(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 637 068**

(51) Int. CI.:

C12N 1/21 (2006.01)
A61K 39/02 (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01)
C07K 14/195 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)
C07K 14/71 (2006.01)
C07K 14/47 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.03.2010 PCT/US2010/026257**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **10.09.2010 WO10102140**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.03.2010 E 10749350 (4)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.05.2017 EP 2403935**

(54) Título: **Composiciones que comprenden factores angiogénicos y métodos de uso de las mismas**

(30) Prioridad:

04.03.2009 US 157367 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
10.10.2017

(73) Titular/es:

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

(72) Inventor/es:

SEAVEY, MATTHEW;
PATERSON, YVONNE;
MACIAG, PAULO y
SEWELL, DUANE

(74) Agente/Representante:

CAMPELLO ESTEBARANZ, Reyes

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

Composiciones que comprenden factores angiogénicos y métodos de uso de las mismas

CAMPO DE LA INVENCIÓN

La presente invención proporciona cepas de *Listeria* recombinantes que comprenden un factor angiogénico, vacunas relacionadas, y usos médicos inmunogénicos y terapéuticos que utilizan las mismas.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

Las células de direccionamiento implicadas en la angiogénesis paralizan los tumores de rápido crecimiento limitando el suministro de oxígeno y nutrientes o, dependiendo de la estrategia empleada, aumentando la susceptibilidad de las células tumorales a la quimioterapia aumentando la eficacia de un fármaco administrado a través de la reorganización de la red vascular. La resistencia de las células tumorales al tratamiento de anti-angiogénesis se ha observado en sistemas de ratón y se ha notificado para estudios en seres humanos para varios tratamientos diferentes. Además, el microambiente tumoral (TME) recluta células supresoras derivadas de mieloides (MDSC) que son responsables del necesario cambio angiogénico necesario para el crecimiento del tumor y la eventual diseminación.

Estudios realizados por varios investigadores han demostrado repetidamente la importancia de dirigir la angiogénesis tumoral debido a su papel central en la invasión, crecimiento y metástasis. Puesto que las células tumorales frecuentemente mutan en respuesta a la terapia o regulan en descenso las moléculas de MHC clase I requeridas para las respuestas mediadas por linfocitos T, será ventajoso el direccionamiento de las células endoteliales y pericitos, que son esenciales para la supervivencia del tumor y pueden carecer de los mecanismos inmunosupresores desplegados por los tumores.

Sin embargo, treinta años después de que se demostrase que la angiogénesis desempeña un papel facilitador en el cáncer, la medicina moderna todavía está intentando desarrollar nuevos compuestos y productos terapéuticos para dirigir la vasculatura del tumor. Sin embargo, la mayoría de los productos terapéuticos requieren múltiples rondas de administración y pueden tener efectos secundarios tóxicos.

El documento WO 03/073995 (The Scripps Research Institute) desvela una vacuna de ADN que comprende VEGFR2 para su uso contra células endoteliales proliferantes y para el tratamiento de tumores.

El documento WO 2008/079172 (The Trustees of the University of Pennsylvania) describe una vacuna basada en *Listeria* que comprende MHW-MAA para su uso en la inducción de una respuesta inmune contra y el tratamiento de tumores.

RESUMEN DE LA INVENCIÓN

En una realización, la presente invención proporciona una cepa de *Listeria* recombinante que expresa un factor angiogénico, en el que dicho factor angiogénico es un polipéptido receptor 2 del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFR2), en el que dicho polipéptido VEGFR2 es un fragmento de cinasa hepática fetal 1 (Flk-1)-E1 que comprende la SEQ ID NO: 5, o una secuencia que tiene más del 83 % de identidad con la misma, o un fragmento Flk-1-I1 que comprende la SEQ ID NO: 7, o una secuencia que tiene más del 95 % de identidad con la misma, o una combinación de los mismos.

En una realización, el factor angiogénico se expresa a partir de un promotor *hly*, un promotor *prfA*, un promotor *actA*, o un promotor p60.

En una realización, el factor angiogénico se expresa a partir de un vector episomal o del cromosoma de *Listeria*.

En una realización, el factor angiogénico se fusiona con un polipéptido adicional, en el que dicho polipéptido adicional es a) un LLO no hemolítico, b) un ActA N-terminal, o c) una secuencia PEST. El polipéptido adicional puede aumentar la inmunogenicidad de dicho factor angiogénico.

En una realización, la cepa de *Listerial* recombinante es una cepa recombinante de *monocytogenes Listerial*.

En una realización, la cepa de *Listeria* recombinante se ha pasado a través de un huésped animal.

En una realización, la cepa de *Listeria* recombinante induce la liberación de uno o más factores anti-angiogénicos, tales como interferón-gamma.

En otra realización, la invención proporciona una vacuna que comprende una cepa de *Listeria* recombinante de la invención y un adyuvante.

En otra realización, la invención proporciona una cepa de *Listeria* recombinante de la invención, o una vacuna, como se describe en el presente documento, para su uso en el tratamiento, la inhibición o la supresión de un crecimiento tumoral o cáncer en un sujeto, para su uso en el direccionamiento de la vasculatura tumoral de un crecimiento tumoral o cáncer en un sujeto, o para su uso en la prevención de la recurrencia de un tumor o para su uso en la inhibición de metástasis de un tumor o cáncer en un sujeto.

El tumor o cáncer puede ser un tumor o cáncer de mama, una metástasis cerebral o un tumor o cáncer que expresa Her-2/neu.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Figura 1. Diseño de las construcciones basadas en *Lm* que expresan Flk-1/VEGFR2. A. Cada fragmento génico se clonó en el vector de expresión pGG34 fusionado a LLO y se puso bajo el control del promotor *hly*. B. Transferencia de Western a partir de sobrenadantes de cultivo que muestra la expresión de cada proteína de fusión de las construcciones enumeradas. Se usó anticuerpo policlonal, de conejo, anti-PEST para la detección de proteína de fusión (parte inferior), y se utilizó anticuerpo anti-LLO de ratón para la confirmación (parte superior). Obsérvese que todos los carriles se tomaron de la misma transferencia Western. C. ELISpot para IFN-g que muestra respuestas restringidas de linfocitos T $CD8^+$ *ex vivo* después de la inmunización con cada construcción. Al grupo sin tratar se le inyectó PBS en solitario; todos los grupos contenían un grupo *Lm* de control. Las respuestas son los epítopos mapeados correspondientes para cada fragmento Flk. N = 5 por grupo. Los gráficos muestran la Media ± SEM; *p <0,05, prueba estadística de Mann-Whitney, experimento repetido una vez.

Figura 2. Diseño de las construcciones basadas en *Lm* que expresan Flk-1/VEGFR2. A. Regiones clonadas en recuadros para cada construcción construida, los aminoácidos destacados/en negrita muestran los epítopos CTL mapeados para el haplotipo $H2^{d/q}$ MHC I. B. Mapa del gen flk que muestra una realización de los fragmentos utilizados en la presente invención. C. Dibujo que muestra cómo los fragmentos flk usados en una realización de la presente invención se relacionan con los diversos dominios del gen flk. D. El ensayo de infección de macrófagos se realizó como se describe en los métodos. Las células J774A.1 se incubaron con construcciones de *Listeria*, se lavaron, luego se incubaron con Gencimicina, las bacterias que fueron capaces de infectar el macrófago y escapar al citoplasma se muestran en Alexa-488 (verde), el PE CD1 $1b^+$ halo (rojo) demarca la forma y tamaño de las células.

Figura 3. Las vacunas *Lm*-LLO-Flk-1 pueden inducir la regresión de tumores Her-2/neu+ establecidos *in vivo*. A. Volumen de tumor NT-2 (mm^3) de ratones tratados con cada construcción. El gráfico muestra la media ± SEM; *p <0,05, prueba estadística de Mann-Whitney, N = 8 ratones por grupo, experimento repetido dos veces. B. ELISpots para IFN-g que muestra el epítopo extendiéndose a varias regiones de Her-2/neu. Los esplenocitos del punto de tiempo de 64 días se estimularon de nuevo *ex vivo* con epítopos de péptido Her-2/neu. El gráfico muestra la media ± SEM; *p <0,05, prueba estadística de Mann-Whitney, N = 5 ratones por grupo, experimento repetido una vez. C. Los ratones se inmunizaron tres veces durante el transcurso de tres semanas después del establecimiento inicial de tumores NT-2. En esta figura, se muestra la tinción para el marcador pan-endotelial CD31-PE y el núcleo usando DAPI. Los controles de isotipo se usaron en secciones secuenciales como se muestra a la derecha. Cuantificación de la densidad de los vasos realizada por el software Image Pro. El gráfico muestra la media ± SEM, *p <0,05, prueba de Mann-Whitney, ns = no significativo. D. Tinción para el marcador pan-endotelial CD31-PE, y el núcleo usando DAPI, y el marcador hipóxico nuclear Factor Inducible de Hipoxia-1α (HIF-1α).

Figura 4. Los ratones con tumores completamente en regresión muestran la memoria a largo plazo para la reexposición del tumor. A. Los ratones con tumores completamente en regresión se expusieron de nuevo a NT-2 en el costado contra lateral el día 100. Se usó un grupo tratado con solución salina como control negativo para el crecimiento del tumor. B. Volumen tumoral para ratones que desarrollaron tumores después de la reexposición el día 100 de ratones libres de tumor. Ambos gráficos se refieren a un único experimento. El número de ratones libres de tumor fue de 2/8 para los grupos Flk-E1 y Flk-I1, el grupo salino tenía 5 ratones.

Figura 5. Las vacunas anti-angiogénesis no son eficaces en ratones tolerantes a HER-2/neu. A. Se inyectaron ratones de tipo silvestre FVB/N (WT) o transgénicos FVB/N (Tg) con 1 x 10^6 células NT-2 por vía s.c., se permitió que los tumores crecieran hasta que se palparan antes de comenzar el tratamiento. Los ratones se inmunizaron un total de tres veces, los tamaños de tumor medios se muestran aquí durante hasta 69 días después de la inoculación del tumor. Los gráficos muestran la media ± SEM; *p <0,05, prueba de Mann-Whitney, experimento repetido dos veces. B. Los bazos se procesaron para ELISpots para IFN-g, se estimularon con diversos péptidos Her-2/neu *ex vivo*, o un péptido de terceros como control negativo (pGag). Los gráficos muestran la media ± SEM; *p <0,05, prueba de Mann-Whitney, experimento repetido una vez. Los tumores de cada grupo se agruparon y se digirieron para determinar TIL; aquí se muestran linfocitos T específicos de Her-2/neu que tiñen CD8α y tetrámeros específicos de EC1 o IC1. Se encuentran significativamente más linfocitos T específicos de Her-2/neu en ratones de tipo silvestre (WT) pero no transgénicos (Tg); el grupo *Lm* de control muestra un bajo histórico. Experimento repetido una vez dando resultados similares.

Figura 6. Los ratones protegidos con vacunas de *Lm* anti-Flk-1 muestran un crecimiento tumoral primario reducido, una carga tumoral, y una morbilidad y mortalidad reducidas cuando se exponen a metástasis experimentales 4T1. A. Los tumores subcutáneos primarios 4T1 crecen más lentamente en animales protegidos con *Lm*-LLO-Flk-1. Los ratones se inmunizaron tres veces con cada vacuna luego y después se les inyectaron s.c. e i.v. 50.000 células 4T1. El gráfico muestra la media ± SEM para el volumen tumoral. B. Carga tumoral mostrada como porcentaje de ratones libres de tumor después de la exposición s.c. a células 4T1. El gráfico muestra la media de 8 ratones por grupo tratado. C. El gráfico muestra el porcentaje de ratones válidos/sanos basándose en la inspección visual y la observación. N = 8 ratones por grupo.

Figura 7. Las vacunas Flk-1 pueden proteger a los ratones de metástasis experimentales e inducir la difusión débil del epítopo Her-2/neu en un modelo de tumor más agresivo para el cáncer de mama. A. Los ratones se inmunizaron tres veces con cada vacuna y después se les inyectaron 50.000 células 4T1 i.v., se permitió que los tumores crecieran durante 25 días, después los ratones se sacrificaron. Las secciones teñidas con H+E se realizaron en tejidos pulmonares, los ganglios tumorales se contaron a mano. El gráfico muestra el número de metástasis pulmonares por lóbulo por animal, media ± SEM; *p <0,05, ensayo de Mann-Whitney, experimento repetido una vez, N = 5 ratones mostrados. B. Los bazos de estos animales se procesaron y expusieron de nuevo *ex vivo* en ensayos de ELISpot para IFN-g para determinar la diseminación del epítopo Her-2/neu. La línea celular 4T1 expresa niveles bajos de Her-2/neu de ratón. La diseminación se ve solamente en los ratones inmunizados con Flk-1-E1. El gráfico muestra la media ± SEM para el número de puntos por pocillo en comparación con el grupo de control *Lm*; *p <0,05, prueba de Mann-Whitney, experimento repetido una vez, N = 5 por grupo. C. Un experimento similar en el que los ratones estaban protegidos mediante inmunización con cada vacuna durante una serie de tres semanas y después se les inyectaron 50.000 células 4T1-Luc i.v., los ratones se sometieron a pruebas de imagen longitudinalmente en el transcurso de cuatro semanas buscando la incidencia de siembra pulmonar y la tasa de metástasis. Promedio de radiancia en fotones (p) capturados por segundo (s) por cm^2 para el área superficial (sr) separada en el ROI. El gráfico muestra la media ± SEM; *p <0,05, prueba de Mann-Whitney. Significación para los ratones como se indica a continuación: Día 18, sólo Flk-E1 significativo; Día 25, tanto Flk-E1 como Flk-I1 significativamente diferentes en comparación con *Lm* de control.

Figura 8. Estudios de seguridad utilizando las vacunas anti-angiogénesis Flk-1. Los ratones se inmunizaron tres veces como se realizó en todos los experimentos anteriores, a continuación, se les permitió aparearse o entraron en estudios de cicatrización de heridas. A. Los ratones (n = 5/grupo) se aparearon con machos FVB/N singénicos, la gestación se confirmó tras la observación de un tapón vaginal después del coito. Esto se consideró como día 0,5 dpc. Se midió la longitud total de gestación, la masa del cachorro a término y el tamaño total de la camada, los gráficos muestran la media ± SEM; *p <0,05. B. Un par de biopsias estériles de piel se produjeron en la parte posterior de cada ratón vacunado (N = 5/grupo). La curación se observó diariamente. El día 14 la cicatrización fue completa para todos los grupos ensayados, se observó una cicatrización idéntica para todos los grupos. El gráfico muestra el número de días hasta el cierre de la herida, media ± SEM; *p <0,05, prueba de Mann-Whitney.

Figura 9. La diseminación del epítopo inducido por la vacuna Flk-1 puede no ser debida a la reactividad cruzada entre los dominios compartidos Flk-1 y Her-2/neu. Los ratones se inmunizaron tres veces con *Lm* de control o la vacuna Flk-I1. Los esplenocitos se procesaron y expusieron de nuevo *ex vivo* para la secreción de IFN-g en respuesta a la exposición peptídica. Los péptidos incluidos fueron el epítopo pFlk-I1 previamente mapeado (PGGPLMVIV, SEQ ID NO: 1), un epítopo pIC1 putativo para Her-2/neu (GSGAFGTVYK; SEQ ID NO: 2) o el epítopo en cuestión, un epítopo putativo compartido entre los dominios Her-2/neu y Flk-1 cinasa (GRGAFGQVI; SEQ ID NO: 3), y un epítopo de terceros utilizado como control negativo (pGag). El gráfico muestra la media ± SEM, N = 3/grupo.

Figura 10A. Las vacunas Flk-1 pueden retrasar significativamente el crecimiento tumoral en modelos

espontáneos ortotópicos para el cáncer de mama Her-2/neu. Los ratones FVB-rHer-2/neu transgénicos se inmunizaron tres veces con cada vacuna Flk o Lm de control en solitario. Se examinaron los tumores de cada ratón para el mensaje Her-2/neu mutado. Se recogió ARN mensajero, se sintetizó ADNc y se secuenció. La secuencia resultante se apareó junto con la secuencia de tipo silvestre para determinar los residuos mutados. Sólo las mutaciones que surgieron 4 veces o más se consideraron mutaciones verdaderas. Un resumen de todas las mutaciones se encuentra a la izquierda, esto muestra un N de al menos 3, pero no más de 5 ratones, por grupo. Todos los datos mutacionales se combinan y se superponen sobre la secuencia de tipo silvestre Her-2/neu de rata. Los residuos de aa en negrita son mutaciones que surgen cuando las vacunas están en contra de los dominios Her-2/neu (Singh, 2007). Los restos de aa resaltados en rojo son mutaciones que surgen cuando se usan vacunas Flk-1. La región resaltada en azul muestra el dominio cinasa Her-2/neu. La región resaltada en verde muestra el dominio de unión a ATP.

Figura 10B. El brote tumoral se debe a mutaciones que surgen en los epítopos CTL clave responsables de mantener el tumor bajo control. Observando más de cerca "puntos calientes" o cadenas de residuos mutados, se encuentra que varios residuos mutados están dentro de los epítopos CTL previamente mapeados (Singh, 2005 y 2007). Uno de tales epítopos muestra mutaciones en aminoácidos clave responsables de anclar el epítopo a la molécula H2Dq MHC I. Otros "puntos calientes" están siendo investigados para nuevos epítopos CTL.

Figura 11A. La vacuna quimérica humana anti-Her-2/neu puede retrasar el crecimiento de una línea metastásica de cáncer de mama en el cerebro de ratones protegidos. Se inmunizaron ratones Balb/c tres veces con cada vacuna, ya sea Her-2/neu anti-humano o vacuna de control NYESO1. Se cultivaron *in vitro* células EMT6-Luc (del laboratorio de John Ohlfest en la Universidad de Minnesota) y luego se inyectaron en el cerebro de ratones anestesiados a 5.000 células por ratón. Las células EMT6-Luc expresan niveles bajos de Her-2/neu de ratón (datos no mostrados). Las células se dejaron crecer antes de tomar imágenes los días indicados. Las células EMT6-Luc producen la enzima luciferasa y cuando metabolizan la D-Luciferina *in vivo* el subproducto son fotones que son capturados *ex vivo* usando una cámara Xenogen X-100 y se muestran usando un mapa de calor. La intensidad del píxel se representa gráficamente como el número de fotones por segundo por cm^2 por cm de área de superficie, presentado como radiancia media.

Figura 11B. La vacuna humana anti-HMWMAA puede retrasar el crecimiento de una línea de melanoma metastásico en el cerebro de ratones protegidos. Se inmunizaron ratones C57B1/6 tres veces con cada vacuna, ya sea HMWMAA-C anti-humana o vacuna de control NYESO1. Las células B16F10-Luc (del laboratorio de Jeff Miller en UCSF) se cultivaron *in vitro* y luego se inyectaron en el cerebro de ratones anestesiados a 5.000 células por ratón. La línea parental B16F10 no expresa HMWMAA (comunicación personal), por lo que la única fuente de HMWMAA está en pericitos y células gliales. El mecanismo de luciferasa y la captura de imagen son iguales que en la figura 11A.

Figura 12. Secuencia de endoglina (CD105). El fragmento original, basado en la secuencia clonada por el grupo de Reisfeld, que se clonó en Lm-LLO-CD5 está en negrita y subrayado. Obsérvese que Rankpep y otro programa de predicción de epítopos de MHC han demostrado que existen varios epítopos CTL alternativos, putativos (destacados en rojo) para los haplotipos b, d y k H-2, que se encuentran fuera de esta región.

Figura 13. El diseño de las nuevas construcciones Listeria que expresan CD105A y CD105B. A. Las regiones clonadas para cada construcción están en negrita y están subrayados dos epítopos putativos; Lm-LLO-CD105A y Lm-LLOCD105B conjuntamente abarcan casi todo el gen de la endoglina y abarcan más epítopos CTL potenciales. B. Cada fragmento subrayado se clonó en el vector de expresión pGG34 fusionado al LLO adyuvante.

Figura 14. Lm-LLO-CD105A expresa y secreta una proteína del tamaño apropiado (~80 kD) detectada por un anticuerpo anti-LLO y transferencia de Western: Las cepas XFL7 se transformaron con el plásmido CD105A usando electroporación. Las células XFL7 transformadas se sembraron en placas sobre 37 ug/ml y 250 ug/ul de cloranfenicol y estreptomicina. Las colonias que se formaron durante el periodo de incubación de dos días se hicieron crecer en medio LB, se centrifugaron y el sobrenadante y el lisado celular se sometieron a transferencia de Western para detectar la proteína de fusión de fusión ya sea como una proteína secretada en el sobrenadante o una proteína endógena atrapada dentro de la célula bacteriana.

Figura 15. Lm-LLO-CD105B expresa y secreta una proteína del tamaño apropiado (~74 kD) detectada por un anticuerpo anti-LLO y transferencia de Western: Las cepas XFL7 se transformaron con el plásmido CD105A usando electroporación. Las células XFL7 transformadas se pusieron en placas sobre 37 ug/ml y 250 ug/ul de cloranfenicol y estreptomicina. Las colonias que se formaron durante el periodo de incubación de dos días se hicieron crecer en medio LB, se centrifugaron y el sobrenadante y el lisado celular se sometieron a transferencia de Western para detectar la proteína de fusión de fusión ya sea como una proteína secretada en el sobrenadante o una proteína endógena atrapada dentro de la célula bacteriana.

Figura 16. Crecimiento de tumores 4T1 (2 x 105 células implantadas en la bolsa de grasa mamaria) en

ratones Balb/c inmunizados con Lm-LLO-CD105 A y B en comparación con una vacuna de control Lm-LLO-NY-ESO-1. Los ratones se vacunaron con 2 x 108 ufc de cada vacuna los días indicados.

Figura 17. Los ratones del experimento mostrado en la figura 5B se sacrificaron al día 32 y los pulmones se extrajeron y se inflaron con PBS. Las metástasis superficiales visibles se contaron bajo un microscopio de disección. Se observó una disminución significativa sólo para Lm-LLO-CD105B en comparación con un estado sin tratar ($p < 0,01$) o Lm-LLO-NY-ESO1 ($p < 0,05$).

Figura 18. La inmunización con Lm-LLO-CD105A y B induce la diseminación del epítopo a los antígenos endógenos HER-2/neu y gp70 y la inducción de linfocitos T específicos de antígeno en el bazo. El día 22 después de la implantación del tumor en el experimento mostrado en la figura 5B, se retiraron los bazos de 3 ratones, se agruparon y se analizó una suspensión de células individuales mediante ELISpot después de la estimulación con los péptidos mostrados. Obsérvese que Kd y Dd son dos péptidos de la secuencia de endoglina que se predijo que se unían a estas moléculas de MHC de clase I. Residen en CD105A: AGPRTVTVM (Dd) y en CD105B AYSSCGMKV (Kd).

Figura 19. La inmunización con Lm-LLO-CD105A y B induce la diseminación del epítopo a los antígenos endógenos HER-2/neu y gp70 y la inducción de linfocitos T específicos que infiltran el tumor. El día 22 después de la implantación del tumor en el experimento mostrado en la figura 5B, los tumores se retiraron de 3 ratones, se agruparon y procesaron para análisis FACS y se tiñeron con los tetrámeros EC1, EC2, IC1 y AH1, anti CD8 y CD62L, CD11B. La población CD11B se separó en CD8+, CD62Llow y se analizó la especificidad del antígeno usando los tetrámeros mostrados.

Figura 20. Crecimiento de tumores NT-2 (1 x 106 células) implantados por vía subcutánea en ratones FVB, que se inmunizaron posteriormente con Lm-LLO-CD105 A y B o una vacuna de control Lm-LLO-NY-ESO-1 los días 4, 11 y 18, con 2 x 108 ufc de cada vacuna.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA PRESENTE INVENCIÓN

En una realización, la presente invención proporciona cepas de *Listeria* recombinantes que comprenden un factor angiogénico, en el que dicho factor angiogénico es un polipéptido receptor 2 del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFR2), en el que dicho polipéptido VEGFR2 es un fragmento de cinasa hepática fetal 1 (Flk-1)-E1 que comprende la SEQ ID NO: 5, o una secuencia que tiene más del 83 % de identidad con la misma, o un fragmento Flk-1-I1 que comprende la SEQ ID NO: 7, o una secuencia que tiene más del 95 % de identidad con la misma, o una combinación de los mismos.

En otra realización, la presente invención proporciona una cepa de *Listeria* recombinante que expresa un factor angiogénico, en el que dicho factor angiogénico es un fragmento Flg-1-E1 de VEGFR2 que comprende SEQ ID NO: 5 o una secuencia que tiene más del 83 % de identidad con la misma, o un fragmento Flg-1-I1 de VEGFR2 que comprende SEQ ID NO: 7, o una secuencia que tiene más del 95 % de identidad con la misma, o una combinación de los mismos.

En otra realización, la presente invención proporciona una cepa de *Listeria* recombinante que comprende un ácido nucleico que codifica un factor angiogénico, en el que dicho factor angiogénico es un fragmento Flg-1-E1 de VEGFR2 que comprende SEQ ID NO: 5 o una secuencia que tiene más del 83 % de identidad con la misma, o un fragmento Flg-1-I1 de VEGFR2 que comprende SEQ ID NO: 7, o una secuencia que tiene más del 95 % de identidad con la misma, o una combinación de los mismos. Estas cepas de *Listeria* recombinantes son útiles para dirigir la vasculatura tumoral de un crecimiento tumoral o cáncer en un sujeto, en la que el sujeto monta una respuesta inmune contra el factor angiogénico.

La cepa de *Listeria* recombinante de las composiciones y usos médicos de la presente invención es, en otra realización, una cepa recombinante de *Listeria monocytogenes*. En otra realización, la cepa de *Listeria* es una cepa recombinante de *Listeria seeligeri*. En otra realización, la cepa de *Listeria* es una cepa recombinante de *Listeria grayi*. En otra realización, la cepa de *Listeria* es una cepa recombinante de *Listeria ivanovii*. En otra realización, la cepa de *Listeria* es una cepa recombinante de *Listeria murrayi*. En otra realización, la cepa de *Listeria* es una cepa recombinante de *Listeria welshimeri*. En otra realización, la cepa de *Listeria* es una cepa recombinante de cualquier otra especie de *Listeria* conocida en la técnica. En una realización, la cepa de *Listeria* es una cepa de *Listeria* que comprende LLO, mientras que en otra realización, la cepa de *Listeria* es una cepa de *Listeria* que comprende ActA, mientras que en otra realización, la cepa de *Listeria* es una cepa Listeria que comprende secuencias de tipo PEST.

Listeria monocytogenes es una bacteria intracelular facultativa gram-positiva capaz de infectar células fagocíticas y cuyo ciclo de vida la convierte en un valioso vehículo de administración de proteínas extrañas. Después de la fagocitosis, *Lm* escapa del fagosoma a través del factor de virulencia hemolítica LLO, codificado por el gen *hly*, para

replicarse en el citoplasma. *Lm* puede diseñarse para expresar un gen de interés fusionado con los primeros 441 aminoácidos de LLO para excluir el dominio hemolítico. LLO contiene un dominio PEST que es importante para la actividad adyuvante en las proteínas fusionadas.

En otra realización, la cepa de *Listeria* se atenúa por la deleción de un gen. En otra realización, la cepa de *Listeria* se atenúa por la deleción de más de 1 gen. En otra realización, la cepa de *Listeria* se atenúa por deleción o inactivación de un gen. En otra realización, la cepa de *Listeria* se atenúa por la deleción o inactivación de más de 1 gen.

En otra realización, el gen que está mutado es *hly*. En otra realización, el gen que está mutado es *actA*. En otra realización, el gen que está mutado es *plc A*. En otra realización, el gen que está mutado es *plcB*. En otra realización, el gen que está mutado es *mpl*. En otra realización, el gen que está mutado es *inlA*. En otra realización, el gen que está mutado es *inlB*. En otra realización, el gen que está mutado es *bsh*.

En otra realización, la cepa de *Listeria* es un mutante auxotrófico. En otra realización, la cepa de *Listeria* es deficiente en un gen que codifica un gen de síntesis de vitaminas. En otra realización, la cepa de *Listeria* es deficiente en un gen que codifica ácido pantoténico sintasa.

En otra realización, la cepa de *Listeria* es deficiente en una enzima del metabolismo de AA. En otra realización, la cepa de *Listeria* es deficiente en un gen de ácido D-glutámico sintasa. En otra realización, la cepa de *Listeria* es deficiente en el gen dat. En otra realización, la cepa de *Listeria* es deficiente en el gen dal. En otra realización, la cepa de *Listeria* es deficiente en el gen dga. En otra realización, la cepa de *Listeria* es deficiente en un gen implicado en la síntesis del ácido diaminopimélico. CysK. En otra realización, el gen es metionina sintasa independiente de vitamina B12. En otra realización, el gen es trpA. En otra realización, el gen es trpB. En otra realización, el gen es trpE. En otra realización, el gen es asnB. En otra realización, el gen es gltD. En otra realización, el gen es gltB. En otra realización, el gen es leuA. En otra realización, el gen es argG. En otra realización, el gen es thrC. En otra realización, la cepa de *Listeria* es deficiente en uno o más de los genes descritos anteriormente en el presente documento.

En otra realización, la cepa de *Listeria* es deficiente en un gen sintasa. En otra realización, el gen es un gen de síntesis de AA. En otra realización, el gen es folP. En otra realización, el gen es la proteína de la familia de la dihidrouridina sintasa. En otra realización, el gen es ispD. En otra realización, el gen es ispF. En otra realización, el gen es fosfoenolpiruvato sintasa. En otra realización, el gen es hisF. En otra realización, el gen es hisH. En otra realización, el gen es fliI. En otra realización, el gen es pseudouridina sintasa de subunidad ribosómica grande. En otra realización, el gen es ispD. En otra realización, el gen es una proteína GMP sintasa/glutamina amidotransferasa bifuncional. En otra realización, el gen es cobS. En otra realización, el gen es cobB. En otra realización, el gen es cbiD. En otra realización, el gen es uroporfirina-III C-metiltransferasa/uroporfirinógeno-III sintasa. En otra realización, el gen es cobQ. En otra realización, el gen es uppS. En otra realización, el gen es truB. En otra realización, el gen es dxs. En otra realización, el gen es mvaS. En otra realización, el gen es dapA. En otra realización, el gen es ispG. En otra realización, el gen es folC. En otra realización, el gen es citrato sintasa. En otra realización, el gen es argJ. En otra realización, el gen es 3-desoxi-7-fosfoheptulonato sintasa. En otra realización, el gen es indol-3-glicerol-fosfato sintasa. En otra realización, el gen es un componente de antranilato sintasa/glutamina amidotransferasa. En otra realización, el gen es menB. En otra realización, el gen es isocorismato sintasa específica de menaquinona. En otra realización, el gen es fosforribosilformilglicinamidina sintasa I o II. En otra realización, el gen es fosforribosilaminoimidazol-succinocarboxamida sintasa. En otra realización, el gen es carB. En otra realización, el gen es carA. En otra realización, el gen es thyA. En otra realización, el gen es mgsA. En otra realización, el gen es aroB. En otra realización, el gen es hepB. En otra realización, el gen es rluB. En otra realización, el gen es ilvB. En otra realización, el gen es ilvN. En otra realización, el gen es alsS. En otra realización, el gen es fabF. En otra realización, el gen es fabH. En otra realización, el gen es pseudouridina sintasa. En otra realización, el gen es pyrG. En otra realización, el gen es truA. En otra realización, el gen es pabB. En otra realización, el gen es un gen de la atp sintasa (por ejemplo, atpC, atpD-2, aptG, atpA-2, etc.).

En otra realización, el gen es phoP. En otra realización, el gen es aroA. En otra realización, el gen es aroC. En otra realización, el gen es aroD. En otra realización, el gen es plcB.

En otra realización, la cepa de *Listeria* es deficiente en un transportador peptídico. En otra realización, el gen es un transportador ABC/proteína de unión a ATP/permeasa. En otra realización, el gen es un transportador ABC oligopeptídico/proteína de unión a oligopéptido. En otra realización, el gen es un transportador ABC oligopeptídico/proteína. En otra realización, el gen es un transportador ABC de cinc/proteína de unión a cinc. En otra realización, el gen es un transportador ABC de azúcar. En otra realización, el gen es un transportador de fosfato. En

otra realización, el gen es un transportador de cinc ZIP. En otra realización, el gen es un transportador de resistencia a fármacos de la familia EmrB/QacA. En otra realización, el gen es un transportador de sulfato. En otra realización, el gen es un transportador de oligopéptidos dependiente de protones. En otra realización, el gen es un transportador de magnesio. En otra realización, el gen es un transportador de formiato/nitrito. En otra realización, el gen es un transportador ABC de espermidina/putrescina. En otra realización, el gen es cotransportador de Na/Pi. En otra realización, el gen es un transportador de fosfato de azúcar. En otra realización, el gen es un transportador de glutamina ABC. En otra realización, el gen es el principal transportador de la familia facilitadora. En otra realización, el gen es un transportador ABC de glicina betaína/L-prolina. En otra realización, el gen es un transportador ABC de molibdeno. En otra realización, el gen es un transportador ABC de ácido teicoico. En otra realización, el gen es un transportador ABC de cobalto. En otra realización, el gen es un transportador de amonio. En otra realización, el gen es un transportador ABC de aminoácidos. En otra realización, el gen es un transportador ABC de división celular. En otra realización, el gen es un transportador ABC de manganeso. En otra realización, el gen es un transportador ABC de compuesto de hierro. En otra realización, el gen es un transportador ABC de maltosa/maltodextrina. En otra realización, el gen es un transportador de resistencia a fármacos de la familia Bcr/CflA.

En otra realización, el gen es una subunidad de una de las proteínas anteriores.

En una realización, las composiciones de la presente invención inducen una fuerte estimulación innata del interferón-gamma, que en una realización, tiene propiedades anti-angiogénicas. En una realización, una *Listeria* de la presente invención induce una fuerte estimulación innata del interferón-gamma, que en una realización, tiene propiedades anti-angiogénicas (Dominiecki et al., Cancer Immunol Immunother. mayo de 2005; 54(5): 477-88; Beatty y Paterson, J Immunol. 15 de febrero de 2001; 166(4): 2276-82). En una realización, las propiedades antiangiogénicas de *Listeria* están mediadas por linfocitos T $CD4^+$ (Beatty y Paterson, 2001). En otra realización, las propiedades antiangiogénicas de Listeria están mediadas por linfocitos T $CD8^+$. En otra realización, la secreción de IFN-gamma como resultado de la vacunación contra Listeria está mediada por células NK, células NKT, linfocitos T $CD4^+$, linfocitos T $CD8^+$, o una combinación de los mismos.

En otra realización, las composiciones de la presente invención inducen la producción de una o más proteínas o factores antiangiogénicos. En una realización, la proteína antiangiogénica es IFN-gamma. En otra realización, la proteína antiangiogénica es un factor derivado del epitelio pigmentario (PEDF); angiostatina; endostatina; tirosina cinasa tipo fms (sFlt)-1; o endoglina soluble (sEng). En una realización, una *Listeria* de la presente invención está implicada en la liberación de factores antiangiogénicos y, por lo tanto, en una realización, tiene un papel terapéutico además de su papel como vector para introducir un antígeno en un sujeto.

En otra realización, la *Listeria* recombinante de composiciones de la presente invención se transforma de forma estable con una construcción que codifica un antígeno o una fusión a antígeno LLO. En una realización, la construcción contiene un polienlazador para facilitar una subclonación adicional. Se conocen varias técnicas para producir *Listeria* recombinante.

En una realización, una construcción útil en las composiciones de la presente invención se expresa a partir del cromosoma de Listeria.

En otra realización, la construcción o el gen heterólogo está integrado en el cromosoma de Listeria usando recombinación homóloga. Las técnicas para la recombinación homóloga se conocen bien en la técnica, y se describen, por ejemplo, en Frankel, FR, Hegde, S, Lieberman, J, e Y Paterson. Induction of a cell-mediated immune response to HIV gag using Listeria monocytogenes as a live vaccine vector. J. Immunol. 155: 4766 - 4774. 1995; Mata, M, Yao, Z, Zubair, A, Syres, K y Y Paterson, Evaluation of a recombinant Listeria monocytogenes expressing an HIV protein that protects mice against viral challenge. Vaccine 19: 1435-45, 2001; Boyer, JD, Robinson, TM, Maciag, PC, Peng, X, Johnson, RS, Pavlakis, G, Lewis, MG, Shen, A, Siliciano, R, Brown, CR, Weiner, D, e Y Paterson. DNA prime Listeria boost induces a cellular immune response to SIV antigens in the Rhesus Macaque model that is capable of limited suppression of SIV239 viral replication. Virology. 333: 88-101, 2005. En otra realización, la recombinación homóloga se realiza como se describe en la Patente de los Estados Unidos N.º 6.855.320. En otra realización, se utiliza un plásmido sensible a la temperatura para seleccionar los recombinantes.

En otra realización, la construcción o el gen heterólogo está integrado en el cromosoma de Listeria usando inserción de transposón. Las técnicas para la inserción de transposón se conocen bien en la técnica, y se describen, entre otros, por Sun et al. (Infection and Immunity 1990, 58: 3770-3778) en la construcción de DP-L967. La mutagénesis de transposón tiene la ventaja, en otra realización, de que puede formarse un mutante de inserción genómica estable. En otra realización, se desconoce la posición en el genoma en la que el gen extraño se ha insertado por

mutagénesis de transposón

En otra realización, la construcción o el gen heterólogo se integra en el cromosoma de Listeria usando sitios de integración de fagos (Lauer P, Chow MY et al, Construction, characterization, and use of two LM site-specific phage integration vectors. J Bacteriol 2002; 184(15): 4177-86). En otra realización, se utiliza un gen de la integrasa y un sitio de unión de un bacteriófago (por ejemplo, listeriofago U153 o PSA) para insertar el gen heterólogo en el sitio de unión correspondiente, que puede ser cualquier sitio apropiado en el genoma (por ejemplo, comK o el extremo 3' del gen de ARNt arg). En otra realización, los profagos endógenos se curan a partir del sitio de unión utilizado antes de la integración de la construcción o el gen heterólogo. En otra realización, este método da como resultado integrantes de una sola copia.

En una realización, el factor angiogénico se expresa a partir de un vector episomal en una cepa de *Listeria*. En otra realización, la construcción es transportada por la cepa de *Listeria* en un vector episomal. En otra realización, la construcción es transportada por la cepa de *Listeria* en un plásmido. Los vectores LM que expresan proteínas de fusión a antígenos se han construido mediante esta técnica. Lm-GG/E7 se hizo complementando un mutante de deleción de prfA con un plásmido que contenía una copia del gen prfA y una copia del gen E7 fusionado a una forma del gen LLO (hly) truncado para eliminar la actividad hemolítica de la enzima, como se describe en el presente documento. Se mantuvo la LLO funcional por el organismo a través de la copia cromosómica endógena de hly. En otra realización, el plásmido contiene un gen de resistencia a antibióticos. En otra realización, el plásmido contiene un gen que codifica un factor de virulencia que carece del genoma de la cepa de Listeria transformada. En otra realización, el factor de virulencia es prfA. En otra realización, el factor de virulencia es LLO. En otra realización, el factor de virulencia es ActA. En otra realización, el factor de virulencia es cualquiera de los genes enumerados anteriormente como dianas para la atenuación. En otra realización, el factor de virulencia es cualquier otro factor de virulencia conocido en la técnica.

En otra realización, un péptido recombinante de la presente invención se fusiona a una proteína de Listeria, tal como PI-PLC, o una construcción que codifica la misma. En otra realización, una secuencia señal de una proteína Listeriana secretada tal como hemolisina, ActA o fosfolipasas se fusiona con el gen que codifica el antígeno. En otra realización, se utiliza una secuencia señal del vector de vacuna recombinante. En otra realización, se utiliza una secuencia señal funcional en el vector de vacuna recombinante.

En otra realización, la construcción está contenida en la cepa de *Listeria* de manera episomal. En otra realización, el antígeno extraño se expresa a partir de un vector alojado por la cepa de *Listeria* recombinante.

En otra realización, una cepa de *Listeria* recombinante de la presente invención ha sido pasada a través de un huésped animal. En otra realización, el paso maximiza la eficacia de la cepa como un vector de vacuna. En otra realización, el paso estabiliza la inmunogenicidad de la cepa de *Listeria*. En otra realización, el paso estabiliza la virulencia de la cepa de *Listeria*. En otra realización, el paso aumenta la inmunogenicidad de la cepa de *Listeria*. En otra realización, el paso aumenta la virulencia de la cepa de *Listeria*. En otra realización, el pasaje elimina las subcepas inestables de la cepa de *Listeria*. En otra realización, el paso reduce la prevalencia de subcepas inestables de la cepa de *Listeria*. En otra realización, el paso atenúa la cepa, o en otra realización, hace que la cepa sea menos virulenta. En una realización, el animal a través del cual se pasa la *Listeria* es un mamífero, que, en una realización, es un ratón. La presente invención contempla el uso de mamíferos tales como ratones, conejos, cobayas, hámsteres, jerbos, ratas y similares. Tales mamíferos se conocen bien en la técnica y están disponibles para el experto en la materia a través de una diversidad de mayoristas, distribuidores y laboratorios, por ejemplo, Jackson Laboratories (Bar Harbor, ME). Los métodos para pasar una cepa de *Listeria* recombinante a través de un huésped animal se conocen en la técnica y se describen, por ejemplo, en la Solicitud de Patente de los Estados Unidos con el N.º de Serie 10/54.614.

También se desvelan ácidos nucleicos aislados que codifican una proteína truncada ActA, LLO o PEST y un ácido nucleico aislado que codifica el fragmento inmunógeno de VEGFR2 unido operativamente a un ácido nucleico que comprende una secuencia promotora/reguladora de tal forma que el ácido nucleico es preferiblemente capaz de dirigir la expresión de la proteína codificada por el ácido nucleico. Por lo tanto, también se desvelan vectores de expresión y métodos para la introducción de ADN exógeno en células con expresión concomitante del ADN exógeno en las células tales como las descritas, por ejemplo, en Sambrook et al. (1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York), y en Ausubel et al. (1997, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Nueva York).

Como se describe en el presente documento, "ácidos nucleicos" o "nucleótido" se refiere a una cadena de al menos

dos combinaciones de base-azúcar-fosfato. El término incluye ADN y ARN. "Nucleótidos" se refiere a las unidades monoméricas de polímeros de ácido nucleico. El ARN puede estar en forma de ARNt (ARN de transferencia), ARNsn (ARN nuclear pequeño), ARNr (ARN ribosómico), ARNm (ARN mensajero), ARN antisentido, ARN inhibidor pequeño (ARNsi), micro ARN (ARNmi) y ribozimas. Se ha descrito el uso de ARNsi y ARNmi (Caudy AA et al, Genes & Devel 16: 2491-96 y referencias citadas en la presente). El ADN puede estar en forma de ADN plasmídico, ADN vírico, ADN lineal o ADN cromosómico o derivados de estos grupos. Además, estas formas de ADN y ARN pueden estar trenzadas sencillas, dobles, triples o cuádruples. El término también incluye ácidos nucleicos artificiales que contienen otros tipos de estructuras principales pero las mismas bases. El ácido nucleico artificial puede ser un PNA (ácido nucleico peptídico). El PNA contiene estructuras principales peptídicos y bases de nucleótidos y son capaces de unirse a tanto moléculas de ADN como de ARN. El nucleótido puede estar modificado con oxetano o puede ser modificado por reemplazo de uno o más enlaces fosfodiéster con un enlace fosforotioato. El ácido nucleico artificial puede contener cualquier otra variante de la estructura principal de fosfato de ácidos nucleicos nativos conocidos en la técnica. El uso de ácidos nucleicos de fosfotiorato y PNA se conocen por los expertos en la técnica, y se describen, por ejemplo, en Neilsen PE, Curr Opin Struct Biol 9:353-57; y Raz NK et al Biochem Biophys Res Commun. 297: 1075-84. La producción y uso de ácidos nucleicos se conoce por los expertos en la técnica y se describe, por ejemplo, en Molecular Cloning, (2001), Sambrook y Russell, eds. y Methods in Enzymology: Methods for molecular cloning in eukaryotic cells (2003) Purchio y G. C. Fareed.

Un "ácido nucleico aislado" se refiere a un segmento o fragmento de ácido nucleico que ha sido separado de secuencias que lo flanquean en un estado natural, por ejemplo, un fragmento de ADN que ha sido eliminado de las secuencias que están normalmente adyacentes al fragmento, por ejemplo, las secuencias adyacentes al fragmento en un genoma en el que ocurre naturalmente. El término también se aplica a ácidos nucleicos que se han purificado sustancialmente a partir de otros componentes que acompañan naturalmente al ácido nucleico, por ejemplo, ARN o ADN o proteínas, que lo acompañan naturalmente en la célula. Por lo tanto, el término incluye, por ejemplo, un ADN recombinante que se incorpora en un vector, en un plásmido o virus de replicación autónoma, o en el ADN genómico de un procariota o eucariota, o que existe como una molécula separada (por ejemplo, como un ADNc o un fragmento genómico o de ADNc producido por PCR o digestión con enzimas de restricción) independiente de otras secuencias. También incluye un ADN recombinante que es parte de un gen híbrido que codifica una secuencia polipeptídica adicional.

También se desvelan vectores que comprenden un polinucleótido que codifica un polipéptido expresado por la *Listeria* recombinante de la presente invención. En una realización, el término "polinucleótido" se refiere a una cadena de muchos nucleótidos, que en una realización, es más de 5, en otra realización, más de 10, en otra realización, más de 20, en otra realización, más de 50. En una realización, un oligonucleótido o polinucleótido o ácido nucleico puede referirse a secuencias procarióticas, ARNm eucariota, ADNc de ARNm eucariota, secuencias de ADN genómico de ADN eucariota (por ejemplo, mamífero), o secuencias de ADN sintético. El término también se refiere a secuencias que incluyen cualquiera de los análogos de base conocidos de ADN y ARN.

En una realización, dos polinucleótidos útiles en la *Listeria* recombinante de la presente invención están unidos operativamente. Por ejemplo, en una realización, los polinucleótidos que codifican LLO y Flk1-E1 o Flk1-I1 están unidos operativamente. En una realización, "unido operativamente" indica que un resto de ácido nucleico de cadena sencilla o doble cadena comprende los dos polinucleótidos dispuestos dentro del resto de ácido nucleico de tal manera que se expresan juntos. A modo de ejemplo, un promotor unido operativamente a la región codificante de un gen es capaz de promover la transcripción de la región codificante.

En una realización, un polinucleótido útil en la *Listeria* recombinante de la presente invención comprende una secuencia promotora/reguladora. La secuencia promotora/reguladora puede estar situada en el extremo 5' de la secuencia codificante de proteína deseada de tal manera que impulse la expresión de la proteína deseada en una célula. Juntos, el ácido nucleico que codifica la proteína deseada y su secuencia promotora/reguladora comprenden un "transgén".

En una realización, un ácido nucleico aislado puede expresarse bajo el control de un promotor, que en una realización, es un promotor hly, un promotor prfA, un promotor ActA o un promotor p60. En otra realización, un polipéptido puede expresarse a partir de un promotor, como se describe en el presente documento, tal como un promotor de CMV o CAG. Otros promotores que se pueden utilizar se conocen en la técnica.

En una realización, la expresión "secuencia promotora/reguladora" se refiere a una secuencia de ácido nucleico que se requiere para la expresión de un producto génico unido operativamente a la secuencia promotora/reguladora. En algunos casos, esta secuencia puede ser la secuencia promotora del núcleo y en otros casos, esta secuencia

también puede incluir una secuencia potenciadora y otros elementos reguladores que se requieren para la expresión del producto génico. La secuencia promotora/reguladora puede ser, por ejemplo, una que expresa el producto génico en una forma específica de tejido.

Un promotor "constitutivo" es una secuencia de nucleótidos que, cuando está unida operativamente a un polinucleótido que codifica o especifica un producto génico, hace que el producto génico se produzca en una célula humana viva bajo la mayoría o todas las condiciones fisiológicas de la célula.

Un promotor "inducible" es una secuencia de nucleótidos que, cuando está unida operativamente a un polinucleótido que codifica o especifica un producto génico, hace que el producto génico sea producido en una célula viva sustancialmente sólo cuando un inductor que corresponde al promotor está presente en la célula.

Un promotor "específico de tejido" es una secuencia de nucleótidos que, cuando está unida operativamente a un polinucleótido que codifica o especifica un producto génico, hace que el producto génico se produzca en una célula humana viva sustancialmente sólo si la célula es una célula del tipo tisular correspondiente al promotor.

También se desvelan vectores que comprenden un ácido nucleico aislado que son útiles en la *Listeria* recombinante de la presente invención. La incorporación de un ácido nucleico deseado en un vector y la elección de vectores se conoce bien en la técnica como se describe, por ejemplo, en Sambrook et al. (1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York), y en Ausubel et al. (1997, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Nueva York).

La solicitud también desvela células, virus, provirus, y similares, que contienen dichos vectores. Los métodos para producir células que comprenden vectores y/o ácidos nucleicos exógenos se conocen bien en la técnica. Véase, por ejemplo, Sambrook et al. (1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York), y en Ausubel et al. (1997, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Nueva York).

El vector de expresión puede ser un plásmido. Los métodos para construir y utilizar vectores recombinantes se conocen bien en la técnica y se describen, por ejemplo, en Sambrook et al. (2001, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York), y en Brent et al. (2003, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Nueva York).

El vector puede ser un patógeno intracelular o derivado de un patógeno citosólico o un patógeno intracelular. Un patógeno intracelular puede inducir una respuesta inmune predominantemente mediada por células. El vector puede ser una cepa de Salmonella, una cepa BCG, o un vector bacteriano. Las células dendríticas transducidas con un vector de la presente invención pueden aumentar la respuesta inmunitaria del sujeto, lo que puede lograrse mediante el aumento de la actividad de CTL.

El vector de vacuna recombinante puede inducir una respuesta inmune predominantemente de tipo Th1.

El vector puede seleccionarse de Salmonella sp., Shigella sp., BCG, L. monocytogenes, E. coli y S. gordonii. Las proteínas de fusión pueden administrarse mediante vectores bacterianos recombinantes modificados para escapar a la fusión fagolisosómica y vivir en el citoplasma de la célula. En otra realización, el vector es un vector vírico. En otras realizaciones, el vector se selecciona de Vaccinia, Avipox, Adenovirus, AAV, virus de Vaccinia NYVAC, cepa de vaccinia modificada Ankara (MVA), virus del bosque Semliki, virus de la encefalitis equina venezolana, virus del herpes y retrovirus. En otra realización, el vector es un vector de ADN desnudo.

En una realización, la presente invención proporciona una Listeria, que en una realización, es una cepa de vacuna contra Listeria que comprende un ácido nucleico aislado o un vector de la presente invención. En una realización, una "cepa de vacuna contra Listeria" se usa en el presente documento para referirse a un organismo de Listeria recombinante que expresa un polipéptido Flg-1-E1 o Flk-1-I1 de VEGFR2, o una combinación de los mismos.

En otra realización, la presente invención proporciona una vacuna que comprende una cepa de *Listeria* recombinante de la presente invención y un adyuvante.

En una realización, una vacuna de la presente invención comprende un adyuvante y comprende adicionalmente una citocina, quimiocina o una combinación de las mismas. En una realización, una vacuna es una composición que provoca una respuesta inmune a un antígeno o polipéptido en la composición como resultado de la exposición a la composición. En otra realización, la vacuna o composición comprende adicionalmente APC, que en una realización

son autólogas, mientras que en otra realización, son alogénicas para el sujeto.

En una realización, una "vacuna" es una composición que provoca una respuesta inmune en un huésped a un antígeno o polipéptido en la composición como resultado de la exposición a la composición. En una realización, la respuesta inmune es a un antígeno particular o a un epítopo particular sobre el antígeno. En otra realización, la vacuna puede estar contenida dentro y, en otra realización, suministrada por una célula, que en una realización es una célula bacteriana, que en una realización, es una Listeria. En una realización, una vacuna puede impedir que un sujeto contraiga o desarrolle una enfermedad o afección, en la que en otra realización, una vacuna puede ser terapéutica para un sujeto que tiene una enfermedad o afección. Los efectos terapéuticos y profilácticos de las composiciones de la presente invención se han descrito anteriormente en el presente documento. En una realización, una vacuna de la presente invención comprende una composición de la presente invención y un adyuvante, citocina, quimiocina, o una combinación de los mismos.

Una composición inmunogénica de la presente invención puede comprender, en otra realización, un adyuvante que favorece una respuesta inmune predominantemente de tipo Th1. En otra realización, el adyuvante favorece una respuesta inmune predominantemente mediada por Th1. En otra realización, el adyuvante favorece una respuesta inmune de tipo Th1. En otra realización, el adyuvante favorece una respuesta inmune mediada por Th1. En otra realización, el adyuvante favorece una respuesta inmune mediada por células sobre una respuesta mediada por anticuerpos. En otra realización, el adyuvante es cualquier otro tipo de adyuvante conocido en la técnica. En otra realización, la composición inmunógena induce la formación de una respuesta inmunitaria de linfocitos T contra la proteína diana.

En otra realización, el adyuvante es MPL. En otra realización, el adyuvante es QS21. En otra realización, el adyuvante es un agonista de TLR. En otra realización, el adyuvante es un agonista de TLR4. En otra realización, el adyuvante es un agonista de TLR9. En otra realización, el adyuvante es Resiquimod®. En otra realización, el adyuvante es imiquimod. En otra realización, el adyuvante es un oligonucleótido CpG. En otra realización, el adyuvante es una citocina o un ácido nucleico que codifica la misma. En otra realización, el adyuvante es una quimiocina o un ácido nucleico que lo codifica. En otra realización, el adyuvante es IL-12 o un ácido nucleico que lo codifica. En otra realización, el adyuvante es IL-6 o un ácido nucleico que lo codifica. En otra realización, el adyuvante es un lipopolisacárido. En otra realización, el adyuvante es como se describe en Fundamental Immunology, 5ª ed. (Agosto de 2003): William E. Paul (Editor); Lippincott Williams & Wilkins Publishers; Capítulo 43: Vaccines, GJV Nossal. En otra realización, el adyuvante es cualquier otro adyuvante conocido en la técnica.

En una realización, una "respuesta inmune predominantemente de tipo Th1" se refiere a una respuesta inmunitaria en la que el IFN-gamma es secretado. En otra realización, se refiere a una respuesta inmune en la que el factor de necrosis tumoral β es secretado. En otra realización, se refiere a una respuesta inmune en la que se secreta IL-2.

En otra realización, la presente invención proporciona una cepa de *Listeria* recombinante que comprende un polipéptido de VEGFR2 Flg-1-E1 o Flk-1-I1, o una combinación de los mismos, unidos operativamente a un polipéptido no VEGFR2 seleccionado de un polipéptido no hemolítico de listeriolisina (LLO), un polipéptido ActA, o un polipéptido de tipo PEST, o un fragmento de los mismos. En una realización, el fragmento tiene las mismas o similares propiedades o función que el péptido o proteína de longitud completa, como se puede demostrar usando ensayos y herramientas que se conocen en la técnica. Las propiedades y funciones de los péptidos y proteínas de longitud completa de la presente invención se describen en detalle a continuación en el presente documento.

En una realización, la presente invención proporciona una cepa de *Listeria* recombinante que comprende un ácido nucleico que codifica un factor angiogénico, en la que el factor angiogénico es un polipéptido de VEGFR2 Flk-1-E1 o Flk-1-I1, o una combinación de los mismos.

En una realización, el factor angiogénico está unido operativamente a un polipéptido que comprende una secuencia de tipo PEST.

En una realización, el factor angiogénico VEGFR2 comprende uno o más epítopos reconocidos por el sistema inmune huésped. En una realización, el factor angiogénico es una molécula implicada en la formación de nuevos vasos sanguíneos.

Por lo tanto, en una realización, las composiciones y usos médicos de la presente invención se dirigen a la vasculatura tumoral. En una realización, las composiciones y usos médicos de la presente invención demuestran una propagación profunda del epítopo, que en una realización, es un proceso por el cual los epítopos distintos y sin

reacción cruzada con un epítopo inductor se convierten en dianas principales de una respuesta inmune en curso. En una realización, los datos presentados en los Ejemplos a continuación en el presente documento demuestran que una vacuna dirigida a la vasculatura tumoral puede inducir una respuesta inmune contra antígenos tumorales endógenos, que en una realización, permite a un experto en la técnica tratar, suprimir o inhibir un tumor sin direccionamiento de un antígeno específico asociado al tumor. Por lo tanto, en una realización, las composiciones de la presente invención sirven como vacuna universal contra un cáncer o tumor, que en una realización, no depende de que un antígeno tumoral particular sea eficaz. En una realización, la especificidad tumoral se confiere porque los tumores tienen una mala cobertura vascular y pericítica.

En una realización, las composiciones de la presente invención son extremadamente eficaces en los usos médicos de la presente invención, en una realización, durante periodos prolongados de tiempo, debido a que es improbable que se produzcan variantes de pérdida de antígeno, porque los polipéptidos relacionados con angiogénicos tales como VEGFR2, son cruciales para el funcionamiento general, y por lo tanto, no se perderán ni se reemplazarán. En una realización, las composiciones y los usos médicos de la presente invención no perjudicarán al tejido normal, que tiene una cobertura vascular y pericítica bien desarrollada, sino que se dirigirán a la vasculatura del tumor, cuya cobertura vascular y pericítica no está bien desarrollada.

En esta invención, el factor angiogénico utilizado en las composiciones y usos médicos de la presente invención es un fragmento Flk-1-E1 o Flk-1-I1 de VEGFR2. En una realización, el fragmento contiene epítopos de linfocitos T.

El factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) es una importante proteína de señalización implicada tanto en la vasculogénesis (la formación del sistema circulatorio embrionario) como en la angiogénesis (el crecimiento de los vasos sanguíneos de la vasculatura preexistente). En una realización, la actividad del VEGF se restringe principalmente a las células del endotelio vascular, aunque sí tiene efectos sobre un número limitado de otros tipos de células (por ejemplo, migración de monocitos/macrófagos por estimulación). *In vitro*, se ha demostrado que el VEGF estimula la mitogénesis de las células endoteliales y la migración celular. El VEGF también mejora la permeabilidad microvascular y a veces se denomina factor de permeabilidad vascular.

En una realización, todos los miembros de la familia de VEGF estimulan las respuestas celulares uniéndose a receptores de tirosina cinasa (los VEGFR) en la superficie celular, haciendo que se dimericen y se activen a través de transfosforilación. Los receptores de VEGF tienen una porción extracelular que consiste en 7 dominios de tipo inmunoglobulina, una única región de extensión transmembrana y una porción intracelular que contiene un dominio de tirosina-cinasa dividido.

En una realización, VEGF-A es un ligando VEGFR-2 (KDR/Flk-1), así como un ligando VEGFR-1 (Flt-1). En una realización, VEGFR media casi todas las respuestas celulares conocidas a VEGF. La función de VEGFR-1 está menos bien definida, aunque se piensa que modula la señalización de VEGFR-2, en una realización, mediante secuestro de VEGF a partir de la unión a VEGFR-2, que en una realización, es particularmente importante durante la vasculogénesis en el embrión. En una realización, VEGF-C y VEGF-D son ligandos del receptor de VEGFR-3, que en una realización, media la linfangiogénesis.

En una realización, las composiciones de la presente invención comprenden un fragmento Flk-1-E1 o Flk-1-I1 de VEGFR-2, o una combinación de los mismos.

El receptor del factor de crecimiento endotelial vascular 2 (VEGFR2) está altamente expresado en células endoteliales activadas (EC) y participa en la formación de nuevos vasos sanguíneos. En una realización, VEGFR2 se une a las 5 isoformas de VEGF. En una realización, la señalización de VEGF a través de VEGFR2 en las EC induce la proliferación, migración y diferenciación eventual. En una realización, el homólogo de ratón de VEGFR2 es el gen 1 de la cinasa hepática fetal (Flk-1), que es una diana terapéutica fuerte, y tiene papeles importantes en el crecimiento, la invasión y la metástasis del tumor. En una realización, el VEGFR2 también se denomina receptor del dominio de inserción de la cinasa (un receptor tirosina cinasa de tipo III) (KDR), grupo de diferenciación 309 (CD309), FLK1, Ly73, Krd-1, VEGFR, VEGFR-2, o 6130401C07.

En otra realización, la proteína VEGFR2 tiene la siguiente secuencia:

MESKALLAVALWFCVETRAASVGLPGDFLHPPKLSTQKDILTILANTTLQITCRGQR
DLDWLWPNAQ**RDSEERVLVTECGGGDSIFCKTLTIPRVVGNDTGAYKCSYRDVDIAST**
VYVYVRDYRSPFIASVSDQHGIVYITENKNKTVVIPCRGSISNLNVSLCARYPEKRFVPD
GNRISWDSEIGFTLPSYMISYAGMVFCEAKINDETYQSIMYIVVVVGYRIYDVILSPPHE

IELSAGEKLVLNCTARTELNVGLDFTWHSPPSKSHHKKIVNRDVKPFPGTVAKMFLSTL
TIESVTKSDQGEYTCVASSGRMIKRNRTFVRVHTKPFIAFGSGMKSLVEATVGSQVRIPVKY
LSYPAPDIKWYRNGRPIESNYTMIVGDELTIMEVTERDAGNYTVILTNPISMEKQSHMVSLV
VNVPPQIGEKALISPMDSYQYGTMQTLTCTVYANPPLHHIQWYWQLEEACSYRPGQTSPY
ACKEWRHVEDFQGGNKIEVTKNQYALIEGKNKTVSTLVIQAANVSALYKCEAINKAGRGE
RVISFH**VIRGPEITVOPAAQPTEQESVSLLCTADRNTFENLTWYKLGSQATSVHMGESL**
TPVCKNLDALWKLNGTMFSNSTNDILIVAFQNASLODQGDYVCSAQDKKTKKRHCLV
KQLIILERMAPMITGNLENQTTTIGETIEVTCPASGNPTPHITWFKDNETLVEDSGIVLR
DGNRNLTIRRVRKEDGGLYTCQACNVLGCARAETLFIIEGAQEKTNLEVIILVGTAVIAMF
FWLLLVIVLRTVKRAN**EGELKTGYLSIVMDPDELPLDERCERLPYDASKWEFPRDRLK**
LGKPLGRGAFGQVIEADAFGIDKTATCKTVAVKMLKEGATHSEHRALMSELKILIHIG
HHLNVVNLLGACTKPGGPLMVIVEFCKFGNLSTYLRGKRNEFVPYKSKGARFRQGK
DYVGELSVDLKRRLDSITSSQSSASSGFVEEKSLSDVEEEEASEELYKDFLTLEHLICYS
FQVAKGMEFLASRKCIHRDLAARNILLSEKNV VKICDFGLARDIYKDPDYVRKGDARL
PLKWMAPETIFDRVYTIQSDVWSFGVLLWEIFSLGASPYPGVKIDEEFCRRLKEGTRMRAP
DYTTPEMYQTMLDCWHEDPNQRPSFSELVEHLGNLLQANAQQDGKDYIVLPMSETLSMEE
DSGLSLPTSPVSCMEEEEVCDPKFHYDNTAGISHYLQNSKRKSRPVSVKTFEDIPLEEPEVK
VIPDDSQTDSGMVLASEELKTLEDRNKLSPSFGGMMPSKSRESVASEGSNQTSGYQSGYHS
DDTDTTVYSSDEAGLLKMVDAAVHADSGTTLRSPPV (N.º de Acceso al GenBank NP_034742.2, AAH20530.1, o EDL37891.1; SEQ ID NO: 4; la secuencia de ácido nucleico se expone en el N.º de acceso al GenBank NM_010612.2 o BC020530.1). En una realización, AA 68-277 corresponde a E1 descrito en el presente documento, AA 545-730 corresponde a E2 descrito en el presente documento, y AA 792-1081 corresponde a I1 descrito en el presente documento. En otra realización, la secuencia anterior se utiliza como fuente del fragmento VEGFR2 incorporado en una vacuna de la presente invención. En otra realización, una secuencia de AA de VEGFR2 de composiciones de la presente invención es un homólogo de SEQ ID NO: 4. En otra realización, la secuencia de AA de VEGFR2 es una variante de SEQ ID NO: 4. En otra realización, la secuencia de AA de VEGFR2 es un fragmento de SEQ ID NO: 4. En otra realización, la secuencia de AA de VEGFR2 es una isoforma de SEQ ID NO: 4.

En otra realización, el VEGFR2 tiene una secuencia de aminoácidos expuesta en una de las siguientes entradas de GenBank: EDL37891.1; CAA61917.1; BAC27532.1; BAE24892.1; AAH20530.1; AAB25043.1; CAA42040.1; o CAA50192.1. En otra realización, el VEGFR2 tiene una secuencia de aminoácidos expuesta en una de las siguientes entradas de GenBank: EAX05462.1; EAX05463.1; EAX05464.1; CAA61916.1; BAD93138.1; AAB88005.1; AAC16450.1; BAG57114.1; AAI31823.1; ACF47599.1; AAA59459.1; o CAA43837.1. En otra realización, el VEGFR2 tiene una secuencia de aminoácidos expuesta en una de las siguientes entradas de GenBank: EDL89914.1; EDL89915.1; EDL89916.1; AAH87029.1; AAB97508.1; o AAB97509.1. En otra realización, el VEGFR2 tiene una secuencia de aminoácidos expuesta en una de las siguientes entradas de GenBank: CAQ13438.1; AAF03237.1; AAN47136.1; AAL16381.1; AAI29159.1; CAM73177.1; AAB18415.1; AAB41042.1; o AAB62405.1. En otra realización, el VEGFR2 tiene cualquier secuencia de aminoácidos de VEGFR2 conocida en la técnica. En otra realización, el VEGFR2 es un homólogo de una secuencia de una de las entradas de GenBank anteriores. En otra realización, el VEGFR2 es una variante de una secuencia de una de las entradas de GenBank anteriores. En otra realización, el VEGFR2 es una isoforma de una secuencia de una de las entradas de GenBank anteriores. En otra realización, el VEGFR2 es un fragmento de una secuencia de una de las entradas de GenBank anteriores.

En otra realización, el VEGFR2 tiene una secuencia de ácido nucleico expuesta en una de las siguientes entradas de GenBank: AC124615.11; AC134903.4; AC160723.2; AF061804.1; AF153058.1; CH466524.1; X89777.1; AK031739.1; AK054510.1; AK141938.1; BC020530.1; S53103.1; X59397.1; o X70842.1. En otra realización, el VEGFR2 tiene una secuencia de ácido nucleico expuesta en una de las siguientes entradas de GenBank: AC021220.7; AC111194.4; CH471057.1; EAX05463.1; EAX05464.1; X89776.1; AB209901.1; AF035121.1; AF063658.1; AK293668.1; BC131822.1; BP280621.1; CR606055.1; EU826563.1; L04947.1; o X61656.1. En otra realización, el VEGFR2 tiene una secuencia de ácido nucleico expuesta en una de las siguientes entradas de GenBank: CH473981.1; BC087029.1; U93306.1; o U93307.1. En otra realización, el VEGFR2 tiene una secuencia de ácido nucleico expuesta en una de las siguientes entradas de GenBank: AL935131.7; BX247946.6; CR759732.9; AF180354.1; AF487829.1; AY056466.1; BC129158.1; CU458916.1; U75995.1; U82383.1; y U89515.1. En otra realización, el VEGFR2 es un homólogo de una secuencia de una de las entradas de GenBank anteriores. En otra realización, el VEGFR2 es una variante de una secuencia de una de las entradas de GenBank anteriores. En otra realización, el VEGFR2 es una isoforma de una secuencia de una de las entradas de GenBank anteriores. En otra realización, el VEGFR2 es un fragmento de una secuencia de una de las entradas de GenBank anteriores.

En otra realización, se utiliza un fragmento polipeptídico de VEGFR2 en composiciones y usos médicos de la presente invención. En otra realización, el fragmento VEGFR2 comprende los aminoácidos 68-277 de la proteína VEGFR2, que en una realización, se denomina Flk1-E1. En otra realización, el fragmento polipeptídico de VEGFR2 tiene la secuencia:

RDSEERVLVTECGGGDSIFCKTLTIPRWGNDTGAYKCSYRDVDIASTVYVYVRDY
RSPFIASVSDQHGIVYITENKNKTVVIPCRGSISNLNVSLCARYPEKRFVPDGNRISWDSEIGF
TLPSYMISYAGMVFCEAKINDETYQSIMYIVVVVGYRIYDVILSPPHEIELSAGEKLVLNCTA
RTELNVGLDFTWHSPPSKSHHKKIVNR (SEQ ID NO: 5). En otra realización, una secuencia de AA de VEGFR2 de composiciones de la presente invención comprende la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 5. En otra realización, la secuencia de AA de VEGFR2 es un homólogo de SEQ ID NO: 5. En otra realización, la secuencia de AA de VEGFR2 es una variante de SEQ ID NO: 5. En otra realización, la secuencia de AA de VEGFR2 es un fragmento de SEQ ID NO: 5. En otra realización, la secuencia de AA de VEGFR2 es una isoforma de SEQ ID NO: 5.

En otra realización, el fragmento VEGFR2 comprende los aminoácidos 792-1081 de la proteína VEGFR2, que en una realización, se denomina Flk1-I1. En otra realización, el fragmento polipeptídico de VEGFR2 tiene la secuencia:

EGELKTGYLSIVMDPDELPLDERCERLPYDASKWEFPRDRLKLGKPLGRGAFGQVI
EADAFGIDKTATCKTVAVKMLKEGATHSEHRALMSELKILIHIGHHLNVVNLLGACTKPGG
PLMVIVEFCKFGNLSTYLRGKRNEFVPYKSKGARFRQGKDYVGELSVDLKRRLDSITSSQSS
ASSGFVEEKSLSDVEEEEASEELYKDFLTLEHLICYSFQVAKGMEFLASRKCIHRDLAARNIL
LSEKNVVKICDFGLARDIYKDPDYVRKGDARLPLKWMAPETIFDRVYT (SEQ ID NO: 7). En otra realización, una secuencia de AA de VEGFR2 de composiciones de la presente invención comprende la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 7. En otra realización, la secuencia de AA de VEGFR2 es un homólogo de SEQ ID NO: 7. En otra realización, la secuencia de AA de VEGFR2 es una variante de SEQ ID NO: 7. En otra realización, la secuencia de AA de VEGFR2 es un fragmento de SEQ ID NO: 7. En otra realización, la secuencia de AA de VEGFR2 es una isoforma de SEQ ID NO: 7.

En otra realización, una secuencia de AA de VEGFR2 de composiciones de la presente invención consiste en la secuencia expuesta en las SEQ ID NOs: 54-58. En otra realización, una secuencia de AA de VEGFR2 de composiciones de la presente invención comprende una o más de las secuencias expuestas en las SEQ ID NOs: 54-58. En otra realización, la secuencia de AA de VEGFR2 es un homólogo de las SEQ ID NOs: 54-58. En otra realización, la secuencia de AA de VEGFR2 es una variante de las SEQ ID NOs: 54-58. En otra realización, la secuencia de AA de VEGFR2 es un fragmento de las SEQ ID NOs: 54-58. En otra realización, la secuencia de AA de VEGFR2 es una isoforma de las SEQ ID NOs: 54-58.

Por lo tanto, en una realización, el fragmento de VEGFR2 usado en las composiciones y la presente invención es Flk1-E1 o Flk1-I1, o una combinación de los mismos. En otra realización, el fragmento de VEGFR2 usado en las composiciones de la presente invención se selecciona de SEQ ID NO: 5 o SEQ ID NO: 7.

En una realización, el VEGFR2 para las composiciones y usos médicos de la presente invención comprende la secuencia señal de VEGFR2, que en una realización, son los aminoácidos 1-20 de la secuencia de aminoácidos de VEGFR2. En otra realización, el VEGFR2 para las composiciones y usos médicos de la presente invención excluye la secuencia señal de VEGFR2.

En otra realización, un polipéptido recombinante en la Listeria de la presente invención comprende además un péptido no VEGFR2. En otra realización, un polipéptido recombinante en la Listeria de la presente invención está operativamente unido a un polipéptido que comprende una secuencia de tipo PEST. En otra realización, el péptido no VEGFR2 aumenta la inmunogenicidad del fragmento.

En una realización, el polipéptido no VEGFR2 comprende una secuencia de tipo PEST, mientras que en otra realización, el polipéptido no VEGFR2 consiste en una secuencia de tipo PEST. El polipéptido no VEGFR2 es, en otra realización, un oligopéptido de listeriolisina (LLO), que en una realización, comprende una secuencia de tipo PEST. En otra realización, el péptido no VEGFR2 es un oligopéptido ActA, que en una realización, comprende una secuencia de tipo PEST. En otra realización, el péptido no VEGFR2 es un oligopéptido de tipo PEST. Como se proporciona en el presente documento, la fusión a LLO, ActA, secuencias de tipo PEST y fragmentos de los mismos aumenta la inmunogenicidad mediada por células de antígenos. En una realización, la fusión a LLO, ActA, secuencias de tipo PEST y fragmentos de los mismos aumenta la inmunogenicidad mediada por células de

antígenos en una diversidad de sistemas de expresión. En una realización, el sistema de expresión es vírico, mientras que en otra realización, el sistema de expresión es bacteriano. En otra realización, el péptido no VEGFR2 es cualquier otro péptido inmunógeno no VEGFR2 conocido en la técnica.

En una realización, un polipéptido que comprende una secuencia de tipo PEST es un péptido listeriolisina (LLO). En una realización, un polipéptido que comprende una secuencia de tipo PEST es un polipéptido no hemolítico de listeriolisina (LLO). En una realización, un polipéptido que comprende una secuencia de tipo PEST es un polipéptido ActA. En una realización, un polipéptido que comprende una secuencia de tipo PEST es un polipéptido ActA N-terminal. En una realización, un polipéptido que comprende una secuencia de tipo PEST consiste en una secuencia de tipo PEST.

Un oligopéptido LLO para su uso en las composiciones de la presente invención es, en otra realización, un oligopéptido LLO no hemolítico. En otra realización, el oligopéptido es un fragmento LLO. En otra realización, el oligopéptido es una proteína LLO completa. En otra realización, el oligopéptido es cualquier proteína LLO o fragmento de la misma conocida en la técnica.

En una realización, la proteína LLO es el principal factor de virulencia de Lm responsable de la lisis del fagolisosoma. En una realización, LLO es altamente inmunógeno, en otra realización, LLO induce la maduración de linfocitos T específicos de antígeno en células Th1, y en otra realización, LLO induce la secreción de interferón gamma por los linfocitos T.

En una realización, el fragmento LLO comprende una mutación en el dominio de unión al colesterol o una supresión dentro del dominio de unión al colesterol, o una deleción del dominio de unión al colesterol, que en una realización, vuelve a la LLO no hemolítica. En otra realización, el fragmento LLO se vuelve no hemolítico por tratamiento químico. En otra realización, el tratamiento químico comprende glutaraldehído. En otra realización, el tratamiento químico comprende un compuesto de acción similar. En otra realización, el tratamiento químico comprende cualquier otro compuesto adecuado conocido en la técnica.

En otra realización, la proteína LLO utilizada para construir vacunas de la presente invención tiene la siguiente secuencia:

mkkimlvfitlilvslpiaqqteakdasafnkensissmappasppaspktpiekkhadeidkyiqgldynknnvlvyhgdavtn
vpprkgykdgneyivvekkkksinqnnadiqvvnaissltypgalvkanselvenqpdvlpvkrdsltlsidlpgmtnqdnkivvknatks
nvnnavntlverwnekyaqaypnvsakidyddemaysesqliakfgtafkavnnslnvnfgaisegkmqeevisfkqiyynvnvneptrp
srffgkavtkeqlqalgvnaenppayissvaygrqvylklstnshstkvkaafdaavsgksvsgdveltniiknssfkaviyggsakdevqiid
gnlgdlrdilkkgatfnretpgvpiayttnflkdnelaviknnseyiettskaytdgkinidhsggyvaqfniswdevnydpegneivqhknw
sennksklahftssiylpgnarninvyakectglawewwrtviddrnlplvknrnisiwgttlypkysnkvdnpie (N.º de acceso al GenBank P13128; SEQ ID NO: 8; la secuencia de ácido nucleico se expone en el N.º de acceso al GenBank X15127). En una realización, los primeros 25 AA de la proproteína que corresponde a esta secuencia son la secuencia señal y se escinden en LLO cuando es secretada por la bacteria. Por lo tanto, de acuerdo con esta realización, la proteína LLO activa de longitud completa tiene 504 residuos de largo. En otra realización, la secuencia anterior se utiliza como fuente del fragmento LLO incorporado en una vacuna de la presente invención. En otra realización, una secuencia de AA de LLO de composiciones de la presente invención es un homólogo de SEQ ID NO: 8. En otra realización, la secuencia de AA de LLO es una variante de SEQ ID NO: 8. En otra realización, la secuencia de AA de LLO es un fragmento de SEQ ID NO: 8. En otra realización, la secuencia de AA de LLO es una isoforma de SEQ ID NO: 8.

En otra realización, se utiliza un fragmento de proteína LLO en composiciones y usos médicos de la presente invención. En otra realización, el fragmento LLO es un fragmento N-terminal. En otra realización, el fragmento LLO N-terminal tiene la secuencia:

mkkimlvfitlilvslpiaqqteakdasafnkensissvappasppaspktpiekkhadeidkyiqgldynknnvlvyhgdavtn
vpprkgykdgneyivvekkkksinqnnadiqvvnaissltypgalvkanselvenqpdvlpvkrdsltlsidlpgmtnqdnkivvknatks
nvnnavntlverwnekyaqaysnvsakidyddemaysesqliakfgtafkavnnslnvnfgaisegkmqeevisfkqiyynvnvneptrp
srffgkavtkeqlqalgvnaenppayissvaygrqvylklstnshstkvkaafdaavsgksvsgdveltniiknssfkaviyggsakdevqiid
gnlgdlrdilkkgatfnretpgvpiayttnflkdnelaviknnseyiettskaytdgkinidhsggyvaqfniswdevnyd (SEQ ID NO: 9). En otra realización, una secuencia de AA de LLO de composiciones de la presente invención comprende la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 9. En otra realización, la secuencia de AA de LLO es un homólogo de SEQ ID NO: 9. En otra realización, la secuencia de AA de LLO es una variante de SEQ ID NO: 9. En otra

realización, la secuencia de AA de LLO es un fragmento de SEQ ID NO: 9. En otra realización, la secuencia de AA de LLO es una isoforma de SEQ ID NO: 9.

En otra realización, el fragmento LLO tiene la secuencia:

mkkimlvfitlilvslpiaqqteakdasafnkensissvappasppaspktpiekkhadeidkyiqgldynknnvlvyhgdavtn
vpprkgykdgneyivvekkkksinqnnadiqvvnaissltypgalvkanselvenqpdvlpvkrdsltlsidlpgmtnqdnkivvnatks
nvnnavntlverwnekyaqaysnvsakidyddemaysesqliakfgtafkavnnslnvnfgaisegkmqeevisfkqiyynvnvneptrp
srffgkavtkeqlqalgvnaenppayissvaygrqvylklstnshstkvkaafdaavsgksvsgdveltniiknssfkaviyggsakdevqiid
gnlgdlrdilkkgatfnretpgvpiayttnflkdnelaviknnseyiettskaytd (SEQ ID NO: 10). En otra realización, una secuencia de AA de LLO de composiciones de la presente invención comprende la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 10. En otra realización, la secuencia de AA de LLO es un homólogo de SEQ ID NO: 10. En otra realización, la secuencia de AA de LLO es una variante de SEQ ID NO: 10. En otra realización, la secuencia de AA de LLO es un fragmento de SEQ ID NO: 10. En otra realización, la secuencia de AA de LLO es una isoforma de SEQ ID NO: 10.

En otra realización, el fragmento LLO de composiciones de la presente invención comprende un dominio de tipo PEST. En otra realización, un fragmento LLO que comprende una secuencia PEST se utiliza como parte de una composición o en los usos médicos de la presente invención.

En otra realización, el fragmento LLO no contiene el dominio de activación en el extremo carboxi. En otra realización, el fragmento LLO no incluye cisteína 484. En otra realización, el fragmento LLO es un fragmento no hemolítico. En otra realización, el fragmento LLO se hace no hemolítico por deleción o mutación del dominio de activación. En otra realización, el fragmento LLO se hace no hemolítico por deleción o mutación de la cisteína 484. En otra realización, una secuencia LLO se hace no hemolítica por deleción o mutación en otra ubicación.

En otra realización, el fragmento LLO consiste en aproximadamente los primeros 441 AA de la proteína LLO. En otra realización, el fragmento LLO comprende aproximadamente los primeros AA 400-441 de la proteína LLO de longitud completa de 529 AA. En otra realización, el fragmento LLO corresponde a AA 1-441 de una proteína LLO desvelada en el presente documento. En otra realización, el fragmento LLO consiste en aproximadamente los primeros 420 AA de LLO. En otra realización, el fragmento LLO corresponde a los AA 1-420 de una proteína LLO desvelada en el presente documento. En otra realización, el fragmento LLO consiste en aproximadamente AA 20-442 de LLO. En otra realización, el fragmento LLO corresponde a los AA 20-442 de una proteína LLO desvelada en el presente documento. En otra realización, cualquier ΔLLO sin el dominio de activación que comprende cisteína 484, y en particular sin cisteína 484, es adecuado para los usos y composiciones de la presente invención.

En otra realización, el fragmento LLO corresponde a los primeros 400 AA de una proteína LLO, o los primeros 300 AA de una proteína LLO, o los primeros 200 AA de una proteína LLO, o los primeros 100 AA de una proteína LLO, o el fragmento LLO corresponde a los primeros 50 AA de una proteína LLO, que en una realización, comprende una o más secuencias de tipo PEST.

En otra realización, el fragmento LLO contiene residuos de una proteína LLO homóloga que corresponde a uno de los intervalos de AA anteriores. Los números de residuos no necesitan, en otra realización, corresponder exactamente con los números de residuos enumerados anteriormente; por ejemplo, si la proteína LLO homóloga tiene una inserción o deleción, en relación con una proteína LLO utilizada en el presente documento.

En otra realización, se pueden usar homólogos de LLO de otras especies, incluyendo lisinas conocidas, tales como estreptolisina O, perfringolisina O, neumolisina, etc., o fragmentos de las mismas como el no VEGFR2.

En otra realización de composiciones y usos médicos de la presente invención, un fragmento de una proteína ActA se fusiona con el fragmento VEGFR2. En otra realización, el fragmento de una proteína ActA tiene la secuencia:

MRAMMVVFITANCITINPDIIFAATDSEDSSLNTDEWEEEKTEEQPSEVNTGPRYETA
REVSSRDIKELEKSNKVRNTNKADLIAMLKEKAEKGPNINNNNSEQTENAAINEEASGADR
PAIQVERRHPGLPSDSAAEIKKRRKAIASSDSELESLTYPDKPTKVNKKKVAKESVADASES
DLDSSMQSADESSPQPLKANQQPFFPKVFKKIKDAGKWVRDKIDENPEVKKAIVDKSAGLI
DQLLTKKKSEEVNASDFPPPPTDEELRLALPETPMLLGFNAPATSEPSSFEFPPPPTDEELRLA
LPETPMLLGFNAPATSEPSSFEFPPPPTEDELEIIRETASSLDSSFTRGDLASLRNAINRHSQNF
SDFPPIPTEEELNGRGGRP (SEQ ID NO: 11). En otra realización, una secuencia de AA de ActA de

composiciones de la presente invención comprende la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 11. En otra realización, la secuencia de AA de ActA es un homólogo de SEQ ID NO: 11. En otra realización, la secuencia de AA de ActA es una variante de SEQ ID NO: 11. En otra realización, la secuencia de AA de ActA es un fragmento de SEQ ID NO: 11. En otra realización, la secuencia de AA de ActA es una isoforma de SEQ ID NO: 11.

En otra realización, el fragmento Act se codifica por un nucleótido recombinante que comprende la secuencia:

atgcgtgcgatgatggtggttttcattactgccaattgcattacgattaaccccgacataatatttgcagcgacagatagcgaagattctag
tctaaacacagatgaatgggaagaagaaaaaacagaagagcaaccaagcgaggtaaatacgggaccaagatacgaaactgcacgtgaagtaa
gttcacgtgatattaaagaactagaaaaatcgaataaagtgagaaatacgaacaaagcagacctaatagcaatgttgaaagaaaaagcagaaaaa
ggtccaaatatcaataataacaacagtgaacaaactgagaatgcggctataaatgaagaggcttcaggagccgaccgaccagctatacaagtgga
gcgtcgtcatccaggattgccatcggatagcgcagcggaaattaaaaaaagaaggaaagccatagcatcatcggatagtgagcttgaaagcctta
cttatccggataaaccaacaaaagtaaataagaaaaaagtggcgaaagagtcagttgcggatgcttctgaaagtgacttagattctagcatgcagtc
agcagatgagtcttcaccacaaccttttaaaagcaaaccaacaaccatttttccctaaagtatttaaaaaaataaaagatgcggggaaatgggtacgtg
ataaaatcgacgaaaatcctgaagtaaagaaagcgattgttgataaaagtgcagggttaattgaccaattattaaccaaaaagaaaagtgaagaggt
aaatgcttcggacttcccgccaccacctacggatgaagagttaagacttgctttgccagagacaccaatgcttcttggttttaatgctcctgctacatca
gaaccgagctcattcgaatttccaccaccacctacggatgaagagttaagacttgctttgccagagacgccaatgcttcttggttttaatgctcctgcta
catcggaaccgagctcgttcgaatttccaccgcctccaacagaagatgaactagaaatcatccgggaaacagcatcctcgctagattctagttttaca
agaggggatttagctagtttgagaaatgctattaatcgccatagtcaaaatttctctgatttcccaccaatcccaacagaagaagagttgaacgggag
aggcggtagacca (SEQ ID NO: 12). En otra realización, el nucleótido recombinante tiene la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 12. En otra realización, un nucleótido que codifica ActA de composiciones de la presente invención comprende la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 12. En otra realización, el nucleótido que codifica ActA es un homólogo de SEQ ID NO: 12. En otra realización, el nucleótido que codifica ActA es una variante de SEQ ID NO: 12. En otra realización, el nucleótido que codifica ActA es un fragmento de SEQ ID NO: 12. En otra realización, el nucleótido que codifica ActA es una isoforma de SEQ ID NO: 12.

En otra realización de composiciones de la presente invención, un fragmento de una proteína ActA se fusiona con el fragmento VEGFR2. En otra realización, el fragmento de una proteína ActA tiene la secuencia que se expone en el N.º de acceso al Genbank AAF04762. En otra realización, una secuencia de AA de ActA de composiciones de la presente invención comprende la secuencia expuesta en el N.º de acceso al Genbank AAF04762. En otra realización, la secuencia de AA de ActA es un homólogo del N.º de acceso al Genbank AAF04762. En otra realización, la secuencia de AA de ActA es una variante del N.º de acceso al Genbank AAF04762. En otra realización, la secuencia de AA de ActA es un fragmento del N.º de acceso al Genbank AAF04762. En otra realización, la secuencia de AA de ActA es una isoforma del N.º de acceso al Genbank AAF04762.

En otra realización, el fragmento ActA está codificado por un nucleótido recombinante que comprende la secuencia que se expone en el N.º de acceso al Genbank AF103807. En otra realización, el nucleótido recombinante tiene la secuencia expuesta en el N.º de acceso al Genbank AF103807. En otra realización, un nucleótido que codifica ActA de composiciones de la presente invención comprende la secuencia expuesta en el N.º de acceso al Genbank AF103807. En otra realización, el nucleótido que codifica ActA es un homólogo del N.º de acceso al Genbank AF103807. En otra realización, el nucleótido que codifica ActA es una variante de N.º de acceso al Genbank AF103807. En otra realización, el nucleótido que codifica ActA es un fragmento de N.º de acceso al Genbank AF103807. En otra realización, el nucleótido que codifica ActA es una isoforma de N.º de acceso al Genbank AF103807.

En otra realización de composiciones y usos de la presente invención, una secuencia de AA tipo PEST se fusiona con el fragmento VEGFR2. En otra realización, la secuencia de AA de tipo PEST es KENSISSMAPPASPPASPKTPIEKKHADEIDK (SEQ ID NO: 13). En otra realización, la secuencia de tipo PEST es KENSISSMAPPASPPASPK (SEQ ID NO: 14). En otra realización, la fusión de un antígeno con cualquier secuencia de LLO que incluye una de las secuencias de AA de tipo PEST enumeradas en el presente documento puede aumentar la inmunidad mediada por células contra VEGFR2.

En otra realización, la secuencia de AA de tipo PEST es una secuencia de tipo PEST de una proteína Listeria ActA. En otra realización, la secuencia de tipo PEST es KTEEQPSEVNTGPR (SEQ ID NO: 15), KASVTDTSEGDLDSSMQSADESTPQPLK (SEQ ID NO: 16), KNEEVNASDFPPPPTDEELR (SEQ ID NO: 17), o RGGIPTSEEFSSLNSGDFTDDENSETTEEEIDR (SEQ ID NO: 18). En otra realización, la secuencia de tipo PEST es una variante de la secuencia de tipo PEST descrita anteriormente en el presente documento, que en una realización es KESVVDASESDLDSSMQSADESTPQPLK (SEQ ID NO: 19), KSEEVNASDFPPPPTDEELR (SEQ ID NO: 20), o

RGGRPTSEEFSSLNSGDFTDDENSETTEEEIDR (SEQ ID NO: 21). En otra realización, la secuencia de tipo PEST es de citolisina *Listeria seedigeri*, codificada por el gen *lso*. En otra realización, la secuencia de tipo PEST es RSEVTISPAETPESPPATP (SEQ ID NO: 22). En otra realización, la secuencia de tipo PEST es de la proteína Estreptolisina O de Streptococcus sp. En otra realización, la secuencia de tipo PEST es de Estreptolisina O *Streptococcus pyogenes*, p. KQNTASTETTTTNEQPK (SEQ ID NO: 23) en AA 35-51. En otra realización, la secuencia de tipo PEST es de Estreptolisina O de *Streptococcus equisimilis*, por ejemplo, KQNTANTETTTTNEQPK (SEQ ID NO: 24) en AA 38-54. En otra realización, la secuencia de tipo PEST es otra secuencia de AA de tipo PEST derivada de una proteína de un organismo procariótico, que en una realización es una proteína ActA, y en otra realización, es una proteína citolisina, que en una realización, es listeriolisina, y en otra realización, es la estreptolisina.

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

En una realización, las secuencias de tipo PEST de organismos procariotas se identifican de acuerdo con métodos tales como los descritos, por ejemplo, por Rechsteiner y Rogers (1996, Trends Biochem. Sci. 21: 267-271) para LM y en Rogers S et al (Science 1986; 234(4774): 364-8). Como alternativa, las secuencias de AA tipo PEST de otros organismos procariotas pueden identificarse también basándose en este método. Otros organismos procariotas en los que se esperaría que las secuencias de AA tipo PEST incluyan, pero sin limitación, otras especies de Listeria. En una realización, la secuencia de tipo PEST se ajusta a un algoritmo desvelado en Rogers et al. En otra realización, la secuencia de tipo PEST se ajusta a un algoritmo desvelado en Rechsteiner et al. En otra realización, la secuencia de tipo PEST se identifica usando el programa PEST-find.

En otra realización, la identificación de los motivos PEST se logra mediante un escaneado inicial de AA R, H, y K cargados positivamente dentro de la secuencia proteica especificada. Todos los AA entre los flancos cargados positivamente se cuentan y solo se consideran adicionalmente estos motivos, que contienen un número de AA igual o superior al parámetro de tamaño de ventana. En otra realización, una secuencia tipo PEST debe contener al menos 1 P, 1 D o E, y al menos 1 S o T.

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

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

En otra realización, una hidrofobicidad potencial de motivos PEST se calcula como la suma sobre los productos de porcentaje molar e índice de hidrofobicidad para cada especie de AA. La puntuación de PEST deseada se obtiene como combinación del término de enriquecimiento local y el término de hidrofobicidad como se expresa por la siguiente ecuación:

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

En otra realización, la "secuencia PEST", "secuencia de tipo PEST" o "péptido de secuencia de tipo PEST" se refiere a un péptido que tiene una puntuación de al menos +5, usando el algoritmo anterior. En otra realización, el término se refiere a un péptido que tiene una puntuación de al menos 6. En otra realización, el péptido tiene una puntuación de al menos 7. En otra realización, la puntuación es de al menos 8. En otra realización, la puntuación es de al menos 9. En otra realización, la puntuación es de al menos 10. En otra realización, la puntuación es de al menos 11. En otra

realización, la puntuación es de al menos 12. En otra realización, la puntuación es de al menos 13. En otra realización, la puntuación es de al menos 14. En otra realización, la puntuación es de al menos 15. En otra realización, la puntuación es de al menos 16. En otra realización, la puntuación es de al menos 17. En otra realización, la puntuación es de al menos 18. En otra realización, la puntuación es de al menos 19. En otra realización, la puntuación es de al menos 20. En otra realización, la puntuación es de al menos 21. En otra realización, la puntuación es de al menos 22. En otra realización, la puntuación es de al menos 22. En otra realización, la puntuación es de al menos 24. En otra realización, la puntuación es de al menos 24. En otra realización, la puntuación es de al menos 25. En otra realización, la puntuación es de al menos 26. En otra realización, la puntuación es de al menos 27. En otra realización, la puntuación es de al menos 28. En otra realización, la puntuación es de al menos 29. En otra realización, la puntuación es de al menos 30. En otra realización, la puntuación es de al menos 32. En otra realización, la puntuación es de al menos 35. En otra realización, la puntuación es de al menos 38. En otra realización, la puntuación es de al menos 40. En otra realización, la puntuación es de al menos 45.

En otra realización, la secuencia de tipo PEST se identifica utilizando cualquier otro método o algoritmo conocido en la técnica, por ejemplo, el CaSPredictor (Garay-Malpartida HM, Occhiucci JM, Alves J, Belizario JE. Bioinformatics. 2005 Jun; 21 Suppl 1: i169-76). En otra realización, se utiliza el siguiente método:

Se calcula un índice de PEST para cada tramo de longitud apropiada (por ejemplo, un tramo de 30-35 AA) asignando un valor de 1 a los AA Ser, Thr, Pro, Glu, Asp, Asn, o Gln. El valor del coeficiente (CV) para cada uno de residuo PEST es 1 y para cada uno de los otros AA (no-PEST) es 0.

"Fusión a una secuencia tipo PEST" se refiere, en otra realización, a la fusión con un fragmento de proteína que comprende una secuencia de tipo PEST. En otra realización, el término incluye casos en los que el fragmento de proteína comprende una secuencia circundante distinta de la secuencia de tipo PEST. En otra realización, el fragmento de proteína consiste en la secuencia de tipo PEST. Por lo tanto, en otra realización, "fusión" se refiere a dos péptidos o fragmentos de proteína unidos entre sí en sus respectivos extremos o se incrustan uno dentro del otro.

En una realización, la presente invención proporciona cepas de Listeria que expresan un polipéptido recombinante que comprende el fragmento de polipéptido receptor 2 del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFR2), unido operativamente a un polipéptido que comprende una secuencia de tipo PEST.

En una realización, "proteína" o "polipéptido" se refiere a una cadena de aminoácidos que comprende múltiples subunidades peptídicas, y puede incluir, en una realización, una proteína de longitud completa, oligopéptidos y fragmentos de los mismos, en donde los residuos de aminoácidos están unidos por enlaces peptídicos covalentes. En una realización, una proteína puede comprender un polipéptido de la presente invención. En una realización, una proteína es una estructura multimérica.

En una realización, un polipéptido "recombinante" se refiere a un polipéptido que se deriva del ADN recombinante, que en una realización, es una forma de ADN sintético que combina secuencias de ADN que normalmente no tendrán lugar conjuntamente en la naturaleza. En una realización, un polipéptido recombinante puede denominarse como un polipéptido diseñado o modificado genéticamente.

La expresión "nativo" o "secuencia nativa" se refiere a un polipéptido que tiene la misma secuencia de aminoácidos que un polipéptido que se produce en la naturaleza. Se considera que un polipéptido es "nativo" de acuerdo con la presente invención independientemente de su modo de preparación. Por lo tanto, dicho polipéptido de secuencia nativa puede aislarse de la naturaleza o puede producirse mediante medios recombinantes y/o sintéticos. Las expresiones "nativo" y "secuencia nativa" abarcan específicamente formas truncadas o secretadas que ocurren de forma natural (por ejemplo, una secuencia de dominio extracelular), formas de variantes de origen natural (por ejemplo, formas alternativamente empalmadas) y variantes alélicas de origen natural de un polipéptido.

Como se usa en el presente documento en la memoria descriptiva y en la sección de ejemplos que sigue el término "péptido" incluye péptidos nativos (productos de degradación, péptidos sintetizados sintéticamente o péptidos recombinantes) y peptidomiméticos (típicamente, péptidos sintetizados sintéticamente), tales como peptoides y sempeptoides que son análogos peptídicos, que pueden tener, por ejemplo, modificaciones que hacen a los péptidos más estables mientras están en un cuerpo o más capaces de penetrar en células bacterianas. Dichas modificaciones incluyen, pero sin limitación, modificación del extremo N, modificación del extremo C, modificación del enlace peptídico, incluyendo, pero sin limitación, CH2-NH, CH2-S, CH2-S=O, O=C-NH, CH2-O, CH2-CH2, S=C-NH,

CH=CH o CF=CH, modificaciones de cadena principal, y modificación de residuos. Los métodos para preparar compuestos peptidomiméticos son bien conocidos en la técnica y se especifican, por ejemplo, en Quantitative Drug Design, C.A. Ramsden Gd., Capítulo 17.2, F. Choplin Pergamon Press (1992). A continuacion en el presente documento se proporcionan más detalles a este respecto.

Los enlaces peptídicos (-CO-NH-) dentro del péptido pueden estar sustituidos, por ejemplo, por enlaces N-metilados (-N(CH3)-CO-), enlaces éster (-C(R)H-C-O-O-C(R)-N-), enlaces cetometileno (-CO-CH2-), enlaces α-aza (-NH-N(R)-CO-), en los que R es cualquier enlace alquilo, por ejemplo, metilo, enlaces carba (-CH2-NH-), enlaces hidroxietileno (-CH(OH)-CH2-), enlaces tioamida (-CS-NH-), enlaces dobles olefínicos (-CH=CH-), enlaces retro amida (-NH-CO-), derivados peptídicos (-N(R)-CH2-CO-), en los que R es la cadena lateral "normal", presentada naturalmente en el átomo de carbono.

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

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

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

Como se utiliza en el presente documento en la memoria descriptiva y en la sección de reivindicaciones más adelante, el término "aminoácido" o "aminoácidos" se entiende que incluye los 20 aminoácidos de origen natural; los aminoácidos a menudo modificados post-traduccionalmente *in vivo*, incluyendo, por ejemplo, hidroxiprolina, fosfoserina y fosfotreonina; y otros aminoácidos inusuales incluyendo, pero sin limitación, ácido 2-aminoadípico, hidroxilisina, isodesmosina, norvalina, norleucina y ornitina. Además, el término "aminoácido" incluye tanto D-aminoácidos como L-aminoácidos.

Los aminoácidos de origen natural y los aminoácidos no convencionales o modificados que se pueden usar con la presente invención son bien conocidos en la técnica.

Como se usa en el presente documento, el término "aminoácido" se refiere a la forma estereoisómera D o L del aminoácido, a menos que se designe específicamente otra cosa. También se incluyen dentro del alcance de esta invención proteínas equivalentes o péptidos equivalentes, por ejemplo, que tienen la actividad biológica de la proteína supresora de tumor de tipo silvestre purificada. "Proteínas equivalentes" y "polipéptidos equivalentes" se refieren a compuestos que se apartan de la secuencia lineal de las proteínas o polipéptidos naturales, pero que tienen sustituciones de aminoácidos que no cambian su actividad biológica. Estos equivalentes pueden diferir de las secuencias nativas por el reemplazo de uno o más aminoácidos con aminoácidos relacionados, por ejemplo, aminoácidos cargados de manera similar, o la sustitución o modificación de cadenas laterales o grupos funcionales.

El polipéptido de la presente invención puede ser de cualquier tamaño. Como es de esperar, los polipéptidos pueden exhibir una amplia diversidad de pesos moleculares, algunos que exceden de 150 a 200 kilodaltons (kD). Típicamente, los polipéptidos pueden tener un peso molecular que varía de aproximadamente 5.000 a aproximadamente 100.000 daltons. Aún otros pueden estar en un intervalo más estrecho, por ejemplo, de aproximadamente 10.000 a aproximadamente 75.000 daltons, o de aproximadamente 20.000 a aproximadamente 50.000 daltons. En una realización, los polipéptidos tienen un peso molecular entre 19 y 51 kD. En una realización, un polipéptido de la presente invención es de 298 aminoácidos. En otra realización, un polipéptido de la presente invención es de 396 aminoácidos. En otra realización, un polipéptido de la presente invención es de 301 aminoácidos. En una realización, un polipéptido de la presente invención tiene entre 250 y 450 residuos de aminoácidos de longitud. En otra realización, un polipéptido de la presente invención tiene entre 200 y 500 residuos de aminoácidos de longitud. En otra realización, un polipéptido de la presente invención tiene entre 275 y 425 residuos de aminoácidos de longitud. En otra realización, un polipéptido de la presente invención tiene entre 100 y 600 residuos de aminoácidos de longitud.

En una realización, "variante" se refiere a una secuencia de aminoácidos o ácidos nucleicos (o en otras realizaciones, un organismo o tejido) que es diferente de la mayoría de la población, pero sigue siendo suficientemente similar al modo común que debe ser considerado como uno de ellos, por ejemplo, las variantes de corte y empalme. En una realización, la variante puede ser una variante conservadora de la secuencia, mientras que en otra realización, la variante puede ser una variante funcional conservadora. En una realización, una variante

puede comprender una adición, deleción o sustitución de 1 aminoácido. En una realización, una variante puede comprender una adición, deleción, sustitución o combinación de los mismos de 2 aminoácidos. En una realización, una variante puede comprender una adición, deleción, sustitución o combinación de los mismos de 3 aminoácidos. En una realización, una variante puede comprender una adición, deleción, sustitución o combinación de los mismos de 4 aminoácidos. En una realización, una variante puede comprender una adición, deleción, sustitución o combinación de los mismos de 5 aminoácidos. En una realización, una variante puede comprender una adición, deleción, sustitución o combinación de los mismos de 7 aminoácidos. En una realización, una variante puede comprender una adición, deleción, sustitución o combinación de los mismos de 10 aminoácidos. En una realización, una variante puede comprender una adición, deleción, sustitución o combinación de los mismos de 2-15 aminoácidos. En una realización, una variante puede comprender una adición, deleción, sustitución o combinación de los mismos de 3-20 aminoácidos. En una realización, una variante puede comprender una adición, deleción, sustitución o combinación de los mismos de 4-25 aminoácidos.

Las variantes de secuencias de aminoácidos pueden usarse en las composiciones de la presente invención. En una realización, pueden producirse variantes de secuencia de aminoácidos expresando la secuencia de ADN subyacente en una célula huésped recombinante adecuada, o mediante síntesis *in vitro* del polipéptido deseado, como se ha analizado anteriormente. La secuencia de ácido nucleico que codifica una variante de polipéptido se prepara, en una realización, mediante mutagénesis de sitio dirigido de la secuencia de ácido nucleico que codifica el polipéptido nativo correspondiente (por ejemplo, humano). En otra realización, se usa la mutagénesis de sitio dirigido utilizando la amplificación de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos N.º 4.683.195 expedida el 28 de julio de 1987; y Current Protocols In Molecular Biology, Capítulo 15 (Ausubel et al., ed., 1991). Otras técnicas de mutagénesis de sitio dirigido se conocen bien en la técnica y se describen, por ejemplo, en las siguientes publicaciones: Current Protocols In Molecular Biology, anteriormente, Capítulo 8; Molecular Cloning: A Laboratory Manual., 2ª edición (Sambrook et al., 1989); Zoller et al., Methods Enzymol. 100:468-500 (1983); Zoller & Smith, DNA 3:479-488 (1984); Zoller et al., Nucl. Acids Res., 10:6487 (1987); Brake et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 4642-4646 (1984); Botstein et al., Science 229: 1193 (1985);Kunkel et al., Methods Enzymol. 154: 367-82 (1987), Adelman et al., DNA 2: 183 (1983); y Carter et al., Nucl. Acids Res., 13:4331 (1986). También pueden usarse mutagénesis de casete (Wells et al., Gene 34: 315 [1985]), y mutágenesis de selección por restricción (Wells et al., Philos. Trans. R. Soc. London SerA, 317: 415 [1986]).

Las variantes de secuencia de aminoácidos con más de una sustitución de aminoácidos pueden generarse de una de varias maneras. Si los aminoácidos están situados muy juntos en la cadena polipeptídica, pueden mutarse simultáneamente, utilizando un oligonucleótido que codifica todas las sustituciones de aminoácidos deseadas. Sin embargo, si los aminoácidos están situados a cierta distancia unos de otros (por ejemplo, separados en más de diez aminoácidos), es más difícil generar un único oligonucleótido que codifique todos los cambios deseados. En su lugar, se puede emplear uno de dos métodos alternativos. En el primer método, se genera un oligonucleótido separado para cada aminoácido a sustituir. Los oligonucleótidos se hibridan entonces simultáneamente al ADN plantilla monocatenario, y la segunda cadena de ADN que se sintetiza a partir de la plantilla codificará todas las sustituciones aminoacídicas deseadas. El método alternativo implica dos o más rondas de mutagénesis para producir el mutante deseado.

En otra realización, las proteínas de fusión se preparan mediante un proceso que comprende subclonar las secuencias apropiadas, seguido de la expresión del nucleótido resultante. En otra realización, las subsecuencias se clonan y las subsecuencias apropiadas se escinden usando enzimas de restricción apropiadas. Los fragmentos se ligan entonces, en otra realización, para producir la secuencia de ADN deseada. En otra realización, el ADN que codifica la proteína de fusión se produce utilizando métodos de amplificación de ADN, por ejemplo reacción en cadena de la polimerasa (PCR). En primer lugar, los segmentos del ADN nativo a cada lado del nuevo extremo se amplifican por separado. El extremo 5' de una secuencia amplificada codifica el enlazador peptídico, mientras que el extremo 3' de la otra secuencia amplificada también codifica el enlazador peptídico. Dado que el extremo 5' del primer fragmento es complementario al extremo 3' del segundo fragmento, los dos fragmentos (después de la purificación parcial, por ejemplo, sobre LMP agarosa) se pueden usar como plantilla solapante en una tercera reacción de PCR. La secuencia amplificada contendrá codones, el segmento en el lado carboxi del sitio de apertura (que ahora forma la secuencia amino), el enlazador y la secuencia en el lado amino del sitio de apertura (que ahora forma la secuencia carboxilo). El inserto se liga a continuación en un plásmido. En otra realización, se utiliza una estrategia similar para producir una proteína en la que un fragmento VEGFR2 está embebido en un péptido heterólogo.

En otra realización, un polipéptido recombinante en la Listeria y composiciones de la presente invención comprende una secuencia señal. En otra realización, la secuencia señal es del organismo utilizado para construir el vector de

vacuna. En otra realización, la secuencia señal es una secuencia señal de LLO. En otra realización, la secuencia señal es una secuencia señal de ActA. En otra realización, la secuencia señal es una secuencia señal de Listeria.

En otra realización, Listeria y composiciones de la presente invención utilizan una molécula quimérica, que comprende una fusión de un polipéptido quimérico recombinante con un polipéptido marcador que proporciona un epítopo al que puede unirse selectivamente un anticuerpo anti-etiqueta. La etiqueta del epítopo se coloca, en otras realizaciones, en el extremo amino o carboxilo de la proteína o en una ubicación interna en el mismo. La presencia de tales formas marcadas con epítopo del polipéptido quimérico se detecta, en otra realización, usando un anticuerpo contra el polipéptido marcador. En otra realización, la inclusión de la etiqueta de epítopo permite que el polipéptido quimérico recombinante se purifique fácilmente por purificación por afinidad utilizando un anticuerpo anti-etiqueta u otro tipo de matriz de afinidad que se une a la etiqueta de epítopo. Se conocen en la técnica diversos polipéptidos marcadores y sus respectivos anticuerpos. Los ejemplos incluyen etiquetas de poli-histidina (poly-his) o poli-histidina-glicina (poly-his-gly); el polipéptido de la etiqueta HA de la gripe y su anticuerpo 12CA5 (Field et al., Mol. Cell. Biol., 8: 2159-2165 (1988)); la etiqueta c-myc y los anticuerpos 8F9, 3C7, 6E10, G4, B7 y 9E10 para las mismas (Evan et al., Molecular and Cellular Biology, 5: 3610-3616 (1985)); y la etiqueta de glicoproteína D (gD) del virus de Herpes Simplex y su anticuerpo (Paborsky et al., Protein Engineering, 3(6): 547-553 (1990)). Otros polipeptídicos marcadores incluyen el péptido etiqueta (Hopp et al., BioTechnology, 6: 1204-1210 (1988)); el péptido del epítopo KT3 (Martin et al., Science, 255: 192-194 (1992)); un péptido de epítopo de tubulina (Skinner et al., J. Biol. Chem., 266:15163-15166 (1991)); y el marcador peptídico de la proteína del gen 10 T7 (Lutz-Freyermuth et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87: 6393-6397 (1990)). Los métodos para construir proteínas de fusión se conocen bien en la técnica y se describen, por ejemplo, en LaRochelle et al., J. Cell Biol., 139(2): 357-66 (1995); Heidaran et al., FASEB J., 9(1): 140-5 (1995); Ashkenazi et al., Int. Rev. Immunol., 10(2-3): 219-27 (1993) y Cheon et al., PNAS USA, 91(3): 989-93 (1994).

En otra realización, la Listeria puede expresar un péptido que es homólogo a un péptido enumerado en el presente documento. Los términos "homología", "homólogo", etc., cuando hacen referencia a cualquier proteína o péptido, se refieren, en una realización, a un porcentaje de residuos de aminoácidos en la secuencia candidata que son idénticos a los residuos de un polipéptido nativo correspondiente, después de alinear las secuencias e introducir huecos, si es necesario, para conseguir el máximo de porcentaje de homología, y no considerar ninguna sustitución conservadora como parte de la identidad de secuencia. Los métodos y programas informáticos para la alineación se conocen bien en la técnica.

La homología, en otra realización, se determina por un algoritmo informático para la alineación de secuencias, por métodos bien descritos en la técnica. Por ejemplo, el análisis de algoritmos informáticos de homología de secuencias de ácidos nucleicos puede incluir la utilización de cualquier número de paquetes de software disponibles, tales como, por ejemplo, los paquetes BLAST, DOMAIN, BEAUTY (unidad de alineación mejorada por BLAST), GENPEPT y TREMBL.

En otra realización, "homología" u "homólogo" se refiere a una secuencia que comparte más del 70 % de identidad con una segunda secuencia. En otra realización, "homología" se refiere a una secuencia que comparte más del 72% de identidad con una segunda secuencia. En otra realización, "homología" se refiere a una secuencia que comparte más del 75% de identidad con una segunda secuencia. En otra realización, "homología" se refiere a una secuencia que comparte más del 78% de identidad con una segunda secuencia. En otra realización, "homología" se refiere a una secuencia que comparte más del 80% de identidad con una segunda secuencia. En otra realización, "homología" se refiere a una secuencia que comparte más del 82% de identidad con una segunda secuencia. En otra realización, "homología" se refiere a una secuencia que comparte más del 83% de identidad con una segunda secuencia. En otra realización, "homología" se refiere a una secuencia que comparte más del 85% de identidad con una segunda secuencia. En otra realización, "homología" se refiere a una secuencia que comparte más del 87% de identidad con una segunda secuencia. En otra realización, "homología" se refiere a una secuencia que comparte más del 88% de identidad con una segunda secuencia. En otra realización, "homología" se refiere a una secuencia que comparte más del 90% de identidad con una segunda secuencia. En otra realización, "homología" se refiere a una secuencia que comparte más del 92% de identidad con una segunda secuencia. En otra realización, "homología" se refiere a una secuencia que comparte más del 93% de identidad con una segunda secuencia. En otra realización, "homología" se refiere a una secuencia que comparte más del 95% de identidad con una segunda secuencia. En otra realización, "homología" se refiere a una secuencia que comparte más del 96% de identidad con una segunda secuencia. En otra realización, "homología" se refiere a una secuencia que comparte más del 97% de identidad con una segunda secuencia. En otra realización, "homología" se refiere a una secuencia que comparte más del 98% de identidad con una segunda secuencia. En otra realización, "homología" se refiere a una secuencia que comparte más del 99% de identidad con una segunda secuencia. En otra realización, "homología" se refiere a

una identidad del 100 % de identidad con una segunda secuencia.

En otra realización, la homología se determina mediante la determinación de la hibridación de secuencia candidata, cuyos métodos se describen bien en la técnica (véase, por ejemplo, "Nucleic Acid Hybridization" Hames, B. D., y Higgins S. J., Eds. (1985); Sambrook et al., 2001, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, N.Y.; y Ausubel et al., 1989, Current Protocols in Molecular Biology, Green Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y). En otras realizaciones, los métodos de hibridación se realizan en condiciones moderadas a rigurosas, para el complemento de un ADN que codifica un péptido de caspasa nativo. Las condiciones de hibridación que se encuentran, por ejemplo, en incubación durante una noche a 42 ºC en una solución, que comprende: formamida al 10-20 %, 5X SSC (NaCl 150 mM, citrato trisódico 15 mM), fosfato sódico 50 mM (pH 7,6), solución 5 X de Denhardt, sulfato de dextrano al 10 %, y 20 µg/ml de ADN de esperma de salmón desnaturalizado y desintegrado.

La homología de proteína y/o péptido para cualquier secuencia de AA enumerada en el presente documento se determina, en otra realización, por métodos ya descritos en la técnica, incluyendo análisis de inmunotransferencia, o a través de análisis de algoritmos informáticos de secuencias de AA, utilizando cualquiera de una serie de programas informáticos disponibles, a través de métodos establecidos. Algunos de estos paquetes incluyen los paquetes FASTA, BLAST, MPsrch o Scanps y, en otra realización, emplean el uso de los algoritmos Smith y Waterman, y/o alineaciones global/local o BLOCKS para análisis.

Como se usa en el presente documento, una "variante" es un péptido o proteína que difiere de otro péptido o proteína de menor manera, que en una realización, se refiere a una mutación en una región que no afecta la función del péptido o proteína, y en otra realización, una mutación conservadora que no afecta la función del péptido o proteína.

Como se usa en el presente documento, "isoforma" se refiere a una versión de una molécula, por ejemplo, una proteína, con sólo ligeras diferencias con otra isoforma de la misma proteína. En una realización, las isoformas pueden producirse a partir de genes diferentes pero relacionados, o en otra realización, pueden surgir del mismo gen mediante corte y empalme alternativo. En otra realización, las isoformas son causadas por polimorfismos de un solo nucleótido.

En una realización, un fragmento de un polipéptido de VEGFR2, que en una realización, es un fragmento Flk1, mantiene su actividad biológica. En una realización, un fragmento de un polipéptido no VEGFR2, por ejemplo, una secuencia de ActA, LLO o tipo PEST, mantiene su capacidad para aumentar la inmunogenicidad del antígeno o polipéptido al que está fusionado. En otra realización, un fragmento de un polipéptido no VEGFR2, por ejemplo, para una secuencia de ActA, LLO o tipo PEST, mantiene su capacidad para lisar el fagosoma de la célula huésped, o en otra realización, para polimerizar la actina huésped o, en otra realización, sirven como señales proteolíticas.

Como se usa en el presente documento, "inmunogénico" se refiere a la capacidad de una sustancia (en una realización, un antígeno) para inducir una respuesta inmune.

Como se utiliza en el presente documento, una "célula huésped" incluye una célula o cultivo celular individual que puede ser o ha sido un receptor de cualquier vector de la presente invención. Las células huésped incluyen la progenie de una única célula huésped, y la progenie puede no ser necesariamente completamente idéntica (en morfología o en complemento de ADN total) a la célula parental original debido a una mutación y/o cambio natural, accidental o deliberada. Una célula huésped incluye células transfectadas o *infectadas in vivo* con un vector que comprende un ácido nucleico de la presente invención.

En algunas realizaciones, cualquiera de los polipéptidos o ácidos nucleicos de y para su uso en la Listeria de la presente invención comprenderá un fragmento de polipéptido de VEGFR2, o un ácido nucleico aislado que codifique dicho fragmento de polipéptido de VEGFR2, en cualquier forma o realización tal como se describe en el presente documento. En algunas realizaciones, cualquiera de los polipéptidos o ácidos nucleicos de y para su uso en la Listeria de la presente invención consistirá en un fragmento de polipéptido de VEGFR2, o un ácido nucleico aislado que codifique dicho fragmento de polipéptido de VEGFR2 de la presente invención, en cualquier forma o realización tal como se describe en el presente documento. En algunas realizaciones, los polipéptidos o ácidos nucleicos consistirán esencialmente en un fragmento de polipéptido de VEGFR2, o un ácido nucleico aislado que codifica dichos componentes de la presente invención, en cualquier forma o realización como se describe en el presente documento. En algunas realizaciones, el término "comprende" se refiere a la inclusión de otros fragmentos, otros anticuerpos, polipéptidos adicionales, así como la inclusión de otras proteínas que pueden ser conocidas en la

técnica. En algunas realizaciones, la expresión "que consiste esencialmente en" se refiere a un polipéptido o ácido nucleico, que tiene el polipéptido o fragmento específico de VEGFR2. Sin embargo, se pueden incluir otros péptidos que no están implicados directamente en la utilidad de la toxina. En algunas realizaciones, el término "que consiste" se refiere a una toxina que tiene el polipéptido o fragmento VEGFR2 específico de la presente invención, en cualquier forma o realización como se describe en el presente documento.

En otra realización, la presente invención proporciona una cepa de *Listeria* recombinante de la invención como se describe en el presente documento para su uso en el direccionamiento de la vasculatura tumoral de un crecimiento tumoral o cáncer en un sujeto.

En otra realización, la presente invención proporciona una cepa de Listeria recombinante de la invención como se describe en el presente documento para su uso en la prevención de la recurrencia de un tumor o para su uso en la inhibición de metástasis de un tumor o cáncer en un sujeto.

Se desvela en el presente documento para inducir una respuesta inmunitaria anti-VEGFR2 en un sujeto, que comprende administrar a dicho sujeto una composición que comprende una cepa de Listeria recombinante que expresa un polipéptido receptor de factor de crecimiento endotelial vascular 2 (VEGFR2) o un fragmento inmunogénico del mismo.

También se desvela en el presente documento un método para tratar un cáncer en un sujeto, que comprende la etapa de administrar a dicho sujeto una composición que comprende una cepa de *Listeria* recombinante que expresa un factor angiogénico.

También se desvela en el presente documento un método para inhibir o suprimir un cáncer en un sujeto, que comprende la etapa de administrar a dicho sujeto una composición que comprende una cepa de *Listeria* recombinante que expresa un factor angiogénico.

También se desvela en el presente documento un método para prevenir la recurrencia de un tumor en un sujeto, que comprende la etapa de administrar a dicho sujeto una composición que comprende una cepa de *Listeria* recombinante que expresa un factor angiogénico. La eficacia de una cepa de *Listeria* recombinante que expresa un factor angiogénico que previene la recurrencia de un tumor se demuestra en la Figura 4.

También se desvela en el presente documento un método para inhibir la metástasis de un tumor en un sujeto, que comprende la etapa de administrar a dicho sujeto una composición que comprende una cepa de *Listeria* recombinante que expresa un factor angiogénico.

En otra realización, la presente invención proporciona composiciones para su uso en el tratamiento de un cáncer en un sujeto, que comprende una cepa de *Listeria* recombinante que expresa un polipéptido del factor de crecimiento endotelial vascular 2 (VEGFR2) Flk-1-E1 o Flk-1-I1, como se describe en el presente documento.

En otra realización, la presente invención proporciona composiciones para su uso en la inhibición o supresión de un cáncer en un sujeto, que comprende una cepa de *Listeria* recombinante que expresa un polipéptido del factor de crecimiento endotelial vascular 2 (VEGFR2) Flk-1-E1 o Flk-1-I1, como se describe en el presente documento.

En otra realización, la presente invención proporciona composiciones para su uso en la prevención de la recurrencia de un tumor en un sujeto, que comprende una cepa de *Listeria* recombinante que expresa un polipéptido del factor de crecimiento endotelial vascular 2 (VEGFR2) Flk-1-E1 o Flk-1-I1, como se describe en el presente documento.

En otra realización, la presente invención proporciona composiciones para su uso en la inhibición de metástasis de un tumor en un sujeto, que comprende una cepa de *Listeria* recombinante que expresa un polipéptido del factor de crecimiento endotelial vascular 2 (VEGFR2) Flk-1-E1 o Flk-1-I1, como se describe en el presente documento.

En otra realización, el polipéptido del receptor 2 del factor de crecimiento endotelial vascular 2 (VEGFR2) Flk-1-E1 o Flk-1-I1 puede estar unido operativamente a un polipéptido que comprende una secuencia tipo PEST.

En una realización, la presente invención proporciona una composición para su uso en el tratamiento, inhibición o supresión de cáncer o metástasis tumoral en la que el sujeto monta una respuesta inmune contra el polipéptido VEGFR2. En otra realización, el sujeto monta una respuesta inmune contra un antígeno tumoral expresado por el tumor mediante la extensión del epítopo.

En una realización, las composiciones de la presente invención son para uso en sujetos humanos, mientras que en otra realización, son para uso en sujetos mamíferos. En una realización, el sujeto es un sujeto animal, que en una realización, es murino, bovino, canino, felino, equino, porcino, etc. En una realización, el término "mamífero" se refiere a cualquier animal clasificado como un mamífero, incluyendo seres humanos, animales domésticos y de granja, y animales de zoológico, deportivos o de animales de compañía, tales como perros, gatos, ganado vacuno, caballos, ovejas, cerdos, cabras, conejos, así como roedores tales como ratones y ratas. En una realización, las composiciones y los usos médicos de la presente invención son eficaces en sujetos macho. En otra realización, las composiciones y los usos médicos de la presente invención son eficaces en sujetos femeninos.

En una realización, las composiciones de la presente invención se usan para tratar, impedir, suprimir, inhibir o prevenir cualquiera de las enfermedades, trastornos, síntomas o efectos secundarios descritos anteriormente. En una realización, "tratar" se refiere tanto al tratamiento terapéutico como a medidas profilácticas o preventivas, en los que el objeto es prevenir o disminuir la afección o trastorno patológico diana como se ha descrito anteriormente. Por lo tanto, en una realización, el tratamiento puede incluir afectar directamente o curar, suprimir, inhibir, prevenir, reducir la gravedad, retrasar la aparición de, reducir síntomas asociados con la enfermedad, trastorno o afección, o una combinación de los mismos. Por lo tanto, en una realización, "tratar" se refiere entre otros a retrasar el avance, acelerar la remisión, inducir la remisión, aumentar la remisión, acelerar la recuperación, inducir la regresión, aumentar la eficacia o disminuir la resistencia a productos terapéuticos alternativos, o una combinación de los mismos. En una realización, "prevenir" o "impedir" se refiere, entre otros, a retrasar la aparición de los síntomas, prevenir la recaída de una enfermedad, prevenir la recurrencia de una enfermedad, disminuir el número o frecuencia de episodios de recaída, aumentar la latencia entre episodios sintomáticos, o una combinación de los mismos. En una realización, "suprimir" o "inhibir", se refiere, entre otros, a reducir la gravedad de los síntomas, reducir la gravedad de un episodio agudo, reducir el número de síntomas, reducir la incidencia de síntomas relacionados con la enfermedad, reducir la latencia de los síntomas, mejorar los síntomas, reducir los síntomas secundarios, reducir las infecciones secundarias, prolongar la supervivencia del paciente, o una combinación de los mismos.

En una realización, las composiciones y usos médicos de la presente invención erradican completamente un tumor existente, mientras que en otra realización, las composiciones y usos médicos de la presente invención inducen la regresión del tumor, mientras que en otra realización, las composiciones y usos médicos de la presente invención controlan el crecimiento tumoral.

En una realización, los síntomas son primarios, mientras que en otra realización, los síntomas son secundarios. En una realización, "primario" se refiere a un síntoma que es un resultado directo de una enfermedad o trastorno particular, mientras que en una realización, "secundario" se refiere a un síntoma que se deriva o es consecuencia de una causa primaria. En una realización, los compuestos para su uso en la presente invención tratan síntomas primarios o secundarios o complicaciones secundarias relacionadas con cáncer, que en una realización, es cáncer de mama. En otra realización, los "síntomas" pueden ser cualquier manifestación de una enfermedad o afección patológica.

En una realización, las composiciones y usos médicos de la presente invención inhiben la angiogénesis. En otra realización, las composiciones y usos médicos de la presente invención disminuyen la densidad microvascular, que en una realización, es la densidad microvascular de un tumor.

En una realización, las composiciones y usos médicos de la presente invención son para tratar el cáncer. En una realización, el cáncer es cáncer de mama. En otra realización, el cáncer es cáncer colorrectal, que en una realización, es cáncer colorrectal metastásico.

En una realización, el cáncer es un cáncer que expresa Her-2/neu.

En una realización, la metástasis es un proceso por el cual el cáncer se extiende desde el lugar en el que se presentó por primera vez como un tumor primario a lugares distantes en el cuerpo. En una realización, un cáncer de la presente invención es una metástasis de cáncer de mama. En otra realización, un cáncer de la presente invención es una metástasis de melanoma. En una realización, el cáncer hace metástasis al cerebro. En otra realización, el cáncer hace metástasis hasta el pulmón. En otra realización, el cáncer hace metástasis al riñón. En otra realización, el cáncer hace metástasis hasta el colon. En otra realización, el cáncer, que en una realización, es un cáncer de mama, se hace metástasis en la mama o el área donde solía estar la mama, la pared torácica, los ganglios linfáticos, los huesos, los pulmones o alrededor de los pulmones, el hígado, el cerebro, o una combinación de los mismos. En otra realización, el cáncer, que en una realización, es un melanoma, hace metástasis en la piel (otras áreas de la

piel), tejido subcutáneo y ganglios linfáticos, pulmones y área entre los pulmones, el hígado, el cerebro, el hueso, el tracto gastrointestinal, el corazón, páncreas, glándulas suprarrenales, riñones, tiroides o una combinación de los mismos.

En una realización, se conocen en la técnica otros cánceres de metástasis, así como órganos secundarios probables en los que crecerán los cánceres en metástasis.

En una realización, las composiciones y usos médicos de la presente invención son para tratar un tumor, que en una realización, es un tumor sólido. En una realización, el tumor es un melanoma. En otra realización, el tumor es un sarcoma. En otra realización, el tumor es un carcinoma. En otra realización, el tumor es un mesotelioma (por ejemplo, mesotelioma maligno). En otra realización, el tumor es un glioma. En otra realización, el tumor es un tumor de células germinales. En otra realización, el tumor es un coriocarcinoma.

En otra realización, el tumor es cáncer de páncreas. En otra realización, el tumor es cáncer de ovario. En otra realización, el tumor es cáncer gástrico. En otra realización, el tumor es una lesión carcinomatosa del páncreas. En otra realización, el tumor es adenocarcinoma pulmonar. En otra realización, el tumor es adenocarcinoma colorrectal. En otra realización, el tumor es adenocarcinoma escamoso pulmonar. En otra realización, el tumor es adenocarcinoma gástrico. En otra realización, el tumor es una neoplasia epitelial de superficie ovárica (por ejemplo, una variedad benigna, proliferativa o maligna de la misma). En otra realización, el tumor es un carcinoma de células escamosas oral. En otra realización, el tumor es carcinoma de pulmón de células no pequeñas. En otra realización, el tumor es un carcinoma de endometrio. En otra realización, el tumor es un cáncer de vejiga. En otra realización, el tumor es un cáncer de cabeza y cuello. En otra realización, el tumor es un carcinoma de próstata.

En otra realización, el tumor es un cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC). En otra realización, el tumor es un tumor de Wilms. En otra realización, el tumor es un tumor de células redondas pequeño desmoplásico. En otra realización, el tumor es un cáncer de colon. En otra realización, el tumor es un cáncer de pulmón. En otra realización, el tumor es un cáncer de ovario. En otra realización, el tumor es un cáncer uterino. En otra realización, el tumor es un cáncer de tiroides. En otra realización, el tumor es un carcinoma hepatocelular. En otra realización, el tumor es un cáncer de tiroides. En otra realización, el tumor es un cáncer de hígado. En otra realización, el tumor es un cáncer renal. En otra realización, el tumor es un kaposi. En otra realización, el tumor es un sarcoma de kaposi.

En otra realización, el tumor es un tumor de mama. En una realización, las composiciones y usos médicos de la presente invención son para tratar adenocarcinoma, que en una realización, se desarrolla en tejido glandular. En una realización, las composiciones y usos médicos de la presente invención son para tratar el carcinoma ductal *in situ* (DCIS), que en una realización, se desarrolla en los conductos de leche y, en otra realización, es una forma temprana de cáncer de mama.

En otra realización, las composiciones y usos médicos de la presente invención son para tratar el carcinoma ductal invasivo (IDC), que en una realización, es el tipo más común de cáncer de mama, que se desarrolla a partir de DCIS, se extiende a través de las paredes del conducto, e invade el tejido mamario. En otra realización, las composiciones y usos médicos de la presente invención son para tratar el carcinoma lobular invasivo, que en una realización, se origina en las glándulas de la leche y representa el 10-15 % de los cánceres de mama invasivos. Otros tipos de cáncer de mama que pueden ser tratados usando composiciones de la presente invención incluyen: Inflamatorio (donde, en una realización, el tejido mamario es cálido y parece rojo; tiende a extenderse rápidamente), carcinoma medular (que, en una realización, se origina en el tejido mamario central), carcinoma mucino (donde, en una forma de realización, es invasivo; se produce generalmente en mujeres posmenopáusicas), enfermedad de Paget del pezón (que, en una realización, se origina en los conductos de leche y se extiende a la piel de los pezones o la areola), tumor filoides (que, en una realización, se caracteriza por un tumor con un aspecto similar a una hoja que se extiende dentro de los conductos, rara vez hace metástasis), y carcinoma tubular (que, en una realización, es un pequeño tumor que es a menudo indetectable por palpación). Las composiciones de la presente invención también se pueden usar para tratar sarcomas (en una realización, cáncer de tejido conectivo) y linfomas (en una realización, cáncer de tejido linfático) que se desarrollan en tejido mamario.

En otra realización, las composiciones y usos médicos de la presente invención son para tratar afecciones relacionadas con la mama en hombres, que en una realización, es ginecomastia, cáncer de mama lobular (LBC) y carcinoma ductal infiltrante (o invasivo) (IDC), que en una realización, es la forma más común de cáncer de mama masculino y representa del 80 al 90 por ciento de todos los diagnósticos de cáncer de mama en hombres. En una realización, el IDC se origina en el conducto y rompe o invade el tejido graso circundante. En una realización, el IDC puede estar contenido solamente dentro de la mama, o, en otra realización, puede hacer metástasis (extenderse) a

otras partes del cuerpo.

En una realización, esta invención proporciona composiciones y usos médicos para prevenir el cáncer en poblaciones que están predispuestas al cáncer o en poblaciones que están en alto riesgo para el cáncer, que en una realización, puede ser una población de mujeres con las mutaciones brca1 o brca2, cuya población en una realización es susceptible al cáncer de mama.

En otra realización, la respuesta inmune provocada por las composiciones de la presente invención es una respuesta inmune mediada por células. En otra realización, la respuesta inmune es una respuesta inmune mediada por linfocitos T.

La respuesta inmune mediada por linfocitos T inducida por composiciones de la presente invención comprende, en otra realización, un CTL. En otra realización, el linfocito T implicado en la respuesta inmune mediada por linfocitos T es un CTL.

En otra realización, la respuesta inmune mediada por linfocitos T comprende un linfocito T auxiliar. En otra realización, el linfocito T implicado en la respuesta inmune mediada por linfocitos T es un linfocito T auxiliar.

En una realización, una composición de la presente invención conduce a una infiltración de linfocitos T CD8+ alrededor de vasos sanguíneos y en el estroma de tumores de ratones inmunizados. En una realización, la presencia de linfocitos infiltrantes de tumor se correlaciona con respuestas clínicas en inmunoterapia de cáncer. Como se describe a continuación en el presente documento, a pesar de su efecto sobre la vasculatura, las composiciones de la presente invención no conducen a problemas de toxicidad tal como problemas en la cicatrización de heridas, en el embarazo o de fertilidad asociados con el daño en vasos sanguíneos en ratones inmunizados con una vacuna de la presente invención.

En una realización, las composiciones de la presente invención comprenden además un antígeno tumoral. En una realización, el antígeno tumoral es antígeno asociado a melanoma de alto peso molecular (HMW-MAA). En una realización, el antígeno tumoral es una proteína NY-ESO-1. En otra realización, el antígeno tumoral es una proteína E7 del Virus del Papiloma Humano (HPV). En otra realización, el antígeno tumoral es una proteína del receptor de linfocitos B (BCR). En otra realización, el péptido heterólogo de interés es un péptido antigénico. En otra realización, el antígeno tumoral es un péptido NY-ESO-1. En otra realización, el antígeno tumoral es un péptido E7 de Virus de Papiloma Humano (HPV). En otra realización, el antígeno tumoral es un péptido de receptor de linfocitos B (BCR). En otra realización, el antígeno tumoral es un Virus del Papiloma Humano (HPV)-16-E6, HPV-16-E7, HPV-18-E6, HPV-18-E7, un antígeno Her/2-neu, un antígeno específico de próstata (PSA), un antígeno de células madre de próstata (PSCA), antígeno de enzima quimotróptica de estrato córneo (SCCE), antígeno 1 de tumor de Wilms (WT-1), transcriptasa reversa de telomerasa humana (hTERT), proteinasa 3, proteasa relacionada a tirosinasa 2 (TRP2), sarcoma sinovial, X (SSX)-2, antígeno carcinoembrionario (CEA), MAGE-A, receptor interleucina-13 alfa (IL13-R alfa), anhidrasa carbónica IX (CAIX), survivina, GP100 o péptido testisina. En otra realización, el antígeno tumoral es alfa-fetoproteína, A3, antígeno específico para el anticuerpo A33, Ba 733, antígeno BrE3, CA125, CD1, CD1a, CD3, CD5, CD1 5, CD1 6, CD1 9, CD20, CD21, CD22, CD23, CD25, CD30, CD33, CD38, CD45, CD74, CD79a, CD80, CD138, antígeno específico de colon p (CSAp), CEA (CEACAM5), CEACAM6, CSAp, EGFR, EGP- 2, Ep-CAM, Flt-I, Flt-3, receptor de folato, HLA-DR, gonadotropina coriónica humana (HCG) y sus subunidades, HER2/neu, factor inducible de hipoxia (HIF-I), Ia, IL-2, IL-6, IL-8, factor de crecimiento de insulina 1 (IGF-I), antígeno KC4, antígeno KS-I, KS 1-4, Le-Y, factor de inhibición de macrófagos (MIF), MAGE, MUC1, MUC2, MUC3, MUC4, NCA66, NCA95, NCA90, antígeno específico para el anticuerpo PAM-4, factor de crecimiento placentario, p53, fosfatasa ácida prostática, PSMA, RS5, S1OO, TAC, TAG-72, tenascina, receptores TRAIL, antígeno Tn, antígenos de Thomson-Friedenreich, antígenos de necrosis tumoral, VEGF, fibronectina ED-B, antígeno 17-1A, un marcador de angiogénesis, un marcador oncogénico o un producto oncogénico. Se describen otros antígenos tumorales en Mizukami et al., (2005, Nature Med. 11: 992-97); Hatfield et al., (2005, Curr. Cancer Drug Targets 5: 229-48); Vallbohmer et al. (2005, J. Clin. Oncol. 23: 3536-44); y Ren et al. (2005, Ann. Surg. 242: 55-63).

En una realización, el antígeno tumoral es antígeno asociado a melanoma de alto peso molecular (HMW-MAA), mientras que en otra realización, el antígeno tumoral es un fragmento de HMW-MAA, como se describe en Maciag et al, Cancer Res. 1 de octubre de 2008; 68(19): 8066-75).

En una realización, las composiciones de la presente invención comprenden HMW-MAA o un fragmento del mismo, Her-2/neu o un fragmento del mismo, y Flk/VEGFR2, o un fragmento del mismo. En una realización, HMW-MAA se dirige a pericitos, en una realización, Her-2/neu se dirige a células tumorales, y en una realización, Flk/VEGFR2 se

dirige a células endoteliales.

En una realización, el antígeno tumoral es Her-2/neu, mientras que en otra realización, el antígeno tumoral es un fragmento Her-2/neu.

En una realización, el fragmento VEGFR2 y el antígeno tumoral se expresan por el mismo vector, mientras que en otra realización, se expresan mediante diferentes vectores. En una realización, el fragmento VEGFR2 y el antígeno tumoral se expresan por la misma Listeria, mientras que en otra realización, se expresan por una Listeria diferente.

En una realización, el antígeno tumoral se expresa como un polipéptido de fusión con un polipéptido que contiene PEST, como se ha descrito anteriormente en este documento. En una realización, el antígeno tumoral está operativamente unido a un polipéptido que comprende una secuencia de tipo PEST, como se ha descrito anteriormente. En una realización, el polipéptido que contiene PEST es un polipéptido de listeriolisina no hemolítica (LLO), un polipéptido ActA N-terminal o una secuencia PEST.

Composiciones farmacéuticas y vías de administración

"Composición farmacéutica" se refiere, en otra realización, a una cantidad terapéuticamente eficaz del principio activo, es decir, el péptido o vector recombinante que comprende o codifica el mismo, junto con un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable. Una "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere, en otra realización, a esa cantidad que proporciona un efecto terapéutico para una afección dada y un régimen de administración.

Las composiciones farmacéuticas que contienen el principio activo pueden administrar, en otra realización, a un sujeto por cualquier ruta conocida por un experto en la técnica, tal como por vía parenteral, transmucosa, transdérmica, intramuscular, intravenosa, intradérmica, subcutánea, intraperitoneal, intraventricular, intracraneal, intravaginal o intratumoral.

En otra realización de la presente invención, las composiciones farmacéuticas se deben administrar por vía oral y, por lo tanto, se formulan en una forma adecuada para la administración oral, es decir, como una preparación sólida o líquida. Las formulaciones orales sólidas adecuadas incluyen comprimidos, cápsulas, píldoras, gránulos, perlas y similares. Las formulaciones orales líquidas adecuadas incluyen soluciones, suspensiones, dispersiones, emulsiones, aceites y similares. En otra realización de la presente invención, el principio activo se formula en una cápsula. De acuerdo con esta realización, las composiciones de la presente invención comprenden, además del compuesto activo y el vehículo o diluyente inerte, una cápsula de gelificación dura.

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

En otra realización, las composiciones farmacéuticas se han de administrar por vía tópica a las superficies del cuerpo y, por lo tanto, se formulan en una forma adecuada para la administración tópica. Las formulaciones tópicas adecuadas incluyen geles, ungüentos, cremas, lociones, gotas y similares. Para la administración tópica, el péptido o vector recombinante se prepara y se aplica como una solución, suspensión o emulsión en un diluyente fisiológicamente aceptable con o sin un vehículo farmacéutico.

En otra realización, el principio activo se administra en una vesícula, por ejemplo, un liposoma.

En otras realizaciones, los vehículos o diluyentes utilizados en las composiciones de la presente invención incluyen, pero sin limitación, una goma, un almidón (por ejemplo, almidón de maíz, almidón pregelatinizado), un azúcar (por ejemplo, lactosa, manitol, sacarosa, dextrosa), un material celulósico (por ejemplo, celulosa microcristalina), un acrilato (por ejemplo, acrilato de polimetilo), carbonato de calcio, óxido de magnesio, talco o mezclas de los mismos.

En otras realizaciones, los vehículos farmacéuticamente aceptables para formulaciones líquidas son soluciones, suspensiones, emulsiones o aceites acuosos o no acuosos. Los ejemplos de disolventes no acuosos son

propilenglicol, polietilenglicol y ésteres orgánicos inyectables tales como oleato de etilo. Los vehículos acuosos incluyen agua, soluciones alcohólicas/acuosas, emulsiones o suspensiones, incluyendo solución salina y medio tamponado. Los ejemplos de aceites son los de origen animal, vegetal o sintético, por ejemplo, aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite de oliva, aceite de girasol, aceite de hígado de pescado, otro aceite marino, o un lípido de leche u huevos.

En otra realización, los vehículos parenterales (para inyección subcutánea, intravenosa, intraarterial o intramuscular) incluyen una solución de cloruro sódico, dextrosa de Ringer, dextrosa y cloruro sódico, Ringer lactato y aceites fijos. Los vehículos intravenosos incluyen reponedores de fluidos y nutrientes, reponedores electrolíticos tales como los basados en dextrosa de Ringer, y similares. Los ejemplos son líquidos estériles tales como agua y aceites, con o sin la adición de un tensioactivo y otros adyuvantes farmacéuticamente aceptables. En general, los vehículos líquidos preferidos son agua, solución salina, dextrosa acuosa y soluciones de azúcar relacionadas, y glicoles tales como propilenglicoles o polietilenglicol, particularmente para soluciones inyectables. Los ejemplos de aceites son los de origen animal, vegetal o sintético, por ejemplo, aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite de oliva, aceite de girasol, aceite de hígado de pescado, otro aceite marino, o un lípido de leche u huevos.

En otra realización, las composiciones farmacéuticas proporcionadas en el presente documento son composiciones de liberación controlada, es decir, composiciones en las que el principio activo se libera durante un período de tiempo después de la administración. Las composiciones de liberación controlada o sostenida incluyen formulación en depósitos lipófilos (por ejemplo, ácidos grasos, ceras, aceites). En otra realización, la composición es una composición de liberación inmediata, es decir una composición en la que todo el principio activo se libera inmediatamente después de la administración.

En una realización, la respuesta inmune secundaria a un antígeno tumoral, que en una realización, es Her-2/neu, se refuerza. En una realización, esto proporcionará protección adicional frente a células tumorales residentes, o células madre tumorales, ya que Her-2/neu también se expresa altamente en estos tipos de células. Por lo tanto, en una realización, contemplada como parte de la presente invención, se encuentra una vacunación preferida con una composición de la presente invención y un refuerzo con una vacuna que comprende un antígeno tumoral relacionado con el tumor que se trata, de tal manera que el efecto de la propagación del epítopo de la primera vacunación principal se mejora por el refuerzo.

En una realización, el uso de inmunoterapia para dirigir la vasculatura presenta varias ventajas sobre la administración pasiva de anticuerpos purificados, siendo una la capacidad para reforzar la respuesta inmune inicial a lo largo del tiempo y el coste de la vacunación. Sin embargo, aquí se presenta el uso novedoso de una proteína de fusión recombinante que expresa el vector de *Listeria monocytogenes*, que presenta varias ventajas sobre el uso de otros vectores bacterianos. En una realización, las cepas Lm-LLO-Flk-1 tienen inmunogenicidad aumentada del fragmento Flk-1 a través de la fusión a LLO, están altamente atenuadas y se replican principalmente dentro de macrófagos y células dendríticas. Por lo tanto, en una realización, tanto la respuesta inflamatoria a la infección con *Listeria* como las respuestas adicionales inducidas por estas construcciones de proteína de fusión tienen el poder de reducir simultáneamente el número de linfocitos T reguladores en el sitio del tumor mientras se inducen potentes CTL antitumorales.

En una realización, el cáncer de mama metastásico es especialmente susceptible al tratamiento de antiangiogénesis debido a que las metástasis necesitan reclutar nuevos vasos al establecerse en localizaciones distantes del sitio del tumor primario. En una realización, las micrometástasis pueden existir en un estado estático de crecimiento de aproximadamente 1-3 mm de diámetro y alimentarse a partir del movimiento pasivo de moléculas. Sin embargo, para soportar el crecimiento tumoral más allá de 3 mm, se requiere la nueva síntesis de una red vascular. Por lo tanto, en una realización, las vacunas anti-VEGFR2 de la presente invención serán especialmente eficaces para atenuar la propagación del cáncer de mama metastásico una vez que el crecimiento del tumor sea de 3 mm o mayor.

En la medida en que los siguientes ejemplos no se refieren a cepas de *Listeria* recombinantes que expresan polipéptidos VEGFR2 Flk-1-E1 o Flk-1-I1 que son útiles para tratar un tumor o cáncer, son ejemplos comparativos.

Ejemplos

MATERIALES Y MÉTODOS

Ratones.

Se adquirieron ratones FVB/N hembras en Charles River Laboratories. Los ratones transgénicos FVB/N Her-2/neu se enjaularon y se criaron en la instalación definitiva para animales en la Universidad de Pensilvania. Los ratones tenían entre seis y ocho semanas de edad al comienzo de los experimentos, que se realizaron de acuerdo con las regulaciones del Institutional Animal Care and Use Committee de la University of Pennsylvania.

Péptidos y Anticuerpos.

Se adquirieron controles de isotipo IgG^{2a}-PE de rata, CD31 anti-ratón, CD8α-PE anti-ratón en BD Biosciences (San Jose, CA). El anticuerpo policlonal de antisuero anti-Listeria de conejo, serotipos 1, 4 se adquirió en Difco BD Biosciences. Se adquirió anti-HIF-1α de conejo en Novus Biologicals (Littleton, CO). El anticuerpo secundario anti-conejo-Alexa-488 de cabra se adquirió en Invitrogen. DAPI se adquirió en Sigma (St. Louis, MO). Se adquirió IFN-g de rata anti-ratón (clon AN18) en MABTECH (Mariemont, OH). Se adquirió IFN-g de rata anti-ratón (clon XMG1.2) en eBioscience (San Diego, CA). Los anticuerpos utilizados en la transferencia de Western para la expresión proteína de fusión era un suero policlonal de conejo elevado a los primeros treinta residuos (PEST) de proteína LLO (Sewell et al., 2004, Cancer research. 64: 8821-8825) o un anticuerpo anti-LLO de ratón, específico para LLO de longitud completa, generado a partir del sobrenadante de hibridoma, el clon #B5-19 (Edelson et al., 2001, Immunity. 14: 503-512). Todos los péptidos se adquirieron en EZBiolabs (Westfield, IN). Se proporcionaron los tetrámeros por la Dra. Amy Stout de los National Institutes of Health AIDS Research and Reference Reagent Program. Los tetrámeros utilizados se conjugaron todos con PE $H\text{-}2D^{q}$ y contenían péptidos para la región Her-2/neu EC1 (ASPETHLDML; SEQ ID NO: 25), o EC2 (PDSLRDLSVF; SEQ ID NO: 26) o IC1 (GSGAFGTVYK; SEQ ID NO: 27). Los péptidos utilizados en estos estudios fueron los siguientes: $Flk\text{-}E1_{210\text{-}219}$ (TYQSIMYIV; SEQ ID NO: 28), $Flk\text{-}E2_{613\text{-}622}$ (MFSNSTNDI; SEQ ID NO: 29), $Flk\text{-}I1_{906\text{-}915}$ (PGGPLMVIV; SEQ ID NO: 30), $Flk\text{-}I1_{839\text{-}848}$ (GRGAFGQVI; ; SEQ ID NO: 31); ($Her2\text{-}pECl_{302\text{-}310}$ (PYNYLSTEV; SEQ ID NO: 32), $Her2\text{-}pEC2_{420\text{-}429}$ (PDSLRDLSVF; SEQ ID NO: 33), $Her2\text{-}pICl_{732\text{-}741}$ (GSGAFGTVYK; SEQ ID NO: 34); HIV-pGag (AMQMLKETI; SEQ ID NO: 35).

ELISpots

La secreción de IFN-g por esplenocitos de ratón en respuesta a la estimulación peptídica se ensayó mediante un ensayo de immunospot ligando a enzimas (ELISpot). Se prefiere el uso de ELISpots por encima de otros ensayos debido al nivel de sensibilidad que se puede obtener para las células específicas de antígeno de baja frecuencia, y también porque se pueden ensayar linfocitos T específicos de anti-Her-2/neu y anti-Flk-1 directamente *ex vivo* sin manipulación *in vitro*. En resumen, los esplenocitos aislados se pusieron en placas a 1 x 10^6 células por pocillo o valoraron a través de una placa de 96 pocillos recubierta con 7 µg/ml de anticuerpo IFN-γ de rata anti-ratón (clon AN18, MABTECH, Mariemont, OH), en presencia de 10 µg/ml de péptido y 5 U/ml de IL-2. Se añadió un anticuerpo secundario, biotinilado, anti-IFN-g (clon XMG1.2, eBioscience) a cada pocillo a una concentración final de 2 µg/ml. Después de una incubación durante una noche a 37 ºC, las placas se desarrollaron durante 1 hora a temperatura ambiente con estreptavidina-peroxidasa de rábano picante (dilución 1: 1000) seguido de sustrato TMB (Vector laboratories, kit ABC). Los puntos se contaron usando el escáner Immunospot C.T.L. y el software de recuento (CTL, Cleveland, OH).

Línea celulares.

Los medios de cultivo celular y los suplementos se adquirieron en Gibco (Invitrogen). Las células NT-2 y J774A.1 se mantuvieron como se ha descrito previamente. Todos los cultivos celulares se mantuvieron a 37 ºC y CO_2 al 5 %. Las células 4T1 y 4T1 que expresan de forma estable el gen luciferasa de luciérnaga (4T1-Luc) fueron la amable donación de la Dra. Ellen Pure (Wistar Institute) y se mantuvieron en un medio de cultivo celular.

Construcción de vacunas Lm-LLO-Flk-1.

La fuente del gen Flk-1 era un plásmido de vacuna de ADN proporcionado generosamente por el Dr. Ralph Reisfeld (The Scripps Research Institute, La Jolla, CA). Los fragmentos correspondientes a los residuos 68 a 1081 se amplificaron mediante PCR utilizando los siguientes cebadores: Flk-E1 (F): 5'-GGGCTCGAGCGTGATTCTGAGGAAAGGGTATT-3' (SEQ ID NO: 36), Flk-E1 (R): 5' GGGACTAGT**TTA**CCCGGTTTACAATCTTCTTAT-3' (SEQ ID NO: 37), (AA 68-277); Flk-E2 (F): 5'-GGGCTCGAGGTGATCAGGGGTCCTGAAATTA-3' (SEQ ID NO: 38), Flk-E2 (R): 5'-GGGACTAGT**TTA**GCCTCCATCCTCCTTCCT-3' (SEQ ID NO: 39), (AA 545-730); Flk-I1 (F): 5'-GGGCTCGAGGAAGGGGAACTGAAGACAGCC-3' (SEQ ID NO: 40), Flk-I1 (R): 5'-GGGACTAGT**TTA**TGTGTATACTCTGTCAAAAATGGTTTC-3' (SEQ ID NO: 41), (AA 792-1081). Secuencia *Xho*I subrayada para cebador directo (F), secuencia *SpeI* subrayada para cebador inverso (R), codón de terminación en

negrita. El producto de PCR se ligó en el plásmido pCR2.1-TOPO (Invitrogen), se confirmó por secuenciación y posteriormente se suprimió por doble digestión con *Xho*I y *Spe*I (New England Biolabs). El fragmento se ligó en un plásmido basado en pGG34 aguas abajo y se fusionó a un gen que codificaba los primeros 441 residuos de la proteína LLO, cuya expresión es impulsada por el promotor *hly*. La construcción del plásmido pGG34 se ha descrito en detalle en otra parte. El plásmido resultante se electroporó en la cepa de *Lm* defectuosa con PrfA XFL-7, que se obtiene a partir de la cepa de *Lm* 10403S. Los clones positivos se seleccionaron en placas de infusión de cerebro-corazón (BHI, Difco) suplementadas con 34 µg/ml de cloranfenicol y 250 µg/ml de estreptomicina. Las manchas resultantes se denominaron *Lm*-LLO-Flk-E1, *Lm*-LLO-Flk-E2, y *Lm*-LLO-Flk-I1.

Crecimiento y preparación de dosis de vacuna de Lm

Las reservas de vacuna se mantuvieron a -80 ºC en glicerol al 10 % en 1X PBS. Cada reserva se manchó sobre una placa de cloranfenicol/estreptomicina y se desarrolló durante una noche. Se usó una única colonia para el crecimiento en un cultivo durante una noche de 5 ml de medio BHI bajo selección antibiótica. Este cultivo se expandió adicionalmente durante 4 h en una incubadora de agitación a 37 ºC y se hizo crecer hasta que la densidad microbiana alcanzó 0,4-0,8 OD^{600}, momento en el que los microbios se lavaron y se congelaron estériles en glicerol al 10 % y se mantuvieron a -80 ºC hasta su uso. Las reservas se valoraron por cada lote generado. Se utilizaron lotes individuales para un experimento continuo, se usaron lotes diferentes para cada repetición, no se observó variación de lote a lote. Cada lote se comprobó la expresión de la proteína de fusión por transferencia de Western con un anticuerpo anti-PEST y anti-LLO. Para cada dosis, se selecciona un vial, se descongela y se lava dos veces en PBS 1X antes de la dilución y el uso; los microbios no utilizados se descartan.

Efecto de las vacunas Lm-LLO-Flk-1 en el crecimiento tumoral

Se inyectaron 1 x 10^6 de células tumorales NT-2 s.c. en 200 µl de PBS en el costado de ratones FVB/N. El día 4 después de la inoculación del tumor, los ratones se inmunizaron i.p. con 5 x 10^8 UFC de *Lm*-LLO-Flk-E1, Lm-LLO-Flk-E2 o *Lm*-LLO-Flk-I1. Esta dosis se determinó como una décima parte de la dosis mínima observada para tener efectos adversos en los ratones y se usó en todos los experimentos. Las inmunizaciones se repitieron semanalmente hasta un total de 3 dosis de la vacuna para todos los experimentos. En los grupos de control, los ratones recibieron una vacuna de *Lm* de control - *Lm*-LLO-NY-ESO-$1_{101-156}$- *Lm*-LLO-NY-ESO-$1_{101-156}$ actúa como una vacuna de *Lm* irrelevante o de terceros para controlar las respuestas inmunes a LLO o la infección listerial, se usa comúnmente esta vacuna como un control en concentraciones comparables a la vacuna de ensayo. Se midieron los tumores cada 3 días con calibradores y se registraron los diámetros de superficie más cortos (anchura) y más largo para cada tumor individual. Los volúmenes tumorales calculados se realizaron usando la siguiente ecuación: [(anchura)^2 x longitud x 0,52]. Los ratones se sacrificaron cuando desarrollaron heridas abiertas o los tumores alcanzaron 20 mm de diámetro. Los ratones supervivientes libres de tumor expuestos a NT-2 se expusieron de nuevo en el costado opuesto con la misma línea celular al menos 10 semanas después de la primera inoculación.

Inmunofluorescencia tumoral

El día 64 después de la inoculación tumoral, los ratones fueron sacrificados y los tumores NT-2 fueron extirpados quirúrgicamente, se crioconservaron en medio de congelación OCT y crioseccionaron para proporcionar secciones de 8-10 mm de espesor. Para la inmunofluorescencia, las muestras se descongelaron y se fijaron usando formalina al 4 %. Después del bloqueo (medio acondicionado 2,4G2/FBS al 10 %/suero normal al 5 % de rata y ratón), las secciones se tiñeron con anticuerpos primarios en solución de bloqueo en una cámara humidificada a 37 ºC durante 1 hora. Las muestras se tiñeron con anticuerpo secundario siguiendo el mismo procedimiento que se utilizó para la tinción primaria. La tinción con DAPI (Invitrogen) se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La tinción intracelular para HIF-1α se realizó en solución de PBS/Tween al 0,1 %/BSA al 1 %. Los portaobjetos se cubrieron con una solución de montaje (Biomeda) con agentes anti-descoloramiento, se ajustaron durante 24 horas y se mantuvieron a 4 ºC hasta que se formaron imágenes utilizando el software Spot Image (vs. 2006) y un microscopio fluorescente Olympus de la serie BX51. Las imágenes se fusionaron con el software Spot Image y la cuantificación se realizó después de que un ROI se separó usando el software Image Pro (vs. 2006). Todas las imágenes son una serie combinada de tres canales diferentes capturados para el mismo tiempo de exposición. Para la cuantificación de la densidad microvascular utilizando anti-CD31 se basó el análisis en obras previamente publicadas utilizando estrategias similares para medir MVD en modelos de tumores de ratón (33-35).

Estudios de metástasis y formación de imágenes bioluminiscentes

A los ratones se les dio un total de tres vacunaciones antes de la inyección i.v., 7 días después de la vacunación

final, con 50.000 células 4T1 que expresaban el gen indicador integrado de luciferasa (4T1-Luc). El sustrato correspondiente, D-Luciferina, se inyectó i.p. a 5-10 mg/ratón en 200 ul de PBS antes de la formación de imágenes. Los ratones se colocaron en la cámara oscura de un sistema de formación de imágenes Xenogen IVIS (X-100) (Xenogen Corporation, Alameda, CA), bajo anestesia tras la inyección i.p. de ketamina (80 mg/kg)/xilazina (12 mg/kg) (Sigma, St. Louis, MO). Las imágenes fotográficas y de luminiscencia se capturaron con una cámara CCD y la intensidad de la luminiscencia se cuantificó utilizando el software Living Image (versión 2.11) de Xenogen de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se realizó la captura de imágenes longitudinales semanalmente hasta al menos 4 semanas después de la inoculación del tumor. Todos los ratones fueron sometidos a pruebas de imagen para la misma exposición y duración de tiempo. Las imágenes muestran gráficos normalizados. Para el estudio de patología, se realizó el experimento idéntico excepto que el tejido pulmonar se perfundió, se extrajo, se incluyó en cera y se tiñó con H+E antes de contarse (a mano) para determinar los tumores.

Estudios de seguridad en el embarazo y cicatrización de heridas.

Se inmunizaron ratones hembra FVB/N de seis a ocho semanas de edad tres veces consecutivas semanalmente con una vacuna de *Lm* de control o vacunas *Lm*-LLO-Flk-1. En la cuarta semana se realizaron estudios de seguridad. Para el embarazo y la fertilidad, se permitió que 5 ratones por grupo se aparearan con machos alojados individualmente. El coito fue monitorizado y confirmado por la presencia de un tapón vaginal. Se midió el tiempo hasta la gestación, el peso del cachorro al nacer y el tamaño total de la camada. El ensayo de cicatrización de heridas utilizado en este estudio se realizó de acuerdo con métodos descritos anteriormente. En resumen, los ratones fueron anestesiados, el pelo se eliminó y se limpió la piel con una toallita aséptica. Se perforaron dos heridas circulares de 3 mm de diámetro en la piel usando una herramienta de biopsia para piel estéril (Acuderm). Las heridas no se trataron y no se observó ninguna infección. El tiempo promedio hasta el cierre de la herida se controló y se consideró completo cuando se formó una cicatriz sin dejar ninguna costra visible.

Análisis estadístico y métodos de cuantificación.

Los datos se analizaron utilizando el ensayo no paramétrico de Mann-Whitney. La prueba de ji cuadrado de rango logarítmico se utilizó para todos los datos de supervivencia. Todo el análisis estadístico se realizó con el software Prism, vs 4.0a (2006). La significación estadística se basó en un valor de $p \leq 0,05$. En todos los estudios no transgénicos se incluyeron al menos 8 ratones por grupo. Todos los estudios se repitieron al menos una vez.

EJEMPLO 1

CONSTRUCCIÓN DE CONSTRUCCIONES LLO-FLK-1

Se ensayaron un total de tres construcciones, conteniendo cada una región diferente de Flk-1: E1 (AA 68-277), E2 (AA 545-730) e I1 (792-1081) (figura 1A). Las regiones se seleccionaron basándose en los epítopos predichos. Debido a que había interés en ensayar estas vacunas en el modelo de cáncer de mama basado en FVB/N, se decidió clonar fragmentos que serían más apropiados para el haplotipo modelo usado para el ensayo (es decir, FVB/N, $H2^q$). Los dominios E1, E2 e I1 seleccionados contenían varios epítopos potenciales para el haplotipo MHC I de ratón $H\text{-}2^q$ (figura 2A).

Cada fragmento se clonó como una proteína de fusión con la proteína LLO truncada (figura 1A). Para probar si las proteínas de fusión LLO-Flk-1 fueron producidas y secretadas por las construcciones *Lm*-LLO-Flk-1, se analizó la proteína de sobrenadantes de cultivo por transferencia de Western (figura 1B) usando un anticuerpo anti-PEST policlonal (parte inferior de la figura 1B) o anticuerpo anti-LLO (parte superior de la figura 1B). Se detectó una banda para cada construcción de fusión, LLO-Flk-E1 (~81 kDa), LLO-Flk-E2 (~78 kDa), y LLO-Flk-I1 (~89 kDa). La banda de aproximadamente 60-70 kDa es LLO endógeno; la proteína de fusión truncada LLO se encuentra en torno a 60-50 kDa. La transferencia anti-LLO se utilizó como un control para mostrar que estas proteínas de fusión están ligadas a LLO-Flk. Las tres construcciones fueron capaces de infectar, crecer y escapar del fagolisosoma como se evidencia por la replicación en macrófagos J774A.1 (figura 2D). Además, cada vacuna fue capaz de inmunizar los ratones contra las regiones Flk-1 clonadas como se muestra por las respuestas a esplenocitos IFN-g *ex vivo* (Figura 1C). Los péptidos utilizados para la reexposición en estos experimentos ELISpot de FVB/N se mapearon originalmente en el ratón Balb/c de $H2^d$ como epítopos Flk-1 inmunodominantes. Se usaron rutinariamente epítopos mapeados de $H2^d$ en modelos $H2^q$ como epítopos identificados de $H2^d$ también pueden servir como epítopos de $H2^q$ presumiblemente debido a la alta homología de las moléculas $H2^d$ y $H2^q$.

EJEMPLO 2

EFICACIA TERAPÉUTICA DE LAS VACUNAS LM-LLO-FLK-1 EN UN MODELO TUMOR QUE EXPRESA HER-2/NEU

Para probar la capacidad de nuestras vacunas para inducir la regresión de los tumores de mama Her-2/neu$^+$, se utilizó el modelo tumoral NT-2, que sobreexpresa Her-2/neu de rata como un transgén y se obtuvo originalmente de un tumor mamario espontáneo en el ratón transgénico FVB/N Her-2/neu. La línea celular NT-2 no expresa la molécula Flk-1, y por lo tanto el antígeno de interés sólo se localiza en la vasculatura huésped. Las células se cultivaron *in vitro* y se trasplantaron por vía subcutánea en el costado de ratones FVB/N. El día 4, cuando se habían formado tumores palpables (~4-5 mm de diámetro), se vacunaron los ratones y después se reforzaron semanalmente para un total de tres vacunaciones. Las vacunas Flk-E1 y Flk-I1 fueron capaces de inducir la regresión, y en algunos ratones la erradicación completa (Flk-E1: 2/8; Flk-I1: 2/8) de los tumores trasplantados al día 64 después de la inoculación (figura 3A). Sin embargo, Flk-E2 fue incapaz de controlar el crecimiento tumoral, que fue similar al grupo tratado con la *Lm* de control. Los ratones con tumores completamente en regresión se expusieron de nuevo a NT-2 en el lado contra lateral a los 100 días después de la inoculación tumoral y no se observó recrecimiento del nuevo tumor sugiriendo inmunidad antitumoral de larga duración (figura 4A y B).

La densidad microvascular (MVD) de los tumores del día 64 se evaluó mediante tinción con el marcador de células pan-endoteliales CD31 y se contratiñó con el marcador nuclear DAPI. Como era de esperar, la MVD en tumores del grupo tratado con Flk-E2 se asemejaba a los de ratones tratados con control. Sin embargo, se observó una reducción en la densidad de los vasos CD31$^+$ en ratones tratados con Flk-I1 y se observó una reducción adicional usando la vacunación Flk-E1 (figura 3C). Esta reducción en los vasos CD31$^+$ se correlacionó con un aumento en la tinción para el marcador de hipoxia nuclear, factor inducible de hipoxia 1α (HIF-1α) en los grupos tratados con Flk-E1 y Flk-I1, pero no para el grupo de control (figura 3D). Es posible plantear la hipótesis de que la regresión de estos tumores Her-2/neu$^+$, además de la reducción de la MVD tumoral, se debió a linfocitos T citotóxicos anti-VEGFR2 que destruyen las células endoteliales implicadas en la angiogénesis tumoral, conduciendo posiblemente a la restricción del daño o crecimiento tumoral que da como resultado la regresión observada. Posteriormente, los restos de tumores fagocitados podrían presentarse cruzados por células dendríticas locales en el drenaje de ganglios linfáticos y presentarse en CTL anti-Her-2/neu, cuyos epítopos se han mapeado previamente en el ratón FVB/N. Si tiene lugar esta propagación del epítopo intermolecular, cabe esperar que los ratones que mostraron la mayor regresión también tengan una alta frecuencia de linfocitos T CD8$^+$ anti-Her-2/neu. Para probar esta hipótesis, se cultivaron esplenocitos de ratones del día 64, y se realizó un ELISpot para IFN-g, con exposición de nuevo a tres epítopos conocidos de tres regiones diferentes de Her-2/neu. Se decidió utilizar un ensayo ELISpot para medir las respuestas anti-Her-2/neu porque previamente se habían mapeado epítopos CTL para diferentes regiones de la molécula Her-2/neu y el ensayo ELISpot es lo suficientemente sensible como para detectar una baja frecuencia de linfocitos T específicos, a diferencia de varios ensayos citotóxicos que requieren estimulación y expansión *in vitro*. Se encontró que Flk-E1 y Flk-I1 mostraron la mayor propagación del epítopo, mientras que Flk-E2 mostró la menor (figura 3B, *p <0,05), fuertemente correlacionada con la extensión de la regresión tumoral encontrada *in vivo* (figura 3A).

EJEMPLO 3

LA REGRESIÓN DE TUMOR INDUCIDA POR ANTI-ANGIOGÉNESIS ES DEPENDIENTE DEL EPÍTOPO QUE SE PROPAGA A UN ANTÍGENO DE TUMOR ENDÓGENO

La presencia de propagación del epítopo de Her-2/neu sugiere que la regresión del tumor puede no sólo depender de los eventos anti-vasculares, sino también de la respuesta inmune al antígeno tumoral HER-2/neu. Para probar esta hipótesis, se repitió el mismo experimento utilizando las dos vacunas más potentes, Flk-E1 y Flk-I1 pero, además de la inoculación de ratones FVB/N de tipo silvestre, también se inyectaron las células NT-2 por vía subcutánea en su genoma singénico, FVB/N Her-2/neu transgénico, que exhibe una tolerancia profunda a la molécula Her-2/neu de rata. De nuevo, Flk-E1 y Flk-I1 ralentizaron el crecimiento de los tumores NT-2 en ratones FVB/N de tipo salvaje, como se demostró previamente (figura 5A, panel izquierdo). Sin embargo, en el huésped transgénico donde las respuestas anti-HER-2/neu están limitadas por la tolerancia, se observó el crecimiento de todos los tumores (figura 5A, panel derecho). Ambos resultados reflejaron la propagación del epítopo observada hacia la proteína Her-2/neu endógena demostrada en el bazo (figura 5B) y en el sitio del tumor como se muestra para la vacunación Flk-E1 (figura 5C). Esto sugiere que los eventos anti-vasculares no son suficientes para la regresión tumoral, sino que el efecto combinado tanto en el tumor de la vasculatura como directamente en las células tumorales se requiere para la muerte del tumor y, finalmente, la regresión.

EJEMPLO 4

LA VACUNACIÓN CON FRAGMENTOS DE VACUNA LM-LLO-FLK-1 PUEDE PREVENIR EL CRECIMIENTO DE METÁSTASIS EXPERIMENTALES

Un uso importante para vacunas anti-angiogénesis podría ser el tratamiento o prevención de metástasis de cáncer de mama. Las células tumorales que hacen metástasis dependen en gran medida del desarrollo de nuevos vasos, aunque los tumores más pequeños no dependen completamente de la nueva vasculatura. Sin embargo, se ha planteado la hipótesis de que una vez que han crecido más allá de un cierto tamaño, los tumores se vuelven altamente dependientes de la formación de nuevos vasos y, por lo tanto, se convierten en un posible blanco de CTL anti-VEGFR2. Para probar si estas vacunas podían proteger contra la diseminación del tumor de mama se usó un sistema de metástasis experimental que implicaba la inoculación directa de células tumorales cultivadas *in vitro* en la vena de la cola de ratones permitiendo una rápida colonización de varios órganos aguas abajo, especialmente el pulmón. Puesto que después de la vacunación de la vena de la cola, el modelo NT-2 no coloniza bien el pulmón (datos no mostrados) se usó 4T1, que es una línea celular agresiva de carcinoma de mama de ratón del ratón Balb/c. Se inmunizaron ratones Balb/c tres veces durante el transcurso de tres semanas con *Lm*-LLO-Flk-E1 o Lm-LLO-Flk-I1 o una vacuna de *Lm* de control. A los ratones se les inyectó entonces 50.000 células 4T1 i.v. y también s.c. en del mismo animal. La inyección en el sitio s.c. se realizó para poder medir el crecimiento del tumor primario, mientras que la inyección i.v. simuló metástasis. Los ratones tratados con las vacunas Flk-1 presentaban un crecimiento tumoral prolongado, ralentización del tamaño tumoral s.c. primario, aumento de la supervivencia, y la reducción de la morbilidad en comparación con los ratones de control (figura 6). A diferencia de las malas respuestas frente al tumor 4T1 primario, la tasa de siembra y las metástasis totales encontradas en cada animal fueron significativamente menores en los animales tratados que en los ratones control (figura 7A). Se observó un bajo nivel de epítopo que se extendía a Her-2/neu (figura 7B), probablemente porque 4T1 expresaba débilmente el ratón Her-2/neu.

Para ensayar más rigurosamente la hipótesis de que la inmunización frente a Flk-1 puede prevenir la siembra de tejido pulmonar con metástasis experimentales, se utilizó un modelo bioluminiscente en el que se pueden visualizar células tumorales individuales y masas utilizando imágenes no invasivas. Los ratones fueron inyectados i.v. con 50.000 células 4T1 que expresaban el gen luciferasa de luciérnaga (4T1-Luc) después de varias rondas de vacunación con las vacunas *Lm*-Flk-E1 e -I1. Semanalmente, los ratones se anestesiaron y se inyectaron con un sustrato de luciferasa (D-Luciferina) y se formaron imágenes. La siembra pulmonar fue evidente al día 11 y los ratones tratados con control se colonizaron rápidamente con células 4T1-Luc al día 25 mientras que ninguno de los ratones tratados con Lm-LLO-Flk-E1 y Lm-LLO-Flk-I1 mostraron signos de siembra pulmonar hasta al menos el día 32, momento en el que los ratones tratados con control habían enfermado y se sacrificaron (figura 7C). Al día 32, sólo el 25 % de los ratones vacunados con Flk-1 mostraron tumores de pulmón. Es posible que las masas tumorales fueran indetectables en este momento por este método bioluminiscente ya que se observó una señal para las células tumorales el día 25 pero no el día 32 para el grupo tratado con *Lm*-Flk-E1. Esta señal muy pequeña en el día 25 está por debajo del umbral de las células 1000 y puede haber perdido algo de masa celular en la semana siguiente para estar por debajo del límite de detección para el sistema. Los ratones inmunizados con *Lm* de control rápidamente enfermaron por tumores pulmonares, pero las vacunas Flk-E1 y Flk-I1 retrasaron la carga tumoral, el tiempo hasta la progresión (día 25 para el control tratado frente al día 32 para tratamiento con Flk-1), y enfermedad eventual (reducción de la morbilidad como se muestra en la figura 6).

EJEMPLO 5

LA INMUNIZACIÓN CON FLK-1 NO TIENE IMPACTO EN LA CICATRIZACIÓN DE LAS HERIDAS, EL EMBARAZO O LA FERTILIDAD EN LOS RATONES

Para evaluar si las vacunas *Lm*-LLO-Flk-1 causan toxicidad que está asociada con la inhibición de la angiogénesis, se estudió la cicatrización de heridas, el embarazo y la fertilidad en ratones inmunizados. Los ratones se inmunizaron tres veces con *Lm*-LLO-Flk-E1, *Lm*-LLO-Flk-E2, *Lm*-LLO-Flk-I1, *Lm* de control, o con solución salina solo antes de aparearse o se les hizo perforaciones de herida estériles. Se observaron ratones que se aparearon durante la duración de la gestación desde el coito, la media de la masa del cachorro a término y el tamaño total de la camada. Los punzones de heridas eran estériles, pero los ratones estaban enjaulados juntos. Se siguió la técnica de cicatrización de heridas de acuerdo con métodos descritos anteriormente. Cinco ratones de cada grupo de inmunización se afeitaron y se les hizo perforaciones de herida estériles, dos por animal y luego se dejaron curar con el tiempo. Se midió el tiempo hasta el cierre de la herida. La cicatrización completa de la herida se consideró completa, no se dejaron costras en el momento del cierre de la herida. La inmunización con *Lm*-LLO-Flk-E1, *Lm*-LLO-Flk-E2, o *Lm*-LLO-Flk-I1 no tuvo impacto sobre la fertilidad, la longitud de gestación ni la masa de los cachorros

al nacer (figura 8A). De manera similar, la inmunización no tuvo un impacto significativo en el tiempo requerido para el cierre de la herida (figura 8B).

Para evaluar si las respuestas inmunitarias a Her-2/neu observadas después de la inmunización de Flk-I1 se debían a la reactividad cruzada entre epítopos compartidos entre Flk-1 y Her-2/neu, los ratones FVB/N inmunizados con vacuna Flk-I1 se evaluaron para determinar la inmunidad a FLK-$I1_{839-848}$, que es reactiva cruzada con el epítopo Her-2/neu de rata GSGAFGTV**Y**K (SEQ ID NO: 42). La vacunación de ratones con *Lm*-LLO-Flk-I1 conduce a excelentes respuestas frente al epítopo Flk-I1 previamente asignado PGGPLMVIV (SEQ ID NO: 43). Sin embargo, no se observaron respuestas significativas contra el epítopo Flk-$I1_{839-848}$ de ratón o el epítopo $IC1_{732-741}$ Her-2/neu IC1732-741 (figura 9). Por lo tanto, las respuestas inmunitarias a Her-2/neu observadas después de la inmunización con Flk-I1 fueron muy probablemente debidas a la propagación de epítopos y no debido a reactividad cruzada entre epítopos compartidos.

En conjunto, las vacunas *Lm*-LLO-Flk-1 fueron capaces de erradicar algunos tumores de mama establecidos, reducir la densidad microvascular en los tumores restantes, proteger contra la reexposición del tumor y las metástasis experimentales e inducir la propagación del epítopo a diversas regiones del antígeno asociado a tumor Her-2/neu. Se encontró que la erradicación del tumor dependía de la propagación del epítopo a HER-2/neu y no se debió únicamente a la reducción de la vasculatura tumoral. Sin embargo, la eficacia de la vacuna no afectó a la cicatrización normal de la herida ni ha tenido efectos secundarios tóxicos en el embarazo. Por lo tanto, una vacuna anti-angiogénesis puede superar la tolerancia a la vasculatura huésped que conduce a la propagación del epítopo a una proteína tumoral endógena y conduce a la regresión activa del tumor. Por lo tanto, se presenta en el presente documento un nuevo método para dirigir tanto la vasculatura tumoral como un antígeno tumoral endógeno (Her-2/neu) usando una única vacuna.

EJEMPLO 6

LAS MUTACIONES SURGEN EN MUTANTES DE ESCAPE

Ratones.

Los ratones transgénicos FVB/N Her-2/neu se enjaularon y se criaron en la instalación definitiva para animales en la Universidad de Pensilvania. Los ratones tenían entre seis y ocho semanas de edad cuando se usaron al comienzo de los experimentos, que se realizaron de acuerdo con las regulaciones del Institutional Animal Care and Use Committee de la University of Pennsylvania.

Cepas de vacuna contra Listeria.

Las cepas usadas fueron Lm-LLO-Flk-E1 y Lm-LLO-Flk-I1. La cepa Lm-LLO-NYESO1 se usó como una vacuna de control de terceros para la especificidad del antígeno. Las bacterias se seleccionaron en placas de infusión de cerebro-corazón (BHI, Difco) suplementadas con 34 µg/ml de cloranfenicol y 250 µg/ml de estreptomicina, luego se cultivaron en cultivo líquido y se congelaron en 1 ml de alícuotas a -80 ºC. Para la inyección, las vacunas se lavaron dos veces con PBS estéril antes de la administración.

Protección de tumores autóctonos.

Para ensayar la capacidad de las vacunas de *Listeria* anti-Flk-1 para afectar a los tumores surgidos espontáneamente se usó el ratón hembra transgénico Her-2/neu de rata FVB/N que sobreexpresaba la molécula Her-2/neu de rata, y desarrolla espontáneamente tumores mamarios. Para estos estudios de protección a largo plazo, se inmunizaron ratones hembra (N = 15) un total de seis veces comenzando a las 6 semanas de edad e inmunizando i.p. cada tres semanas hasta las 21 semanas de edad. Las vacunas Lm-LLO-Flk-E1, Lm-LLO-Flk-I1 o Lm-LLO-NYESO-1 se inyectaron a 0,1 DL50 suspendidas en PBS. La carga tumoral se siguió semanalmente. Una vez que los tumores tenían un tamaño superior a 10 mm, se sacrificaron los animales y se extirparon los tumores para su análisis. El análisis estadístico de las diferencias en el crecimiento tumoral autóctono se realizó mediante la prueba Kaplan-Meier de rango logarítmico usando el software GraphPad Prism, comparando el tiempo de inicio del crecimiento tumoral entre cada grupo de vacuna y grupos de control.

Análisis y mapeo de mutaciones.

Se extirparon los tumores frescos y se pusieron en una solución de RNAlater, se almacenaron a 4 ºC durante menos

de 2 semanas. Se extrajeron ARNm de los tumores almacenados utilizando un kit de ARNm Qiagen (Invitrogen), a continuación, se generó ADNc a través de PCR. Las muestras de PCR individuales se dividieron adicionalmente para permitir la secuenciación de cada fragmento individual de Her-2/neu en tramos de 500-800 pb cada una (EC1, EC2, EC3, IC1, IC2) como se describió en otra parte (Singh, 2007). La secuenciación se realizó por la Children's Hospital of Philadelphia (CHOP) Sequencing Facility y se analizó utilizando el software 4Peaks 1.7.2. Las mutaciones que no ocurrieron en cuatro o más reacciones individuales de PCR y secuenciación se descartaron como mutaciones inducidas por PCR. El modelado molecular se realizó usando MacPyMol.

Secuencias de cebadores de PCR:

EC1 FP: AGGGCTGTCAGGTAGTGC (SEQ ID NO: 44)
EC1 RP: TGACCTCTTGGTTATTCG (SEQ ID NO: 45)
EC2 FP: ACCTGCCCCTACAACTAC (SEQ ID NO: 46)
EC2 RP: GACGCCCTCTACAGTTGC (SEQ ID NO: 47)
EC3 FP: GTGGATTGGCTCTGATTC (SEQ ID NO: 48)
EC3 RP: TGAGTTACAGACCAAGCC (SEQ ID NO: 49)
IC1 FP: CAAACGAAGGAGACAGAAG (SEQ ID NO: 50)
IC1 RP: CACCATCAAACACATCGG (SEQ ID NO: 51)
IC2 FP: CACTGCTGGAAGATGATG (SEQ ID NO: 52)
IC2 RP: TTTGTGGCGATGGAGACC (SEQ ID NO: 53)

Se vacunaron ratones FVB/N transgénicos que expresaban Her-2/neu de rata con Flk-E1, Flk-I1, o Lm de control cada 3 semanas a partir de las 6 semanas de edad, y se midieron los tumores semanalmente después de la vacunación final. La vacunación con Flk-E1 y Flk-I1 aumentó el porcentaje de ratones libres de tumor en comparación con la vacuna de Lm de control. Entre la semana 35 y 40, hubo varios ratones en los ratones vacunados con Flk-E1 y Flk-I1 que desarrollaron tumores. Se examinaron los tumores de cada ratón para el mensaje Her-2/neu mutado. Se recogió ARN mensajero, se sintetizó ADNc y se secuenció. La secuencia resultante se apareó junto con la secuencia de tipo silvestre para determinar los residuos mutados. Sólo las mutaciones que surgieron 4 veces o más se consideraron mutaciones verdaderas (figura 10A). Varios de los residuos mutados dentro de los "puntos calientes" o cadenas de residuos mutados estaban en epítopos CTL previamente mapeados. Uno de tales epítopos muestra mutaciones en aminoácidos clave responsables de anclar el epítopo a la molécula H2Dq MHC I (figura 10B).

EJEMPLO 7

DIRECCIONAMIENTO DE METÁSTASIS DE MAMA Y CEREBRO DE MELANOMA

Los experimentos se realizaron usando los métodos como se describieron anteriormente en el presente documento.

Se inmunizaron ratones Balb/c tres veces con cada vacuna, ya sea Her-2/neu anti-humano o vacuna de control NYESO1. Las células de carcinoma de mama murino que expresan de forma estable el gen luciferasa de la luciérnaga (células EMT6-Luc del laboratorio de John Ohlfest en la Universidad de Minnesota) se cultivaron *in vitro* y luego se inyectaron en el cerebro de ratones anestesiados a 5.000 células por ratón. Las células EMT6-Luc expresan niveles bajos de Her-2/neu de ratón (datos no mostrados). Las células se dejaron crecer antes de tomar imágenes los días indicados. Aunque las metástasis cerebrales se observaron claramente en ratones vacunados con NYESO1, la vacunación Her-2/neu anti-humano controló los tumores cerebrales los días 3, 8 y 11 después de la inducción experimental de metástasis (figura 11A).

Se inmunizaron ratones C57B1/6 tres veces con cada vacuna, ya sea HMWMAA-C anti-humana o vacuna de control NYESO1. Las células de melanoma de ratón B16F10-Luc (del laboratorio de Jeff Miller en UCSF) se cultivaron *in vitro* y luego se inyectaron en el cerebro de ratones anestesiados a 5.000 células por ratón. La línea parental B16F10 no expresa HMWMAA (comunicación personal), por lo que la única fuente de HMWMAA está en pericitos y células gliales. La vacunación de ratones con HMW-MAA-C anti-humano redujo los tumores cerebrales los días 11 y 15 después de la inducción experimental de metástasis (figura 11B). Por lo tanto, la vacunación con HMW-MAAC o Her-2/neu protege contra metástasis cerebrales, incluso si las células tumorales no expresan HMW-MAA.

EJEMPLO COMPARATIVO 8

CONSTRUCCIÓN DE NUEVO PRODUCTO TERAPÉUTICO DE VACUNA EN BASE A LISTERIA ANTI-

CD105/ENDOGLINA

Una construcción de una cepa Lm que expresaba un fragmento bastante grande de endoglina (Figura 12) no secretó el fragmento cuando se fusiono con LLO, por lo tanto, se rediseñó en dos nuevas construcciones Lm, Lm-LLO-CD105A (aa17-319) y Lm -LLO-CD105B (359-588) que incluyen casi todo el gen de la endoglina (figura 13A; SEQ ID NO: 62) e incluyen epítopos CTL putativos, determinados usando RANKpep, que se encuentran fuera de la región de endoglina previamente dirigida (figura 12). Al incluir potencialmente más epítopos inmunodominantes dentro de estas nuevas construcciones, se utilizó la expansión del grupo de epítopos CTL para aumentar la eficacia de la vacuna. Además, haciendo las proteínas de fusión más pequeñas y eliminando regiones de alta hidrofobicidad de las construcciones, estas proteínas de fusión se secretaron mejor por Lm. Los genes que codifican estos fragmentos se clonaron en CD105pGG-34 (figura 13B). Tanto Lm-LLO-CD105A (figura 14) como Lm-LLO-CD105B (figura 15) expresaron y secretaron fragmentos del tamaño apropiado.

EJEMPLO COMPARATIVO 9

IMPACTO DE LM-LLO-CD105A Y B EN EL CRECIMIENTO PRIMARIO Y METASTÁSICO DEL TUMOR DE MAMA 4T1 EN EL RATÓN BALB/C

El tumor de mama 4T1 de ratón BALB/c, el más maligno de nuestros modelos de tumor de mama, ya que hace metástasis rápidamente al implantarse en la glándula mamaria, se eligió como el primer ensayo de las vacunas mostradas en el Ejemplo 8. 2 x 10^5 células 4T1 se implantaron en la almohadilla de grasa mamaria en ratones Balb/c. Los ratones se vacunaron con 2 x 10^8 ufc de cada vacuna el día 1, 8 y 15 o los días 4, 11 y 18. Ambos regímenes de vacuna mostraron una disminución significativa del crecimiento tumoral en comparación con ratones sin tratar o vacunados con control (figura 16). El día 32, los ratones se sacrificaron y sus pulmones se extirparon y se examinaron para determinar la diseminación metastásica. Curiosamente, sólo Lm-LLO-CD105B mostró una reducción estadísticamente significativa en las metástasis pulmonares superficiales (figura 17).

A continuación, se examinaron las respuestas de CTL en estos ratones. Como un intento inicial para determinar las regiones inmunogénicas de la molécula de endoglina que podrían ser reconocidas por linfocitos T $CD8^+$, los dos fragmentos fueron sometidos a análisis por RANKpep(http://bio.dfci.harvard.edu/RANKPEP/) y SYFPEITHI (http://www.syfpeithi.de/). A partir de esto se seleccionaron los dos péptidos más prometedores para CD105A: AGPRTVTVM (SEQ ID NO: 59) (un aglutinante D^d) y para CD105B: AYSSCGMKV (SEQ ID NO: 60) (un aglutinante K^d). Sus posiciones en la secuencia de endoglina están subrayadas en la figura 13A.

Estos dos péptidos se usaron en análisis de ELISpot para estimular esplenocitos tomados de ratones mostrados en la figura 16B, que habían sido vacunados los días 4, 11 y 18, cuatro días después de su última vacunación. Sin embargo, no estimularon a los linfocitos T para secretar interferón-gamma, en comparación con un péptido restringido de H-2^d de control de Gag VIH, lo que sugiere que no son epítopos CTL (figura 7). También se analizó la propagación del epítopo a dos antígenos de tumor endógenos expresados a bajos niveles por 4T1. La primera es una glicoproteína de envoltura, gp70, del virus de la leucemia murina ecotrópica endógena. Se ha mapeado un epítopo, designado AH1, SPSYVYHQF (SEQ ID NO: 61), frpm gp70, con restricción L^d para el ratón BALB/c. Curiosamente se encontró que tanto Lm-LLO-CD105A como B indujeron la propagación de epítopos a este antígeno. También se investigó la propagación de epítopos a HER-2/neu. Se usaron dos epítopos conocidos en el dominio extracelular de HER-2/neu, EC1 y EC2 y uno del dominio intracelular. Aunque no se observó ningún aumento significativo en los ELISpots para IFN-gamma frente a IC1 para la vacuna de endoglina en comparación con la vacuna de control Lm-LLO-NY-ESO-1, la propagación a EC1 y EC2 usando la vacuna Lm-LLO-CD105A (figura 17).

Se examinaron los tumores de los ratones para los linfocitos T infiltrantes específicos de antígeno, a partir de los cuales se recogieron los esplenocitos para linfocitos T específicos de HER-2/neu y gp70 usando análisis FACS y de tetrámero. Se observaron aumentos significativos en linfocitos T específicos de EC1, EC2 y AH1 en tumores, y se observaron también aumentos moderados en los linfocitos T específicos de IC1, de ratones vacunados con Lm-LLO-CD105 en comparación con los vacunados con Lm-LLO-NY-ESO-1 (figura 18).

EJEMPLO COMPARATIVO 10

ESTUDIOS SOBRE EL USO DE LM-LLO-CD105A Y B PARA AFECTAR AL CRECIMIENTO DE TUMOR DE MAMA HER-2/NEU POSITIVO NT2 DERIVADO DEL RATÓN TRANSGÉNICO HER-2/NEU FVB

Las vacunas de endoglina se ensayaron en otro modelo de tumor de mama en el ratón FVB utilizando el tumor trasplantable HER-2/neu NT2. Además, se implantaron 1 x 10^6 células tumorales por vía subcutánea en ratones FVB y se inmunizaron con Lm-LLO-CD105 A y B los días 4, 11 y 18, con 2 x 10^8 ufc de cada vacuna. Se usó Lm-LLO-NY-ESO-1 como la vacuna de control. Ambas vacunas afectaron significativamente al crecimiento del tumor (figura 19) y el día 60, el 50 % de los ratones inmunizados con Lm-LLO-CD105A estaban libres de tumor y el 25 % de los ratones vacunados con Lm-LLO-CD105B estaban libres de tumor en comparación con ninguno del grupo no vacunado o el grupo vacunado con Lm-LLO-NYESO1.

LISTA DE SECUENCIAS

<110> The Trustees of the University of Pennsylvania

<120> COMPOSICIONES QUE COMPRENDEN FACTORES ANGIOGÉNICOS Y MÉTODOS DE USO DE LAS MISMAS

<130> P-72863-PC

<140> PCT/US10/999999
<141> 04-03-2010

<150> 61/157.367
<151> 04-03-2009

<160> 63

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> epítopo pFlk-I1

<400> 1

```
Pro Gly Gly Pro Leu Met Val Ile Val
1               5
```

<210> 2
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> epítopo pIC1 Her-2/neu

<400> 2

```
Gly Ser Gly Ala Phe Gly Thr Val Tyr Lys
1               5                   10
```

<210> 3
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> epítopo compartido entre los dominios cinasa Her-2/neu y Flk-1

<400> 3
Gly Arg Gly Ala Phe Gly Gln Val Ile
1 5

<210> 4
<211> 1345
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 4
Met Glu Ser Lys Ala Leu Leu Ala Val Ala Leu Trp Phe Cys Val Glu
1 5 10 15

Thr Arg Ala Ala Ser Val Gly Leu Pro Gly Asp Phe Leu His Pro Pro
20 25 30

Lys Leu Ser Thr Gln Lys Asp Ile Leu Thr Ile Leu Ala Asn Thr Thr
35 40 45

Leu Gln Ile Thr Cys Arg Gly Gln Arg Asp Leu Asp Trp Leu Trp Pro
50 55 60

Asn Ala Gln Arg Asp Ser Glu Glu Arg Val Leu Val Thr Glu Cys Gly
65 70 75 80

Gly Gly Asp Ser Ile Phe Cys Lys Thr Leu Thr Ile Pro Arg Val Val
85 90 95

Gly Asn Asp Thr Gly Ala Tyr Lys Cys Ser Tyr Arg Asp Val Asp Ile
100 105 110

Ala Ser Thr Val Tyr Val Tyr Val Arg Asp Tyr Arg Ser Pro Phe Ile
115 120 125

Ala Ser Val Ser Asp Gln His Gly Ile Val Tyr Ile Thr Glu Asn Lys
130 135 140

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

Val Ser Leu Cys Ala Arg Tyr Pro Glu Lys Arg Phe Val Pro Asp Gly
165 170 175

Asn Arg Ile Ser Trp Asp Ser Glu Ile Gly Phe Thr Leu Pro Ser Tyr
180 185 190

Met Ile Ser Tyr Ala Gly Met Val Phe Cys Glu Ala Lys Ile Asn Asp
195 200 205

Glu Thr Tyr Gln Ser Ile Met Tyr Ile Val Val Val Val Gly Tyr Arg
210 215 220

Ile Tyr Asp Val Ile Leu Ser Pro Pro His Glu Ile Glu Leu Ser Ala
225 230 235 240

```
Gly Glu Lys Leu Val Leu Asn Cys Thr Ala Arg Thr Glu Leu Asn Val
                245                 250                 255

Gly Leu Asp Phe Thr Trp His Ser Pro Pro Ser Lys Ser His His Lys
            260                 265                 270

Lys Ile Val Asn Arg Asp Val Lys Pro Phe Pro Gly Thr Val Ala Lys
        275                 280                 285

Met Phe Leu Ser Thr Leu Thr Ile Glu Ser Val Thr Lys Ser Asp Gln
    290                 295                 300

Gly Glu Tyr Thr Cys Val Ala Ser Ser Gly Arg Met Ile Lys Arg Asn
305                 310                 315                 320

Arg Thr Phe Val Arg Val His Thr Lys Pro Phe Ile Ala Phe Gly Ser
                325                 330                 335

Gly Met Lys Ser Leu Val Glu Ala Thr Val Gly Ser Gln Val Arg Ile
            340                 345                 350

Pro Val Lys Tyr Leu Ser Tyr Pro Ala Pro Asp Ile Lys Trp Tyr Arg
        355                 360                 365

Asn Gly Arg Pro Ile Glu Ser Asn Tyr Thr Met Ile Val Gly Asp Glu
    370                 375                 380

Leu Thr Ile Met Glu Val Thr Glu Arg Asp Ala Gly Asn Tyr Thr Val
385                 390                 395                 400

Ile Leu Thr Asn Pro Ile Ser Met Glu Lys Gln Ser His Met Val Ser
                405                 410                 415

Leu Val Val Asn Val Pro Pro Gln Ile Gly Glu Lys Ala Leu Ile Ser
            420                 425                 430

Pro Met Asp Ser Tyr Gln Tyr Gly Thr Met Gln Thr Leu Thr Cys Thr
        435                 440                 445

Val Tyr Ala Asn Pro Pro Leu His His Ile Gln Trp Tyr Trp Gln Leu
    450                 455                 460

Glu Glu Ala Cys Ser Tyr Arg Pro Gly Gln Thr Ser Pro Tyr Ala Cys
465                 470                 475                 480

Lys Glu Trp Arg His Val Glu Asp Phe Gln Gly Gly Asn Lys Ile Glu
```

```
                485                 490                 495

Val Thr Lys Asn Gln Tyr Ala Leu Ile Glu Gly Lys Asn Lys Thr Val
            500                 505                 510

Ser Thr Leu Val Ile Gln Ala Ala Asn Val Ser Ala Leu Tyr Lys Cys
        515                 520                 525

Glu Ala Ile Asn Lys Ala Gly Arg Gly Glu Arg Val Ile Ser Phe His
    530                 535                 540

Val Ile Arg Gly Pro Glu Ile Thr Val Gln Pro Ala Ala Gln Pro Thr
545                 550                 555                 560

Glu Gln Glu Ser Val Ser Leu Leu Cys Thr Ala Asp Arg Asn Thr Phe
                565                 570                 575

Glu Asn Leu Thr Trp Tyr Lys Leu Gly Ser Gln Ala Thr Ser Val His
            580                 585                 590

Met Gly Glu Ser Leu Thr Pro Val Cys Lys Asn Leu Asp Ala Leu Trp
        595                 600                 605

Lys Leu Asn Gly Thr Met Phe Ser Asn Ser Thr Asn Asp Ile Leu Ile
    610                 615                 620

Val Ala Phe Gln Asn Ala Ser Leu Gln Asp Gln Gly Asp Tyr Val Cys
625                 630                 635                 640

Ser Ala Gln Asp Lys Lys Thr Lys Lys Arg His Cys Leu Val Lys Gln
                645                 650                 655

Leu Ile Ile Leu Glu Arg Met Ala Pro Met Ile Thr Gly Asn Leu Glu
            660                 665                 670

Asn Gln Thr Thr Thr Ile Gly Glu Thr Ile Glu Val Thr Cys Pro Ala
        675                 680                 685

Ser Gly Asn Pro Thr Pro His Ile Thr Trp Phe Lys Asp Asn Glu Thr
    690                 695                 700

Leu Val Glu Asp Ser Gly Ile Val Leu Arg Asp Gly Asn Arg Asn Leu
705                 710                 715                 720

Thr Ile Arg Arg Val Arg Lys Glu Asp Gly Gly Leu Tyr Thr Cys Gln
                725                 730                 735
```

```
Ala Cys Asn Val Leu Gly Cys Ala Arg Ala Glu Thr Leu Phe Ile Ile
            740                 745                 750

Glu Gly Ala Gln Glu Lys Thr Asn Leu Glu Val Ile Ile Leu Val Gly
        755                 760                 765

Thr Ala Val Ile Ala Met Phe Phe Trp Leu Leu Leu Val Ile Val Leu
    770                 775                 780

Arg Thr Val Lys Arg Ala Asn Glu Gly Glu Leu Lys Thr Gly Tyr Leu
785                 790                 795                 800

Ser Ile Val Met Asp Pro Asp Glu Leu Pro Leu Asp Glu Arg Cys Glu
                805                 810                 815

Arg Leu Pro Tyr Asp Ala Ser Lys Trp Glu Phe Pro Arg Asp Arg Leu
            820                 825                 830

Lys Leu Gly Lys Pro Leu Gly Arg Gly Ala Phe Gly Gln Val Ile Glu
        835                 840                 845

Ala Asp Ala Phe Gly Ile Asp Lys Thr Ala Thr Cys Lys Thr Val Ala
    850                 855                 860

Val Lys Met Leu Lys Glu Gly Ala Thr His Ser Glu His Arg Ala Leu
865                 870                 875                 880

Met Ser Glu Leu Lys Ile Leu Ile His Ile Gly His His Leu Asn Val
                885                 890                 895

Val Asn Leu Leu Gly Ala Cys Thr Lys Pro Gly Gly Pro Leu Met Val
            900                 905                 910

Ile Val Glu Phe Cys Lys Phe Gly Asn Leu Ser Thr Tyr Leu Arg Gly
        915                 920                 925

Lys Arg Asn Glu Phe Val Pro Tyr Lys Ser Lys Gly Ala Arg Phe Arg
    930                 935                 940

Gln Gly Lys Asp Tyr Val Gly Glu Leu Ser Val Asp Leu Lys Arg Arg
945                 950                 955                 960

Leu Asp Ser Ile Thr Ser Ser Gln Ser Ser Ala Ser Ser Gly Phe Val
                965                 970                 975

Glu Glu Lys Ser Leu Ser Asp Val Glu Glu Glu Glu Ala Ser Glu Glu
            980                 985                 990
```

```
Leu Tyr Lys Asp Phe Leu Thr Leu  Glu His Leu Ile Cys  Tyr Ser Phe
       995                 1000                1005

Gln Val  Ala Lys Gly Met Glu  Phe Leu Ala Ser Arg  Lys Cys Ile
    1010                1015                1020

His Arg  Asp Leu Ala Ala Arg  Asn Ile Leu Leu Ser  Glu Lys Asn
    1025                1030                1035

Val Val  Lys Ile Cys Asp Phe  Gly Leu Ala Arg Asp  Ile Tyr Lys
    1040                1045                1050

Asp Pro  Asp Tyr Val Arg Lys  Gly Asp Ala Arg Leu  Pro Leu Lys
    1055                1060                1065

Trp Met  Ala Pro Glu Thr Ile  Phe Asp Arg Val Tyr  Thr Ile Gln
    1070                1075                1080

Ser Asp  Val Trp Ser Phe Gly  Val Leu Leu Trp Glu  Ile Phe Ser
    1085                1090                1095

Leu Gly  Ala Ser Pro Tyr Pro  Gly Val Lys Ile Asp  Glu Glu Phe
    1100                1105                1110

Cys Arg  Arg Leu Lys Glu Gly  Thr Arg Met Arg Ala  Pro Asp Tyr
    1115                1120                1125

Thr Thr  Pro Glu Met Tyr Gln  Thr Met Leu Asp Cys  Trp His Glu
    1130                1135                1140

Asp Pro  Asn Gln Arg Pro Ser  Phe Ser Glu Leu Val  Glu His Leu
    1145                1150                1155

Gly Asn  Leu Leu Gln Ala Asn  Ala Gln Gln Asp Gly  Lys Asp Tyr
    1160                1165                1170

Ile Val  Leu Pro Met Ser Glu  Thr Leu Ser Met Glu  Glu Asp Ser
    1175                1180                1185

Gly Leu  Ser Leu Pro Thr Ser  Pro Val Ser Cys Met  Glu Glu Glu
    1190                1195                1200

Glu Val  Cys Asp Pro Lys Phe  His Tyr Asp Asn Thr  Ala Gly Ile
    1205                1210                1215

Ser His  Tyr Leu Gln Asn Ser  Lys Arg Lys Ser Arg  Pro Val Ser
    1220                1225                1230
```

Val Lys Thr Phe Glu Asp Ile Pro Leu Glu Glu Pro Glu Val Lys
1235 1240 1245

Val Ile Pro Asp Asp Ser Gln Thr Asp Ser Gly Met Val Leu Ala
1250 1255 1260

Ser Glu Glu Leu Lys Thr Leu Glu Asp Arg Asn Lys Leu Ser Pro
1265 1270 1275

Ser Phe Gly Gly Met Met Pro Ser Lys Ser Arg Glu Ser Val Ala
1280 1285 1290

Ser Glu Gly Ser Asn Gln Thr Ser Gly Tyr Gln Ser Gly Tyr His
1295 1300 1305

Ser Asp Asp Thr Asp Thr Thr Val Tyr Ser Ser Asp Glu Ala Gly
1310 1315 1320

Leu Leu Lys Met Val Asp Ala Ala Val His Ala Asp Ser Gly Thr
1325 1330 1335

Thr Leu Arg Ser Pro Pro Val
1340 1345

<210> 5
<211> 210
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Fragmento de proteína VEGFR2

<400> 5
Arg Asp Ser Glu Glu Arg Val Leu Val Thr Glu Cys Gly Gly Gly Asp
1 5 10 15

Ser Ile Phe Cys Lys Thr Leu Thr Ile Pro Arg Val Val Gly Asn Asp
20 25 30

Thr Gly Ala Tyr Lys Cys Ser Tyr Arg Asp Val Asp Ile Ala Ser Thr
35 40 45

Val Tyr Val Tyr Val Arg Asp Tyr Arg Ser Pro Phe Ile Ala Ser Val
50 55 60

Ser Asp Gln His Gly Ile Val Tyr Ile Thr Glu Asn Lys Asn Lys Thr
65 70 75 80

Val Val Ile Pro Cys Arg Gly Ser Ile Ser Asn Leu Asn Val Ser Leu
85 90 95

Cys Ala Arg Tyr Pro Glu Lys Arg Phe Val Pro Asp Gly Asn Arg Ile
100 105 110

Ser Trp Asp Ser Glu Ile Gly Phe Thr Leu Pro Ser Tyr Met Ile Ser
115 120 125

Tyr Ala Gly Met Val Phe Cys Glu Ala Lys Ile Asn Asp Glu Thr Tyr
130 135 140

Gln Ser Ile Met Tyr Ile Val Val Val Val Gly Tyr Arg Ile Tyr Asp
145 150 155 160

Val Ile Leu Ser Pro Pro His Glu Ile Glu Leu Ser Ala Gly Glu Lys
165 170 175

Leu Val Leu Asn Cys Thr Ala Arg Thr Glu Leu Asn Val Gly Leu Asp
180 185 190

Phe Thr Trp His Ser Pro Pro Ser Lys Ser His His Lys Lys Ile Val
195 200 205

Asn Arg
210

<210> 6
<211> 186
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Fragmento de proteína VEGFR2

<400> 6
Val Ile Arg Gly Pro Glu Ile Thr Val Gln Pro Ala Ala Gln Pro Thr
1 5 10 15

Glu Gln Glu Ser Val Ser Leu Leu Cys Thr Ala Asp Arg Asn Thr Phe
20 25 30

Glu Asn Leu Thr Trp Tyr Lys Leu Gly Ser Gln Ala Thr Ser Val His
35 40 45

Met Gly Glu Ser Leu Thr Pro Val Cys Lys Asn Leu Asp Ala Leu Trp
50 55 60

Lys Leu Asn Gly Thr Met Phe Ser Asn Ser Thr Asn Asp Ile Leu Ile
65 70 75 80

Val Ala Phe Gln Asn Ala Ser Leu Gln Asp Gln Gly Asp Tyr Val Cys
85 90 95

Ser Ala Gln Asp Lys Lys Thr Lys Lys Arg His Cys Leu Val Lys Gln
100 105 110

Leu Ile Ile Leu Glu Arg Met Ala Pro Met Ile Thr Gly Asn Leu Glu
115 120 125

Asn Gln Thr Thr Thr Ile Gly Glu Thr Ile Glu Val Thr Cys Pro Ala
130 135 140

Ser Gly Asn Pro Thr Pro His Ile Thr Trp Phe Lys Asp Asn Glu Thr
145 150 155 160

Leu Val Glu Asp Ser Gly Ile Val Leu Arg Asp Gly Asn Arg Asn Leu
165 170 175

Thr Ile Arg Arg Val Arg Lys Glu Asp Gly
180 185

<210> 7
<211> 290
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Fragmento de proteína VEGFR2

<400> 7
Glu Gly Glu Leu Lys Thr Gly Tyr Leu Ser Ile Val Met Asp Pro Asp
1 5 10 15

Glu Leu Pro Leu Asp Glu Arg Cys Glu Arg Leu Pro Tyr Asp Ala Ser
20 25 30

Lys Trp Glu Phe Pro Arg Asp Arg Leu Lys Leu Gly Lys Pro Leu Gly
35 40 45

Arg Gly Ala Phe Gly Gln Val Ile Glu Ala Asp Ala Phe Gly Ile Asp
50 55 60

Lys Thr Ala Thr Cys Lys Thr Val Ala Val Lys Met Leu Lys Glu Gly
65 70 75 80

Ala Thr His Ser Glu His Arg Ala Leu Met Ser Glu Leu Lys Ile Leu

85 90 95

Ile His Ile Gly His His Leu Asn Val Val Asn Leu Leu Gly Ala Cys
100 105 110

Thr Lys Pro Gly Gly Pro Leu Met Val Ile Val Glu Phe Cys Lys Phe
115 120 125

Gly Asn Leu Ser Thr Tyr Leu Arg Gly Lys Arg Asn Glu Phe Val Pro
130 135 140

Tyr Lys Ser Lys Gly Ala Arg Phe Arg Gln Gly Lys Asp Tyr Val Gly
145 150 155 160

Glu Leu Ser Val Asp Leu Lys Arg Arg Leu Asp Ser Ile Thr Ser Ser
165 170 175

Gln Ser Ser Ala Ser Ser Gly Phe Val Glu Glu Lys Ser Leu Ser Asp
180 185 190

Val Glu Glu Glu Glu Ala Ser Glu Glu Leu Tyr Lys Asp Phe Leu Thr
195 200 205

Leu Glu His Leu Ile Cys Tyr Ser Phe Gln Val Ala Lys Gly Met Glu
210 215 220

Phe Leu Ala Ser Arg Lys Cys Ile His Arg Asp Leu Ala Ala Arg Asn
225 230 235 240

Ile Leu Leu Ser Glu Lys Asn Val Val Lys Ile Cys Asp Phe Gly Leu
245 250 255

Ala Arg Asp Ile Tyr Lys Asp Pro Asp Tyr Val Arg Lys Gly Asp Ala
260 265 270

Arg Leu Pro Leu Lys Trp Met Ala Pro Glu Thr Ile Phe Asp Arg Val
275 280 285

Tyr Thr
290

<210> 8
<211> 529
<212> PRT
<213> Listeria monocytogenes

<400> 8
Met Lys Lys Ile Met Leu Val Phe Ile Thr Leu Ile Leu Val Ser Leu

```
1               5                   10                  15

Pro Ile Ala Gln Gln Thr Glu Ala Lys Asp Ala Ser Ala Phe Asn Lys
            20                  25                  30

Glu Asn Ser Ile Ser Ser Met Ala Pro Pro Ala Ser Pro Pro Ala Ser
        35                  40                  45

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ile Ile Lys Asn Ser Ser Phe Lys Ala Val Ile Tyr Gly Gly Ser Ala
340 345 350

Lys Asp Glu Val Gln Ile Ile Asp Gly Asn Leu Gly Asp Leu Arg Asp
355 360 365

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Glu

<210> 9

<211> 441
<212> PRT
<213> Listeria monocytogenes

<400> 9

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

Pro Ile Ala Gln Gln Thr Glu Ala Lys Asp Ala Ser Ala Phe Asn Lys
            20                  25                  30

Glu Asn Ser Ile Ser Ser Val Ala Pro Pro Ala Ser Pro Pro Ala Ser
        35                  40                  45

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ile Ile Lys Asn Ser Ser Phe Lys Ala Val Ile Tyr Gly Gly Ser Ala
            340                 345                 350

Lys Asp Glu Val Gln Ile Ile Asp Gly Asn Leu Gly Asp Leu Arg Asp
        355                 360                 365

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

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

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

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

Ile Ser Trp Asp Glu Val Asn Tyr Asp
        435                 440
```

<210> 10
<211> 416
<212> PRT
<213> Listeria monocytogenes

<400> 10

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

Pro Ile Ala Gln Gln Thr Glu Ala Lys Asp Ala Ser Ala Phe Asn Lys
            20                  25                  30

Glu Asn Ser Ile Ser Ser Val Ala Pro Pro Ala Ser Pro Pro Ala Ser
        35                  40                  45

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ile Ile Lys Asn Ser Ser Phe Lys Ala Val Ile Tyr Gly Gly Ser Ala
340 345 350

Lys Asp Glu Val Gln Ile Ile Asp Gly Asn Leu Gly Asp Leu Arg Asp
355 360 365

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

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

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

<210> 11
<211> 390
<212> PRT
<213> Listeria monocytogenes

<400> 11
Met Arg Ala Met Met Val Val Phe Ile Thr Ala Asn Cys Ile Thr Ile
1 5 10 15

Asn Pro Asp Ile Ile Phe Ala Ala Thr Asp Ser Glu Asp Ser Ser Leu
20 25 30

```
Asn Thr Asp Glu Trp Glu Glu Glu Lys Thr Glu Glu Gln Pro Ser Glu
        35                  40                  45

Val Asn Thr Gly Pro Arg Tyr Glu Thr Ala Arg Glu Val Ser Ser Arg
    50                  55                  60

Asp Ile Lys Glu Leu Glu Lys Ser Asn Lys Val Arg Asn Thr Asn Lys
65                  70                  75                  80

Ala Asp Leu Ile Ala Met Leu Lys Glu Lys Ala Glu Lys Gly Pro Asn
                85                  90                  95

Ile Asn Asn Asn Asn Ser Glu Gln Thr Glu Asn Ala Ala Ile Asn Glu
            100                 105                 110

Glu Ala Ser Gly Ala Asp Arg Pro Ala Ile Gln Val Glu Arg Arg His
        115                 120                 125

Pro Gly Leu Pro Ser Asp Ser Ala Ala Glu Ile Lys Lys Arg Arg Lys
    130                 135                 140

Ala Ile Ala Ser Ser Asp Ser Glu Leu Glu Ser Leu Thr Tyr Pro Asp
145                 150                 155                 160

Lys Pro Thr Lys Val Asn Lys Lys Lys Val Ala Lys Glu Ser Val Ala
                165                 170                 175

Asp Ala Ser Glu Ser Asp Leu Asp Ser Ser Met Gln Ser Ala Asp Glu
            180                 185                 190

Ser Ser Pro Gln Pro Leu Lys Ala Asn Gln Gln Pro Phe Phe Pro Lys
        195                 200                 205

Val Phe Lys Lys Ile Lys Asp Ala Gly Lys Trp Val Arg Asp Lys Ile
    210                 215                 220

Asp Glu Asn Pro Glu Val Lys Lys Ala Ile Val Asp Lys Ser Ala Gly
225                 230                 235                 240

Leu Ile Asp Gln Leu Leu Thr Lys Lys Lys Ser Glu Glu Val Asn Ala
                245                 250                 255

Ser Asp Phe Pro Pro Pro Pro Thr Asp Glu Glu Leu Arg Leu Ala Leu
            260                 265                 270

Pro Glu Thr Pro Met Leu Leu Gly Phe Asn Ala Pro Ala Thr Ser Glu
```

275 280 285

Pro Ser Ser Phe Glu Phe Pro Pro Pro Pro Thr Asp Glu Glu Leu Arg
290 295 300

Leu Ala Leu Pro Glu Thr Pro Met Leu Leu Gly Phe Asn Ala Pro Ala
305 310 315 320

Thr Ser Glu Pro Ser Ser Phe Glu Phe Pro Pro Pro Pro Thr Glu Asp
325 330 335

Glu Leu Glu Ile Ile Arg Glu Thr Ala Ser Ser Leu Asp Ser Ser Phe
340 345 350

Thr Arg Gly Asp Leu Ala Ser Leu Arg Asn Ala Ile Asn Arg His Ser
355 360 365

Gln Asn Phe Ser Asp Phe Pro Pro Ile Pro Thr Glu Glu Glu Leu Asn
370 375 380

Gly Arg Gly Gly Arg Pro
385 390

<210> 12
<211> 1170
<212> ADN
<213> Listeria monocytogenes

<400> 12
atgcgtgcga tgatggtggt tttcattact gccaattgca ttacgattaa ccccgacata 60

atatttgcag cgacagatag cgaagattct agtctaaaca cagatgaatg ggaagaagaa 120

aaaacagaag agcaaccaag cgaggtaaat acgggaccaa gatacgaaac tgcacgtgaa 180

gtaagttcac gtgatattaa agaactagaa aaatcgaata aagtgagaaa tacgaacaaa 240

gcagacctaa tagcaatgtt gaaagaaaaa gcagaaaaag gtccaaatat caataataac 300

aacagtgaac aaactgagaa tgcggctata aatgaagagg cttcaggagc cgaccgacca 360

gctatacaag tggagcgtcg tcatccagga ttgccatcgg atagcgcagc ggaaattaaa 420

aaaagaagga aagccatagc atcatcggat agtgagcttg aaagccttac ttatccggat 480

aaaccaacaa aagtaaataa gaaaaaagtg gcgaaagagt cagttgcgga tgcttctgaa 540

agtgacttag attctagcat gcagtcagca gatgagtctt caccacaacc tttaaaagca 600

aaccaacaac catttttccc taaagtattt aaaaaaataa aagatgcggg gaaatgggta 660

cgtgataaaa tcgacgaaaa tcctgaagta aagaaagcga ttgttgataa aagtgcaggg 720

ttaattgacc aattattaac caaaaagaaa agtgaagagg taaatgcttc ggacttcccg 780

ccaccaccta cggatgaaga gttaagactt gctttgccag agacaccaat gcttcttggt 840

tttaatgctc ctgctacatc agaaccgagc tcattcgaat ttccaccacc acctacggat 900

gaagagttaa gacttgcttt gccagagacg ccaatgcttc ttggttttaa tgctcctgct 960

acatcggaac cgagctcgtt cgaatttcca ccgcctccaa cagaagatga actagaaatc 1020

atccgggaaa cagcatcctc gctagattct agttttacaa gaggggattt agctagtttg 1080

agaaatgcta ttaatcgcca tagtcaaaat ttctctgatt tcccaccaat cccaacagaa 1140

gaagagttga acgggagagg cggtagacca 1170

<210> 13
<211> 32
<212> PRT
<213> Listeria monocytogenes

<400> 13
Lys Glu Asn Ser Ile Ser Ser Met Ala Pro Pro Ala Ser Pro Pro Ala
1 5 10 15

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

<210> 14
<211> 19
<212> PRT
<213> Listeria monocytogenes

<400> 14
Lys Glu Asn Ser Ile Ser Ser Met Ala Pro Pro Ala Ser Pro Pro Ala
1 5 10 15

Ser Pro Lys

<210> 15
<211> 14
<212> PRT
<213> Listeria monocytogenes

<400> 15
Lys Thr Glu Glu Gln Pro Ser Glu Val Asn Thr Gly Pro Arg
1 5 10

<210> 16
<211> 28
<212> PRT
<213> Listeria monocytogenes

<400> 16
Lys Ala Ser Val Thr Asp Thr Ser Glu Gly Asp Leu Asp Ser Ser Met
1 5 10 15

Gln Ser Ala Asp Glu Ser Thr Pro Gln Pro Leu Lys
20 25

<210> 17
<211> 20
<212> PRT

<213> Listeria monocytogenes

<400> 17
Lys Asn Glu Glu Val Asn Ala Ser Asp Phe Pro Pro Pro Pro Thr Asp
1 5 10 15

Glu Glu Leu Arg
20

<210> 18
<211> 33
<212> PRT
<213> Listeria monocytogenes

<400> 18
Arg Gly Gly Ile Pro Thr Ser Glu Glu Phe Ser Ser Leu Asn Ser Gly
1 5 10 15

Asp Phe Thr Asp Asp Glu Asn Ser Glu Thr Thr Glu Glu Glu Ile Asp
20 25 30

Arg

<210> 19
<211> 28
<212> PRT
<213> Listeria monocytogenes

<400> 19
Lys Glu Ser Val Val Asp Ala Ser Glu Ser Asp Leu Asp Ser Ser Met
1 5 10 15

Gln Ser Ala Asp Glu Ser Thr Pro Gln Pro Leu Lys
20 25

<210> 20
<211> 20
<212> PRT
<213> Listeria monocytogenes

<400> 20

Lys Ser Glu Glu Val Asn Ala Ser Asp Phe Pro Pro Pro Pro Thr Asp
1 5 10 15

Glu Glu Leu Arg
20

<210> 21
<211> 33
<212> PRT
<213> Listeria monocytogenes

<400> 21

Arg Gly Gly Arg Pro Thr Ser Glu Glu Phe Ser Ser Leu Asn Ser Gly
1 5 10 15

Asp Phe Thr Asp Asp Glu Asn Ser Glu Thr Thr Glu Glu Glu Ile Asp
20 25 30

Arg

<210> 22
<211> 19
<212> PRT
<213> Listeria monocytogenes

<400> 22
Arg Ser Glu Val Thr Ile Ser Pro Ala Glu Thr Pro Glu Ser Pro Pro
1 5 10 15

Ala Thr Pro

<210> 23
<211> 17
<212> PRT
<213> Streptococcus pyogenes

<400> 23
Lys Gln Asn Thr Ala Ser Thr Glu Thr Thr Thr Thr Asn Glu Gln Pro
1 5 10 15

Lys

<210> 24
<211> 17
<212> PRT
<213> Streptococcus equisimilis

<400> 24
Lys Gln Asn Thr Ala Asn Thr Glu Thr Thr Thr Thr Asn Glu Gln Pro
1 5 10 15

Lys

<210> 25
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Her-2/neu EC1

<400> 25
Ala Ser Pro Glu Thr His Leu Asp Met Leu
1 5 10

<210> 26
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> her-2/neu EC2

<400> 26
Pro Asp Ser Leu Arg Asp Leu Ser Val Phe
1 5 10

<210> 27
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> her-2/neu IC1

<400> 27
Gly Ser Gly Ala Phe Gly Thr Val Tyr Lys
1 5 10

<210> 28
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Flk-E1

<400> 28
Thr Tyr Gln Ser Ile Met Tyr Ile Val
1 5

<210> 29
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Flk-E2

<400> 29
Met Phe Ser Asn Ser Thr Asn Asp Ile
1 5

<210> 30
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> FLK-I1 906-915

<400> 30
Pro Gly Gly Pro Leu Met Val Ile Val
1 5

<210> 31
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Flk-I1 839-848

<400> 31
Gly Arg Gly Ala Phe Gly Gln Val Ile
1 5

<210> 32
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Her2-pEC1 302-310

<400> 32
Pro Tyr Asn Tyr Leu Ser Thr Glu Val
1 5

<210> 33
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Her2-pEC2 420-429

<400> 33
Pro Asp Ser Leu Arg Asp Leu Ser Val Phe
1 5 10

<210> 34
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Her2-pIC1 732-741

<400> 34
Gly Ser Gly Ala Phe Gly Thr Val Tyr Lys
1 5 10

<210> 35
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> HIV-pGag

<400> 35
Ala Met Gln Met Leu Lys Glu Thr Ile
1 5

<210> 36
<211> 32
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador Flk-E1 (F)

<400> 36
gggctcgagc gtgattctga ggaaagggta tt 32

<210> 37
<211> 33
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Flk-E1 (R)

<400> 37
gggactagtt tacccggttt acaatcttct tat 33

<210> 38
<211> 31
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Flk-E2 (F)

<400> 38
gggctcgagg tgatcagggg tcctgaaatt a 31

<210> 39
<211> 30
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Flk-E2 (R)

<400> 39
gggactagtt tagcctccat cctccttcct 30

<210> 40
<211> 30
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Flk-I1 (F)

<400> 40
gggctcgagg aaggggaact gaagacagcc 30

<210> 41
<211> 39
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Flk-I1 (R)

<400> 41
gggactagtt tatgtgtata ctctgtcaaa aatggtttc 39

<210> 42
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> FLK-I1 839-848

<400> 42
Gly Ser Gly Ala Phe Gly Thr Val Tyr Lys
1 5 10

<210> 43
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> epítopo Flk-I1

<400> 43
Pro Gly Gly Pro Leu Met Val Ile Val
1 5

<210> 44
<211> 18
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> EC1FP FP = cebador inverso RP = cebador inverso

<400> 44
Ala Gly Gly Gly Cys Thr Gly Thr Cys Ala Gly Gly Thr Ala Gly Thr
1 5 10 15

Gly Cys

<210> 45
<211> 18
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> EC1RP

<400> 45
Thr Gly Ala Cys Cys Thr Cys Thr Thr Gly Gly Thr Thr Ala Thr Thr
1 5 10 15

Cys Gly

<210> 46
<211> 18
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> EC2FP

<400> 46
Ala Cys Cys Thr Gly Cys Cys Cys Cys Thr Ala Cys Ala Ala Cys Thr
1 5 10 15

Ala Cys

<210> 47
<211> 18
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>

<400> 47
Gly Ala Cys Gly Cys Cys Cys Thr Cys Thr Ala Cys Ala Gly Thr Thr
1 5 10 15

Gly Cys

<210> 48
<211> 18
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> EC2 RP

<400> 48
Gly Thr Gly Gly Ala Thr Thr Gly Gly Cys Thr Cys Thr Gly Ala Thr
1 5 10 15

Thr Cys

<210> 49
<211> 18
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> EC3RP

<400> 49
Thr Gly Ala Gly Thr Thr Ala Cys Ala Gly Ala Cys Cys Ala Ala Gly
1 5 10 15

Cys Cys

<210> 50
<211> 19
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> IC1FP

<400> 50
Cys Ala Ala Ala Cys Gly Ala Ala Gly Gly Ala Gly Ala Cys Ala Gly
1 5 10 15

Ala Ala Gly

<210> 51
<211> 18
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> IC1 RP

<400> 51
Cys Ala Cys Cys Ala Thr Cys Ala Ala Ala Cys Ala Cys Ala Thr Cys
1 5 10 15

Gly Gly

<210> 52
<211> 18
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> IC2 FP

<400> 52
Cys Ala Cys Thr Gly Cys Thr Gly Gly Ala Ala Gly Ala Thr Gly Ala
1 5 10 15

Thr Gly

<210> 53
<211> 18
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> IC2 RP

<400> 53
Thr Thr Thr Gly Thr Gly Gly Cys Gly Ala Thr Gly Gly Ala Gly Ala
1 5 10 15

Cys Cys

<210> 54
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> fragmento VEGFR2

<400> 54

Ile Ile Leu Val Gly Thr Ala Val Ile
1 5

<210> 55
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> fragmento VEGFR2

<400> 55
Leu Leu Val Ile Ile Leu Arg Thr Val
1 5

<210> 56
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> fragmento VEGFR2

<400> 56
Ile Leu Leu Ser Glu Lys Asn Val Val
1 5

<210> 57
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> fragmento VEGFR2

<400> 57
Thr Ile Phe Asp Arg Val Tyr Thr Ile
1 5

<210> 58
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> fragmento VEGFR2

<400> 58
Val Leu Leu Trp Glu Ile Phe Ser Leu
1 5

<210> 59
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> péptido CD105A

<400> 59

Ala Gly Pro Arg Thr Val Thr Val Met
1 5

<210> 60
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> péptido Cd105B

<400> 60
Ala Tyr Ser Ser Cys Gly Met Lys Val
1 5

<210> 61
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> péptido AH1

<400> 61
Ser Pro Ser Tyr Val Tyr His Gln Phe
1 5

<210> 62
<211> 654
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 62
Met Asp Arg Gly Val Leu Pro Leu Pro Ile Thr Leu Leu Leu Phe Glu
1 5 10 15

```
Ile Tyr Ser Phe Glu Pro Thr Thr Gly Leu Ala Glu Arg Val Gly Cys
            20                  25                  30

Asp Leu Gln Pro Val Asp Pro Thr Arg Gly Glu Val Thr Phe Thr Thr
        35                  40                  45

Ser Gln Val Ser Glu Gly Cys Val Ala Gln Ala Ala Asn Ala Val Arg
    50                  55                  60

Glu Val His Val Leu Phe Leu Asp Phe Pro Gly Met Leu Ser His Leu
65                  70                  75                  80

Glu Leu Thr Leu Gln Ala Ser Lys Gln Asn Gly Thr Glu Thr Arg Glu
                85                  90                  95

Val Phe Leu Val Leu Val Ser Asn Lys Asn Val Phe Val Lys Phe Gln
            100                 105                 110

Ala Pro Glu Ile Pro Leu His Leu Ala Tyr Asp Ser Ser Leu Val Ile
        115                 120                 125

Phe Gln Gly Gln Pro Arg Val Asn Ile Thr Val Leu Pro Ser Leu Thr
    130                 135                 140

Ser Arg Lys Gln Ile Leu Asp Trp Ala Ala Thr Lys Gly Ala Ile Thr
145                 150                 155                 160

Ser Ile Ala Ala Leu Asp Asp Pro Gln Ser Ile Val Leu Gln Leu Gly
                165                 170                 175

Gln Asp Pro Lys Ala Pro Phe Leu Cys Leu Pro Glu Ala His Lys Asp
            180                 185                 190

Met Gly Ala Thr Leu Glu Trp Gln Pro Arg Ala Gln Thr Pro Val Gln
        195                 200                 205

Ser Cys Arg Leu Glu Gly Val Ser Gly His Lys Glu Ala Tyr Ile Leu
    210                 215                 220

Arg Ile Leu Pro Gly Ser Glu Ala Gly Pro Arg Thr Val Thr Val Met
225                 230                 235                 240

Met Glu Leu Ser Cys Thr Ser Gly Asp Ala Ile Leu Ile Leu His Gly
                245                 250                 255

Pro Pro Tyr Val Ser Trp Phe Ile Asp Ile Asn His Ser Met Gln Ile
            260                 265                 270
```

```
Leu Thr Thr Gly Glu Tyr Ser Val Lys Ile Phe Pro Gly Ser Lys Val
        275                 280                 285

Lys Gly Val Glu Leu Pro Asp Thr Pro Gln Gly Leu Ile Ala Glu Ala
    290                 295                 300

Arg Lys Leu Asn Ala Ser Ile Val Thr Ser Phe Val Glu Leu Pro Leu
305                 310                 315                 320

Val Ser Asn Val Ser Leu Arg Ala Ser Ser Cys Gly Gly Val Phe Gln
                325                 330                 335

Thr Thr Pro Ala Pro Val Val Thr Thr Pro Pro Lys Asp Thr Cys Ser
            340                 345                 350

Pro Val Leu Leu Met Ser Leu Ile Gln Pro Lys Cys Gly Asn Gln Val
        355                 360                 365

Met Thr Leu Ala Leu Asn Lys Lys His Val Gln Thr Leu Gln Cys Thr
    370                 375                 380

Ile Thr Gly Leu Thr Phe Trp Asp Ser Ser Cys Gln Ala Glu Asp Thr
385                 390                 395                 400

Asp Asp His Leu Val Leu Ser Ser Ala Tyr Ser Ser Cys Gly Met Lys
                405                 410                 415

Val Thr Ala His Val Val Ser Asn Glu Val Ile Ile Ser Phe Pro Ser
            420                 425                 430

Gly Ser Pro Pro Leu Arg Lys Lys Val Gln Cys Ile Asp Met Asp Ser
        435                 440                 445

Leu Ser Phe Gln Leu Gly Leu Tyr Leu Ser Pro His Phe Leu Gln Ala
    450                 455                 460

Ser Asn Thr Ile Glu Leu Gly Gln Gln Ala Phe Val Gln Val Ser Val
465                 470                 475                 480

Ser Pro Leu Thr Ser Glu Val Thr Val Gln Leu Asp Ser Cys His Leu
                485                 490                 495

Asp Leu Gly Pro Glu Gly Asp Met Val Glu Leu Ile Gln Ser Arg Thr
            500                 505                 510

Ala Lys Gly Ser Cys Val Thr Leu Leu Ser Pro Ser Pro Glu Gly Asp
        515                 520                 525
```

Pro Arg Phe Ser Phe Leu Leu Arg Val Tyr Met Val Pro Thr Pro Thr
530 535 540

Ala Gly Thr Leu Ser Cys Asn Leu Ala Leu Arg Pro Ser Thr Leu Ser
545 550 555 560

Gln Glu Val Tyr Lys Thr Val Ser Met Arg Leu Asn Val Val Ser Pro
565 570 575

Asp Leu Ser Gly Lys Gly Leu Val Leu Pro Ser Val Leu Gly Ile Thr
580 585 590

Phe Gly Ala Phe Leu Ile Gly Ala Leu Leu Thr Ala Ala Leu Trp Tyr
595 600 605

Ile Tyr Ser His Thr Arg Gly Pro Ser Lys Arg Glu Pro Val Val Ala
610 615 620

Val Ala Ala Pro Ala Ser Ser Glu Ser Ser Ser Thr Asn His Ser Ile
625 630 635 640

Gly Ser Thr Gln Ser Thr Pro Cys Ser Thr Ser Ser Met Ala
645 650

<210> 63
<211> 653
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 63
Met Asp Arg Gly Val Leu Pro Leu Pro Ile Thr Leu Leu Phe Val Ile
1 5 10 15

Tyr Ser Phe Val Pro Thr Thr Gly Leu Ala Glu Arg Val Gly Cys Asp
20 25 30

Leu Gln Pro Val Asp Pro Thr Arg Gly Glu Val Thr Phe Thr Thr Ser
35 40 45

Gln Val Ser Glu Gly Cys Val Ala Gln Ala Ala Asn Ala Val Arg Glu
50 55 60

Val His Val Leu Phe Leu Asp Phe Pro Gly Met Leu Ser His Leu Glu
65 70 75 80

Leu Thr Leu Gln Ala Ser Lys Gln Asn Gly Thr Glu Thr Arg Glu Val
85 90 95

```
Phe Leu Val Leu Val Ser Asn Lys Asn Val Phe Val Lys Phe Gln Ala
            100                 105                 110

Pro Glu Ile Pro Leu His Leu Ala Tyr Asp Ser Ser Leu Val Ile Phe
        115                 120                 125

Gln Gly Gln Pro Arg Val Asn Ile Thr Val Leu Pro Ser Leu Thr Ser
    130                 135                 140

Arg Lys Gln Ile Leu Asp Trp Ala Ala Thr Lys Gly Ala Ile Thr Ser
145                 150                 155                 160

Ile Ala Ala Leu Asp Asp Pro Gln Ser Ile Val Leu Gln Leu Gly Gln
                165                 170                 175

Asp Pro Lys Ala Pro Phe Leu Cys Leu Pro Glu Ala His Lys Asp Met
            180                 185                 190

Gly Ala Thr Leu Glu Trp Gln Pro Arg Ala Gln Thr Pro Val Gln Ser
        195                 200                 205

Cys Arg Leu Glu Gly Val Ser Gly His Lys Glu Ala Tyr Ile Leu Arg
    210                 215                 220

Ile Leu Pro Gly Ser Glu Ala Gly Pro Arg Thr Val Thr Val Met Met
225                 230                 235                 240

Glu Leu Ser Cys Thr Ser Gly Asp Ala Ile Leu Ile Leu His Gly Pro
                245                 250                 255

Pro Tyr Val Ser Trp Phe Ile Asp Ile Asn His Ser Met Gln Ile Leu
            260                 265                 270

Thr Thr Gly Glu Tyr Ser Val Lys Ile Phe Pro Gly Ser Lys Val Lys
        275                 280                 285

Gly Val Glu Leu Pro Asp Thr Pro Gln Gly Leu Ile Ala Glu Ala Arg
    290                 295                 300

Gln Leu Asn Ala Ser Ile Val Thr Ser Phe Val Glu Leu Pro Leu Val
305                 310                 315                 320

Ser Asn Val Ser Leu Arg Ala Ser Ser Cys Gly Gly Val Phe Gln Thr
                325                 330                 335

Thr Pro Ala Pro Val Val Thr Thr Pro Pro Lys Asp Thr Cys Ser Pro
```

```
            340                 345                 350

Val Leu Leu Met Ser Leu Ile Gln Pro Lys Cys Gly Asn Gln Val Met
        355                 360                 365

Thr Leu Ala Leu Asn Lys Lys His Val Gln Thr Leu Gln Cys Thr Ile
    370                 375                 380

Thr Gly Leu Thr Phe Trp Asp Ser Ser Cys Gln Ala Glu Asp Thr Asp
385                 390                 395                 400

Asp His Leu Val Leu Ser Ser Ala Tyr Ser Ser Cys Gly Met Lys Val
                405                 410                 415

Thr Ala His Val Val Ser Asn Glu Val Ile Ile Ser Phe Pro Ser Gly
            420                 425                 430

Ser Pro Pro Leu Arg Lys Lys Val Gln Cys Ile Asp Met Asp Ser Leu
        435                 440                 445

Ser Phe Gln Leu Gly Leu Tyr Leu Ser Pro His Phe Leu Gln Ala Ser
    450                 455                 460

Asn Thr Ile Glu Leu Gly Gln Gln Ala Phe Val Gln Val Ser Val Ser
465                 470                 475                 480

Pro Leu Thr Ser Glu Val Thr Val Gln Leu Asp Ser Cys His Leu Asp
                485                 490                 495

Leu Gly Pro Glu Gly Asp Met Val Glu Leu Ile Gln Ser Arg Thr Ala
            500                 505                 510

Lys Gly Ser Cys Val Thr Leu Leu Ser Pro Ser Pro Glu Gly Asp Pro
        515                 520                 525

Arg Phe Ser Phe Leu Leu Arg Val Tyr Met Val Pro Thr Pro Thr Ala
    530                 535                 540

Gly Thr Leu Ser Cys Asn Leu Ala Leu Arg Pro Ser Thr Leu Ser Gln
545                 550                 555                 560

Glu Val Tyr Lys Thr Val Ser Met Arg Leu Asn Val Val Ser Pro Asp
                565                 570                 575

Leu Ser Gly Lys Gly Leu Val Leu Pro Ser Val Leu Gly Ile Thr Phe
            580                 585                 590
```

```
Gly Ala Phe Leu Ile Gly Ala Leu Leu Thr Ala Ala Leu Trp Tyr Ile
        595                 600                 605

Tyr Ser His Thr Arg Gly Pro Ser Lys Arg Glu Pro Val Val Ala Val
    610                 615                 620

Ala Ala Pro Ala Ser Ser Glu Ser Ser Ser Thr Asn His Ser Ile Gly
625                 630                 635                 640

Ser Thr Gln Ser Thr Pro Cys Ser Thr Ser Ser Met Ala
                645                 650
```

REIVINDICACIONES

1. Una cepa de *Listeria* recombinante que expresa un factor angiogénico, en el que dicho factor angiogénico es un polipéptido receptor 2 del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFR2), en el que dicho polipéptido VEGFR2 es un fragmento de cinasa hepática fetal 1 (Flk-1)-E1 que comprende la SEQ ID NO: 5, o una secuencia que comparte más del 83 % de identidad con la misma, un fragmento Flk-1-I1 que comprende la SEQ ID NO: 7, o una secuencia que comparte más del 95 % de identidad con la misma, o una combinación de los mismos, en la que dicho factor angiogénico es una molécula implicada en la formación de nuevos vasos sanguíneos.

2. Una cepa de *Listeria* recombinante de acuerdo con la reivindicación 1, en la que dicho factor angiogénico se fusiona con un polipéptido adicional, en el que dicho polipéptido adicional es a) un LLO no hemolítico, b) un ActA N-terminal, o c) una secuencia PEST.

3. Una cepa de *Listeria* recombinante de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en la que dicho factor angiogénico se expresa a partir de un promotor *hly*, un promotor *prfA*, un promotor *actA*, o un promotor p60.

4. Una cepa de *Listeria* recombinante de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en la que dicho factor angiogénico se expresa a partir de un vector episomal o a partir del cromosoma de *Listeria*.

5. Una cepa de *Listeria* recombinante de acuerdo con la reivindicación 2, en la que dicho polipéptido adicional aumenta la inmunogenicidad de dicho factor angiogénico.

6. Una cepa de *Listeria* recombinante de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en la que dicha cepa de *Listeria* recombinante es una cepa recombinante de *Listeria monocytogenes*.

7. Una vacuna que comprende una cepa de *Listeria* recombinante de acuerdo con cualquier reivindicación anterior y un adyuvante.

8. Una cepa de *Listeria* recombinante de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, o una vacuna de acuerdo con la reivindicación 7, para su uso en el tratamiento, inhibición o supresión de un crecimiento tumoral o cáncer en un sujeto.

9. Una cepa de *Listeria* recombinante de acuerdo cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, o una vacuna de acuerdo con la reivindicación 7, para su uso en el direccionamiento de la vasculatura tumoral de un crecimiento tumoral o cáncer en un sujeto.

10. Una cepa de *Listeria* recombinante de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, o una vacuna de acuerdo con la reivindicación 7, para su uso en la prevención de la recidiva de un tumor o cáncer, o para su uso en la inhibición de metástasis de un tumor o cáncer en un sujeto.

11. Una cepa recombinante de *Listeria* o vacuna para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 8-10, en la que dicho tumor o cáncer es un tumor de mama o cáncer de mama, una metástasis cerebral o un tumor o cáncer que expresa Her-2/neu.

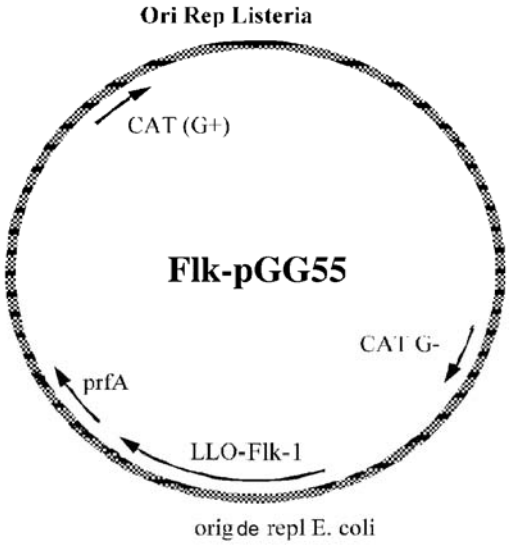


Figura 1A

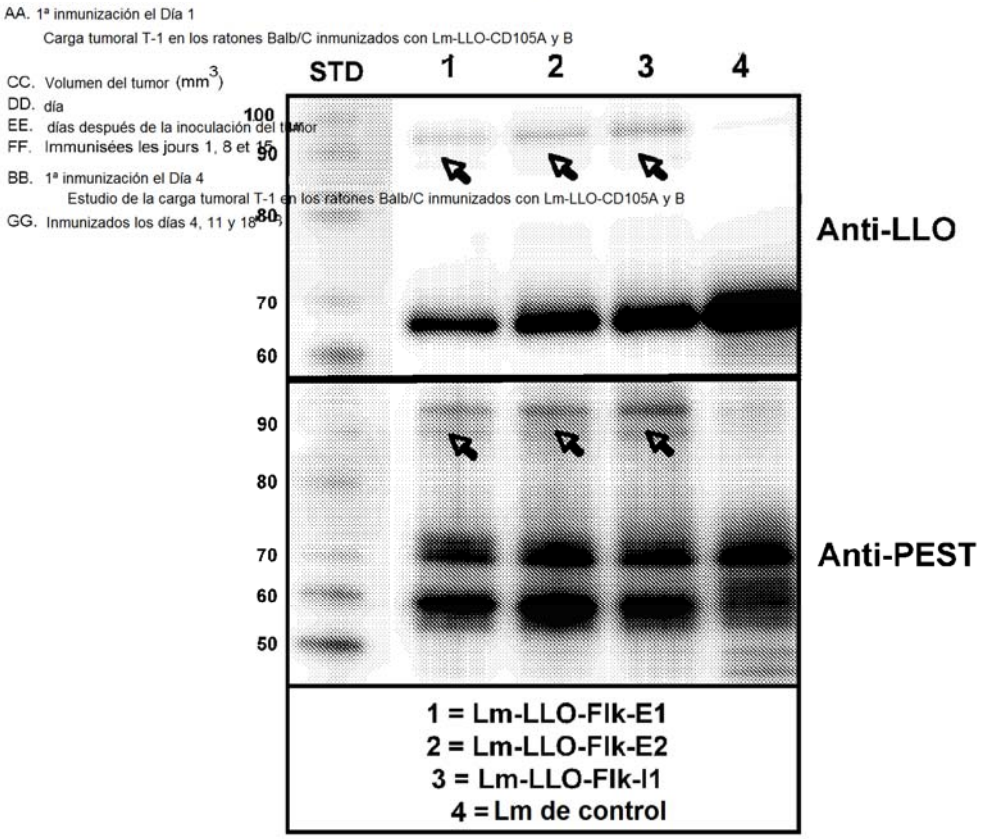


Figura 1B

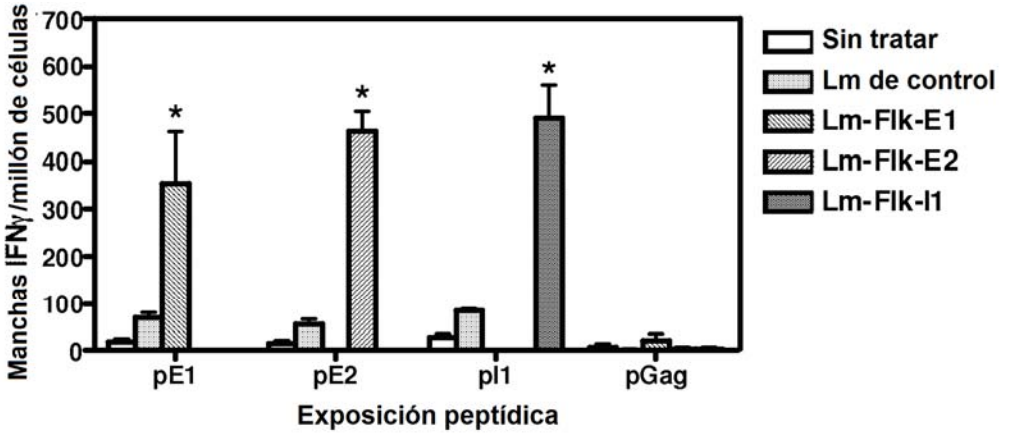


Figura 1C

MESKALLAVALWFCVETRAASVGLPGDFLHPPKLSTQKDILTILANTTLQITCRGQRDLDWLWPN
AQRDSEERVLVTECGGGDSIFCKTLTIPRVVGNDTGAYKCSYRDVDIASTVYVYVRDYRSPFIAS
VSDQHGIVYITENKNKTVVIPCRGSISNLNVSLCARYPEKRFVPDGNRISWDSEIGFTLPSYMISYA
GMVFCEAKINDETYQSIMYIVVVVGYRIYDVILSPPHEIELSAGEKLVLNCTARTELNVGLDFTWHS
PPSKSHHKKIVNRIDVKPFPGTVAKMFLSTLTIESVTKSDQGEYTCVASSGRMIKRNRTFVRVHTK
PFIAFGSGMKSLVEATVGSQVRIPVKYLSYPAPDIKWYRNGRPIESNYTMIVGDELTIMEVTERDA
GNYTVILTNPISMEKQSHMVSLVVNVPPQIGEKALISPMDSYQYGTMQTLTCTVYANPPLHHIQW
YWQLEEACSYRPGQTSPYACKEWRHVEDFQGGNKIEVTKNQYALIEGKNKTVSTLVIQAANVSA
LYKCEAINKAGRGERVISFHVIRGPEITVQPAAQPTEQESVSLLCTADRNTFENLTWYKLGSQATS
VHMGESLTPVCKNLDALWKLNGTMFSNSTNDILIVAFQNASLQDQGDYVCSAQDKKTKKRHCLV
KQLIILERMAPMITGNLENQTTTIGETIEVTCPASGNPTPHITWFKDNETLVEDSGIVLRDGNRNLTI
RRVRKEDGGLYTCQACNVLGCARAETLFIIEGAQEKTNLEVIILVGTAVIAMFFWLLLVIVLRTVKR
ANEGELKTGYLSIVMDPDELPLDERCERLPYDASKWEFPRDRLKLGKPLGRGAFGQVIEADAFGI
DKTATCKTVAVKMLKEGATHSEHRALMSELKILIHIGHHLNVVNLLGACTKPGGPLMVIVEFCKFG
NLSTYLRGKRNEFVPYKSKGARFRQGKDYVGELSVDLKRRLDSITSSQSSASSGFVEEKSLSDV
EEEEASEELYKDFLTLEHLICYSFQVAKGMEFLASRKCIHRDLAARNILLSEKNVVKICDFGLARDI
YKDPDYVRKGDARLPLKWMAPETIFDRVYTIQSDVWSFGVLLWEIFSLGASPYPGVKIDEEFCRR
LKEGTRMRAPDYTTPEMYQTMLDCWHEDPNQRPSFSELVEHLGNLLQANAQQDGKDYIVLPMS
ETLSMEEDSGLSLPTSPVSCMEEEEVCDPKFHYDNTAGISHYLQNSKRKSRPVSVKTFEDIPLEE
PEVKVIPDDSQTDSGMVLASEELKTLEDRNKLSPSFGGMMPSKSRESVASEGSNQTSGYQSGY
HSDDTDTTVYSSDEAGLLKMVDAAVHADSGTTLRSPPV

Flk-E1
Flk-E2
Flk-I1

Figura 2A

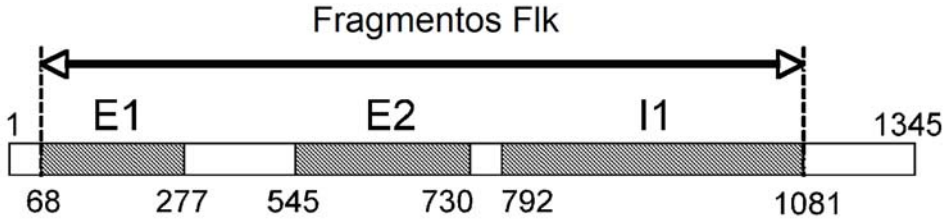


Figura 2B

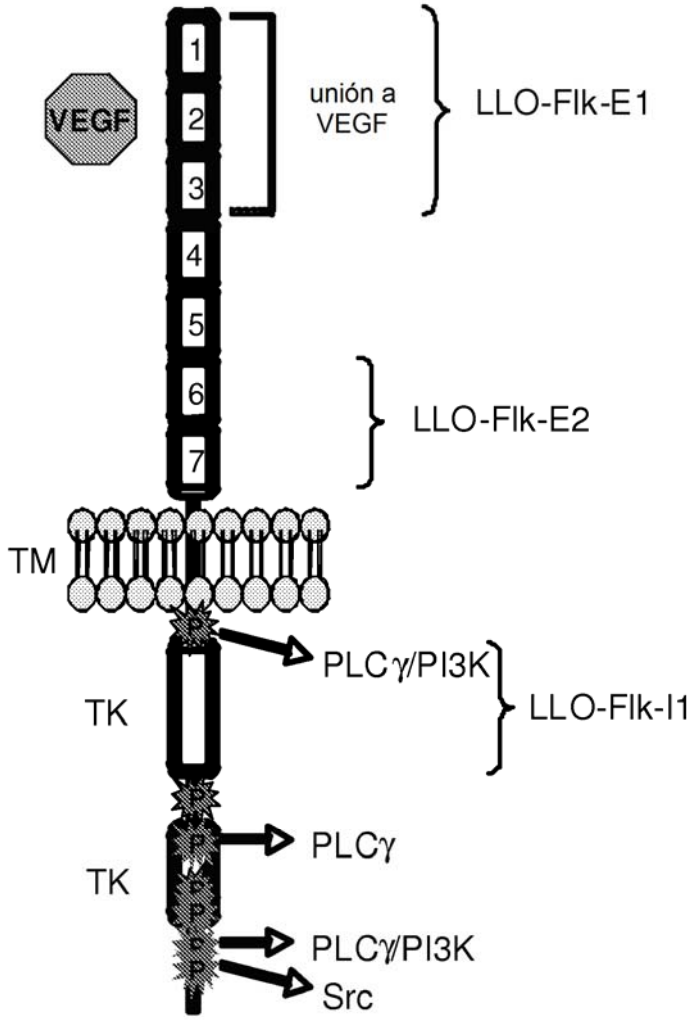


Figura 2C

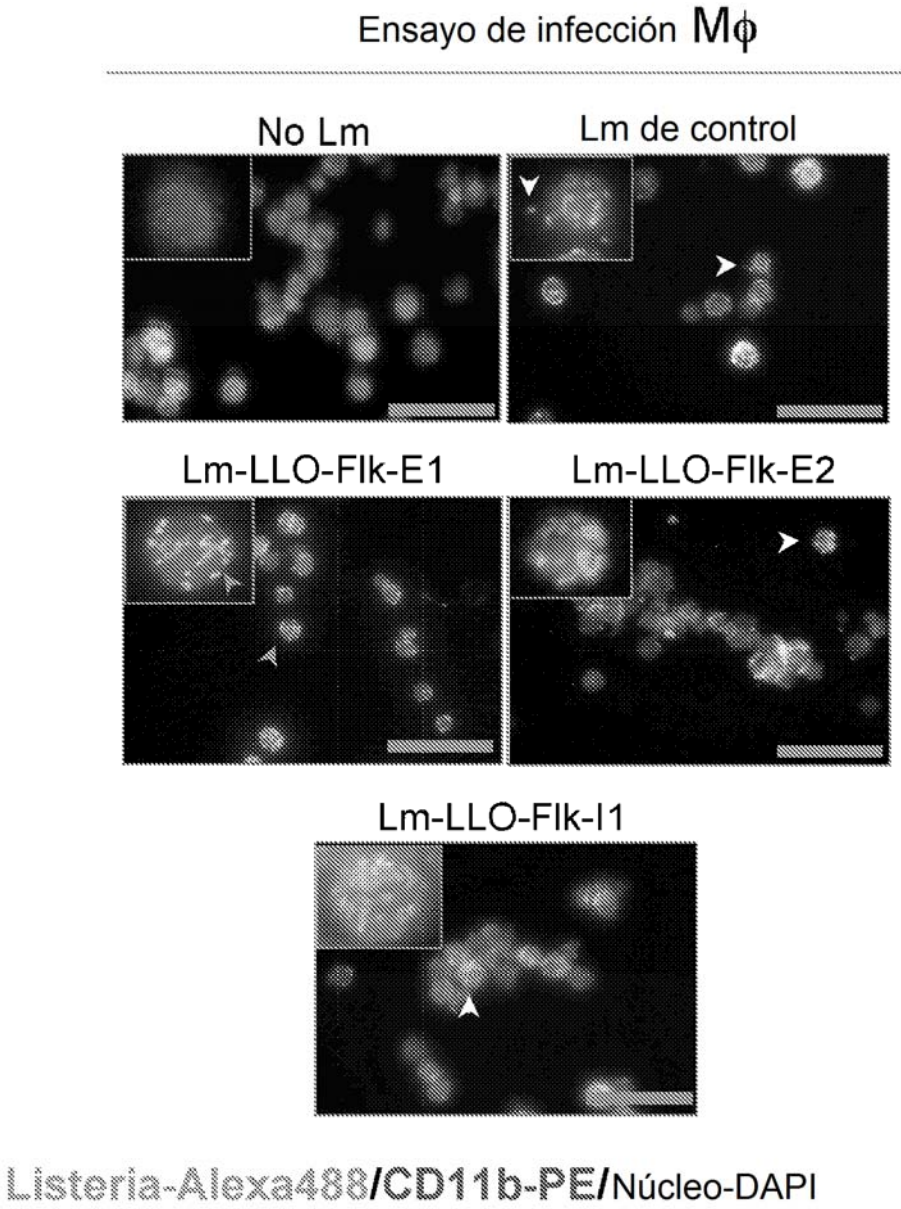

Ensayo de infección Mϕ
No Lm
Lm de control
Lm-LLO-Flk-E1
Lm-LLO-Flk-E2
Lm-LLO-Flk-I1
Listeria-Alexa488/CD11b-PE/Núcleo-DAPI

Figura 2D

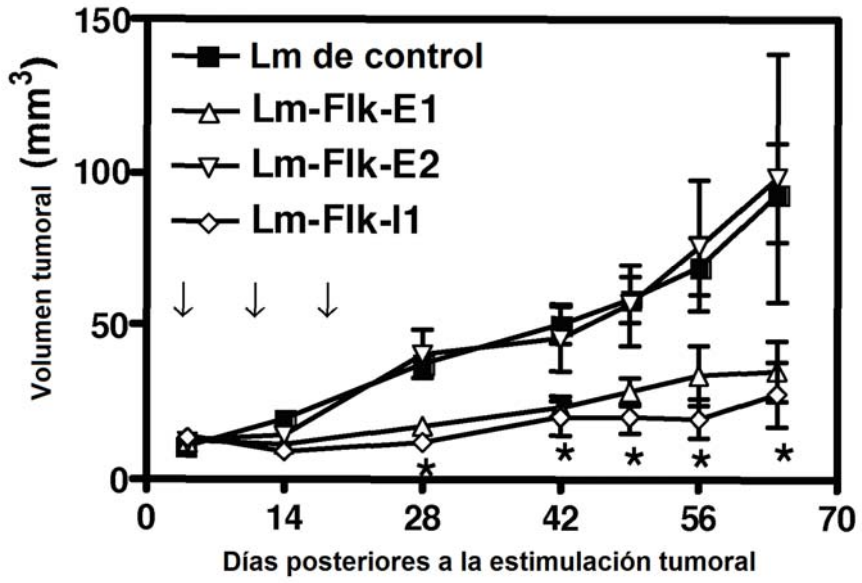


Figura 3A

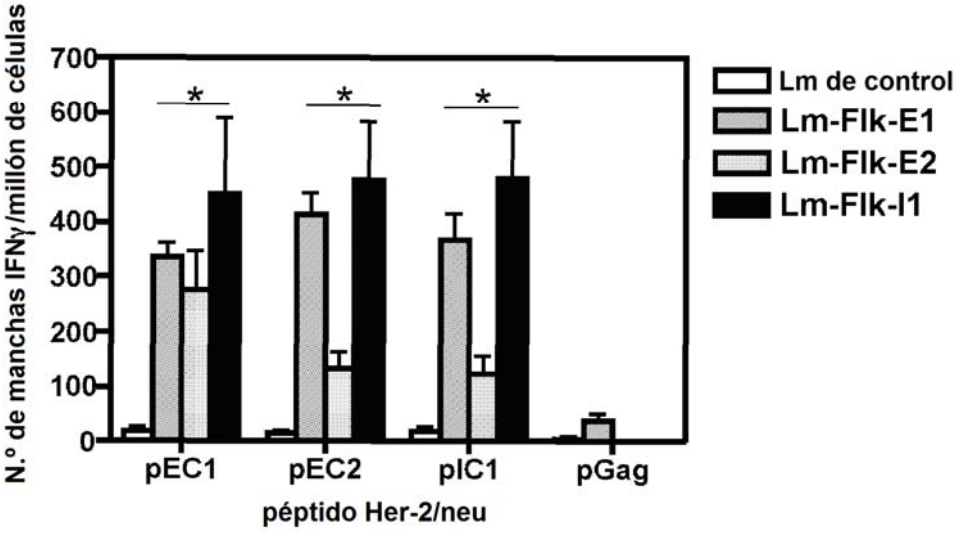
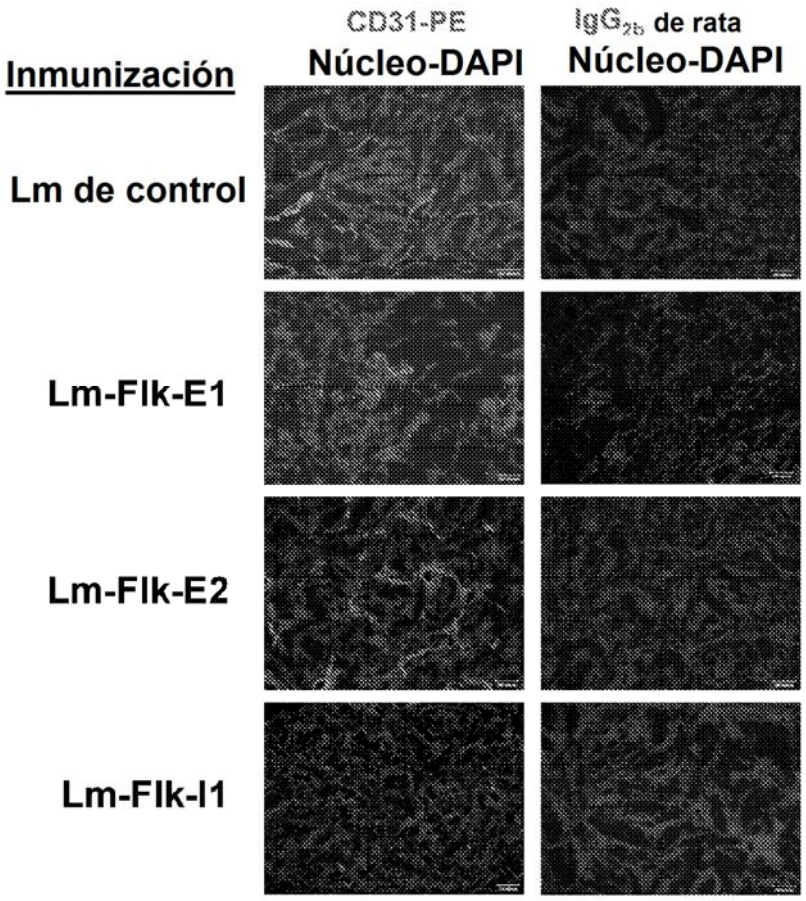


Figura 3B


CD31-PE
IgG2b de rata
Inmunización
Núcleo-DAPI
Núcleo-DAPI
Lm de control
Lm-Flk-E1
Lm-Flk-E2
Lm-Flk-l1

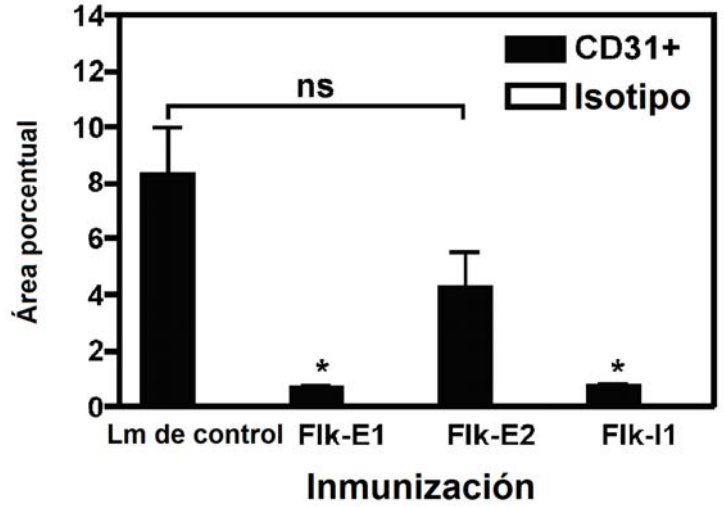

14
12
10
8
6
4
2
0
Área porcentual
ns
CD31+
Isotipo
*
*
Lm de control
Flk-E1
Flk-E2
Flk-l1
Inmunización

Figura 3C

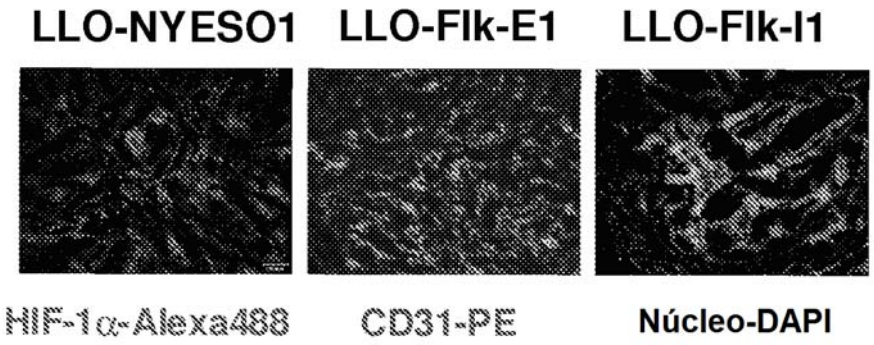


Figura 3D

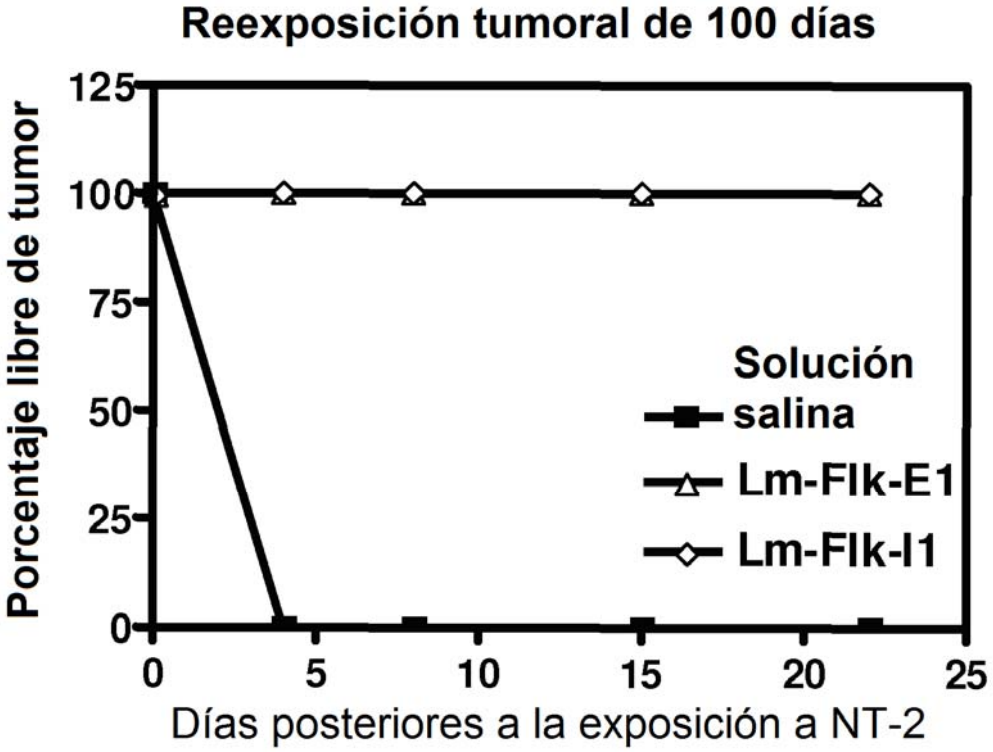


Figura 4A

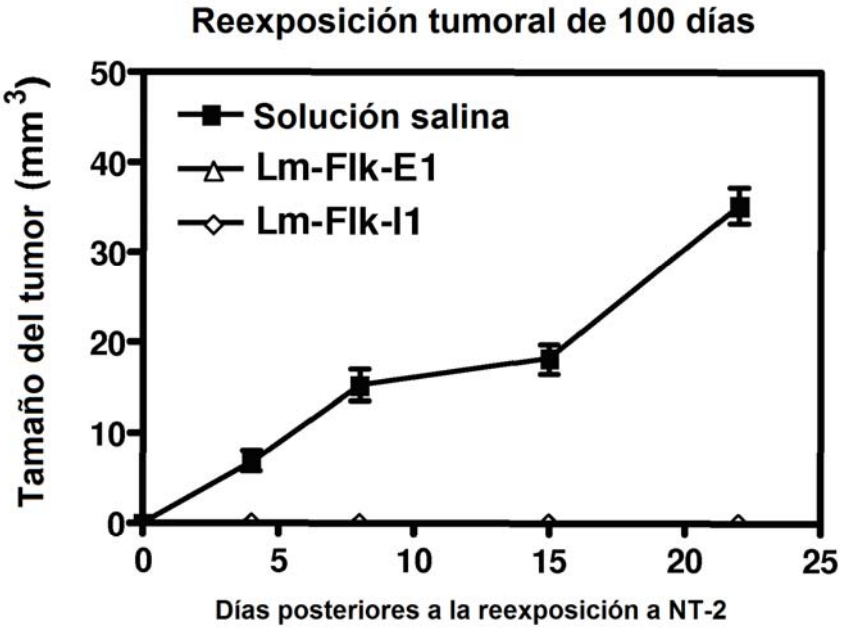


Figura 4B

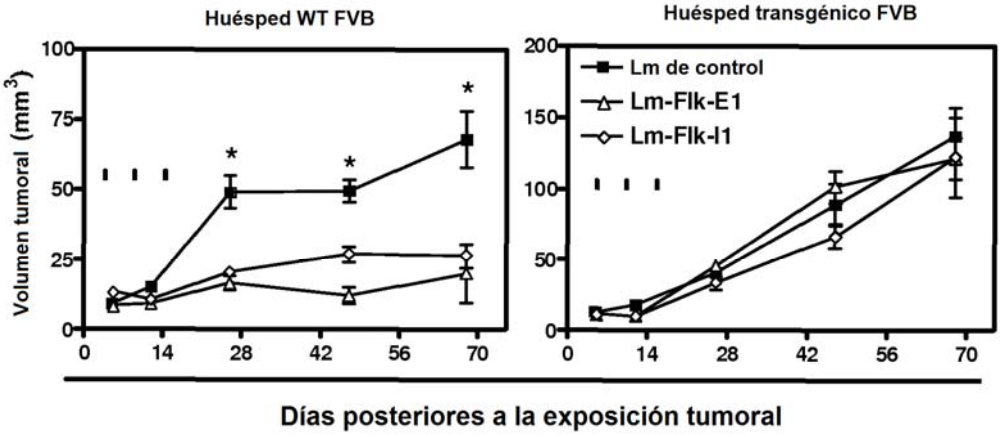


Figura 5A

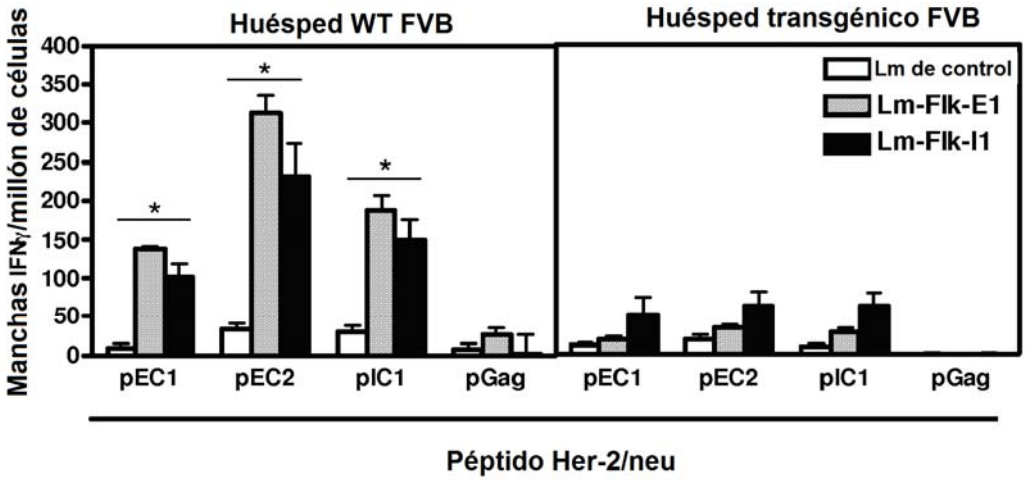

Huésped WT FVB
Huésped transgénico FVB
Manchas IFNγ/millón de células
400
350
300
250
200
150
100
50
0
*
*
*
Lm de control
Lm-Flk-E1
Lm-Flk-I1
pEC1
pEC2
pIC1
pGag
pEC1
pEC2
pIC1
pGag
Péptido Her-2/neu

Figura 5B

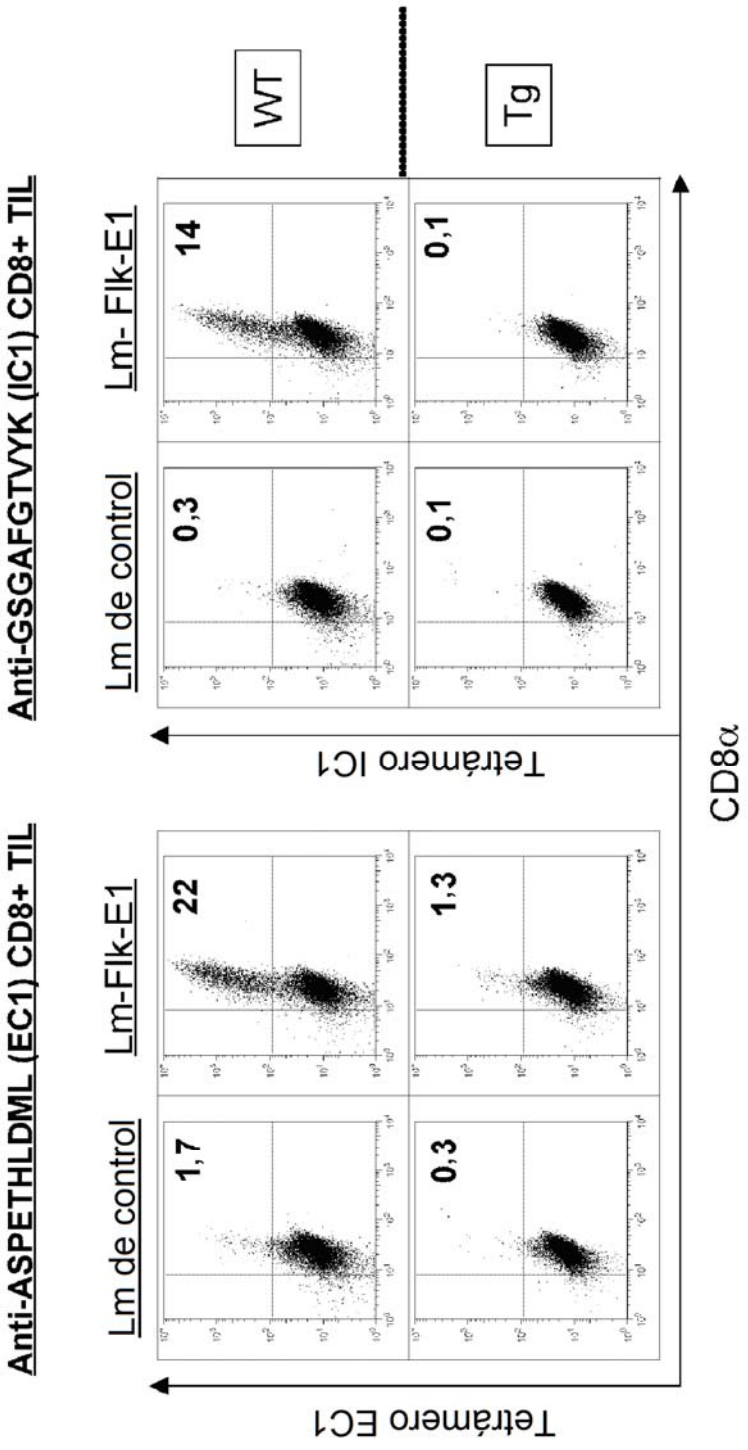

Anti-ASPETHLDML (EC1) CD8+ TIL
Anti-GSGAFGTVYK (IC1) CD8+ TIL
Lm de control
Lm-Flk-E1
Lm de control
Lm- Flk-E1
WT
Tg
1,7
22
0,3
0,3
1,3
0,1
0,1
14
Tetrámero EC1
Tetrámero IC1
CD8α

Figura 5C

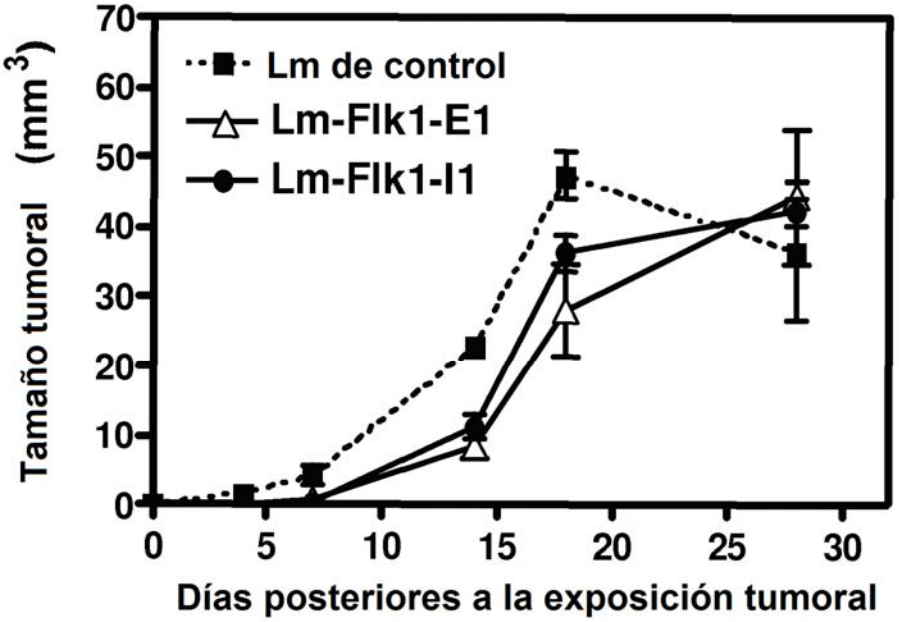


Figura 6A

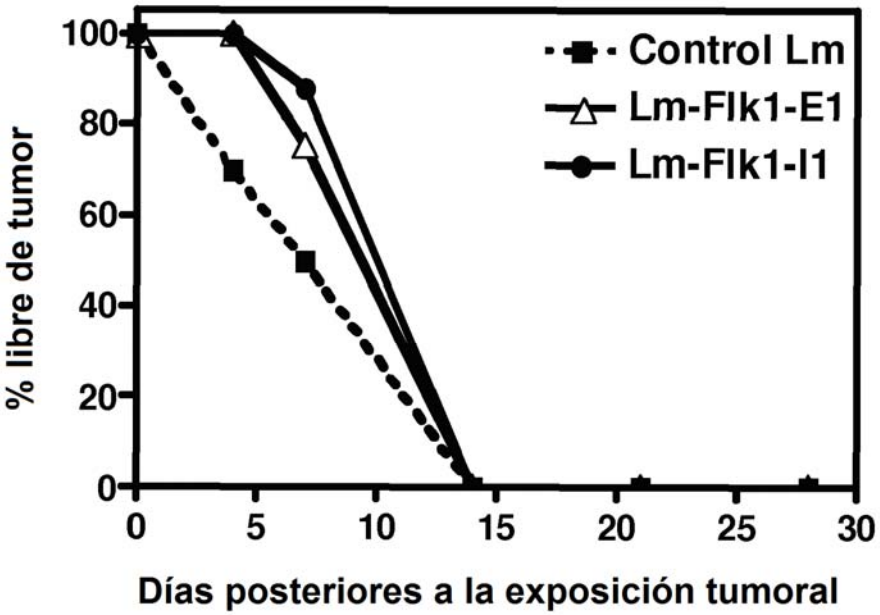


Figura 6B

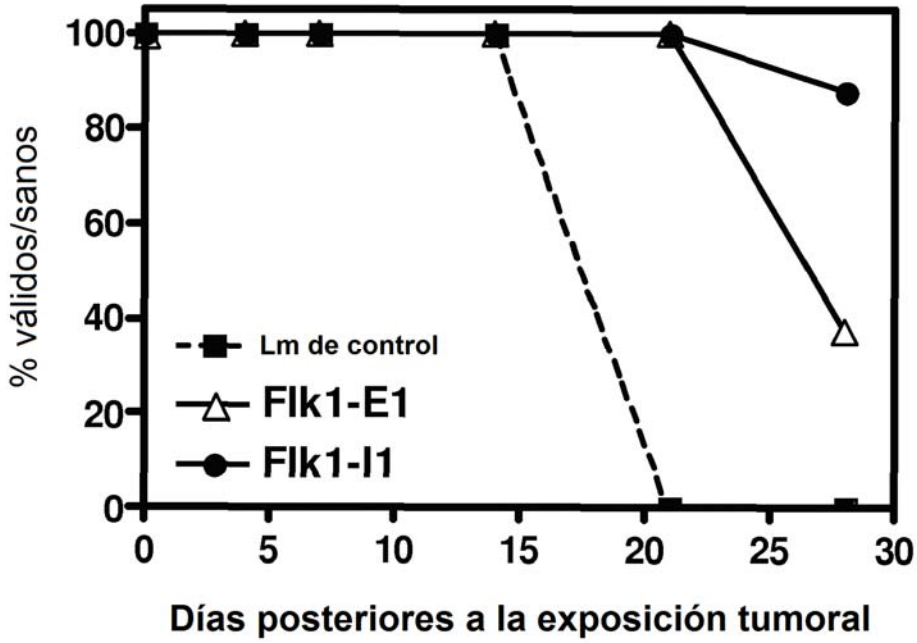


Figura 6C

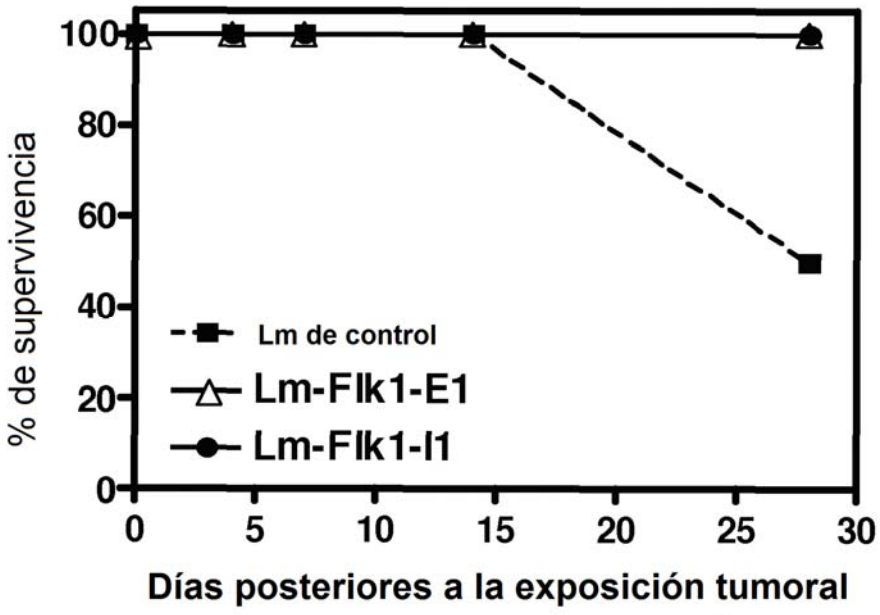
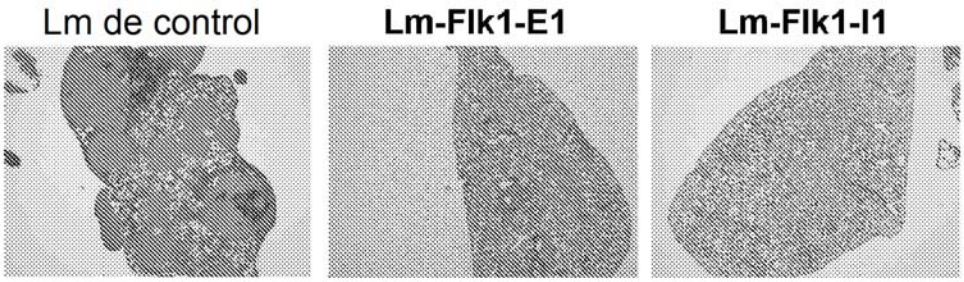


Figura 6D


Lm de control
Lm-Flk1-E1
Lm-Flk1-l1

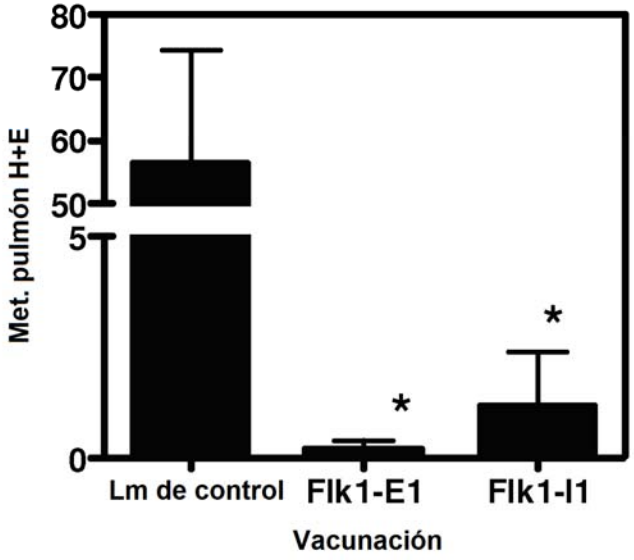

80
70
60
50
5
0
Met. pulmón H+E
*
*
Lm de control
Flk1-E1
Flk1-l1
Vacunación

Figura 7A

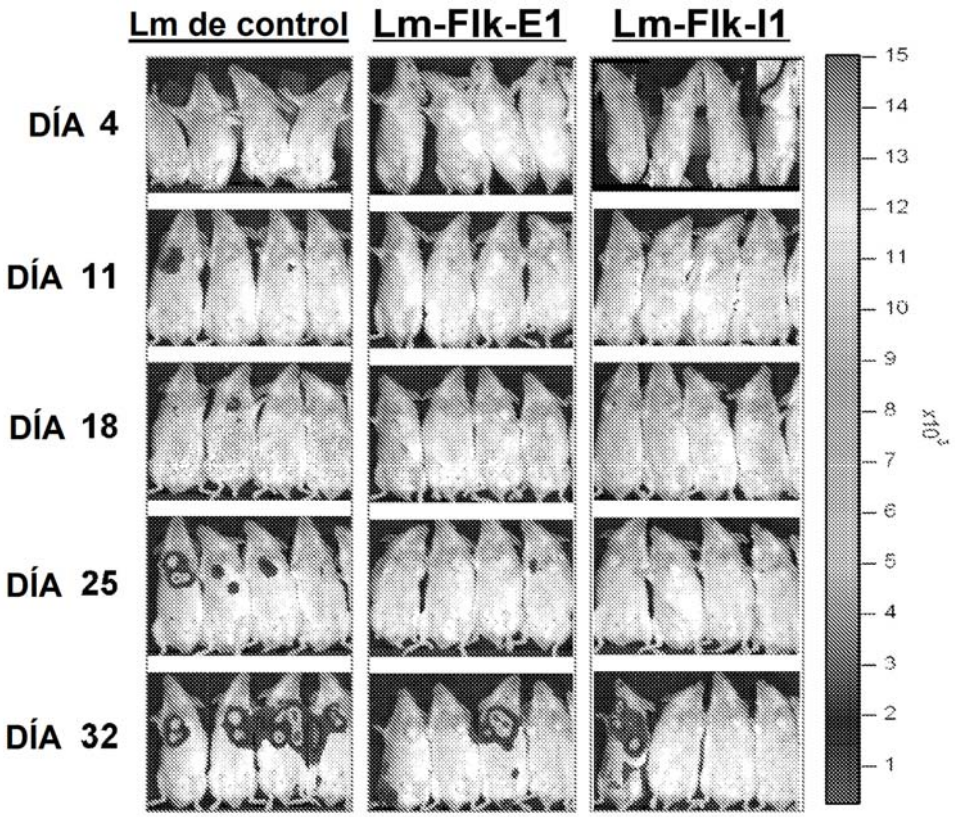

Lm de control
Lm-Flk-E1
Lm-Flk-I1
DÍA 4
DÍA 11
DÍA 18
DÍA 25
DÍA 32
15
14
13
12
11
10
9
8
7
6
5
4
3
2
1
x10³

Figura 7B

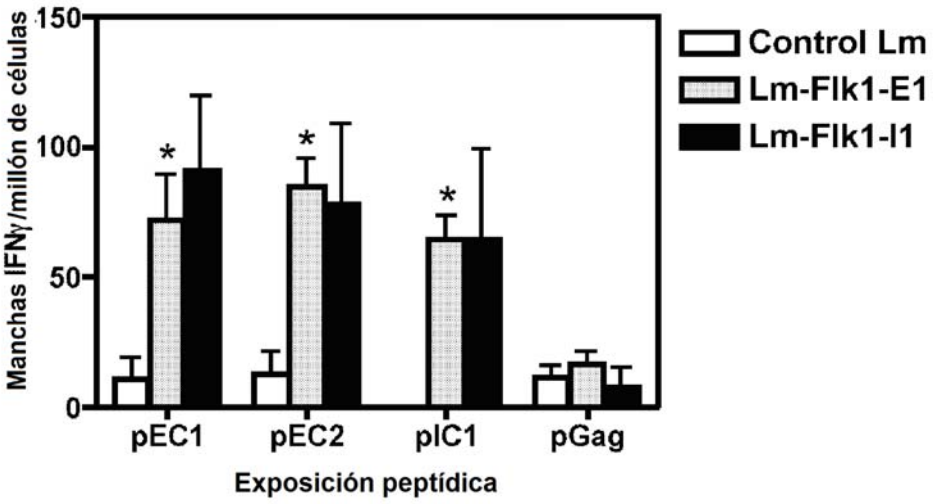


Figura 7C

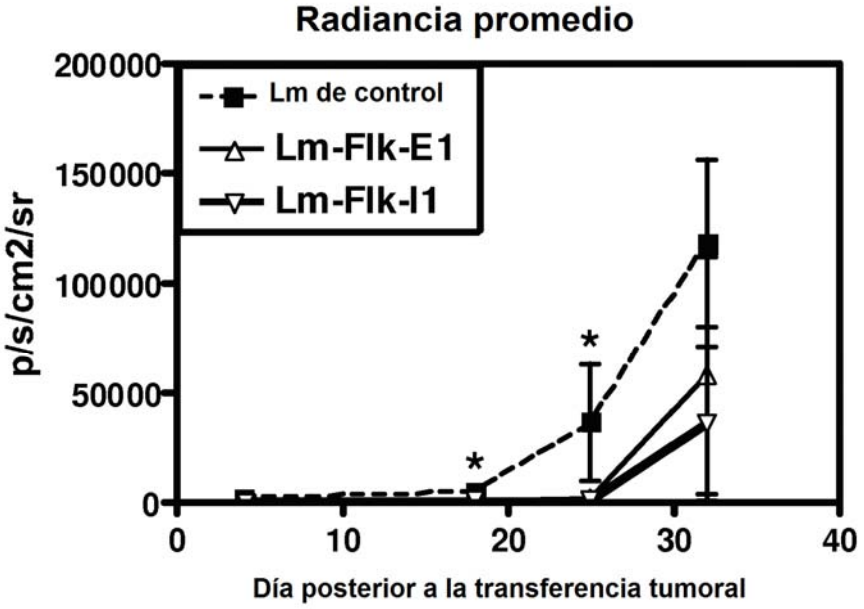


Figura 7D

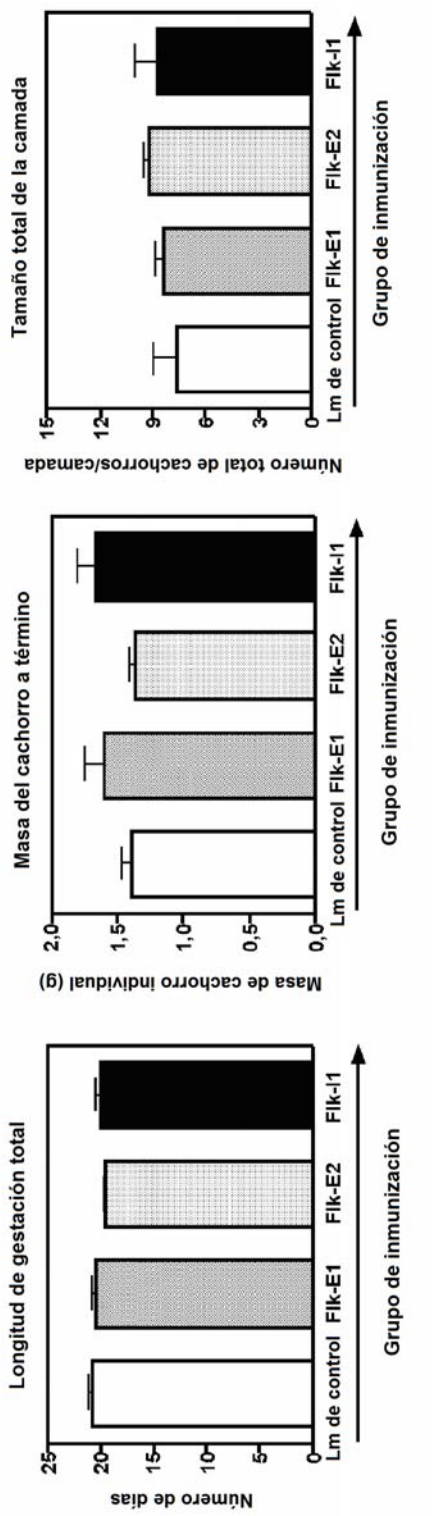
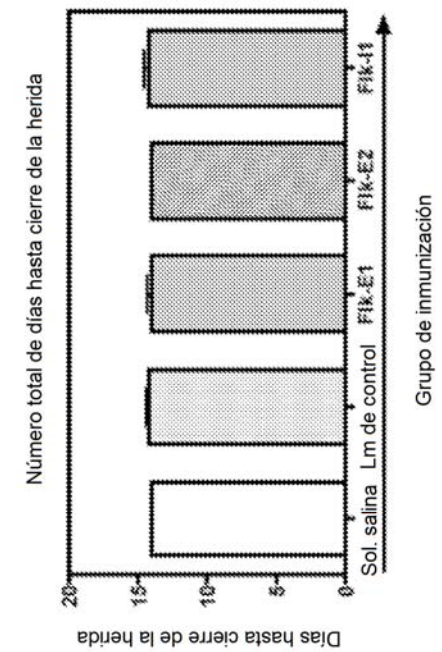

Longitud de gestación total
Número de días
25
20
15
10
5
0
Lm de control
Flk-E1
Flk-E2
Flk-I1
Grupo de inmunización
Masa del cachorro a término
Masa de cachorro individual (g)
2,0
1,5
1,0
0,5
0,0
Tamaño total de la camada
Número total de cachorros/camada
15
12
9
6
3
0

Figura 8A


Número total de días hasta cierre de la herida
Días hasta cierre de la herida
20
15
10
5
0
Sol. salina
Lm de control
Flk-E1
Flk-E2
Flk-I1
Grupo de inmunización

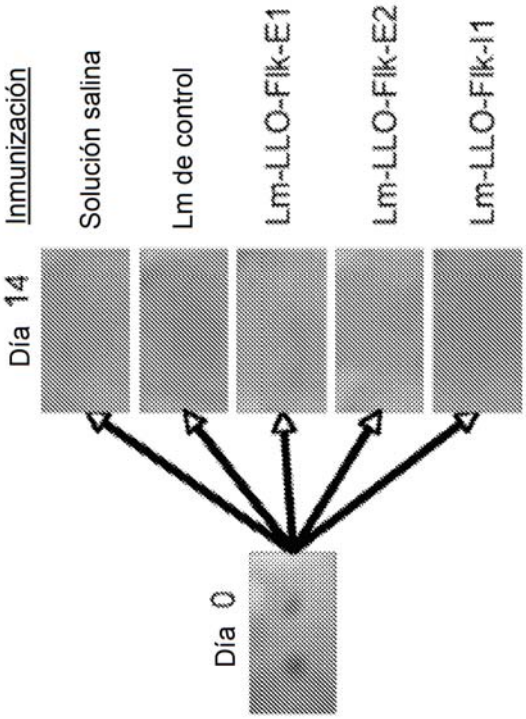

Inmunización
Día 14
Día 0
Solución salina
Lm de control
Lm-LLO-Flk-E1
Lm-LLO-Flk-E2
Lm-LLO-Flk-I1

Figura 8B

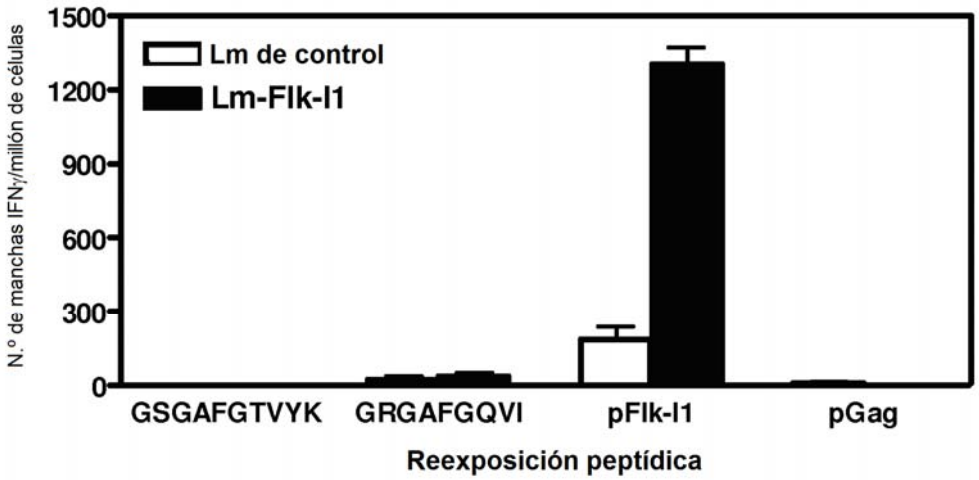

1500
1200
900
600
300
0
N.º de manchas IFNγ/millón de células
Lm de control
Lm-Flk-l1
GSGAFGTVYK
GRGAFGQVI
pFlk-l1
pGag
Reexposición peptídica

Figura 9

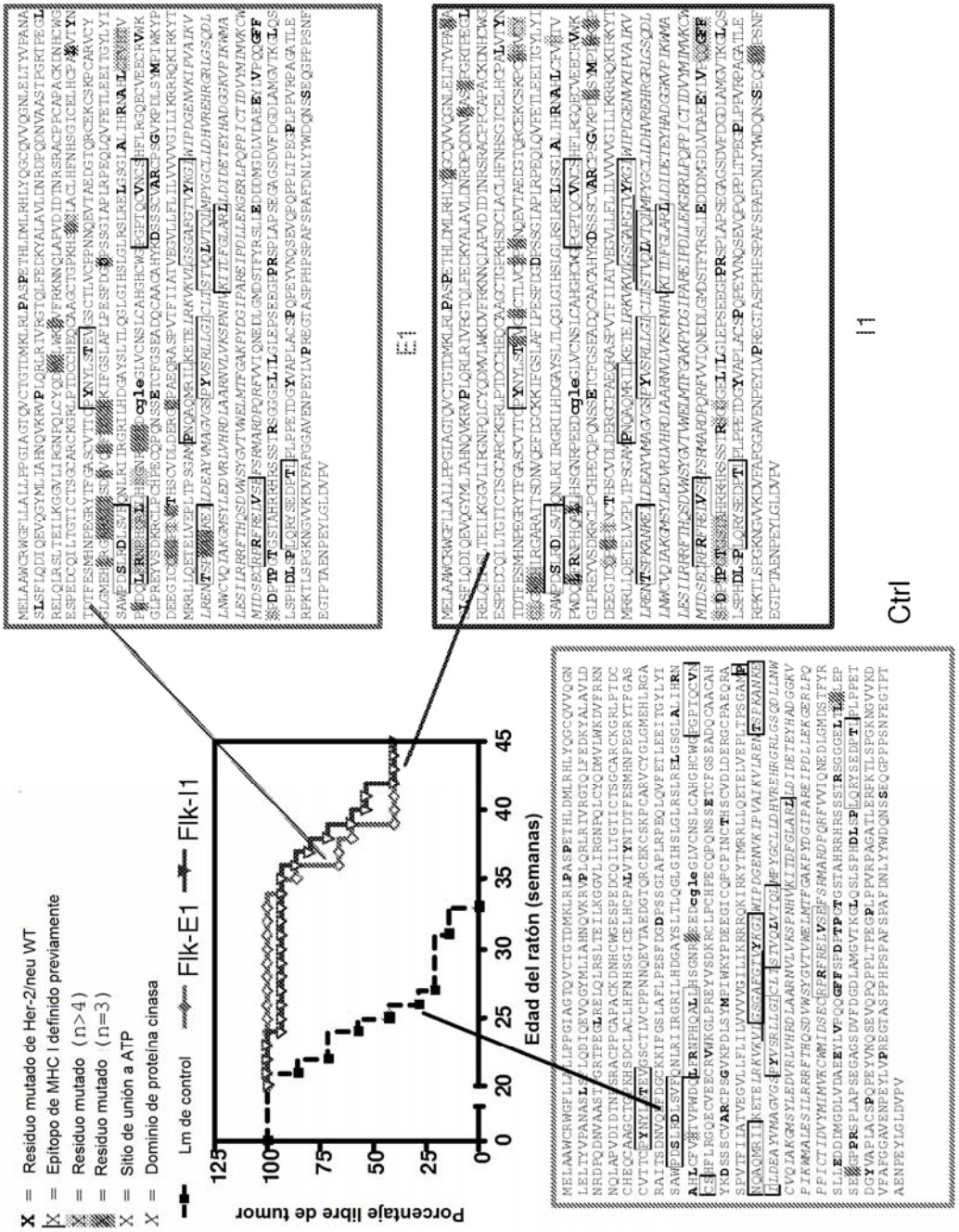

X = Residuo mutado de Her-2/neu WT
X = Epítopo de MHC I definido previamente
X = Residuo mutado (n>4)
X = Residuo mutado (n=3)
X = Sitio de unión a ATP
X = Dominio de proteína cinasa
Lm de control
Flk-E1
Flk-I1
Porcentaje libre de tumor
Edad del ratón (semanas)
E1
I1
Ctrl

Figura 10A

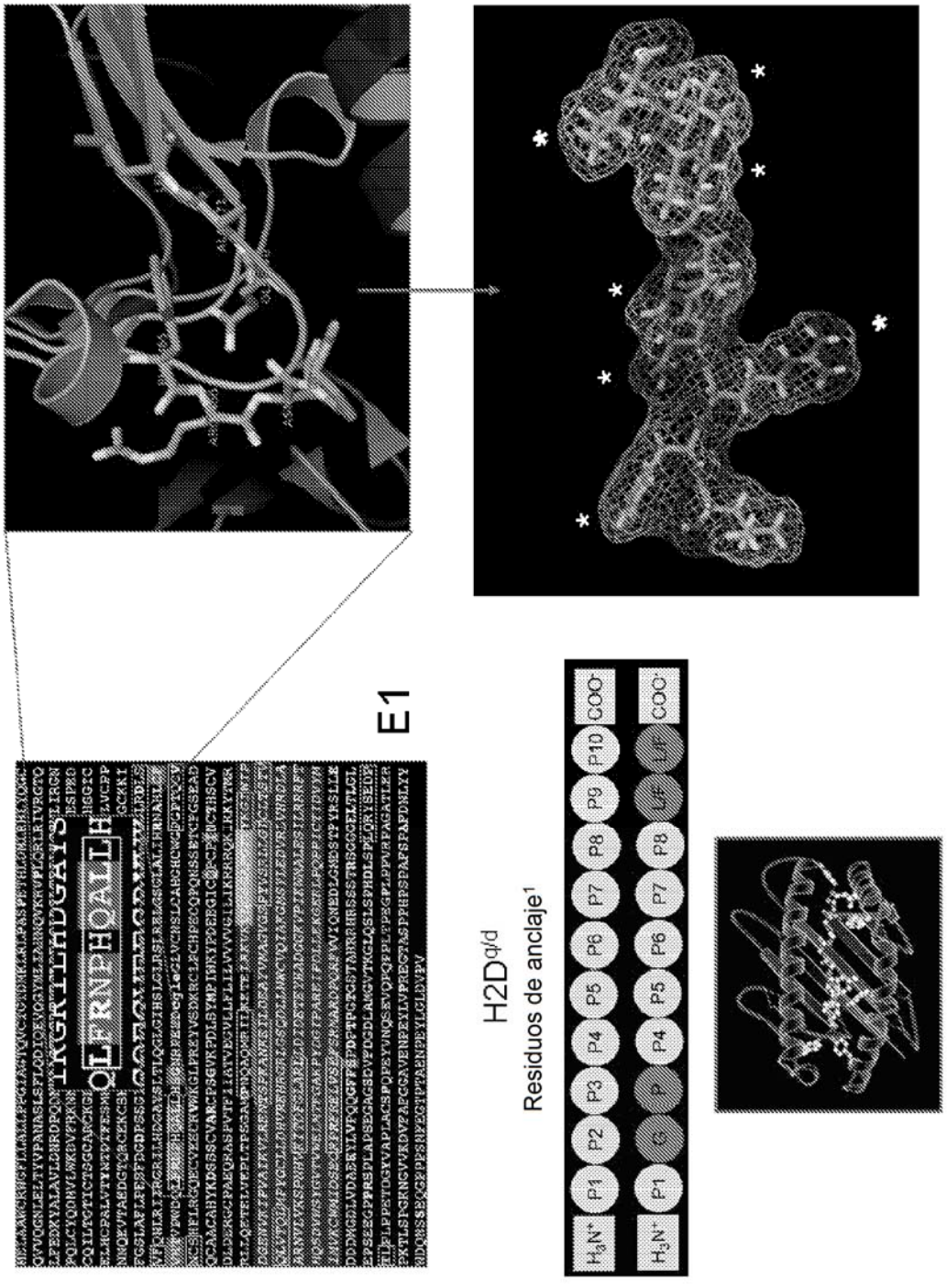

E1
H2Dq/d
Residuos de anclaje[1]
H3N+
P1
P2
P3
P4
P5
P6
P7
P8
P9
P10
COO-
H3N+
P1
P
P4
P5
P6
P7
P8
L/F
COO-

Figura 10B

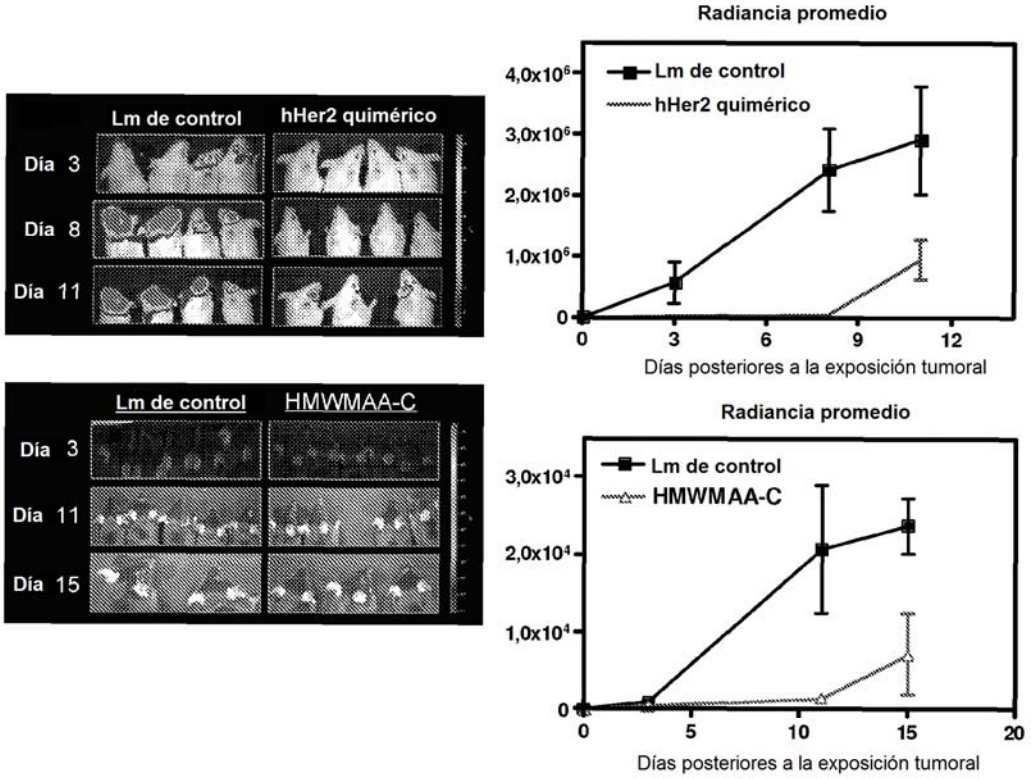

Lm de control
hHer2 quimérico
Día 3
Día 8
Día 11
Radiancia promedio
4,0x10⁶
3,0x10⁶
2,0x10⁶
1,0x10⁶
0
Lm de control
hHer2 quimérico
0
3
6
9
12
Días posteriores a la exposición tumoral
Lm de control
HMWMAA-C
Día 3
Día 11
Día 15
Radiancia promedio
3,0x10⁴
2,0x10⁴
1,0x10⁴
0
Lm de control
HMWMAA-C
0
5
10
15
20
Días posteriores a la exposición tumoral

Figura 11

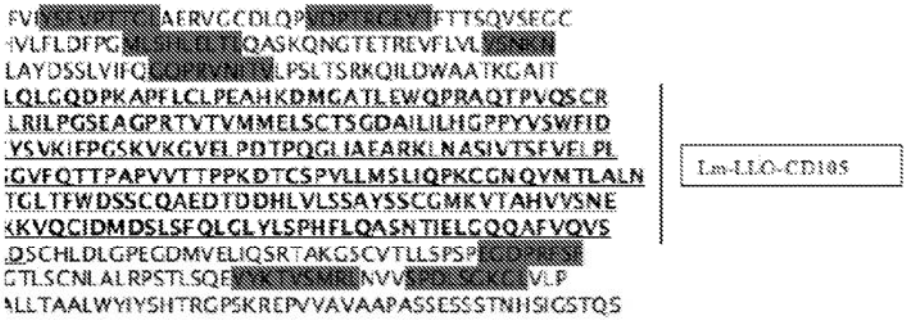


Figura 12

A)

MDRGVLPLPITLLFVIYSFVPTTGLAERVGCDLQPVDPTRGEVTFTTSQVSEGCVAQAA
NAVREVHVLFLDFPGMLSHLELTLQASKQNGTETREVFLVLVSNKNVFVKFQAPEIP
LHLAYDSSLVHFQGQPRVNITVLPSLTSRKQHLDWAATKGAITSIAALDDPQSIVLQLG
QDPKAPFLCLPEAHKDMGATLEWQPRAQTPVQSCRLEGVSGHKEAYHLRHLPGSEAG
PRTVTVMMELSCTSGDAHLHGPPYVSWFIDINHSMQILTTGEYSVKIFPGSKVKGV
ELPDTFPQGLIAEARKLNASIVTSFVELPLVSNVSLRASSCGGVFQTTPAPVVTTPPKDTCS
PVLLMSLIQPKCGNQVMTLALNKKHVQTLQCTITGLTFWDSSCQAEDTDDHLVLSS
AYSSCGMKVTAHVVSNEVHSFPSGSPPLRKKVQCIDMDSLSFQLGLYLSPHFLQASNT
IELGQQAFVQVSVSPLTSEVTVQLDSCHLDLGPEGDMVELIQSRTAKGSCVTLLSPSP
EGDPRFSFLLRVYMVPTPTAGTLSCNLALRPSTLSQEVYKTVSMRLNVVSPDLSGKG
LVLPSVLGTTFGAFLIGALLTAALWYFYSHTRGPSKREPVVAVAAPASSESSSTNHSIGSTQ
STPCSTSSMA

Lm-LLO-CI

Lm-LLO-CI

In CD105A: AGPRTVTVM (D^d)
In CD105B AYSSCGMKV (K^d)

B)

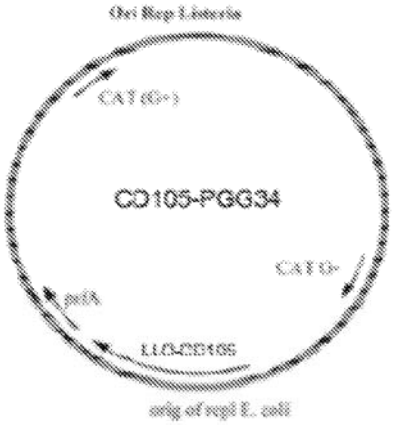


Figura 13

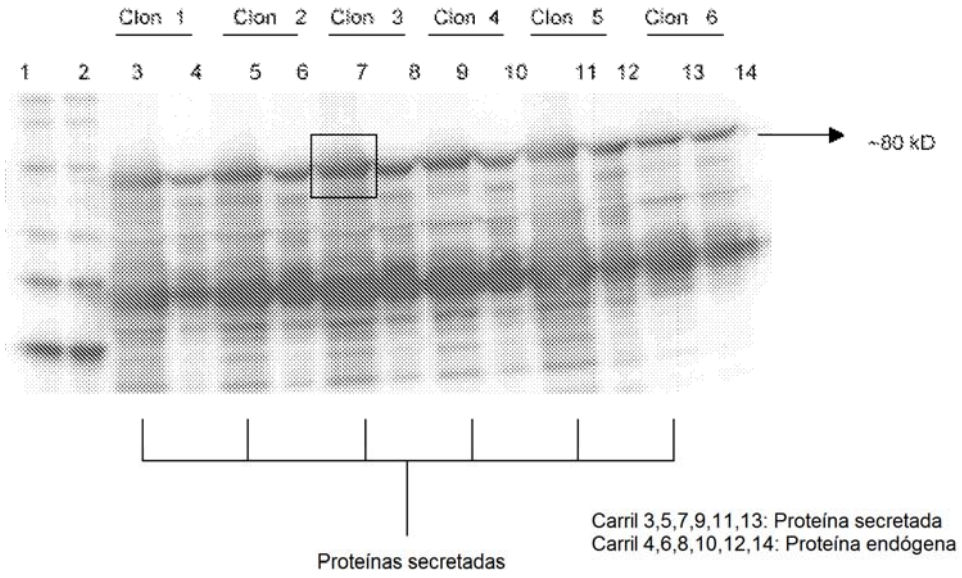

Clon 1
Clon 2
Clon 3
Clon 4
Clon 5
Clon 6
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14
~80 kD
Proteínas secretadas
Carril 3,5,7,9,11,13: Proteína secretada
Carril 4,6,8,10,12,14: Proteína endógena

Figura 14

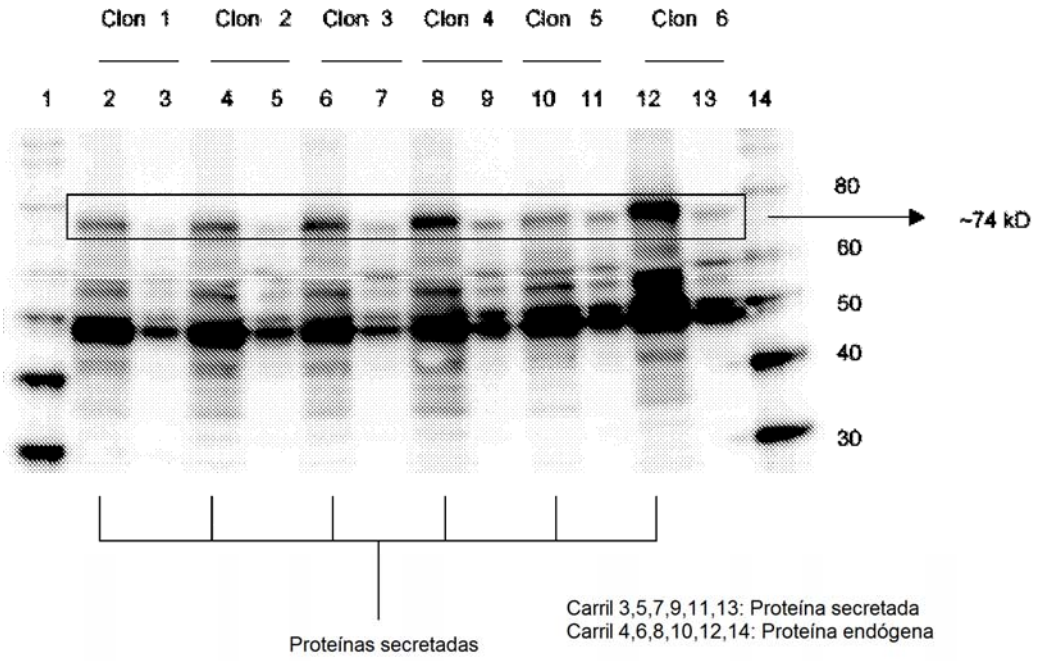
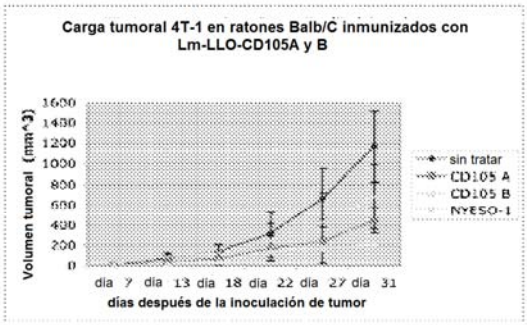

Clon 1
Clon 2
Clon 3
Clon 4
Clon 5
Clon 6
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14
80
60
50
40
30
~74 kD
Proteínas secretadas
Carril 3,5,7,9,11,13: Proteína secretada
Carril 4,6,8,10,12,14: Proteína endógena

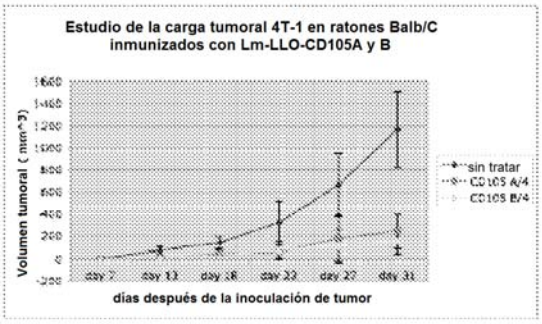
Figura 15

A. 1ª inmunización el Día 1



Inmunizados el día
1, 8 y 15

B. 1ª inmunización el Día 24



Inmunizados el día
4, 11 y 18

Figura 16

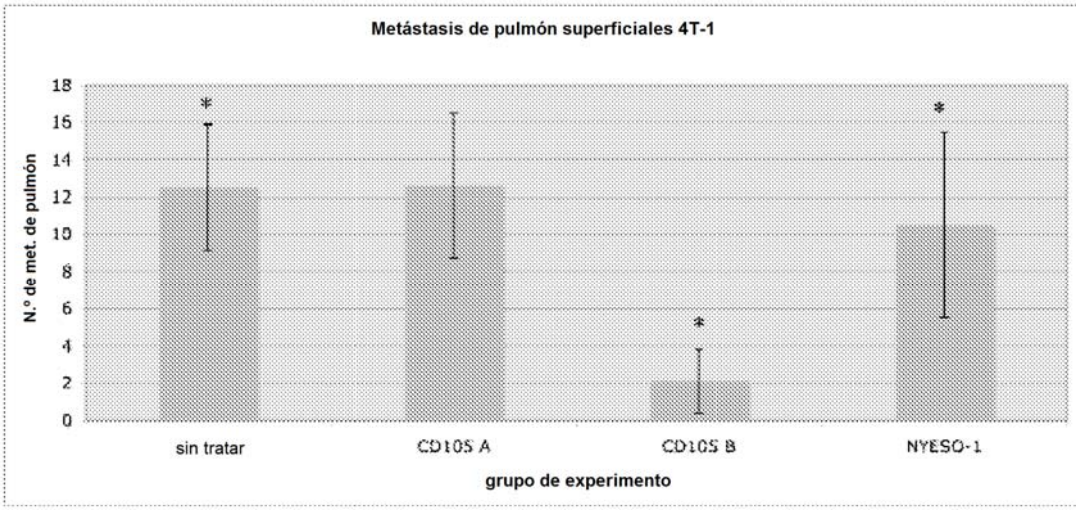

Metástasis de pulmón superficiales 4T-1
N.º de met. de pulmón
18
16
14
12
10
8
6
4
2
0
sin tratar
CD105 A
CD105 B
NYESO-1
grupo de experimento

Figura 17

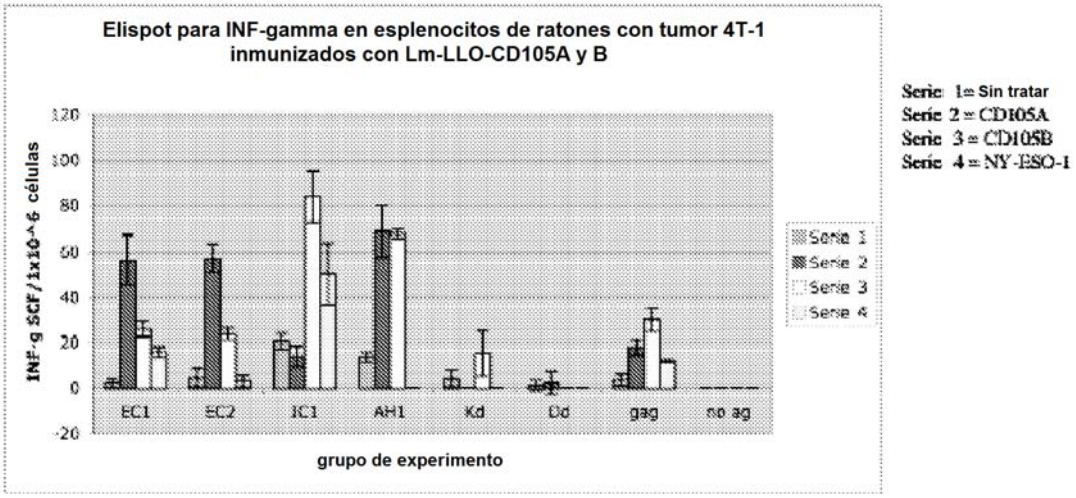

Elispot para INF-gamma en esplenocitos de ratones con tumor 4T-1 inmunizados con Lm-LLO-CD105A y B
INF-g SCF/1x10^6 células
120
100
80
60
40
20
0
-20
EC1
EC2
IC1
AH1
Kd
Dd
gag
no ag
grupo de experimento
Serie 1
Serie 2
Serie 3
Serie 4
Serie 1= Sin tratar
Serie 2 = CD105A
Serie 3 = CD105B
Serie 4 = NY-ESO-1

Figura 18

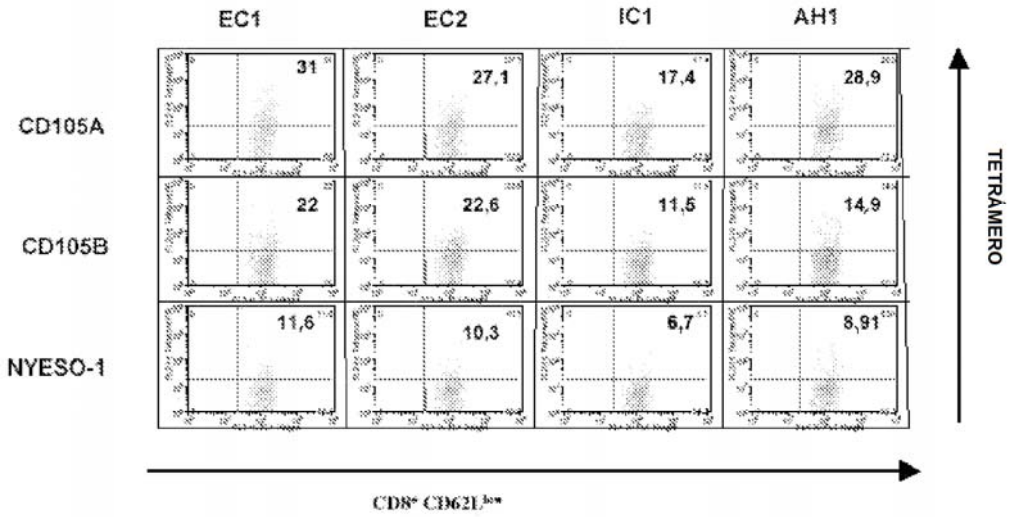
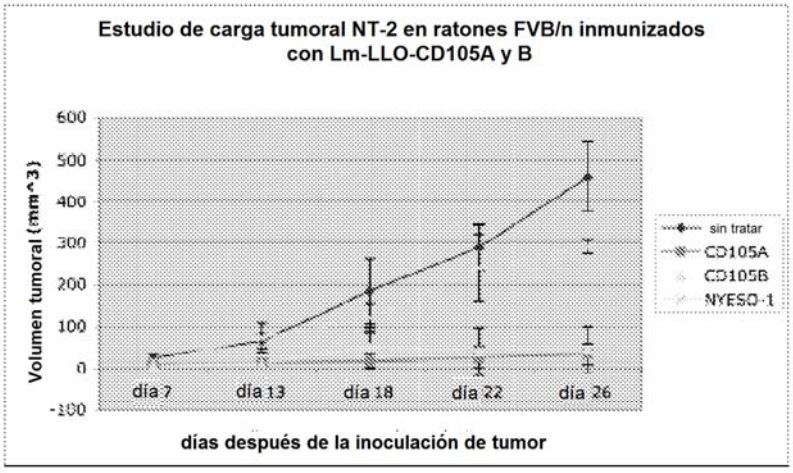

EC1
EC2
IC1
AH1
CD105A
CD105B
NYESO-1
31
27,1
17,4
28,9
22
22,6
11,5
14,9
11,6
10,3
6,7
8,91
TETRÁMERO
CD8+ CD62L+/-

Figura 19



Libre de tumor el día 60

Sin tratar	**0/8**
CD105A	**4/8**
CD105B	**2/8**
NYESO-1	**0/8**

Figura 20