño de partícula, y (c) Ribit.M. sistema auxiliar (RAS), (Ribit Immunochem, Hamilton, MT) que contiene 2 % de escualeno, 0,2 % de Tween 80, y uno o más componentes de la pared celular bacteriana seleccionados entre el grupo que consiste en monofosfolípido A (MPL), trehalosa dimicolato (TDM), y esqueleto de pared celular (CWS), preferentemente MPL+CWS (Detoxu); (3) auxiliars de saponina, tales como Stimulon.TM. (Cambridge Bioscience, Worcester, Mass.) se pueden usar, o bien las partículas generadas a partir de los mismos tales como ISCOM (complejos inmunoestimuladores); (4) Auxiliar completo de Freund (CFA) y auxiliar incompleto de Freund (IFA); (5) citoquinas, tales como interleuquinas (IL-1, IL-2, etc.), factor estimulador de colonias de macrófagos (M-CSF), factor de necrosis tumoral (TNF), betaquimioquinas (MIP, 1-alfa, 1-beta Rantes, etc.); (6) mutantes destoxificados de una toxina ribosilante de ADP bacteriano tal como una toxina del cólera (TC), una toxina pertussis (PT), o una toxina de E. coli térmicamente lábil (TL), particularmente LT-K63 (donde lisina se sustituye por el aminoácido natural en la posición 63) LT-R72 (donde arginina se sustituye por el aminoácido natural en la posición 72), CT-S109 (donde serina se sustituye por el aminoácido natural en la posición 109), y PT-K9/G129 (donde lisina se sustituye por el aminoácido natural en la posición 9 y glicina sustituida en la posición 129) (Véanse, por ejemplo, publicaciones internacionales números WO93/13202 y WO92/19265); y (7) otras sustancias que actúan como agentes inmunoestimuladores para mejorar la eficacia de la composición.

#### 5. Preparación de composiciones de vacuna

Las vacunas se preparan por métodos conocidos del experto en la materia. Generalmente, uno o más de los agentes anteriormente descritos (para su uso en vacunas de sensibilización o refuerzo) se preparan mezclando una cantidad deseada del agente con un excipiente farmacéuticamente aceptable. Los excipientes farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no se limitan a, agua destilada estéril, solución salina, soluciones tamponadas con fosfato, tampones basados en aminoácidos, o soluciones tamponadas con bicarbonato.

#### 6. Administración de la vacuna

El experto en la técnica puede determinar una cantidad eficaz de un vector de sensibilización o un vector de refuerzo a suministrar en una o varias dosis de una vacuna. Dicha cantidad estará comprendida en un intervalo que se puede determinar mediante ensayos de rutina.

La vacuna de sensibilización y la vacuna de refuerzo se pueden administrar mediante una cualquiera o una combinación de las siguientes vías. En un aspecto, la vacuna de sensibilización y la vacuna de refuerzo se administran por la misma vía. En otro aspecto, la vacuna de sensibilización y la vacuna de refuerzo se administran por vías diferentes. La expresión "vías diferentes" abarca, pero no se limita a, diferentes sitios del cuerpo, por ejemplo, un sitio que es oral, no oral, enteral, parenteral, rectal, intraganglional (ganglios linfáticos), intravenosa, arterial, subcutánea, intramuscular, intratumoral, peritumoral, intratumoral, infusión, mucosales, nasal, en el espacio cefalorraquídeo o fluido cefalorraquídeo, y así sucesivamente, así como por diferentes modos, por ejemplo, oral, intravenosa, e intramuscular.

Una cantidad eficaz de una vacuna de sensibilización o refuerzo se puede administrar en una dosis, pero no se restringe a una dosis. Por lo tanto, la administración puede ser dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece, catorce, quince, dieciséis, diecisiete, dieciocho, diecinueve, veinte, o más, administraciones de la vacuna. Cuando hay más de una administración de una vacuna, las administraciones pueden estar separadas por intervalos de tiempo de un minuto, dos minutos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, o más minutos, por intervalos de aproximadamente una hora, dos horas, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 horas, y así sucesivamente. En el contexto de horas, el término "aproximadamente" significa más o menos cualquier intervalo de tiempo dentro de 30 minutos. Las administraciones también pueden estar separadas por intervalos de tiempo de un día, dos días, tres días, cuatro días, cinco días, seis días, siete días, ocho días, nueve días, diez días, 11 días, 12 días, 13 días, 14 días, 15 días, 16 días, 17 días, 18 días, 19 días, 20 días, 21 días, y combinaciones de los mismos. La invención no está limitada a los intervalos de las dosis que estén equitativamente separados en el tiempo, sino que abarcan dosis en intervalos no equivalentes, tal como un calendario de sensibilización que consiste en administrar en 1 día, 4 días, 7 días, y 25 días, simplemente para proporcionar un ejemplo no limitante.

Lo siguiente puede tenerse en cuenta para determinar el calendario relativo de la vacuna de sensibilización y la vacuna de refuerzo. Se ha descubierto que la administración de un antígeno, o de un ácido nucleico que codifica un antígeno, puede estimular la expansión de células inmunitarias específicas de antígeno, dando como resultado un pico, seguido por la contracción del número de células inmunitarias específicas de antígeno (véanse, por ejemplo, Badovinac, et al. (2002) Nature Immunol. 3:619-626). El inicio de la vacunación de refuerzo se puede administrar antes de alcanzar el pico, coincidiendo con el pico, o después del pico.

La administración de la vacunación de refuerzo se puede iniciar cuando una población de células inmunitarias específicas de antígeno se ha expandido (ha aumentado de número) hasta al menos un 20 % del número máximo de células inmunitarias específicas de antígeno que eventualmente se alcanza; hasta al menos un 30 %; hasta al menos un 40 %; hasta al menos un 50 %; hasta al menos un 60 %; hasta al menos un 70 %; hasta al menos un 80 %; hasta al menos un 90 %; hasta al menos un 95 %; hasta al menos un 99 % del número máximo de células inmunitarias específicas de antígeno que eventualmente se alcanza. Están disponibles calendarios adicionales de vacunas de sensibilización-refuerzo, por ejemplo, la vacunación de refuerzo se puede iniciar cuando la población de células específicas de antígeno se ha contraído hasta por debajo del 90 % del número máximo de células inmunitarias específicas de antígeno; por debajo del 80 %; por debajo del 70 %; por debajo del 60 %; por debajo del 50 %; por debajo del 40 %; por debajo del 30 %; por debajo del 20 %; por debajo del 10 %; por debajo del 5 %; por debajo del 1,0 %; por debajo del 0,5 %; por debajo del 0,1 %; por debajo del 0,05 %; o por debajo del 0,01 % del número máximo de células inmunitarias específicas de antígeno. Las células específicas de antígeno se pueden identificar como específicas de un antígeno específico del vector (específicas de un vector vacío), o específicas de un antígeno heterólogo expresado mediante un ácido nucleico incluido en el vector.

En otros aspectos, la administración de la vacunación de refuerzo se puede iniciar aproximadamente 5 días después de iniciar la vacunación de sensibilización; aproximadamente 10 días después de iniciar la vacunación de sensibilización; aproximadamente 15 días; aproximadamente 20 días; aproximadamente 25 días; aproximadamente 30 días; aproximadamente 35 días; aproximadamente 40 días; aproximadamente 45 días; aproximadamente 50 días; aproximadamente 55 días; aproximadamente 60 días; aproximadamente 65 días; aproximadamente 70 días; aproximadamente 75 días; aproximadamente 80 días, aproximadamente 6 meses, aproximadamente 1 año después de iniciar la vacunación de sensibilización.

La vacunación de refuerzo se puede administrar 5-10 días después de la vacunación de sensibilización; 10-15 días después de la vacunación de sensibilización; 15-20 días después de la vacunación de sensibilización; 20-25 días después de la vacunación de sensibilización; 25-30 días después de la vacunación de sensibilización; 30-40 días después de la vacunación de sensibilización; 40-50 días después de la vacunación de sensibilización; 50-60 días después de la vacunación de sensibilización; 60-70 días después de la vacunación de sensibilización; y así sucesivamente.

El experto en la técnica puede determinar el periodo de tiempo entre el inicio de la vacunación de sensibilización y el inicio de la vacunación de refuerzo. Por ejemplo, se puede basar en un algoritmo que sea sensible a los parámetros fisiológicos medidos tras producirse la inmunización de sensibilización.

La dosificación y el régimen se determinarán, al menos en parte, según la potencia de la modalidad, la administración de la vacuna empleada, la necesidad del sujeto y dependerá del criterio del especialista médico.

Por ejemplo, la Listeria de las vacunas utilizadas en la invención se puede administrar en una dosis, o dosificaciones, donde cada dosis comprende entre  $10^7$  y  $10^8$  Listeria por 70 kg de peso corporal;  $2 \times 10^7$  y  $2 \times 10^8$  de Listeria por 70 kg de peso corporal;  $5 \times 10^7$  y  $5 \times 10^8$  de Listeria por 70 kg de peso corporal;  $10^8$  y  $10^9$  de Listeria por 70 kg de peso corporal; entre  $2,0 \times 10^8$  y  $2,0 \times 10^9$  de Listeria por 70 kg; entre  $5,0 \times 10^8$  y  $5,0 \times 10^9$  de Listeria por 70 kg; entre  $10^9$  y  $10^{10}$  de Listeria por 70 kg; entre  $2 \times 10^9$  y  $2 \times 10^{10}$  de Listeria por 70 kg; entre  $5 \times 10^9$  y  $5 \times 10^{10}$  de Listeria por 70 kg; entre  $10^{11}$  y  $10^{12}$  Listeria por 70 kg; entre  $2 \times 10^{11}$  y  $2 \times 10^{12}$  de Listeria por 70 kg; entre  $5 \times 10^{11}$  y  $5 \times 10^{12}$  Listeria por 70 kg; entre  $10^{12}$  y  $10^{13}$  Listeria por 70 kg; entre  $2 \times 10^{12}$  y  $2 \times 10^{13}$  de Listeria por 70 kg; entre  $5 \times 10^{12}$  y  $5 \times 10^{13}$  de Listeria por 70 kg; y así sucesivamente, peso húmedo. También se proporciona cada una de las dosis anteriores, basada en un área superficial base de 1,7 metros cuadrados, o sobre la base de 1,5 kg de peso de hígado. Debe entenderse que un hígado de ratón, en el momento de administrar la Listeria de la invención, pesa aproximadamente 1,5 gramos. El hígado humano pesa aproximadamente 1,5 kilogramos.

En algunas realizaciones de la invención, la dosis de refuerzo de Listeria potenciará la respuesta inmunitaria de la dosis de sensibilización en al menos dos veces, en momentos, entre aproximadamente tres y cinco veces o de cinco veces a diez veces, o de diez veces a 100 veces o más. En algunas realizaciones de la invención, la dosis de sensibilización y la dosis de refuerzo tendrán un efecto sinérgico en la respuesta inmunitaria. En algunas realizaciones de la invención, la respuesta inmunitaria mejorada incluirá una respuesta de linfocitos T, y en algunas realizaciones, la respuesta de linfocitos T será una respuesta de linfocitos T CD8+. En algunas realizaciones de la invención, la dosis de sensibilización y la dosis de refuerzo alterarán el estado tolerogénico del mamífero respecto del antígeno diana. Se proporcionan a continuación ejemplos de todas estas realizaciones.

7. Métodos para medir la respuesta inmunitaria

Se conocen en la técnica varios ensayos *in vitro* e *in vivo* para medir una respuesta inmunitaria, incluida la medición de las respuestas inmunitarias humorales y celulares, que incluyen, aunque no de forma limitante, los inmunoensayos convencionales, tales como RIA, ensayos ELISA; tinción intracelular; los ensayos con linfocitos T que incluyen, por ejemplo, ensayos de linfoproliferación (activación linfocitaria), ensayos con linfocitos citotóxicos CTL, o sometiendo a ensayo los linfocitos T específicos del antígeno en un sujeto sensibilizado. Dichos ensayos son bien conocidos en la materia. Véase, por ejemplo, Erickson et al., *J. Immunol.* (1993) 151:4189-4199; Doe et al., *Eur. J. Immunol.* (1994) 24:2369-2376. Los métodos recientes para medir la respuesta inmunitaria incluyen la medición de citoquinas intracelulares o la secreción de citoquinas mediante poblaciones de linfocitos T, o mediante la medición linfocitos T específicos de epítipo (por ejemplo, mediante la técnica de los tetrámeros (revisado por McMichael, A.J., y O'Callaghan, C.A., *J. Exp. Med.* 187(9)1367-1371, 1998; Mcheyzer-Williams, M.G., et al., *Immunol. Rev.* 150:5-21, 1996; Lalvani, A., et al., *J. Exp. Med.* 186:859-865, 1997). En las realizaciones ilustrativas divulgadas en el presente documento, se utiliza el ensayo de el enzoinmunoanálisis de transferencia (ELISPOT) para detectar y analizar células individuales que secretan interferón? (IFN-?). Los ensayos ELISPOT IFN-? y sus reactivos están disponibles de BD Biosciences 2350 Qume Drive San Jose, CA, 95131. El ensayo ELISPOT puede detectar células productoras de citoquinas procedentes de poblaciones de linfocitos T activados tanto no expuestos al antígeno como de recuerdo, y deriva su especificidad y sensibilidad utilizando anticuerpos de captura y detección de alta afinidad y la amplificación mediante enzima. Se proporciona más información relativa al uso del ensayo ELISPOT en *J. Immunol. Methods.* 2001, 254(1-2):59. Los modelos animales, por ejemplo, primates no humanos, son conocidos en la técnica. Por ejemplo, el ratón es un modelo aceptado de la respuesta inmunitaria humana. La respuesta de los linfocitos NK de ratón es un modelo aceptado de la respuesta de los linfocitos NK humanos a los tumores. Adicionalmente, los linfocitos T de ratón son un modelo de los linfocitos T humanos, las células dendríticas (DC) de ratón son un modelo de las DC humanas, los linfocitos NKT de ratón son un modelo de los linfocitos NKT humanos, la respuesta innata del ratón es un modelo aceptado de la respuesta innata humana, y así sucesivamente. Los estudios con modelos se divulgan, por ejemplo, para los linfocitos T CD8+, linfocitos T con función de memoria, y linfocitos T efectores con función de memoria (véanse, por ejemplo, Walzer, et al. (2002) *J. Immunol.* 168:2704-2711); los dos subconjuntos de linfocitos NK (véanse, por ejemplo, Chakir, et al. (2000) *J. Immunol.* 165:4985-4993; Smith, et al. (2000) *J. Exp. Med.* 191:1341-1354; Ehrlich, et al. (2005) *J. Immunol.* 174:1922-1931; Peritt, et al. (1998) *J. Immunol.* 161:5821-5824); linfocitos NKT (véanse, por ejemplo, Couedel, et al. (1998) *Eur. J. Immunol.* 28:4391-4397; Sakamoto, et al. (1999) *J. Allergy Clin. Immunol.* 103:5445-5451; Saikh, et al. (2003) *J. Infect. Dis.* 188:1562-1570; Emoto, et al. (1997) *Infection Immunity* 65:5003-5009; Taniguchi, et al. (2003) *Annu. Rev. Immunol.* 21:483-513; Sidobre, et al. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 101:12254-12259); monocitos/macrófagos (Sunderkotter, et al. (2004) *J. Immunol.* 172:4410-4417); los dos linajes de DC (Boonstra, et al. (2003) *J. Exp. Med.* 197:101-109; Donnenberg, et al. (2001) *Transplantation* 72:1946-1951; Becker (2003) *Virus Genes* 26:119-130; Carine, et al. (2003) *J. Immunol.* 171:6466-6477; Penna, et al. (2002) *J. Immunol.* 69:6673-6676; Alferink, et al. (2003) *J. Exp. Med.* 197:585-599). La respuesta innata del ratón, incluidos los receptores de tipo Toll (TLR), es un modelo de la respuesta inmunitaria innata humana, según se divulga (véanse, por ejemplo, Janssens y Beyaert (2003) *Clinical Microb. Revs.* 16:637-646). Los neutrófilos de ratón son un modelo aceptado de neutrófilos humanos (véanse, por ejemplo, Kobayashi, et al. (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100:10948-10953; Torres, et al. (2004) *J. Immunol.* 173:2131-2139; Sibelius, et al. (1999) *Infection Immunity* 67:1125-1130; Tvinnereim, et al. (2004) *J. Immunol.* 173:1994-2002). Las respuestas murinas a *Listeria* son un modelo aceptado de la respuesta humana a *Listeria* (véanse, por ejemplo, Kolb-Maurer, et al. (2000) *Infection Immunity* 68:3680-3688; Brzoza, et al. (2004) *J. Immunol.* 173:2641-2651).

#### 8. Usos del régimen de sensibilización-refuerzo

Los cánceres e infecciones se pueden tratar y/o inhibir mediante la administración de reactivos que modulan el sistema inmunitario. Los métodos de sensibilización-refuerzo abarcados en la divulgación suscitan respuestas inmunitarias que están reguladas en exceso, e incluyen alterar la tolerancia a autoantígenos. Por lo tanto, se espera que estos métodos de sensibilización-refuerzo sean útiles para inhibir el crecimiento de cánceres y/o mejorar uno o más síntomas asociados con el cáncer. También se espera que los métodos de sensibilización-refuerzo sean útiles en la profilaxia o el tratamiento de una enfermedad causada por un agente patógeno.

Además de lo anterior, estos regímenes se pueden usar para determinar si un mamífero será sensible al tratamiento. Por ejemplo, cuando se utiliza un régimen de sensibilización-refuerzo frente a un antígeno específico, si no se consigue obtener una respuesta inmunitaria significativa después del refuerzo sugiere que el mamífero no es sensible frente al antígeno diana, y se debe buscar un modo de tratamiento alternativo. Los ejemplos de esto podrían ser cuando el fondo genético del cáncer o agente patógeno es tal que el antígeno diana está ausente, o está modificado de una forma tal que no muestra reactividad cruzada con el antígeno diana.

#### Ejemplos

Debe entenderse que la presente invención no se limita a los ejemplos particulares divulgados en el presente documento, y que estos pueden variar. También debe entenderse que no se pretende que los ejemplos sean limitantes, ya que el alcance de la presente invención está marcado por las reivindicaciones adjuntas.

Información general sobre los métodos utilizados en los ejemplos



Las respuestas inmunitarias a las vacunas se evaluaron recogiendo esplenocitos, una fuente que proporciona las células del sistema inmunitario, incluidos los linfocitos T y las células dendríticas (DC). Las respuestas inmunitarias específicas de antígeno se midieron incubando los esplenocitos con uno o varios péptidos y midiendo la actividad de las células inmunitarias, donde la actividad se determinó mediante ensayos de tinción intracelular (ICS) y ensayos elispot. En algunos ensayos, solamente se añadió un único péptido, donde el péptido contenía solamente un epítipo de un antígeno tumoral. En otros ensayos, se añadió una biblioteca de péptidos completa, abarcando la longitud completa del antígeno.

Los ensayos ICS implican la permeabilización de los esplenocitos, y su tratamiento con un anticuerpo que se une a las citoquinas que se han acumulado en el interior de la célula inmunitaria, donde el anticuerpo permite un marcado fluorescente. Brefeldina bloquea el transporte de proteínas, y ocasiona la acumulación de citoquinas dentro de la célula inmunitaria.

Los ensayos elispot (enzimoinmunoanálisis de transferencia) son sensibles a las proteínas secretadas, donde las proteínas se secretan durante un periodo de tiempo desde las células inmunitarias que quedan en un pocillo. Se une un anticuerpo de captura al pocillo, que inmoviliza la citoquina secretada. Tras el periodo de secreción, las células se retiran, y se utiliza un anticuerpo de detección para detectar la citoquina inmovilizada. El anticuerpo de captura y el anticuerpo de detección se unen a regiones diferentes de la citoquina. Los detalles metodológicos de los ensayos ICS y elispot se divulgan (véanse, por ejemplo, solicitud de patente de EE.UU. publicada N.º 2005/0249748, publicada el 10 de noviembre de 2005, de Dubensky, et al.).

Cuando el vector administrado contiene un ácido nucleico que codifica la ovoalbúmina, el análisis de cualquier respuesta inmunitaria inducida por medio de ensayos ICS o ELISPOT utiliza un péptido convencional de ovoalbúmina, OVA<sub>257-264</sub> (SIINFEKL (SEQ ID NO:1)), donde el péptido se añade y se incuba con la preparación de esplenocitos.

La secuencia de ácidos nucleicos de la mesotelina humana, usada en las siguientes construcciones, fue la identificada en ENGINEERED LISTERIA AND METHODS OF USE THEREOF, patente de Estados Unidos con N.º de Serie 11/395.197, presentada el 30 de marzo de 2006, asignada a Cerus Corporation. La biblioteca del péptido mesotelina, que abarca la longitud completa de la mesotelina humana, consiste en 153 péptidos, cada uno un 15-mero, donde cada 15-mero solapa el siguiente 15-mero en 11 aminoácidos.

Lm-hMeso38, una construcción de *Listeria monocytogenes* usada en los siguientes ejemplos, se identifica en la Tabla 1. Véase también, ENGINEERED LISTERIA AND METHODS OF USE THEREOF, patente de Estados Unidos con N.º de Serie 11/395.197, presentada el 30 de marzo de 2006. Lm-mMeso es la misma construcción que Lm-hMeso38 salvo que la secuencia de longitud completa de la mesotelina humana está sustituida por la secuencia de longitud completa de la mesotelina de ratón. La secuencia de longitud completa de ratón está disponible con el n.º de registro de GenBank NM\_018857.

Tabla 3. *Listeria monocytogenes*-hMeso38 (Lm-hMeso38).

Cepa (nombre común)	Construcción	Fondo genético	Locus de integración	Promotor unido de manera operativa a un casete de expresión de antígeno	Secuencia secretora (SS)
Lm-hMeso38	ActA-N100-hme so [deltaSS]. Se eliminó la secuencia señal de la secuencia de la mesotelina humana, pero no se eliminó su anclaje GPI. "ActA-N100" son los 100 primeros aminoácidos de ActA, donde los 29 primeros de estos aminoácidos es la secuencia señal.	$\Delta$ actA $\Delta$ inIB	inIB	ActA	ActA-N 100

La preparación de *Listeria monocytogenes* que codifica OVA ("Lm-OVA") fue como se analiza en la Publicación de patente de los EE.UU. N.º 2004/0197343, (patente de Estados Unidos con N.º de Serie 10/773.618).

El vector derivado del virus vaccinia (VV-OVA), que contiene un ácido nucleico que codifica la ovoalbúmina de longitud completa, se preparó y se proporcionó por N.P. Restifo, como se describe (Overwijk, et al. (1998) J. Exp. Med. 188:277-286).

Los vectores basados en adenovirus contienen un ácido nucleico que codifica la mesotelina humana de longitud completa o la mesotelina de ratón de longitud completa (Ad-hMeso o Ad-mMeso). Los vectores Ad de control con incluyen un antígeno heterólogo, también se utilizó lo que se denomina un "vector Ad vacío". Todos los vectores Ad de

control y que codifican antígenos se basaron en un adenovirus serotipo 5 con las regiones E1 y E3 eliminadas, y se derivaron usando el sistema "AdEasy" obtenido de Stratagene (San Diego, CA) y se derivados según los métodos descritos por el proveedor. Los antígenos se clonaron en el locus E1. El ácido nucleico que codifica el antígeno heterólogo se integró en el vector lanzadera AdEasy unido de forma operativa con el promotor CMV.

5 GVAX® se refiere a una célula tumoral inactivada que contiene un ácido nucleico que codifica el factor de estimulación de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF), donde la línea tumoral fue las células CT-26, una línea de células que expresan el gp70. AH1 es un epitopo de gp70, un antígeno inmunodominante de las células CT26. GVAX® (CELL GENESYS, INC.) se preparó y se administró como se divulga (véanse, por ejemplo, Yoshimura, et al. (2006) Cancer Res. 66:1096-1104; Jain, et al. (2003) Annals Surgical Oncol. 10:810-820; Zhou, et al. (2005) Cancer Res. 65:1079-1088; Chang, et al. (2000) Int. J. Cancer 86:725-730; Borrello y Pardoll (2002) Cytokine Growth Factor Rev. 13:185-193; Thomas, et al. (1998) Human Gene Ther. 9:835-843).

15 Lm muerta pero metabólicamente activa ("KBMA-Lm"), se preparó mediante tratamiento de Lm vivas cuyos genes uvrAB se habían eliminado, y cuya expresión en combinación con el producto génico uvrC forma la exonucleasa necesaria para la reparación por escisión de nucleótidos, con psoraleno y luz ultravioleta, dando como resultado una pequeña cantidad de reticulación en el genoma (véanse, por ejemplo, patente de Estados Unidos con N.º de Serie 10/773.618, publicada N.º US 2004/0197343. MODIFIED FREE-LIVING MICROBES, VACCINE COMPOSITIONS AND METHODS OF USE THEREOF, de Dubensky, et al.; Brockstedt, et al. (2005) Nature Med. 11:853-860).

20 Ejemplo 1

Ratones C57BL/6 (3 por grupo) se inmunizaron el día 0 bien con  $1 \times 10^6$  ufp de virus vaccinia ("VV") que codifica OVA o con  $5 \times 10^6$  ufc de Listeria monocytogenes recombinante ("Lm") de la que se ha eliminado actA y los determinantes de la virulencia inlB virulence y que codifica OVA. El día 21, los ratones recibieron una dosis de refuerzo de VV o Lmat que en cada caso fue equivalente a las dosis de inmunización de sensibilización. Los ratones se sacrificaron, y los esplenocitos se recogieron el día 27. Para evaluar la magnitud de los linfocitos T CD8+ específicos de OVA inducidos por la vacuna después de una sola inmunización, los ratones del control recibieron una única inmunización con VV o Lm el día 20 y se sacrificaron y los esplenocitos se recogieron el día 27. Las respuestas de los linfocitos T CD8+ específicos de OVA se determinaron usando el péptido OVA<sub>257-264</sub> en ensayos ISC.

Las respuestas inmunitarias de los linfocitos T CD8+ específicos de OVA resultantes de los regímenes de sensibilización-refuerzo se muestran en la Fig. 1A. Como se observa en la figura, un régimen de sensibilización-refuerzo que utiliza una sensibilización con VV y un refuerzo con Lm produce casi una duplicación del porcentaje de linfocitos CD8+ específicos de OVA cuando se compara con una sensibilización con Lm/refuerzo con VV. Además, el porcentaje de linfocitos CD8+ específicos de OVA en la sensibilización con VV / refuerzo con Lm es aproximadamente 3 veces mayor que una sensibilización con Lm/refuerzo con Lm homólogo, y aproximadamente 9 veces mayor que una sensibilización VV/refuerzo VV homólogo. Estos datos proporcionan evidencias de direccionalidad en el régimen de sensibilización-refuerzo, donde se obtienen resultados mejores con un sistema que utiliza un refuerzo con Lm.

40 Ejemplo 2

Ratones Balb/c, con 3 ratones por grupo, recibieron el día 0 una inyección de  $3 \times 10^7$  ufp adenovirus ("AV" o "adeno-hMeso") que codifica la mesotelina humana o con  $5 \times 10^6$  ufc LmAactA/AinlB que codifica la mesotelina humana ("Lm-hMeso38"). El día 21, los ratones recibieron una dosis de refuerzo de AV o Lm-hMeso38 que en cada caso fue equivalente a las dosis de inmunización de sensibilización. Los ratones se sacrificaron, y los esplenocitos se recogieron el día 27. Para evaluar la magnitud de los linfocitos T CD8+ específicos de OVA inducidos por la vacuna después de una sola inmunización, los ratones del control recibieron solamente el AV o Lm-hMeso38 el día 20 y se sacrificaron y los esplenocitos se recogieron el día 27.

En la Fig. 1B se muestran las respuestas inmunitarias celulares de CD4+ y CD8+ específicas de mesotelina humana inducidas por la vacuna, resultantes de los regímenes de sensibilización-refuerzo. La sensibilización AV/refuerzo hMeso38 proporcionó una magnitud aproximadamente 10 veces mayor del porcentaje de linfocitos CD8+ esplénicos específicos de la mesotelina humana ("hMeso"), en comparación con el grupo de ratones que recibieron un régimen de sensibilización Lm/refuerzo AV, lo que demuestra tanto que la direccionalidad del régimen de refuerzo heterólogo afecta la magnitud de la inmunidad celular específica inducida por la vacuna para el antígeno codificado, y que se obtienen resultados mejores con un sistema que utiliza un refuerzo con Lm.

60 Ejemplo 3

Ratones Balb/c (3 por grupo) recibieron dosis de sensibilización y dosis de refuerzo para suscitar una respuesta inmunitaria contra la mesotelina humana. El régimen de sensibilización y refuerzo fue el indicado en la Figura 2, usando los vectores indicados que codifican, todos ellos, la mesotelina humana. Como se puede observar en los resultados de los ensayos ICS, un régimen de sensibilización AV/refuerzo Lm proporcionó un porcentaje de 3 a 4 veces mayor de linfocitos CD8+ específicos de mesotelina humana de lo que se consiguió con una sensibilización

Lm/refuerzo Av. Además, los resultados de la Figura 2 también muestran que la sensibilización AV/refuerzo Lm fue significativamente mayor que cualquiera de los otros regímenes de sensibilización-refuerzo heterólogos sometidos a ensayo.

#### 5 Ejemplo 4

Se analizó el efecto de diferentes dosis de sensibilización AV con un refuerzo constante de Lm en la sensibilización AV/refuerzo Lm heterólogo sobre la magnitud de la inmunidad de linfocitos T CD4+ y CD8+ esplénicos específicos de hMeso. Todos los vectores codificaban la mesotelina humana. Se usó HBSS como a control. El régimen de sensibilización y refuerzo usado fue el indicado en la Fig. 3A, donde cada cohorte experimental se compone de tres ratones C57BL/6. En dichos estudios, los esplenocitos obtenidos de los ratones inmunizados se estimularon durante 5 horas con una biblioteca combinatoria de péptido mesotelina compuesta por péptidos de 15 aminoácidos de longitud desplazados en 4 aminoácidos ("biblioteca 15 x 11") correspondientes a la proteína mesotelina de longitud completa antes de ICS. Las respuestas inmunitarias celulares específicas de la mesotelina humana resultantes de la titulación de AV en los regímenes de sensibilización-refuerzo se muestran en la Fig. 3A. Como se observa en la figura, se obtuvo una mejora significativa en las respuestas de linfocitos T específicos para las cantidades más elevadas de AV, y la respuesta de los linfocitos T CD8+ fue mayor que la de los CD4+.

#### 20 Ejemplo 5

Se utilizó un protocolo de inmunización similar al usado en el Ejemplo 4 con ratones Balb/c (véase la Fig. 3B), salvo que el tiempo entre la sensibilización y el refuerzo fue de 38 días, y los ratones del control se inmunizaron con Lm hMeso 38, pero no se cebaron con AV. Como se observa en la Fig. 3B, la mejora significativa en la respuesta de los linfocitos T específicos se produjo para un mayor intervalo de cantidades de AV, y de nuevo, la respuesta de los linfocitos T CD8+ fue mayor que la de los CD4+. En ratones Balb/c, para dosis de sensibilización con AV incluso de  $1 \times 10^4$  ufp se indujeron niveles sustanciales de linfocitos T CD8+ específicos de hMeso tras el refuerzo con  $5 \times 10^6$  ufc de Lm hMeso 38.

#### 30 Ejemplo 6

Se analizó la eficacia de una sensibilización AV/refuerzo Lm en presencia de una inmunidad ya existente a AV. En el primer estudio, la sensibilidad a la inmunización con AV en presencia de una inmunidad específica de adenovirus ya existente se sometió a ensayo usando el protocolo mostrado en la Fig. 4A. La inmunidad específica de adenovirus ya existente se consiguió inmunizando ratones con diferentes niveles de "vector Ad vacío", como se muestra en la figura, 28 días antes de la inmunización con AV que codifica la mesotelina humana. El estudio usó 5 ratones Balb/C por grupo. Los ratones recibieron el día 0 una inyección de partículas Ad vacías y posteriormente, el día 28, con AV que codifica la mesotelina humana ("Ad-hMeso"). Los esplenocitos se recogieron el día 35 y se usaron en ensayos ICS. Los vectores Ad-vacío y Ad-hMeso fueron ambos de serotipo 5. La respuesta inmunitaria específica de mesotelina se midió estimulando los esplenocitos con una combinación de péptido de la mesotelina humana; se midieron las respuestas específicas de AV usando el epítipo Hex3 de clase I. Los resultados mostrados en la Fig. 4A indican que, en presencia de una inmunidad celular específica de Ad5 ya existente, solamente se puede inducir una respuesta específica de hMeso baja cuando los ratones se inmunizaron con el mismo vector Ad5 que codifica la mesotelina humana.

45 El segundo estudio analizó la respuesta inmunitaria celular específica de hMeso tras un régimen de sensibilización AV/refuerzo Lm en ratones con una inmunidad AV ya existente (mostrado como la cantidad de ufp de AV administrada en el eje X de la Fig. 4B). El protocolo utilizado (mostrado en la Fig. 4B) fue similar al utilizado para someter la sensibilización a ensayo, salvo que 20 días después de la sensibilización con AV, los ratones recibieron un refuerzo con Lm-hMeso38, y en lugar de medir la respuesta inmunitaria de los linfocitos T específicos de AV, se determinaron los anticuerpos neutralizantes específicos de AV mediante un ensayo de reducción de placas. Los resultados de la Fig. 4B cuando se compara con la Fig. 4A muestran que, a pesar de la existencia de una inmunidad neutralizante ya existente para el AV serotipo5, la combinación de un refuerzo de Lm hMeso38 tras una sensibilización con AV dio como resultado la inducción de un aumento significativo en la inmunidad celular específica de hMeso.

#### 55 Ejemplo 7

Se realizó una sensibilización/refuerzo heterólogo usando una sensibilización con células tumorales y refuerzo con Lm de la siguiente forma. El régimen usó GVAX® (CELL GENESYS, INC.) para sensibilización con refuerzo de Lm-AH1-A5. GVAX refiere a una célula tumoral inactivada que contiene un ácido nucleico que codifica el factor de estimulación de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF). La Listeria monocytogenes administrada fue Lm- $\Delta$ actA-OVA-AH1-A5. Lm- $\Delta$ actA-OVA-AH1-A5 es una Listeria monocytogenes recombinante, atenuada mediante la delección del gen actA, y que contiene una sola copia de un casete de expresión de antígeno en el genoma de Listeria, integrado en el locus ARMt<sup>Arg</sup>, donde el casete de expresión contiene la AH1-A5 insertada en marco dentro de la ovoalbúmina (Brockstedt, et al. (2004) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101:13832-13837). AH1-A5, es el ligando de linfocitos T alterado del epítipo AH1 L<sup>d</sup> inmunodominante del antígeno de rechazo endógeno gp70 expresado por la línea celular de adenocarcinoma CT26, y que se utiliza habitualmente en estudios de respuesta inmunitaria a

antígenos tumorales, gp70 (Slansky, et al. (2000) *Immunity* 13:529-538; Jain, et al. (2003) *Annals Surgical Oncol.* 10:810-820).

- 5 Para la sensibilización/refuerzo heterólogo, 3 ratones de cada grupo recibieron GVAX® (CELL GENESYS, INC.) ( $1 \times 10^6$  células) (s.c.) como sensibilizador y Lm-OVA-AH1-A5 ( $5 \times 10^6$  ufc) (i.v.) como refuerzo. Para vacunas de sensibilización/refuerzo homólogo con GVAX, los ratones recibieron a GVAX® (CELL GENESYS, INC.) como sensibilizador ( $1 \times 10^6$  células) (s.c.), tanto para la sensibilización como para el refuerzo. Para vacunas de sensibilización/refuerzo homólogo con Lm solamente, Los ratones recibieron LM-OVA-AH1-A5 ( $5 \times 10^6$  ufc) (i.v.), tanto para la sensibilización como para el refuerzo. Se realizaron ensayos clínicos de sensibilización/refuerzo homólogo independientes, donde Lm solamente se administró s.c., i.m., o i.v. En todos los casos, la sensibilización se administró a  $t = 0$  días, el refuerzo a  $t = 21$  días, y los esplenocitos se recogieron a  $t = 29$  días. Los ratones también se trataron con una sola administración de monovacuna (GVAX® (CELL GENESYS, INC.) solamente; Lm-OVA-AH1-A5 solamente), como se indica en la figura.
- 10
- 15 Los resultados indican que GVAX® (CELL GENESYS, INC.) como sensibilizador seguido por Lm- $\Delta$ actA-OVA-AH1-A5 como refuerzo suscitó respuestas inmunitarias específicas de AH1 mayores que cualquier régimen de inmunización de sensibilización/refuerzo homólogo mediante cualquiera de las vías de administración.

#### 20 Ejemplo 8

Una comparación de sensibilización AV/refuerzo Lm con células dendríticas ("DC") se llevó a cabo de la siguiente forma. Se usaron ratones Balb/c, 5 ratones por grupo. Las células dendríticas se administraron en la cantidad de  $2 \times 10^6$  células dendríticas (i.v.). Un vector derivado de adenovirus que contiene un ácido nucleico que codifica la mesotelina humana se administró a dosis de  $1 \times 10^8$  ufc (i.m.). Lm-hMeso38 se administró en la cantidad de  $5 \times 10^6$  ufc (i.v.). DC pulsadas con péptido se administraron a una dosis de  $2 \times 10^6$  DC (i.v.). Las inmunizaciones de sensibilización y refuerzo con DC y Lm se realizaron con 8 días de diferencia, y las inmunizaciones de sensibilización y refuerzo con AV y Lm se realizaron con 14 días de diferencia. En todos los ratones, los linfocitos T CD8+ esplénicos específicos de mesotelina 131-139 se midieron en los días posteriores a la inmunización de refuerzo con Lm hMeso 38. Los controles fueron como se indica en la Fig. 6A y la FIG. 6B.

30 Las DC pulsadas con péptido se prepararon de la siguiente forma. Las DC se pulsaron con hMeso<sub>131-139</sub> (SGPQACTRF). Las DC se prepararon a partir de médula ósea completa de ratones Balb/c usando concentraciones altas de GM-CSF (20 ng/ml de GM-CSF murino) (R&D Systems, Minneapolis, MN). El día 8 después de la siembra en placas inicial y enriquecimiento con GM-CSF, se recogieron las células no adherentes, y se verificó fenotípicamente que eran células dendríticas mieloides (CD11c<sup>hi</sup>). Las DC se trataron con lipopolisacárido (LPS) (24 h) y se pulsaron con 1,0 micromolar de péptido hMeso (<sub>131-139</sub>) (0,001 mM) durante 1 h. Las DC cargadas de péptido se lavaron dos veces, antes de inyectar  $1 \times 10^6$  DC en ratones Balb/c receptores.

40 Los resultados de los ensayos ICS presentados en la Fig. 6A demuestran que la sensibilización/refuerzo heterólogo con DC-hMeso131-139 como sensibilizador y Lm-hMeso38 como refuerzo, y la sensibilización heterólogo con Adeno-hMeso como sensibilizador y Lm-hMeso38 como refuerzo, indujeron, cada uno de ellos, respuestas inmunitarias celulares específicas de mesotelina, donde el nivel de respuesta inmunitaria fue aproximadamente el mismo para ambos regímenes de sensibilización/refuerzo.

45 Los resultados de los ensayos Elispot, mostrados en la Fig. 6B, demuestran que la sensibilización/refuerzo heterólogo con DC-hMeso131-139 como sensibilizador y Lm-hMeso38 como refuerzo, y la sensibilización heterólogo con Adeno-hMeso como sensibilizador y Lm-hMeso38 como refuerzo, indujeron, cada uno de ellos, respuestas inmunitarias celulares específicas de mesotelina, donde el nivel de respuesta inmunitaria fue aproximadamente el mismo para ambos regímenes de sensibilización/refuerzo.

#### 50 Ejemplo 9

Una comparación de Lm, AV, y VV como refuerzo tras una sensibilización con DC se llevó a cabo de la siguiente forma. En el día 0, ratones Balb/c (cinco por grupo) se vacunaron por vía intravenosa con  $1 \times 10^6$  células dendríticas derivadas de médula ósea (sensibilizador). Las DC se prepararon como se describe en el Ejemplo 8. A los 21 días, los ratones recibieron un refuerzo, donde el refuerzo fue uno de los siguientes: Lm-hMeso38 ( $5 \times 10^6$  cfu, i.v.), Ad-hMeso ( $1 \times 10^7$  ufp, i.m.) o virus vacuna-hMeso ("W-hMeso") ( $1 \times 10^6$  ufp, i.p.). Un grupo independiente de ratones recibió HBSS en lugar de la vacuna de refuerzo. Las respuestas de linfocitos T CD8+ específicas de Meso<sub>131-139</sub> se determinaron mediante tinción de citoquinas intracelulares (ICS) cinco días después de la vacunación de refuerzo.

60 Los resultados mostrados en la Fig. 6C indican que, aunque el AV-hMeso dio lugar a un refuerzo significativo de la respuesta de linfocitos específicos de hMeso, se consiguió un resultado aproximadamente cinco veces mayor usando Lm como agente de refuerzo.

#### 65 Ejemplo 10

Se llevó a cabo una comparación de AV y ADN puro como sensibilizador en un régimen de sensibilización/refuerzo heterólogo usando Lm como refuerzo. Además, la mesotelina de ratón se sustituyó por la mesotelina humana para determinar si era posible alterar la tolerancia con el régimen de sensibilización-refuerzo heterólogo. En el estudio, se usaron ratones Balb/c. Se administraron vacunas heterólogas con sensibilizador ADN/refuerzo Lm y sensibilizador Ad/refuerzo Lm, con evaluación de la respuesta inmunitaria específica de mesotelina usando la biblioteca de péptido mesotelina completa. La sensibilización ADN/refuerzo Lm fue una sensibilización con ADN-mMeso (0,1 mg) (i.m.) y refuerzo con Lm-mMeso38 ( $5 \times 10^6$  ufc) (i.v.) (Fig. 7A). La sensibilización Ad/refuerzo Lm fue una sensibilización con Ad-mMeso ( $1 \times 10^8$  ufp) (i.m.) y refuerzo con Lm-mMeso38 ( $5 \times 10^6$  ufc) (i.v.) (Fig. 7B). El vector de ADN puro, ADN-mMeso, se preparó de la siguiente forma. Un ácido nucleico que codifica la mesotelina de longitud completa se insertó en pCDNA3, un vector de expresión eucariota (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA).

La sensibilización se administró a día 0. El refuerzo a los 13 días, y los esplenocitos se recogieron a los 18 días. Los esplenocitos recogidos se trataron con péptidos de la biblioteca peptídica de mesotelina de ratón ("mMesotelina"), donde se añadió un solo péptido a cada pocillo que contenía esplenocitos, y donde se evaluó la respuesta inmunitaria mediante ensayos Elispot. Se utilizaron pocillos con esplenocitos procedentes de ratones inmunizados suficientes de tal forma que los péptidos únicos (15 aminoácidos de longitud, desplazados por 4 aminoácidos) que cubrían la longitud completa de la proteína mesotelina de ratón pudieran utilizarse, permitiendo la identificación de los linfocitos T reactivos a los péptidos de la mesotelina de ratón.

Los resultados de la Fig. 7A indican que, cuando la respuesta inmunitaria se evalúa independientemente para cada péptido de la biblioteca mMesotelina, la sensibilización ADN-mMeso/refuerzo Lm-mMeso38 suscitó relativamente poca respuesta inmunitaria. En contraste, los resultados de la Fig. 7B indican que la sensibilización Ad-mMeso/refuerzo Lm-mMeso38 indujo una respuesta inmunitaria relativamente elevada a los péptidos de la mesotelina de ratón con números 278, 279, y 280, procedentes de la biblioteca peptídica de mesotelina de ratón. Se observó una respuesta inmunitaria relativamente baja para el resto de péptidos utilizados de la biblioteca peptídica de mesotelina de ratón. La Fig. 7C es una fotografía de los pocillos, donde los esplenocitos estaban expuestos a los péptidos de la mesotelina de ratón con números 278, 279, o 280, y donde la fotografía ilustra las manchas de los ensayos elispot. Por lo tanto, los resultados mostrados en la Fig. 7B y la Fig. 7C demuestran que el régimen de sensibilización AV/refuerzo Lm da como resultado una respuesta inmunitaria celular a mMesothelin. Además, los resultados también indican la alteración de la tolerancia contra el antígeno de mesotelina endógeno en ratones a los que se había administrado un régimen de inmunización de sensibilizador-refuerzo compuesto por vectores Av y Lm, donde ambos vectores codifican la mesotelina de ratón.

#### Ejemplo 11

Se evaluó la eficacia de Lm KBMA como agente de sensibilización y/o agente de refuerzo. Ratones C57BL/6 (3 por grupo) recibieron Lm KBMA como sensibilizador en el día 0. El día 14 se administró un refuerzo de uno de los siguientes: Lm "viva", Lm KBMA, o VV. El día 14 también se administraron controles de Lm KBMA y Lm viva. Los ratones se sacrificaron el día 19, y los esplenocitos se recogieron.

Las construcciones de Listeria tienen un promotor hly unido de manera operativa a una secuencia secretora BaPA y a ovoalbúmina, con integración genómica en el locus ARNtArg.

El número de Listeria monocytogenes KBMA  $\Delta$ actA $\Delta$ uvrAB-OVA (KBMA Lm) inyectadas fue de  $3 \times 10^8$  partículas bacterianas. Las Lm KBMA se habían tratado previamente con psoraleno y luz UV. La cantidad administrada de Listeria monocytogenes "vivas" (Lm- $\Delta$ actA $\Delta$ uvrAB-OVA) fue  $1 \times 10^6$  ufc. El número de vector derivado de virus vaccinia administrado (VV-OVA) fue  $1 \times 10^6$  ufp.

La respuesta inmunitaria se determinó pulsando esplenocitos con péptido usando un péptido octapéptido convencional derivado de la ovoalbúmina (OVA<sub>257-264</sub>) y midiendo la respuesta inmunitaria específica de ovoalbúmina mediante ensayos de tinción intracelular (ICS) para IFN- $\gamma$ .

Como se observa en los resultados, mostrados en la Fig. 8, Lm KBMA fue activo como agente de sensibilización. La sensibilización con Lm KBMA y refuerzo con Lm suscitó el mayor nivel de respuesta inmunitaria, y los niveles menores de respuesta inmunitaria se produjeron para la vacuna heteróloga de sensibilización con Lm KBMA y refuerzo con VV.

#### Ejemplo 12

Quince ratones Balb/c por grupo se vacunaron por vía intramuscular con  $1 \times 10^8$  ufp de adenovirus vacío (es decir, adenovirus que no expresa AH1, AH1/A5, o mMesotelina) o un adenovirus que expresa AH1/A5 o mesotelina murina (mMesotelina). 21 días después los ratones recibieron refuerzo por vía intravenosa con  $5 \times 10^6$  ufc de Lm que no codificaba un antígeno heterólogo o Lm que expresa AH1/A5 o mMesotelina. AH1/A5 se describe (véanse, por ejemplo, Brockstedt, et al. (2004) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101:13832-13837). Los bazos de cinco ratones por grupo se recogieron después de cinco días para evaluar las respuestas inmunitarias a AH1/A5 (Fig. 9A) y mMesotelina (Fig. 9B). Una semana después de la vacunación de refuerzo, los restantes ratones se estimularon con  $4 \times 10^5$  células CT-26 por vía intravenosa. Se controló la supervivencia de los ratones (Fig. 9C). En las Figs. 9A-9C, "Ad" denota adenovirus

vacío, "Lm" denota L. monocytogenes que no codificaba un antígeno heterólogo, "Ad-AH1/A5" denota adenovirus que expresa AH1/A5, "Ad-mMeso" denota adenovirus que expresa mesotelina murina, "Lm-AH1/A5" denota L. monocytogenes que codifica AH1/A5, y "Lm-mMeso" denota L. monocytogenes que codifican mesotelina murina.

5 Tal como se muestra en la Fig. 9A, la sensibilización/refuerzo con Ad-AH1/A5 como sensibilizador y Lm-AH1/A5 como refuerzo dio como resultado una respuesta inmunitaria de linfocitos T CD8+ específicos de antígeno notable, según los ensayos ICS. El péptido AH1 y el péptido AH1/A5 se derivan de gp70, una proteína endógena de las células tumorales CT26. Las mezclas de incubación de esplenocitos se complementaron con péptido AH1 o péptido AH1/A5, como se indica. Gp70 es una proteína endógena de CT-26. La respuesta inmunitaria de linfocitos T CD8+ fue mayor cuando los  
10 esplenocitos se incubaron con el péptido AH1/A5 añadido, y menores con el péptido AH1 añadido.

La especificidad de la respuesta inmunitaria se demostró de la siguiente forma. La sensibilización/refuerzo con un adenovirus vacío y Lm que no codifica un Ag heterólogo no dio como resultado una respuesta inmunitaria de linfocitos T CD8+. Asimismo, la sensibilización/refuerzo con vectores que expresaban mesotelina murina no dio como resultado  
15 una respuesta inmunitaria de linfocitos T CD8+ específica de AH o AH1/A5 detectable, demostrando de nuevo la especificidad de la respuesta inmunitaria (Fig. 9A).

Los datos mostrados en la Fig. 9B demuestran la estimulación de sensibilización/refuerzo estimulación de la respuesta inmunitaria contra otro antígeno heterólogo, concretamente mesotelina, y que la respuesta inmunitaria era específica de dicho antígeno. La especificidad se demostró mediante el fallo de la sensibilización con Ad vacío y refuerzo con Lm (que no codifica Ag heterólogo), o sensibilización Ad AH1/A5/refuerzo Lm AH1/A5, para estimular una respuesta  
20 inmunitaria de linfocitos T CD8+ específica de mMesotelina.

Los datos mostrados en la Fig. 9C demuestran que la sensibilización Ad-AH1/A5/refuerzo Lm-AH1/A5 aumenta la supervivencia al estímulo con células tumorales CT26. La imagen también demuestra que la sensibilización Ad-mMeso/refuerzo Lm-mMeso aumenta la supervivencia al estímulo con células tumorales CT26. El tratamiento de sensibilización-refuerzo con vectores vacíos (Ad vacío; Lm que no codifica Ag heterólogo) no altera la supervivencia, en comparación con el tratamiento con HBSS (Fig. 9C).

### 30 Ejemplo 13

El agente en investigación, CRS-207, consiste en una cepa atenuada viva de la bacteria intracelular Listeria monocytogenes (LM) que codifica un antígeno tumoral de mesotelina (Lm  $\Delta$ actA/ $\Delta$ inlB/hMeso). La administración de CRS-207 pretende inducir respuesta antitumoral mediante la inducción de una inmunidad medida por células (CMI) dirigida contra mesotelina expresada en la superficie celular de cánceres tales como mesotelioma maligno, carcinoma  
35 de pulmón no microcítico ("NSCLC"), y carcinomas de páncreas y ovario. CRS-207 se derivó eliminando las secuencias de codificación completas de dos genes determinantes de la virulencia del genoma de Lm de tipo natural. Los productos de los dos genes determinantes de virulencia, inlB y actA, facilitan la invasión con Lm de células no fagocíticas y la diseminación de una célula a otra, respectivamente. La delección combinada de estas dos secuencias de codificación produce una atenuación de más de 1.000 veces, según se determina mediante ensayo de virulencia en ratones. Sin embargo, la captación de CRS-207 por macrófagos y otras células fagocíticas en el hígado y el bazo se retiene, y da como resultado una respuesta inflamatoria localizada y la activación y el reclutamiento hacia el hígado de células inmunitarias efectoras tales como linfocitos citotóxicos naturales (NK) y linfocitos T. Tras la captación de CRS-207 por las células fagocíticas (incluidos DC y macrófagos), la mesotelina se expresa y se libera al  
45 compartimento citosólico y posteriormente se procesa mediante la ruta de presentación endógena MHC de clase I, dando como resultado la activación de la inmunidad mediada por células(CMI) contra mesotelina. Otros mecanismos para activar la CMI específica de mesotelina pueden incluir la captación y presentación cruzada de antígenos mediante APC derivadas de macrófagos y/o otros tipos celulares tras infección con CRS-207 y apoptosis.

50 CRS-207 se formuló en dos concentraciones: Alta dosis y baja dosis. Se seleccionaron dos concentraciones para facilitar la preparación de la gama de dosis prevista en el estudio clínico. Véanse las Tablas 1a y 1b para las formulaciones de los agentes en investigación CRS-207.

Tabla 1a CRS-207 Formulación en dosis alta

Componente	Concentración
Listeria monocytogenes ( $\Delta$ actA/ $\Delta$ inlB cepa hMeso38) atenuada	5x10 <sup>10</sup> ufc/ml
Suero salino tamponado con fosfato de Dulbecco, que contiene:	
Cloruro sódico, USP	8 g/l
Cloruro de potasio, USP	0,2 g/l
Fosfato de sodio dibásico, USP	1,15 g/l
Fosfato de potasio monobásico, NF/FCC/EP/BP	0,2 g/l

Glicerol, USP	9 % (v/v)
---------------	-----------

Tabla 1b CRS-207 Formulación en dosis baja

Componente	Concentración
Listeria monocytogenes ( $\Delta$ actA $\Delta$ inlB cepa hMeso38) atenuada	1X10 <sup>8</sup> ufc/ml
Suero salino tamponado con fosfato de Dulbecco, que contiene:	
Cloruro sódico, USP	8 g/l
Cloruro de potasio, USP	0,2 g/l
Fosfato de sodio dibásico, USP	1,15 g/l
Fosfato de potasio monobásico, NF/FCC/EP/BP	0,2 g/l
Glicerol, USP	9 % (v/v)

5 El CRS-207 se almacenó a -75 °C o por debajo de esa temperatura. Consiste en *Lm* atenuadas suspendidas en 1,5 ml de suero salino tamponado con fosfato de Dulbecco (DPBS) y un 9 % v/v de glicerol. Cada vial de dosis alta tiene una concentración de 5x10<sup>10</sup> ufc/ml y cada vial de dosis baja tiene una concentración de 1x10<sup>8</sup> ufc/ml.

10 El CRS-207 se suministró a sujetos humanos (>18 años de edad) con carcinoma de ovario o páncreas avanzado, cáncer de pulmón no microcítico o mesotelioma maligno sin resultados con tratamiento convencional o que no eran candidatos para el tratamiento convencional. Los sujetos cumplían los siguientes criterios de inclusión para su inscripción en el estudio:

15 Mesotelioma maligno, adenocarcinoma de páncreas, o carcinoma de pulmón no microcítico (NSCLC) que expresa mesotelina o carcinoma de ovarios documentado de forma histológica o citológica, con un fracaso terapéutico o no adecuados para el tratamiento convencional

Puntuación de desempeño ECOG de 0-1 o estado de desempeño Karnofsky (KPS) de 80 % al 100 %

20 Esperanza de vida prevista superior a la duración del estudio

25 Los sujetos femeninos en edad fértil y todos los sujetos masculinos deben consentir en utilizar un método anticonceptivo médicamente aceptable muy eficaz a lo largo del periodo de estudio y en los 28 días posteriores a la administración oral de CRS 207 (anticonceptivo hormonal oral, condón más espermicida, o implantes hormonales) para todos los sujetos. Se debería incluir un método anticonceptivo de barrera, independientemente del resto de métodos.

El sujeto proporciona el consentimiento informado y desea, y puede, cumplir con todos los procedimientos del estudio.

30 La función orgánica adecuada se define de la siguiente forma:

Hematología

35 Plaquetas > 100x10<sup>9</sup>/l

Hemoglobina >9,0 g/dl

Recuento sanguíneo total, WBC >3,5 x10<sup>9</sup>/l

40 ANC>1,5x10<sup>9</sup>/l

Recuento linfocitario total > 0,8 x 10<sup>9</sup>/l

45 PT/INR y PTT <1,3x límite superior normal del laboratorio clínico

Hepático

Bilirrubina <1,5 x límite superior normal del laboratorio clínico

50 AST y ALT <2,5 x límite superior normal del laboratorio clínico (<3,5 x límite superior normal del laboratorio clínico es aceptable para pacientes con adenocarcinoma pancreático)

GGT <5x límite superior normal del laboratorio clínico

Fosfatasa alcalina <2,5 x límite superior normal del laboratorio clínico

5

Renal

Creatinina sérica <1,5 x límite superior normal del laboratorio clínico

10 Además, el sujeto no debe tener ninguno de los siguientes criterios de exclusión:

Metástasis conocida al sistema nervioso central.

15

Antecedentes de listeriosis o vacunación con una vacuna basada en listeria.

Alergia conocida a la penicilina.

20

Cardiopatía clínicamente significativa (tal como angina incontrolada, infarto de miocardio en los 3 meses anteriores, insuficiencia cardíaca congestiva según la New York Heart Association III o IV).

Los individuos con cardiopatía valvular que requieren profilaxis antibiótica para la prevención de endocarditis, coherente con las directrices de la AHA (Dajani et al. Circulation, 1999).

25

Saturación de O<sub>2</sub> <92 % del aire ambiental, medida con un oxímetro de pulso

Los sujetos del estudio que tienen o se sospecha que tienen la función pulmonar alterada, en función de los antecedentes y la exploración física, no son candidatos para el estudio salvo que los valores de VC, DLCO, y FEV<sub>1</sub> documenten >60 % del valor previsto.

30

Enfermedad autoinmunitaria activa clínicamente significativa, o antecedentes de enfermedad autoinmunitaria que requiera tratamiento sistémico.

Resultados de laboratorio clínico correspondientes a anomalías metabólicas o de laboratorio de Grado 3 o 4 de la escala CTCAE.

35

Cirrosis hepática o ascitis clínicamente relevantes o individuos que tienen un considerable riesgo de ictericia obstructiva (por ejemplo, debido a una compresión del hilio hepático por la masa tumoral).

40

Articulación artificial (protésica) u otro implante o dispositivos artificiales que no se puedan retirar con facilidad. Los implantes dentales y los implantes mamarios están permitidos si no hay antecedentes de infección de los implantes ni tampoco ningún evento adverso clínicamente significativo asociado con los implantes.

Trastorno de coagulación conocido o tratamiento con medicación anticoagulante

45

Pacientes que necesiten transfusiones regulares con una frecuencia mayor de dos veces al mes.

Transfusión sanguínea en los cuarenta días anteriores al inicio del estudio, salvo que sea leucorreducida e irradiada.

50

Cualquier patología de inmunodeficiencia o estado inmucomprometido (por ejemplo, uso de agentes inmunosupresoras; quimioterapia o radioterapia en los 28 días anteriores a la administración de CRS 207 o planificada en los 28 días posteriores a la administración de CRS 207).

55

Uso de esteroides sistémicamente activos durante más de 2 días, en los 28 días anteriores a la administración de CRS 207 o planificada durante el estudio después de la administración de CRS 207. Uso de cualquier esteroide sistémico en los 14 días anteriores a la administración de CRS 207.

Los sujetos femeninos que están embarazadas o en periodo de lactancia. Los sujetos femeninos en edad fértil deben tener un ensayo de la β-hCG negativo (suero u orina).

60

Antecedentes de alcoholismo o uso de drogas ilícitas que podrían interferir con el seguimiento de los procedimientos requisitos del estudio (por ejemplo, opiáceos, cocaína, anfetaminas, alucinógenos, etc.)

Los sujetos se trataron con CRS 207 administrado por vía intravenosa durante 2 horas. La dosis aumentó en cada grupo de dosis sucesivas tal como se muestra en la tabla, a continuación:

Cohorte de Dosis (ufc)



## ES 2 613 630 T3

1	$1 \times 10^8$
2	$1 \times 10^9$
3	$1 \times 10^{10}$
4	$3 \times 10^{10}$

Durante la parte de escalado de dosis del estudio, el CRS-207 se administrará en intervalos de 21 días entre las dosis.

Los sujetos se agruparon entre los sujetos que tenían una supervivencia > 15 meses después de la primera dosis con CRS 207 y los que tenían una supervivencia < 15 meses después de la primera administración de CRS 207. La siguiente tabla muestra la demografía de ambos grupos:

5

	Supervivencia > 15 meses	supervivencia < 15 meses
Edad en el momento del consentimiento (media±SD)	59,8 ± 3,2	62 ± 8,4
Raza	100 % Caucásico	100 % Caucásico
Etnicidad	100 % No hispano o latino	100 % No hispano o latino
Sexo	25 % Varón 75 % Mujer	55 % Varón 45 % Mujer
% de sujetos que cumplen todos los criterios de	50 %	82 %
Tipo de cáncer	50 % Pancreático 33 % NSCLC 17 % Mesotelioma	36 % Pancreático 36 % Mesotelioma 18 % Ovario 9 % NSCLC
% de sujetos con estado ECOG 0 antes del inicio	83 %	36 %
# de tratamientos anteriores (media ±SD)	4,0 ± 0,7	3,5 ± 2,5
# de sujetos. Por cohorte:		
1x10 <sup>8</sup> UFC	3	3
1X10 <sup>9</sup> UFC	2	4
1X10 <sup>10</sup> UFC	0	1
3X10 <sup>8</sup> CFU <sup>2</sup>	1	3
n.º de dosis recibidas (media ±SD)	3,5 ± 0,8	2,6 ± 0,9
% de sujetos que reciben las 4 dosis	83 %	27 %
% de sujetos con respuesta inmunitaria específica de LLO inducida por vacuna	100 % (5/5)	0 % (3/3)
% de sujetos con tejido tumoral primario positivo para mesotelina según IHC	100 % (4/4)	100 % (3/3)
Supervivencia desde la 1ª dosis de CRS-207 a fecha 15/4/2010, meses (media ±SD)	19,4 ± 3,0	4,5 ± 1,6

La supervivencia mejoró para aquellos sujetos para los que CRS 207 fue un tratamiento auxiliar:

10

	Supervivencia > 15	supervivencia < 15
% con inmunoterapia anterior	67 %	9 %
% con radioterapia anterior	83 %	9 %
% con cirugía anterior	83 %	73 %

En aquellos sujetos que habían recibido anteriormente GVAX® (CELL GENESYS, INC.) en un ensayo clínico en fase II, la supervivencia mejoró tras la administración de CRS 207:

Todos los sujetos	Sujetos que recibieron posteriormente CRS-207	Sujetos que no recibieron CRS-207
n.º de sujetos	13	2      11
% de sujetos que son HLA-A2	31 % (4/13)	50 % (1/2)      27 % (3/11)

% de sujetos que recibieron Erbitux (es decir, que no tuvieron reacc. de hipersensibilidad)	62 % (8/13)	0 % (0/2)	73 % (8/11)
Supervivencia desde el diagnóstico, meses (media ±SD)	26,3 ± 12,1	43,0 ± 2,0	23,3 ± 9,9
Supervivencia desde el consentimiento, meses (media ±SD)	12,2 ± 6,4	28,0 ± 8,0	9,3 ± 3,4

5 Un experto en la técnica apreciará fácilmente que la presente invención está bien adaptada para llevar a cabo los objetivos y obtener los fines y las ventajas mencionadas, así como los inherentes a los anteriores. Los ejemplos proporcionados en el presente documento son representativos de las realizaciones preferidas, son ilustrativos, y no se pretende que sean limitantes del alcance de la invención.

10 Aunque la invención se ha descrito e ilustrado con detalle suficiente para que los expertos en la técnica la utilicen y la lleven a cabo, varias alternativas, modificaciones, y mejoras deberán ser evidentes sin separarse del espíritu y del alcance de la invención. Los ejemplos proporcionados en el presente documento son representativos de las realizaciones preferidas, son ilustrativos, y no se pretende que sean limitantes del alcance de la invención. El experto en la materia ideará modificaciones de los anteriores y hallarán otros usos. Estas modificaciones están comprendidas en el espíritu de la invención, y están definidas por el alcance de las reivindicaciones.

15 Será evidente para el experto en la materia que se pueden realizar diferentes sustituciones y modificaciones a la invención divulgada en el presente documento sin separarse del alcance y el espíritu de la invención.

Todas las patentes y publicaciones mencionadas en la memoria descriptiva son indicativas de los niveles de los expertos en la materia a la que pertenece la invención.

20 La invención descrita de forma ilustrativa en el presente documento se puede llevar a la práctica en ausencia de cualquier elemento o elementos, limitación o limitaciones que no se divulguen específicamente en el presente documento. Por lo tanto, por ejemplo, en cada instancia del presente documento, cualquiera de los términos "que comprende", "consiste esencialmente de" y "que consiste en" se puede sustituir con cualquiera de los otros dos términos. Los términos y expresiones que se han utilizado en el presente documento se utilizan como términos de descripción y no de limitación, y no hay intención de que en el uso de esos términos y expresiones se excluya ningún equivalente de los rasgos mostrados o descritos o de partes de los mismos, pero se reconoce que son posibles varias modificaciones dentro del alcance de la invención reivindicada. Por lo tanto, se deberá entender que, aunque la presente invención se haya descrito específicamente mediante realizaciones preferidas y rasgos opcionales, los expertos en la materia pueden idear modificaciones y variaciones de los conceptos divulgados en el presente documento, y que dichas modificaciones y variaciones se consideran comprendidas en el ámbito de la presente invención tal como se define en las reivindicaciones adjuntas.

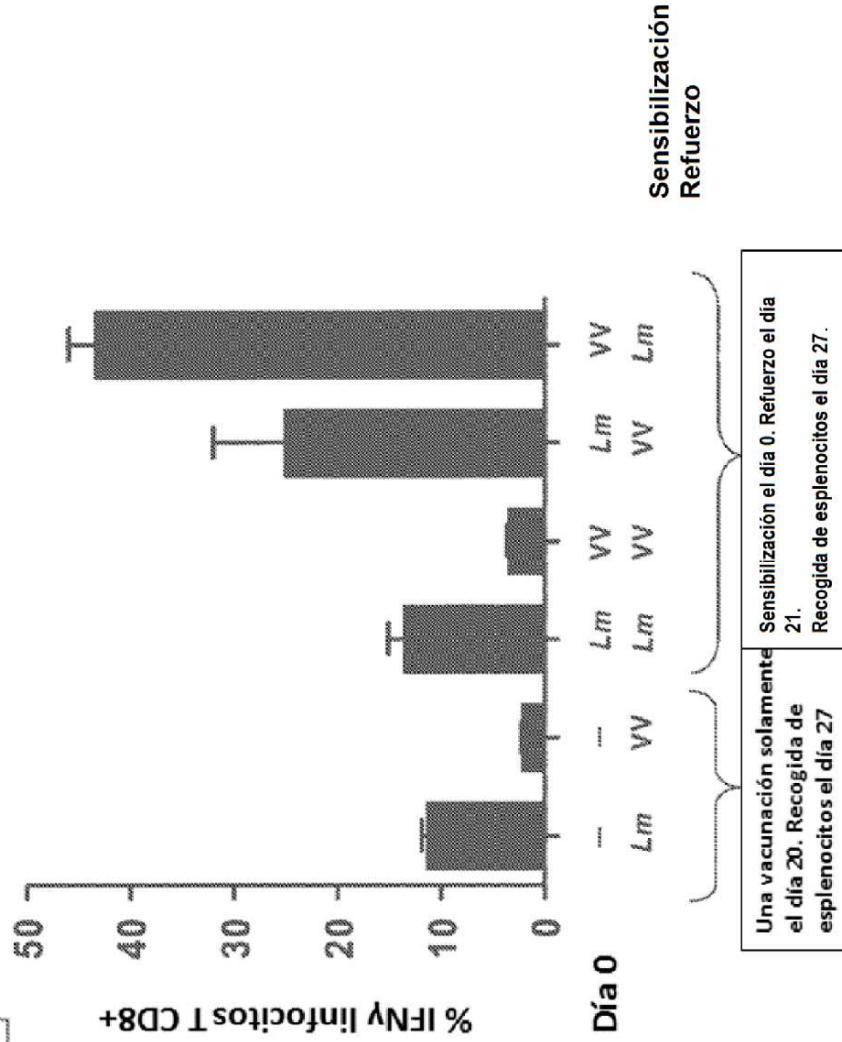
En las siguientes reivindicaciones se definen otras realizaciones.

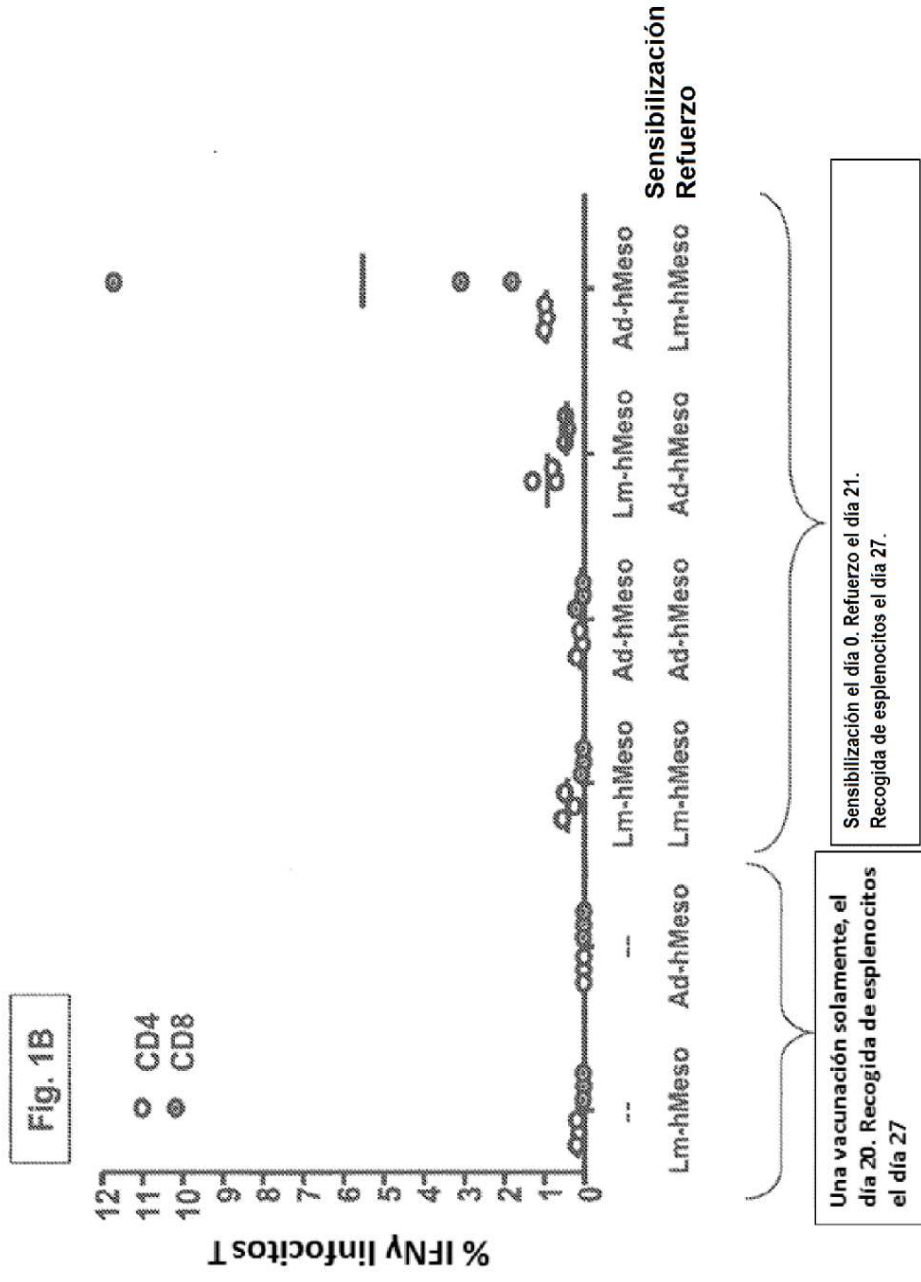
35

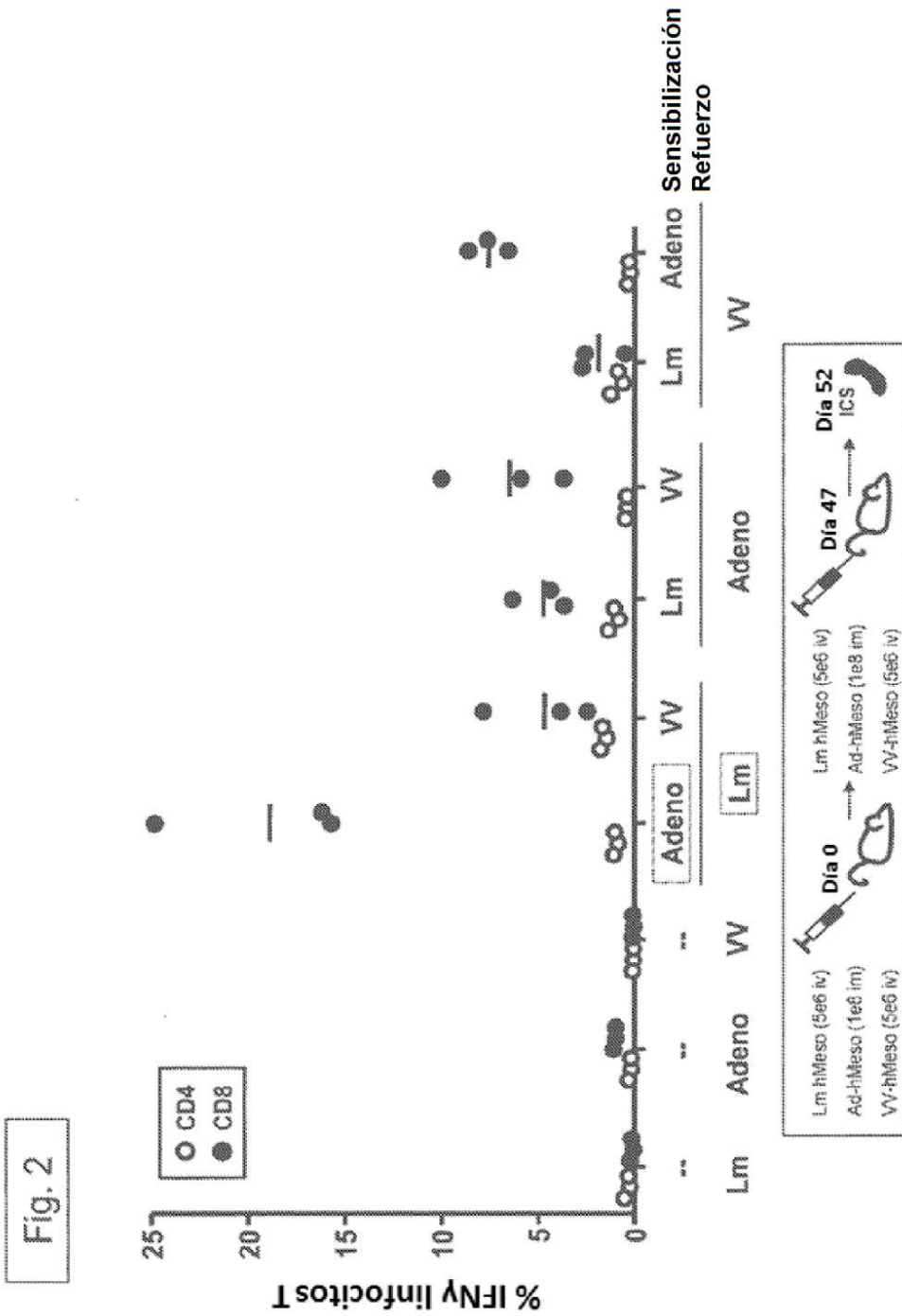
**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Una *Listeria* atenuada, metabólicamente activa, que codifica una porción expresable, inmunológicamente activa de un antígeno del cáncer, para su uso en un método de tratamiento del cáncer mediante terapia auxiliar en un mamífero que padece cáncer, en donde dicho mamífero es tratado con dicha *Listeria* como tratamiento auxiliar, antes o después de una radioterapia administrada al mamífero, para eliminar o destruir las células cancerosas que expresan el antígeno del cáncer, en donde el antígeno del cáncer es la totalidad de mesotelina o una parte de la misma.
- 10 2. Una *Listeria* atenuada, metabólicamente activa, para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el mamífero es uno que ha recibido radioterapia antes de dicho tratamiento auxiliar.
- 15 3. Una *Listeria* atenuada, metabólicamente activa, para el uso de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, en donde el tratamiento auxiliar comprende administrar dicha *Listeria* en varias dosis.
4. Una *Listeria* atenuada, metabólicamente activa, para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde dicha *Listeria* tiene una mutación que inactiva ActA.
- 20 5. Una *Listeria* atenuada, metabólicamente activa, para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde dicha *Listeria* tiene una mutación que inactiva InIB.
6. Una *Listeria* atenuada, metabólicamente activa, para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde dicha *Listeria* es  $\Delta act\Delta inIB$ .
- 25 7. Una *Listeria* atenuada, metabólicamente activa, para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde dicha *Listeria* está muerta pero metabólicamente activa ("KBMA").
- 30 8. Una *Listeria* atenuada, metabólicamente activa, para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde al mamífero se le han administrado previamente células procedentes de una línea celular humana que expresa todo o parte del antígeno del cáncer, en donde dichas células han sido modificadas mediante recombinación para producir y secretar factor estimulante de colonias de macrófagos y granulocitos, y en donde dichas células han sido modificadas para evitar que las células se dividan.
- 35 9. Una *Listeria* atenuada, metabólicamente activa, para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en donde dicho cáncer se selecciona entre el grupo que consiste en cáncer pancreático, cáncer de pulmón no microcítico, cáncer de ovario y mesotelioma.

Fig. 1A







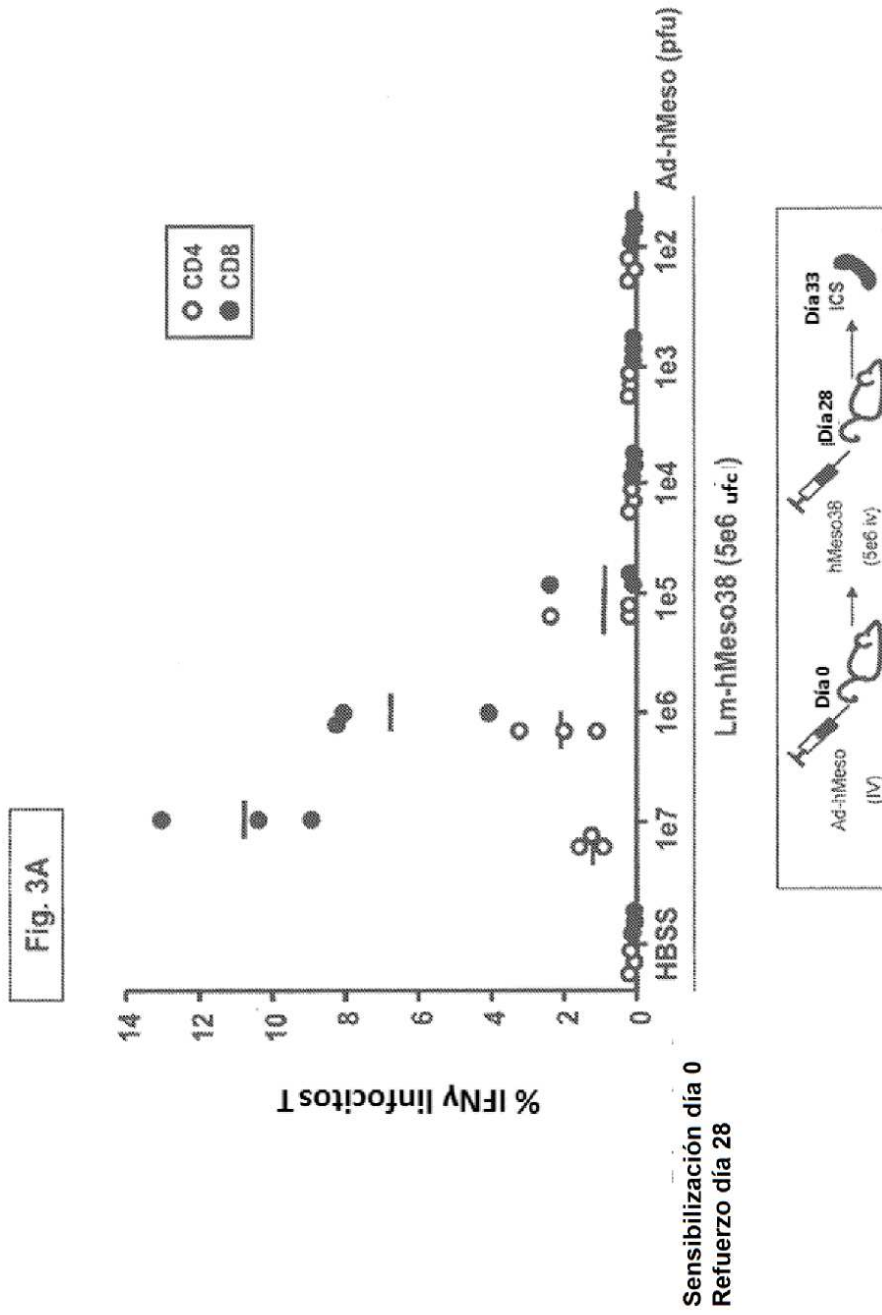


Fig. 3B

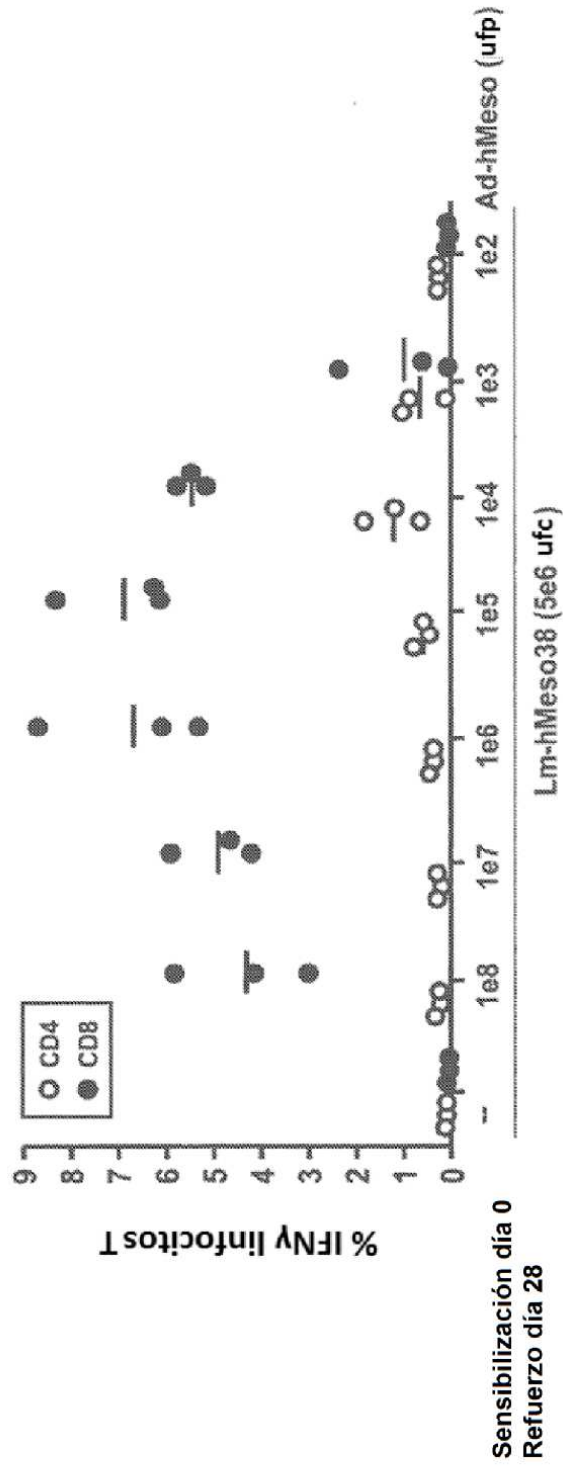




Fig. 4A

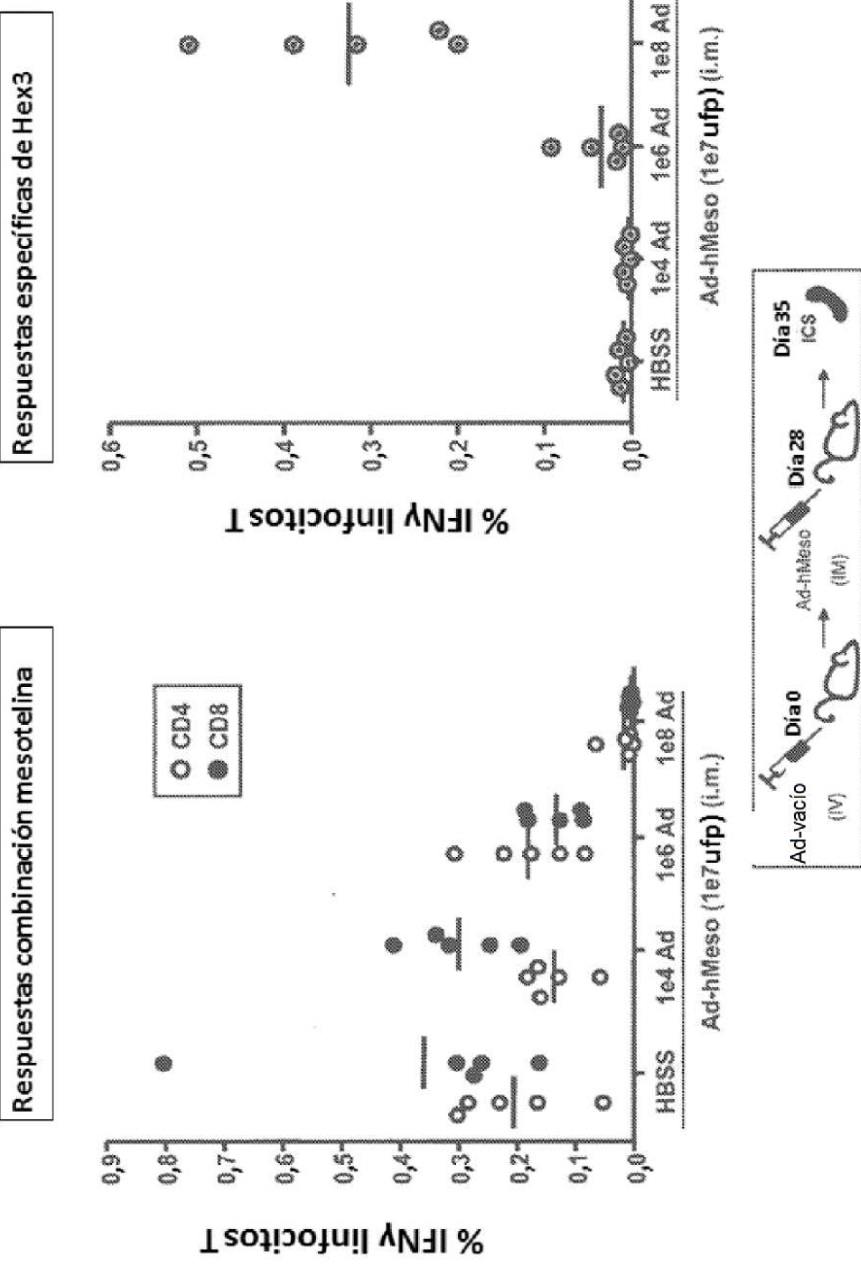
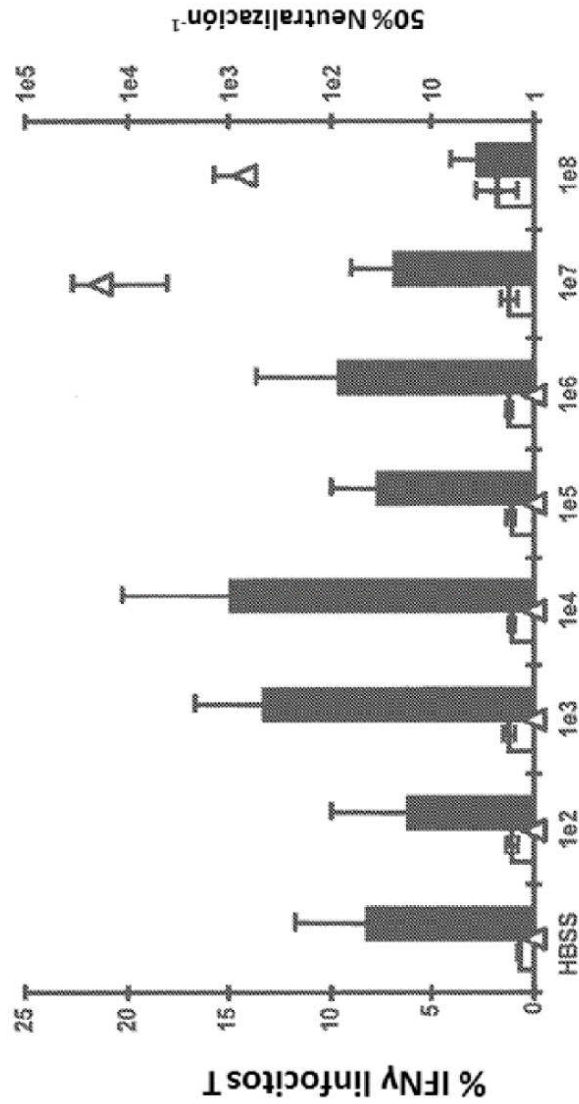


Fig. 4B



Cantidad de adenoimmunidad ya existente (ufp)



Fig. 5

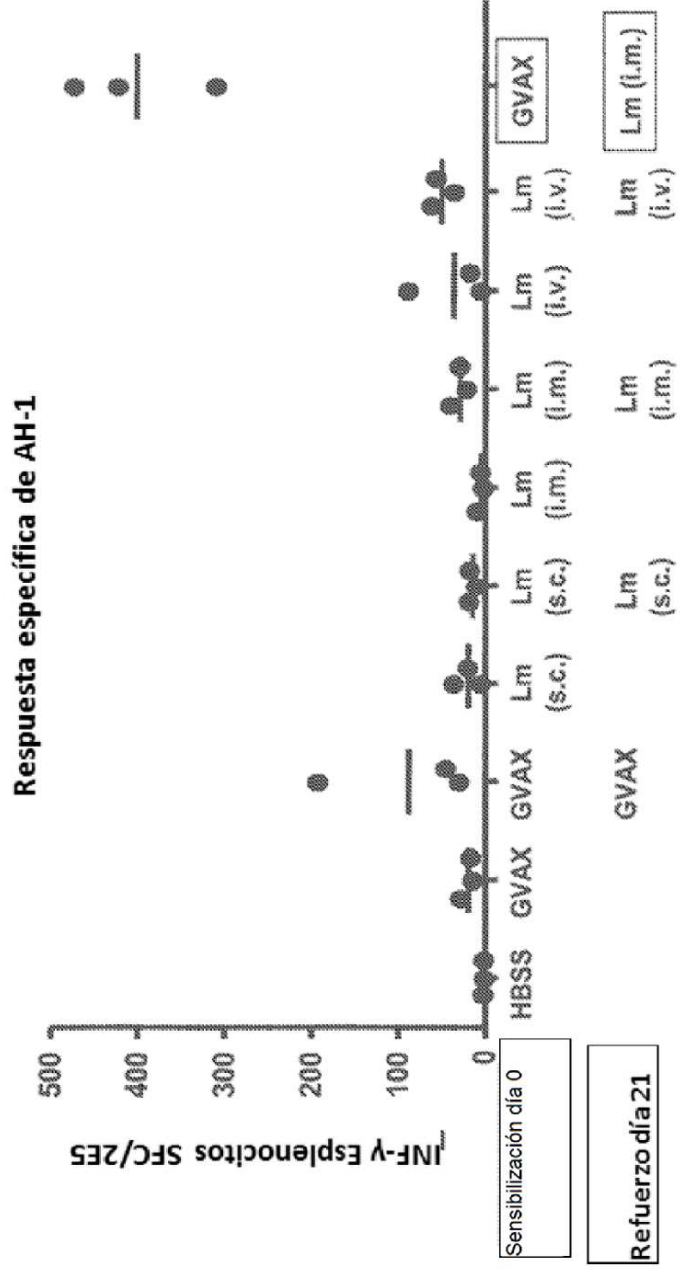


Fig. 6B

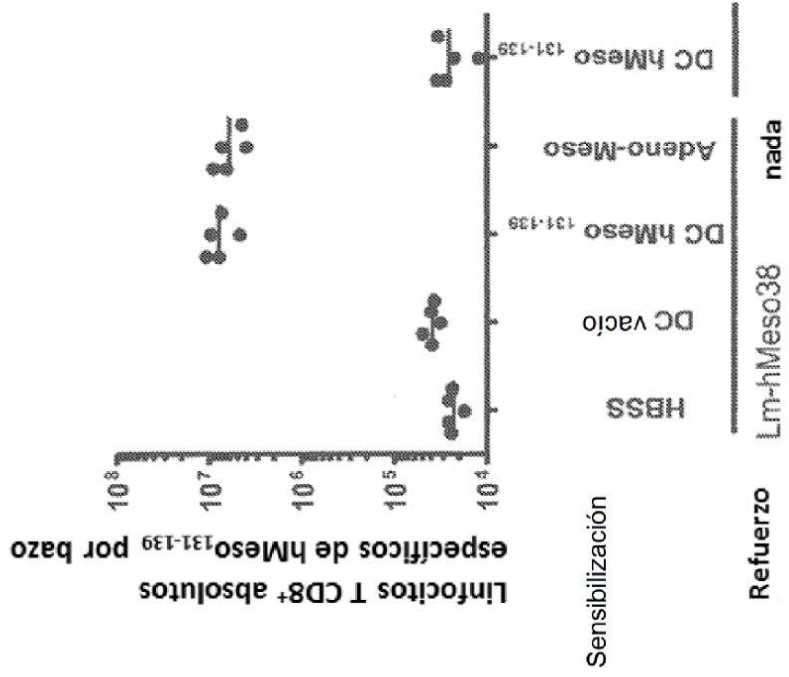
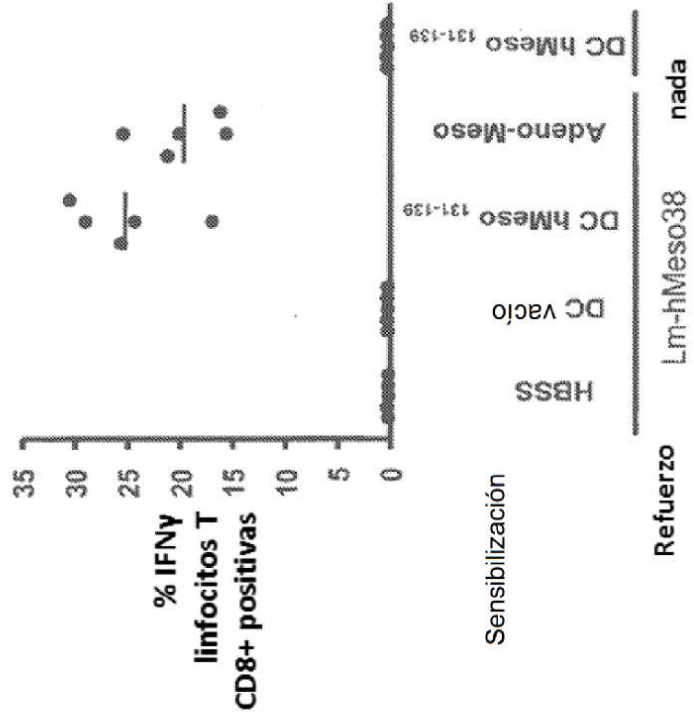
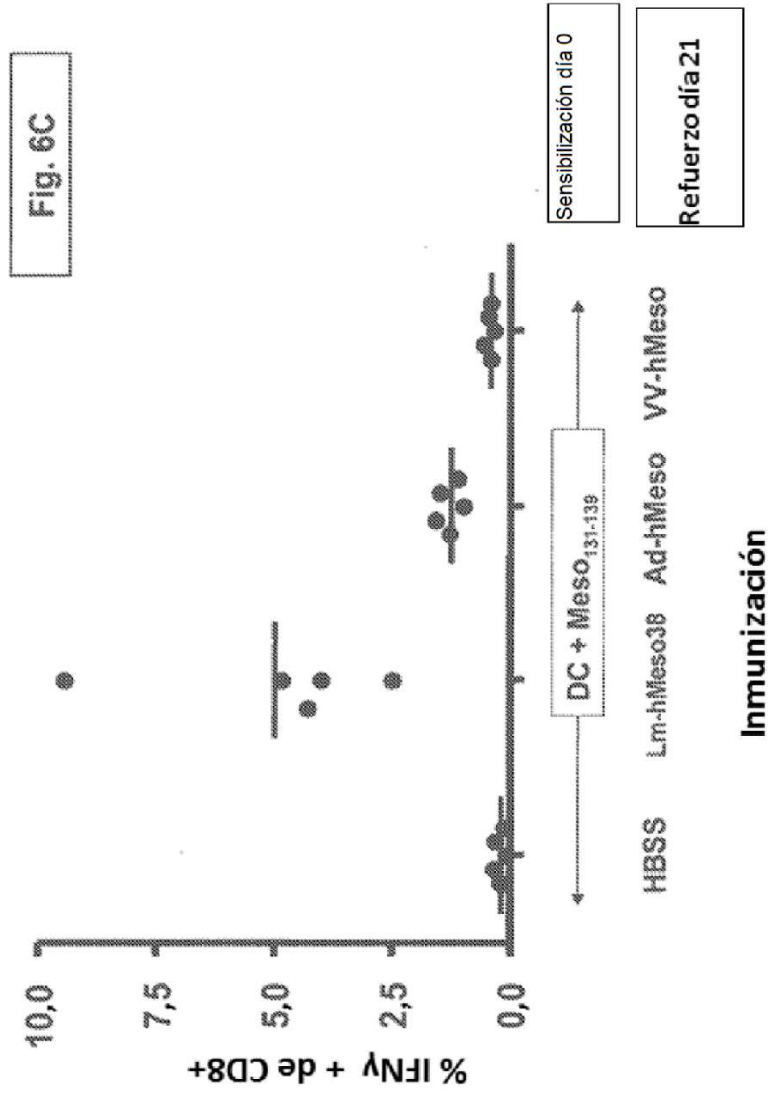
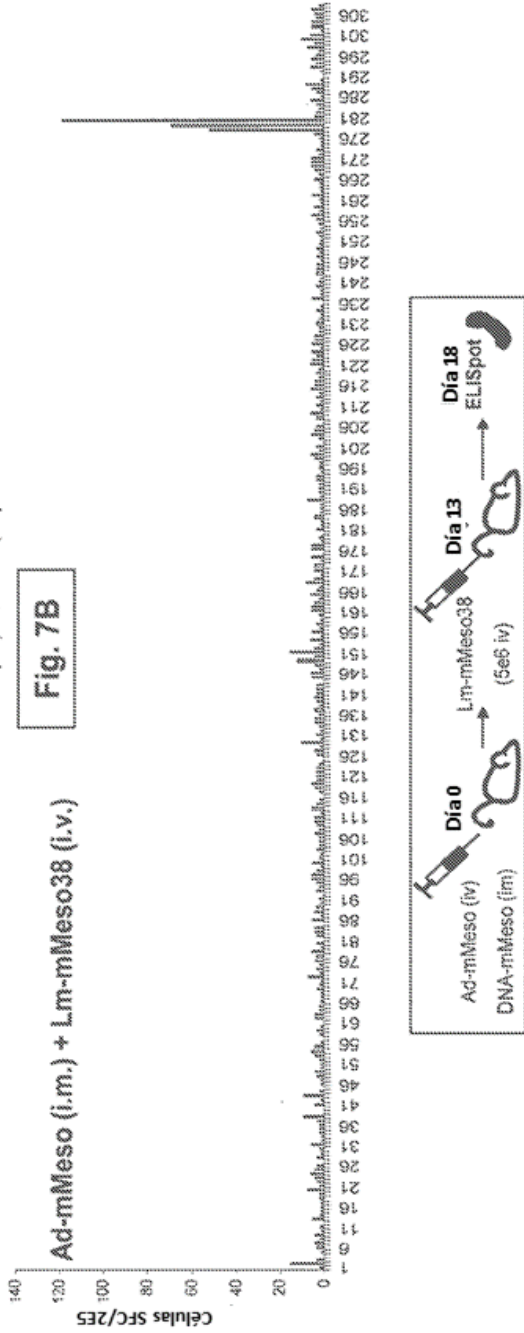
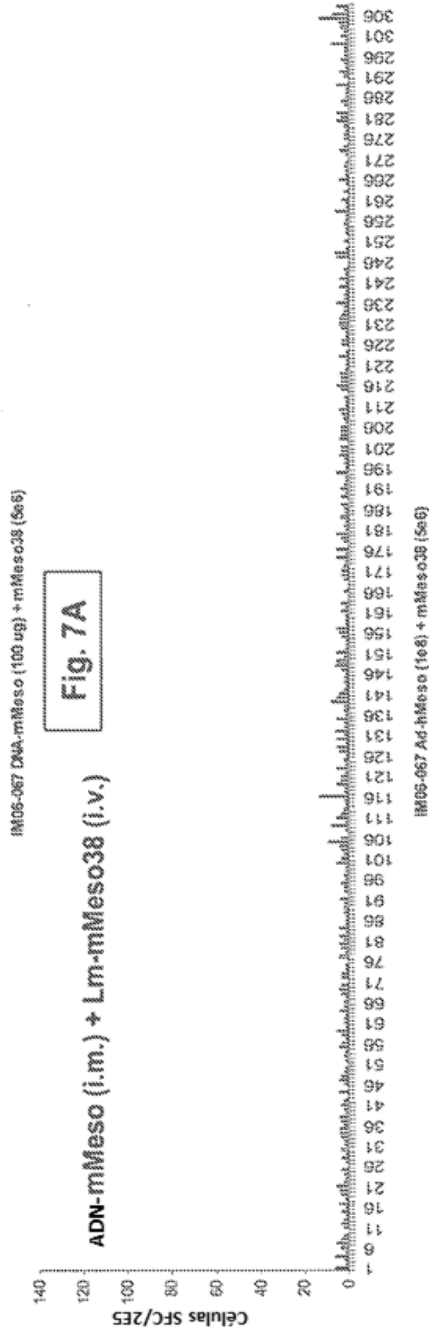


Fig. 6A







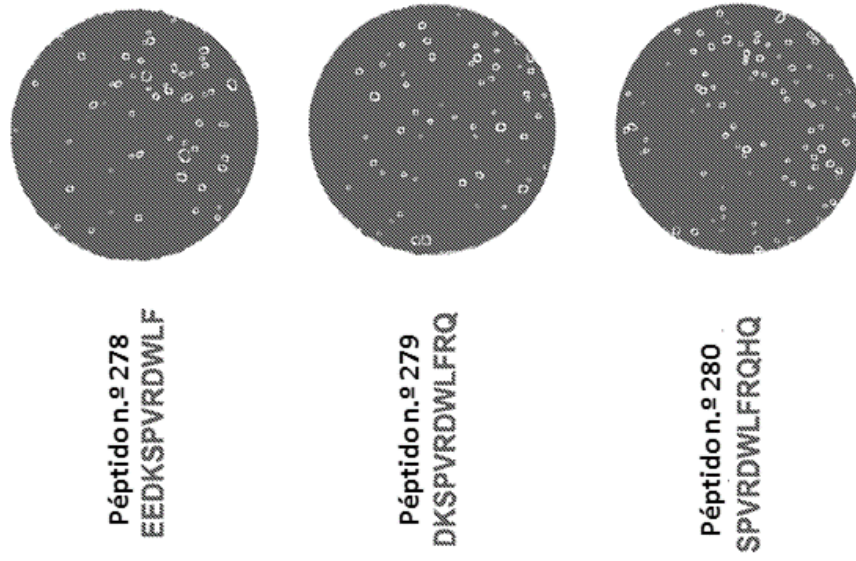


Fig. 7C

Fig. 8

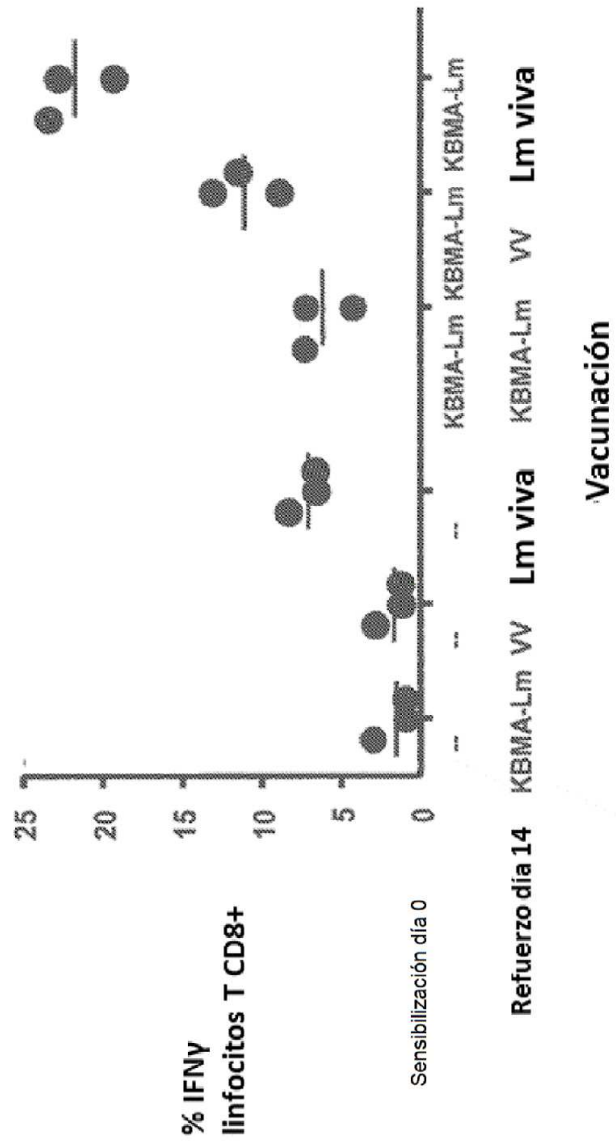




Fig. 9B

Linfocitos T específicos de mMesotelina

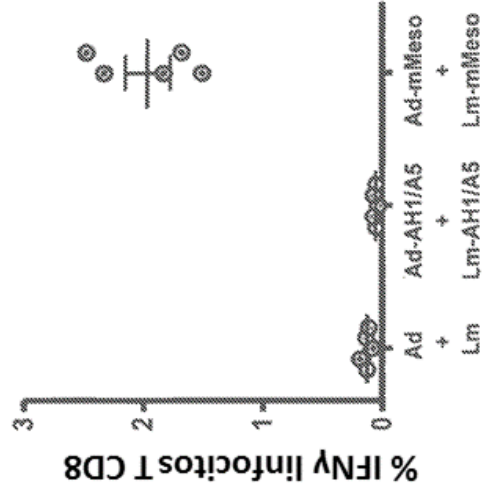


Fig. 9A

Linfocitos T específicos de AH-1 y AH1/A5

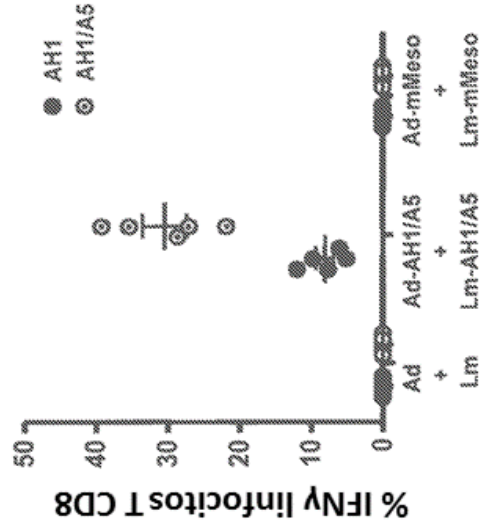


Fig. 9C

