

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 684 684**

51 Int. Cl.:

C12P 21/06	(2006.01)
C12N 15/00	(2006.01)
A61K 38/18	(2006.01)
A61K 39/00	(2006.01)
A61K 38/00	(2006.01)
C07K 14/71	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.11.2011 PCT/US2011/061164**

87 Fecha y número de publicación internacional: **24.05.2012 WO12068360**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.11.2011 E 11841347 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.05.2018 EP 2640842**

54 Título: **Métodos y composiciones para inducir una respuesta inmune al EGFRVIII**

30 Prioridad:

17.11.2010 US 414850 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
04.10.2018

73 Titular/es:

**ADURO BIOTECH, INC. (50.0%)
740 Heinz Avenue
Berkeley, CA 94710, US y
PROVIDENCE HEALTH & SERVICES-OREGON
D/B/A PROVIDENCE PORTLAND MEDICAL
CENTER (50.0%)**

72 Inventor/es:

**LAUER, PETER, M. y
BAHJAT, KEITH**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 684 684 T3

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

DESCRIPCIÓN

Métodos y composiciones para inducir una respuesta inmune al EGFRVIII

5 **Referencia cruzada a solicitudes relacionadas**

La presente invención reivindica prioridad sobre la solicitud de patente provisional de Estados Unidos. 61/414.850, presentada el miércoles, 17 de noviembre de 2010.

10 **Antecedentes de la invención**

La siguiente discusión de los antecedentes de la invención se proporciona meramente para ayudar al lector a comprender la invención y no se admite que describa o constituya la técnica anterior de la presente invención.

15 El gen del EGFR3 (c-erbB-1) a menudo se amplifica y se sobreexpresa en tejidos humanos malignos. Frecuentemente, esta amplificación se correlaciona con la reorganización estructural del gen, dando como resultado mutantes de delección en marco deficientes en los dominios intracelular y transmembrana de c-erb-1 de tipo silvestre. Una clase de mutación por delección identificada en algunos gliomas malignos y carcinomas de pulmón no microcítico se denomina EGFRVIII. EGFRVIII es una mutación en la que se delecionan los aminoácidos 6-273 (en el dominio
20 extracelular, siendo el residuo 1 el residuo que sigue inmediatamente a la secuencia señal) y se inserta una glicina entre los residuos 5 y 274. La secuencia de los 10 residuos en N-terminal de la mutación EGFRVIII es LEEKKGNYVV (SEQ ID NO: 1).

25 Los pacientes con cánceres de mama que expresan EGFRVIII tienen respuestas inmunes humorales y celulares detectables contra este péptido, lo que sugiere que sirve como un neoantígeno inmunogénico. Se ha usado un péptido de 13 aminoácidos de esta unión (LEEKKGNYVVDH; SEQ ID NO: 2), denominado PEPVIII, para vacunar seres humanos con tumores que expresan EGFRVIII. En un estudio publicado recientemente, se administró PEPVIII conjugado con KLH a pacientes con diagnóstico reciente de glioblastoma multiforme ("GBM") tratados mediante
30 resección total macroscópica (> 95 %), radiación y temozolomida que no tenían evidencia radiográfica de progresión. Se observaron respuestas inmunes humorales a EGFRVIII en 6 de 14 pacientes inmunizados, mientras que 3 de 17 mostraron una respuesta DTH positiva. La mediana de la supervivencia global para los pacientes tratados con vacuna y temozolomida fue de 26,0 meses desde el momento del diagnóstico histológico, frente a 15,0 meses para una cohorte equivalente que solo recibió temozolomida. Estos resultados alentadores respaldan la utilidad de las vacunas que expresan EGFRVIII y sugieren que una vacuna más potente, que provoque una respuesta de células T
35 específica de antígeno potente, duradera y fuerte, podría mejorar la magnitud y la duración de la respuesta anti-EGFRVIII.

40 *Listeria monocytogenes* es una bacteria intracelular grampositiva que se está explorando por su utilidad como vector de vacuna. La infección con *L. monocytogenes* provoca una potente respuesta de células T CD8+, necesaria para la destrucción de las células infectadas por *L. monocytogenes* y el control de la infección. La atenuación de *L. monocytogenes* mejora la seguridad del vector 100-1.000 veces mientras se mantiene o mejora su inmunogenicidad. La facilidad con la que el vector puede manipularse genéticamente, junto con las sencillas metodologías de producción, hacen de *L. monocytogenes* una plataforma atractiva para vacunas contra el cáncer.

45 Ciesielski et al., (Cancer Immunol. Immunother. (2005) **54**:2107-119) describen un estudio de los efectos inmunes celulares de un péptido que contiene múltiples copias de un único epítipo de EGFRVIII unido por un puente de lisina. La vacunación con este péptido antigénico múltiple produjo una respuesta inmune antitumoral predominantemente celular dirigida contra gliomas F98 que expresan el antígeno diana EGFRVIII.

50 Siguen necesitándose en la técnica composiciones y métodos para estimular una respuesta inmune efectiva frente a neoplasias malignas que expresan EGFRVIII.

Breve resumen de la invención

55 La presente invención proporciona composiciones que expresan tales antígenos, polipéptidos, ácidos nucleicos y el uso de los mismos como se define en las reivindicaciones.

60 En un aspecto de la invención, es una composición que comprende una bacteria que expresa uno o más polipéptidos inmunogénicos, cuya secuencia de aminoácidos comprende una pluralidad (2, 3, 4, 5 o más copias) de secuencias polipeptídicas de EGFRVIII, cuya secuencia polipeptídica comprende EEKKGNYV (SEQ ID NO: 3) donde cada secuencia polipeptídica de EGFRVIII está flanqueada por una secuencia que está configurada para su escisión por el proteosoma para usar en un método para inducir una respuesta de células T contra EGFRVIII en un sujeto. En determinadas realizaciones, estas secuencias derivadas de EGFRVIII pueden comprender o consistir en

LEEKKGNYV (SEQ ID NO: 4), LEEKKGNVVDH (SEQ ID NO: 2) o PASRALEEKKGNYVVDHGSC (SEQ ID NO: 5). Como se describe a continuación en el presente documento, los más preferidos son bacterias *L. monocytogenes* que expresan el (los) polipéptido (s) inmunogénico (s) descritos en el presente documento.

5 También como se describe en el presente documento, tales métodos pueden estimular una respuesta inmune, incluyendo una o más de una respuesta humoral y respuesta de células T específicas de antígeno (CD4+ y/o CD8+), en dicho sujeto a los polipéptidos de EGFRvIII expresados de manera recombinante. La capacidad de tales polipéptidos para generar una respuesta de células T CD4+ y/o CD8+ se puede confirmar mediante diversos métodos descritos con detalle en este documento y que son bien conocidos en la técnica. Preferentemente, cuando se administran al sujeto, las composiciones de la presente invención inducen un aumento en la concentración en suero de una o más, y preferiblemente cada una de, las proteínas seleccionadas del grupo que consiste en IL-12p70, IFN- γ , IL-6, TNF α y MCP-1 a las 24 horas después de dicha administración; e inducen una respuesta de células T CD4+ y/o CD8+ específicas de antígeno contra EGFRvIII.

15 En un aspecto relacionado de la invención, la invención se refiere a composiciones útiles para inducir una respuesta de células T contra EGFRvIII en un sujeto. Tales composiciones comprenden una bacteria que comprende una molécula de ácido nucleico, cuya secuencia codifica uno o más polipéptidos inmunogénicos, cuya secuencia de aminoácidos comprende una pluralidad (2, 3, 4, 5 o más copias) de secuencias polipeptídicas de EGFRvIII, cuya secuencia polipeptídica comprende EEEKKKGNYV (SEQ ID NO: 3), donde cada secuencia de polipéptido EGFRvIII está flanqueada por una secuencia que está configurada para su escisión por el proteasoma. En determinadas realizaciones, estas secuencias derivadas de EGFRvIII pueden comprender o consistir en LEEKKKGNYV (SEQ ID NO: 4), LEEKKGNVVDH (SEQ ID NO: 2) o PASRALEEKKGNYVVDHGSC (SEQ ID NO: 5). Como se describe a continuación en el presente documento, los más preferidos son bacterias *L. monocytogenes* que expresan el (los) polipéptido (s) inmunogénico (s) descritos en el presente documento. En determinadas realizaciones, las secuencias de ácido nucleico que codifican las secuencias derivadas de EGFRvIII están codificadas optimizadas por codones para la expresión en la bacteria deseada.

25 En otro aspecto relacionado, la invención se refiere a una molécula de ácido nucleico aislada, cuya secuencia codifica uno o más polipéptidos inmunogénicos, cuya secuencia de aminoácidos comprende una pluralidad (2, 3, 4, 5 o más copias) de secuencias polipeptídicas de EGFRvIII, cuya secuencia polipeptídica comprende EEEKKKGNYV (SEQ ID NO: 3), donde cada secuencia de polipéptido EGFRvIII está flanqueada por una secuencia que está configurada para su escisión por el proteasoma o los propios polipéptidos correspondientes. En determinadas realizaciones, estas secuencias derivadas de EGFRvIII pueden comprender o consistir en LEEKKKGNYV (SEQ ID NO: 4), LEEKKGNVVDH (SEQ ID NO: 2) o PASRALEEKKGNYVVDHGSC (SEQ ID NO: 5).

35 Los métodos para derivar secuencias polipeptídicas inmunogénicas apropiadas se describen con detalle más adelante. En determinadas realizaciones, al menos dos de las secuencias del polipéptido EGFRvIII están separadas por un enlazador polipeptídico que está configurado para ser procesado por proteasas presentes en el sujeto. A modo de ejemplo, una secuencia polipeptídica de EGFRvIII puede separarse de una secuencia polipeptídica de EGFR adyacente mediante una secuencia que está configurada para su escisión por el proteasoma. En la invención, cada secuencia polipeptídica de EGFRvIII está flanqueada (y separarse de este modo de la o las secuencias polipeptídicas de EGFR adyacentes mediante) por una secuencia que está configurada para su escisión por el proteasoma. Las secuencias polipeptídicas adecuadas, y las secuencias de ácidos nucleicos que las codifican, se describen con detalle a continuación en el presente documento.

45 En determinadas realizaciones, el (los) polipéptido (s) inmunogénico (s) comprenden una o más secuencias de aminoácidos "escindibles" seleccionadas del grupo que consiste en ASKVL↓ADGSVK; ASKVA↓GDGSIK; LSKVL↓ADGSVK; LAKSL↓ADLAVK; ASVVA↓GIGSIA; GVEKI↓NAANKG; y DGSKKA↓GDGNKK (SEQ ID NOS: 6-12). En estas secuencias, la secuencia antigénica se coloca de nuevo en el lugar indicado por la flecha, de manera que la secuencia de aminoácidos "escindible" flanquea la secuencia antigénica. Estas secuencias se pueden combinar de tal forma que cualquier secuencia a la izquierda de una flecha se pueda combinar con cualquier secuencia a la derecha de una flecha para crear un nuevo par flanqueante.

También se pueden crear cadenas de estas secuencias, tales como ASKVL↓ADGSVKASKVA↓GDGSIKLSKVL↓ADGSVKASKVA↓GDGSIKLSKVL↓ADGSVK (SEQ ID NO: 13), de nuevo en el que la secuencia antigénica se coloca en el lugar indicado por la flecha. En un esfuerzo por mejorar la claridad, esta lista muestra la primera secuencia flanqueante subrayada, la segunda no subrayada, la tercera subrayada, la cuarta no subrayada y la quinta subrayada. Otro ejemplo es ASKVL↓ADGSVKDGSKKA↓GDGNKKLSKVL↓ADGSVKDGSKKA↓GDGNKKLSK VL↓ADGSVKDGSKKA↓GDGNKK (SEQ ID NO: 14). Estas secuencias solo tienen una naturaleza ilustrativa. Los motivos de escisión proteasómica adecuados se describen con detalle en Toes et al., *J. Exp. Med.* 194: 1-12, 2001, que se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad. Véase también, Lauer et al., *Infect. Immun.* 76: 3742-53, 2008; y Sinnathamby et al., (*J. Immunother.* 32:856-69, 2009).

65 Se han desarrollado varias especies bacterianas para usar como vacunas y se pueden usar como una plataforma de vacuna en la presente invención, incluyendo, pero sin limitación, *Shigella flexneri*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella typhi* o especies de *mycobacterium*.

Esta lista no pretende ser limitante. La presente invención contempla el uso de cepas bacterianas atenuadas, comensales y/o muertas pero metabólicamente activas como plataformas de vacuna. En realizaciones preferidas, la bacteria es *Listeria monocytogenes* que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica la expresión por la bacteria de las secuencias polipeptídicas de EGFRvIII de la invención. Este ácido nucleico se integra, más
 5 preferiblemente, en el genoma de la bacteria. Las formas atenuadas y muertas pero metabólicamente activas de *Listeria monocytogenes* son particularmente preferidas y *Listeria monocytogenes* que aloja una mutación atenuante en actA y/o inlB se describe a continuación en realizaciones preferidas. Aunque la presente invención se describe en el presente documento con respecto a vectores bacterianos, los agentes adecuados para la administración de un antígeno diana incluyen vectores recombinantes adicionales, por ejemplo, virus y ADN desnudo.

10 Las composiciones de vacuna descritas en el presente documento se pueden administrar individualmente, solo o en combinación con un excipiente farmacéuticamente aceptable, en una cantidad suficiente para inducir una respuesta inmune apropiada para prevenir o tratar una neoplasia maligna asociada con la expresión de EGFRvIII. Las afecciones preferidas seleccionadas para inducir una respuesta de células T en un sujeto comprenden administrar la
 15 plataforma de vacuna por vía intravenosa a un sujeto; sin embargo, la administración puede ser oral, intravenosa, subcutánea, dérmica, intradérmica, intramuscular, en la mucosa, parenteral, intraorgánica, intralesional, intranasal, inhalación, intraocular, intravascular, intranodal, por escarificación, rectal, intraperitoneal o cualquiera o una combinación de diversas vías de administración bien conocidas.

20 En determinadas realizaciones preferentes, después de que el sujeto haya recibido una dosis efectiva de una vacuna que contiene los polipéptidos inmunogénicos para provocar la respuesta inmune, se administra una segunda vacuna. Esto se conoce en la técnica como un régimen de "sensibilización-refuerzo". En dicho régimen, las composiciones y los métodos de la presente invención se pueden usar como la administración "de sensibilización",
 25 como la administración de "refuerzo" o como tanto "de sensibilización" como "refuerzo". Ejemplos de tales regímenes se describen a continuación.

Una *Listeria monocytogenes* preferente para su uso en la presente invención comprende una mutación en el gen prfA que bloquea el factor de transcripción prfA expresado en un estado constitutivamente activo. Por ejemplo, se ha demostrado que un mutante PrfA* (G155S) mejora la inmunidad celular funcional después de un régimen de
 30 inmunización de sensibilización-refuerzo intravenoso o intramuscular.

En determinadas realizaciones, las secuencias polipeptídicas EGFRvIII de la presente invención se expresan como una proteína de fusión que comprende una secuencia señal secretora en el marco, lo que da como resultado su secreción como polipéptido(s) soluble(s) por la bacteria. Se conocen numerosas secuencia señal de ejemplo en la
 35 técnica para su uso en sistemas de expresión bacterianos. En el caso en el que la bacteria es *Listeria monocytogenes*, se prefiere la secuencia señal secretora sea una secuencia señal de *Listeria monocytogenes*, de la forma más preferente la secuencias señal ActA. ActA u otros aminoácidos enlazadores adicionales también se pueden expresar fusionados con el (los) polipéptido (s) inmunogénico (s). En realizaciones preferidas, uno o más polipéptido (s) inmunogénico (s) se expresan como proteína (s) de fusión que comprenden una secuencia en marco
 40 ActA-N100 (por ejemplo, seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID NO: 37, 38 y 39) o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia con dicha secuencia de ActA-N100.

En realizaciones preferidas, la composición de vacuna comprende una *Listeria monocytogenes* que expresa una proteína de fusión que comprende:

45 (a) una secuencia de ActA-N100 seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 37, 38 y 39, o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia con dicha secuencia de ActA-N100;

50 (b) una secuencia de aminoácidos que comprende una pluralidad (2, 3, 4, 5 o más copias) de secuencias polipeptídicas de EGFRvIII, cuya secuencia polipeptídica comprende EEKKGNYV (SEQ ID NO: 3); y

(c) una secuencia de aminoácidos enlazadora situada entre al menos dos de las secuencias polipeptídicas de EGFRvIII, donde la secuencia de aminoácidos enlazadora está configurada para la escisión proteasómica,
 55

donde la proteína de fusión se expresa a partir de una secuencia de ácido nucleico unida operativamente a un promotor de ActA de *Listeria monocytogenes*.

También se describe un método para evaluar una respuesta inmune de EGFRvIII en un sistema modelo de ratón. Estos métodos comprenden inmunizar un ratón con un polipéptido EGFRvIII y evaluar la respuesta inmune específica de EGFRvIII resultante determinando la reactividad a un polipéptido, cuya secuencia consiste en EEKKGNYV.
 60

Tal como se ha señalado anteriormente, en ciertas realizaciones, las secuencias de ácido nucleico que codifican el (los) polipéptido (s) antigénico (s) se optimizan por codones para la expresión de la bacteria (por ejemplo, *Listeria monocytogenes*). Como se describe a continuación en el presente documento, diferentes organismos a menudo
 65

muestran "sesgo de codón"; es decir, el grado en que un codón dado que codifica un aminoácido particular aparece en el código genético varía significativamente entre organismos. En general, cuanto más codones raros contenga un gen, menor es la probabilidad de que la proteína heteróloga se exprese a un nivel razonable dentro de ese sistema específico de huésped. Estos niveles se vuelven aún más bajos si los codones raros aparecen en grupos o en la porción N-terminal de la proteína. La sustitución de codones raros por otros que reflejen más fielmente el sesgo de codones del sistema del huésped sin modificar la secuencia de aminoácidos puede aumentar los niveles de expresión funcional de proteínas. Los métodos para la optimización de codones se describen a continuación.

Breve descripción de las figuras

La figura 1 representa esquemáticamente casetes de expresión de ejemplo para su uso en la presente invención.

La figura 2 representa los resultados de la transferencia Western que demuestran la expresión de antígenos de EGFRvIII mediante *Listeria* recombinante.

La Fig. 3 representa células T CD8+ específicas de antígeno de EGFRvIII inducidas por inmunización con *Listeria* recombinante.

La Figura 4 representa los resultados obtenidos de un ensayo de activación de células T B3Z después de la inmunización con *Listeria* recombinante.

La Figura 5 representa los resultados obtenidos del cribado de células T CD8+ para reactividad contra péptidos de EGFRvIII específicos después de la inmunización con *Listeria* recombinante.

La Figura 6 representa los resultados obtenidos de un ensayo de células T2 que mide la inducción de la expresión de clase I tras la unión del péptido EGFRvIII.

La Figura 7 representa la sensibilización potenciada de células T CD8+ después de la inmunización con *Listeria* recombinante que expresa múltiples copias de EGFRvIII20-40, con respecto a la variante de copia única.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere a composiciones y a sus usos en métodos para administración de inmunoterapia usando una bacteria que codifica y expresa una pluralidad de copias de un antígeno derivado de EGFRvIII.

Debe entenderse que la invención no está limitada en su aplicación a los detalles de construcción y a las disposiciones de los componentes expuestos en la siguiente descripción o ilustrados en los dibujos. La invención es capaz de realizaciones además de las descritas y de ponerse practicar y llevarse a cabo de diversas maneras. Asimismo, debe entenderse que la fraseología y la terminología empleadas en este documento, así como el resumen, son para los fines de la descripción y no deben considerarse como limitantes.

1. Definiciones

Las abreviaturas utilizadas para indicar una mutación en un gen, o una mutación en una bacteria que comprende el gen, son las siguientes. A modo de ejemplo, la abreviatura "*ΔactA de L. monocytogenes*" significa parte, o todo, el gen *actA* se había delecionado. El símbolo delta (Δ) significa deleción. Una abreviatura que incluye un signo menos superíndice (*Listeria ActA-*) significa que el gen *actA* estaba mutado, *por ejemplo*, por medio de una deleción, mutación puntual o mutación del marco de lectura, pero no se limita a este tipo de mutaciones.

"Administración", tal como se aplica a un ser humano, mamífero, sujeto mamífero, animal, sujeto veterinario, sujeto placebo, sujeto de investigación, sujeto experimental, célula, tejido, órgano o fluido biológico, se refiere, sin limitación, al contacto de un ligando exógeno, reactivo, placebo, molécula pequeña, agente farmacéutico, agente terapéutico, agente de diagnóstico o composición al sujeto, célula, tejido, órgano o fluido biológico y similares. "Administration" puede referirse, *por ejemplo*, a métodos terapéuticos, farmacocinéticos, diagnósticos, de investigación, placebo y experimentales. El tratamiento de una célula abarca el contacto de un reactivo con la célula, así como el contacto de un reactivo con un fluido, donde el fluido está en contacto con la célula. "Administración" también abarca tratamientos *in vitro* y *ex vivo*, *por ejemplo*, de una célula, por una composición de reactivo, diagnóstica, de unión o por otra célula.

Un "agonista" en lo que se refiere a un ligando y receptor, comprende una molécula, combinación de moléculas, un complejo o una combinación de reactivos, que estimula al receptor. Por ejemplo, un agonista del factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) puede abarcar GM-CSF, una muteína o derivado de GM-CSF, un péptido mimético de GM-CSF, una molécula pequeña que imita la función biológica de GM-CSF o un anticuerpo que estimula el receptor de GM-CSF.

Un "antagonista", en lo que se refiere a un ligando y receptor, comprende una molécula, combinación de moléculas,

o un complejo, que inhibe, contrarresta, regula por disminución y/o desensibiliza el receptor. "Antagonista" abarca cualquier reactivo que inhiba una actividad constitutiva del receptor. Una actividad constitutiva es aquella que se manifiesta en ausencia de una interacción ligando/receptor. "Antagonista" también abarca cualquier reactivo que inhiba o prevenga una actividad estimulada (o regulada) de un receptor. A modo de ejemplo, un antagonista del receptor de GM-CSF incluye, sin implicar ninguna limitación, un anticuerpo que se une al ligando (GM-CSF) y evita que se una al receptor, o un anticuerpo que se une al receptor y evita el ligando se une al receptor, o cuando el anticuerpo bloquea el receptor en una conformación inactiva.

Como se usa en el presente documento, un "análogo" o "derivado" con referencia a un péptido, polipéptido o proteína se refiere a otro péptido, polipéptido o proteína que posee una función similar o idéntica al péptido, polipéptido o proteína original, pero que no comprende necesariamente una estructura o secuencia de aminoácidos similar o idéntica del péptido, polipéptido o proteína original. Un análogo satisface, preferiblemente, al menos uno de los siguientes: (a) un agente proteínico que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos un 30 %, al menos un 35 %, al menos un 40%, al menos un 45%, al menos un 50%, al menos un 55%, al menos un 60%, al menos un 65%, al menos un 70%, al menos un 75%, al menos un 80%, al menos un 85%, al menos un 90%, al menos un 95 % o al menos un 99 % idéntica a la secuencia de aminoácidos original (b) un agente proteínico codificado por una secuencia de nucleótidos que hibrida en condiciones rigurosas con una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos original; y (c) un agente proteínico que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos un 30 %, al menos un 35 %, al menos un 40%, al menos un 45%, al menos un 50%, al menos un 55%, al menos un 60%, al menos un 65%, al menos un 70%, al menos un 75%, al menos un 80%, al menos un 85%, al menos un 90%, al menos un 95 % o al menos un 99 % idéntico a la secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos original.

Las "células presentadoras de antígeno" (APC) son células del sistema inmune que se utilizan para presentar antígenos a las células T. Las APC incluyen células dendríticas, monocitos, macrófagos, células de Kupffer de zona marginal, microglía, células de Langerhans, linfocitos T y los linfocitos B. Las células dendríticas se producen en al menos dos linajes. El primer linaje abarca pre-DC1, DC1 mieloides y DC1 maduras. El segundo linaje abarca células CD34⁺CD45RA⁺progenitoras multipotenciales tempranas, células CD34⁺CD45RA⁺, células Cpro- DC2 D34⁺CD45RA⁺CD4⁺ IL-3Rα⁺, células pre-DC2 CD4⁺CD11c⁺plasmacitoides, DC2 derivados de DC2 plasmacitoides humanas linfocíticas y DC2 maduras.

La "atenuación" y "atenuada" abarcan una bacteria, virus, parásito, organismo infeccioso, priones, células tumorales, gen en el organismo infeccioso y similares, que se modifican para reducir la toxicidad para un huésped. El huésped puede ser un huésped humano o animal, o un órgano, tejido o célula. La bacteria, para dar un ejemplo no limitante, puede atenuarse para reducir la unión a una célula huésped, para reducir la propagación de una célula huésped a otra célula huésped, para reducir el crecimiento extracelular o para reducir el crecimiento intracelular en una célula huésped. La atenuación puede evaluarse midiendo, por ejemplo, un índice o índice de toxicidad, la DL₅₀, la tasa de eliminación de un órgano o el índice competitivo (véase, por ejemplo, Auerbuch, *et al.* (2001) *Infect. Immunity* 69:5953-5957). En general, una atenuación produce un aumento en la DL₅₀, y/o un aumento en la tasa de eliminación en al menos un 25 %; más generalmente en al menos un 50 %; más generalmente en al menos un 100 % (2 veces); normalmente por al menos 5 veces; más normalmente por al menos 10 veces; más normalmente por al menos 50 veces; a menudo por al menos 100 veces; más a menudo por al menos 500 veces; y más a menudo por al menos 1.000 veces; habitualmente por al menos 5.000 veces; más habitualmente por al menos 10.000 veces; y más habitualmente por al menos 50.000 veces; y más a menudo por al menos 100.000 veces.

"Gen atenuado" abarca un gen que media la toxicidad, patología o virulencia, en un huésped, crecimiento dentro del huésped o supervivencia dentro del huésped, donde el gen está mutado de una manera que mitiga, reduce o elimina la toxicidad, y la patología o virulencia. La reducción o eliminación se puede evaluar comparando la virulencia o la toxicidad mediada por el gen mutado con la mediada por el gen no mutado (o parental). "Gen mutado" abarca deleciones, mutaciones puntuales y mutaciones de desplazamiento de marco en regiones reguladoras del gen, regiones codificantes del gen, regiones no codificantes del gen o cualquier combinación de las mismas.

"Variantes modificadas de forma conservadora" se aplica a secuencias tanto de aminoácidos como de ácido nucleico. Con respecto a secuencias de ácidos nucleicos concretas, una variante modificada de forma conservadora se refiere a ácidos nucleicos que codifican secuencias de aminoácidos idénticas o secuencias de aminoácidos que tienen una o más sustituciones conservadoras. Un ejemplo de una sustitución conservadora es el intercambio de un aminoácido en uno de los siguientes grupos por otro aminoácido del mismo grupo (patente de Estados Unidos n.º 5.767.063 expedida a Lee, *et al.*; Kyte y Doolittle (1982) *J. Mol. Biol.* 157:105-132).

- (1) Hidrófobos: Norleucina, Ile, Val, Leu, Phe, Cys, Met;
- (2) Hidrófilos neutros: Cys, Ser, Thr;
- (3) Ácidos: Asp, Glu;
- (4) Básicos: Asn, Gln, His, Lys, Arg;
- (5) Restos que influyen sobre la orientación de la cadena: Gly, Pro;
- (6) Aromáticos: Trp, Tyr, Phe; y
- (7) Pequeños aminoácidos: Gly, Ala, Ser.

"Cantidad eficaz" abarca, sin limitación, una cantidad que puede mejorar, invertir, mitigar, prevenir o diagnosticar un síntoma o signo de una afección o trastorno médico. Salvo que se indique otra cosa, explícitamente o por contexto, una "cantidad eficaz" no se limita a una cantidad mínima suficiente para mejorar una afección.

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

10 El término "fragmentos" en el contexto de polipéptidos incluye un péptido o polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de al menos 5 residuos de aminoácidos contiguos, al menos 10 residuos de aminoácidos contiguos, al menos 15 residuos de aminoácidos contiguos, al menos 20 residuos de aminoácidos contiguos, al menos 25 residuos de aminoácidos contiguos, al menos 40 residuos de aminoácidos contiguos, al menos 50
15 residuos de aminoácidos contiguos, al menos 60 residuos de aminoácidos contiguos, al menos 70 residuos de aminoácidos contiguos, al menos 80 residuos de aminoácidos contiguos, al menos 90 residuos de aminoácidos contiguos, al menos 100 residuos de aminoácidos contiguos, al menos 125 residuos de aminoácidos contiguos, al menos 150 residuos de aminoácidos contiguos, al menos 175 residuos de aminoácidos contiguos, al menos 200
20 residuos de aminoácidos contiguos o al menos 250 residuos de aminoácidos contiguos de la secuencia de aminoácidos de un polipéptido más grande.

"Gen" se refiere a una secuencia de ácido nucleico que codifica un oligopéptido o polipéptido. El oligopéptido o polipéptido puede ser biológicamente activo, antigénicamente activo, biológicamente inactivo o antigénicamente inactivo, y similares. El término gen abarca, por ejemplo, la suma de los marcos de lectura abiertos (ORF) que codifican un oligopéptido o polipéptido específico; la suma de los ORF más los ácidos nucleicos que codifican los
25 intrones; la suma de los ORF y el (los) promotor (es) operablemente unido(s); la suma de los ORF y el (los) promotor (es) operablemente unido(s) y cualquier intrón; la suma de los ORF y el (los) promotor (es) operablemente unido(s), intrón (s) y promotor (es), y otros elementos reguladores, tales como potenciador (es). En determinadas realizaciones, "gen" abarca cualquier secuencia requerida en cis para regular la expresión del gen. El término gen también puede referirse a un ácido nucleico que codifica un péptido que abarca un antígeno o un fragmento
30 antigénicamente activo de un péptido, oligopéptido, polipéptido o proteína. El término gen no implica necesariamente que el péptido o proteína codificados tenga actividad biológica o incluso que el péptido o proteína sea antigénicamente activo. Una secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia no expresable generalmente se considera un pseudogén. El término gen también abarca secuencias de ácido nucleico que codifican un ácido ribonucleico tal como ARNr, ARNt o una ribozima.

35 "Crecimiento" de una bacteria, tal como *Listeria*, abarca, sin limitación, las funciones de la fisiología bacteriana y los genes relacionados con la colonización, replicación, aumento en el contenido de proteína y/o aumento en el contenido de lípidos. A menos que se especifique lo contrario explícitamente o por contexto, el crecimiento de *Listeria* abarca el crecimiento de la bacteria fuera de una célula huésped y también el crecimiento dentro de una
40 célula huésped. Los genes relacionados con el crecimiento incluyen, sin implicar ninguna limitación, aquellos que median la producción de energía (por ejemplo, glucólisis, ciclo de Krebs, citocromos), anabolismo y/o catabolismo de aminoácidos, azúcares, lípidos, minerales, purinas y pirimidinas, transporte de nutrientes, transcripción, traducción y/o replicación. En algunas realizaciones, "crecimiento" de una bacteria *Listeria* se refiere al crecimiento intracelular de la bacteria *Listeria*, es decir, crecimiento dentro de una célula huésped, tal como una célula de mamífero.
45 Mientras que el crecimiento intracelular de una bacteria *Listeria* se puede medir mediante microscopía óptica o unidades formadoras de colonias (UFC), el crecimiento no debe limitarse con ninguna técnica de medición. Los parámetros bioquímicos, tales como la cantidad de un antígeno 1 de *Listeria*, la secuencia de ácido nucleico 1 de *Listeria*, o lípido específico de la bacteria *Listeria*, se pueden usar para evaluar el crecimiento. En algunas realizaciones, un gen que participa en el crecimiento es uno que participa específicamente en el crecimiento intracelular. En algunas realizaciones, un gen que media específicamente en el crecimiento intracelular abarca, aunque sin limitación, un gen en el que la inactivación del gen reduce la tasa de crecimiento intracelular pero no reduce de forma detectable, sustancial o apreciable la tasa de crecimiento extracelular (por ejemplo, crecimiento en caldo), o un gen en el que la inactivación del gen reduce la tasa de crecimiento intracelular en mayor medida que reduce la tasa de crecimiento extracelular. Para proporcionar un ejemplo no limitante, en algunas realizaciones, un
50 gen en el que la inactivación reduce la tasa de crecimiento intracelular en mayor medida que el crecimiento extracelular abarca la situación en la que la inactivación reduce el crecimiento intracelular a menos del 50 % del valor normal o máximo, pero reduce crecimiento extracelular a solo 1-5 %, 5-10 % o 10-15 % del valor máximo. La invención, en ciertos aspectos, abarca una *Listeria* atenuada en el crecimiento intracelular pero no atenuada en el crecimiento extracelular, una *Listeria* no atenuada en el crecimiento intracelular y no atenuada en el crecimiento extracelular, así como una *Listeria* no atenuada en el crecimiento intracelular pero atenuada en el crecimiento extracelular.
60

Un "análisis de hidropatía" se refiere al análisis de una secuencia polipeptídica por el método de Kyte y Doolittle: "A Simple Method for Displaying the Hydropathic Character of a Protein". J. Mol. Biol. 157(1982):105-132. En este método, a cada aminoácido se le asigna una puntuación de hidrofobicidad entre 4,6 y -4,6. Una puntuación de 4,6 es el más hidrofóbico y una puntuación de -4,6 es el más hidrofílico. Entonces se establece un tamaño de ventana. Un
65

tamaño de ventana es el número de aminoácidos cuyas puntuaciones de hidrofobicidad se promedian y se asignan al primer aminoácido en la ventana. El cálculo comienza con la primera ventana de aminoácidos y calcula el promedio de todas las puntuaciones de hidrofobicidad en esa ventana. Luego, la ventana baja un aminoácido y calcula el promedio de todas las puntuaciones de hidrofobicidad en la segunda ventana. Este patrón continúa hasta el final de la proteína, calculando la puntuación promedio para cada ventana y asignándola al primer aminoácido en la ventana. A continuación, los promedios se trazan en un gráfico. El eje y representa las puntuaciones de hidrofobicidad y el eje x representa el número de ventana. Las siguientes puntuaciones de hidrofobicidad se utilizan para los 20 aminoácidos comunes.

Arg:	-4,5	Ser:	-0,8	Lys:	-3,9
Tre:	-0,7	Asn:	-3,5	Gly:	-0,4
Asp:	-3,5	Ala:	1,8	Gln:	-3,5
Met:	1,9	Glu:	-3,5	Cys:	2,5
His:	-3,2	Phe:	2,8	Pro:	-1,6
Leu:	3,8	Tyr:	-1,3	Val:	4,2
Trp:	-0,9	Ile:	4,5		

Una composición que está "marcada" es detectable, tanto directa como indirectamente, por métodos espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, inmuoquímicos, isotópicos o químicos. Por ejemplo, los marcadores útiles incluyen ^{32}P , ^{33}P , ^{35}S , ^{14}C , ^3H , ^{125}I , isótopos estables, marcadores epitópicos, colorantes fluorescentes, reactivos densos en electrones, sustratos o enzimas, por ejemplo, como se usan en inmunoensayos ligados a enzimas, o fluorados (véase, por ejemplo, Rozinov y Nolan (1998) Chem. Biol. 5:713-728).

"Ligando" se refiere a una molécula pequeña, péptido, polipéptido o molécula asociada a la membrana o unida a la membrana, que es un agonista o antagonista de un receptor. "Ligando" también abarca un agente de unión que no es un agonista o antagonista, y no tiene propiedades agonistas o antagonistas. Por convención, cuando un ligando está unido a la membrana en una primera célula, el receptor normalmente se produce en una segunda célula. La segunda célula puede tener la misma identidad (el mismo nombre), o puede tener una identidad diferente (un nombre diferente), como la primera célula. Un ligando o receptor puede ser completamente intracelular, es decir, puede residir en el citosol, el núcleo o en algún otro compartimento intracelular. El ligando o receptor puede cambiar su ubicación, por ejemplo, desde un compartimento intracelular a la cara externa de la membrana plasmática. El complejo de un ligando y receptor se denomina un "complejo receptor ligando". Cuando un ligando y un receptor están implicados en una ruta de señalización, el ligando se produce en una posición corriente arriba y el receptor se produce en una posición corriente abajo de la ruta de señalización.

"Ácido nucleico" se refiere a desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos y polímeros de los mismos en forma monocatenaria, bicatenaria o multicatenaria. Los ejemplos no limitantes de un ácido nucleico son, por ejemplo, ADNc, ARNm, oligonucleótido y polinucleótido. Una secuencia de ácido nucleico particular también puede incluir implícitamente "variantes alélicas" y "variantes de corte y empalme".

"Unido operativamente" en el contexto de un promotor y un ácido nucleico que codifica un ARNm significa que el promotor puede usarse para iniciar la transcripción de ese ácido nucleico.

Los términos "porcentaje de identidad de secuencia" y "% de identidad de secuencia" se refieren al porcentaje de similitud de secuencia encontrado mediante una comparación o alineación de dos o más secuencias de aminoácidos o de ácidos nucleicos. El porcentaje de identidad se puede determinar mediante una comparación directa de la información de secuencia entre dos moléculas alineando las secuencias, contando el número exacto de coincidencias entre las dos secuencias alineadas, dividiendo por la longitud de la secuencia más corta, y multiplicando el resultado por 100. Un algoritmo para calcular el porcentaje de identidad es el algoritmo de búsqueda de homología de Smith-Waterman (véase, por ejemplo, Kann y Goldstein (2002) Proteins 48:367-376; Arslan, et al. (2001) Bioinformatics 17:327-337).

Por "purificado" y "aislado" se entiende, cuando se hace referencia a un polipéptido, que el polipéptido está presente en ausencia sustancial de las otras macromoléculas biológicas con las que está asociado en la naturaleza. El término "purificado" como se usa en este documento significa que un polipéptido identificado a menudo representa al menos el 50 %, más a menudo representa al menos el 60 %, normalmente representa al menos el 70 %, más normalmente representa al menos el 75 %, lo más normalmente representa al menos el 80 %, habitualmente representa al menos el 85 %, más habitualmente representa al menos el 90 %, de la forma más habitual representa al menos el 95 % y convencionalmente representa al menos 98 % en peso, o más, de los polipéptidos presentes. Los pesos de agua, tampones, sales, detergentes, agentes reductores, inhibidores de la proteasa, estabilizantes (incluida una proteína añadida tal como albúmina) y excipientes y moléculas que tienen un peso molecular inferior a 1.000, generalmente no se usan en la determinación de la pureza del polipéptido. Véase, por ejemplo, la discusión sobre pureza en la patente de Estados Unidos n.º 6.090.611 emitida a Covacci, *et al.*

- "Péptido" se refiere a una secuencia corta de aminoácidos, donde los aminoácidos están conectados entre sí mediante enlaces peptídicos. Un péptido puede encontrarse libre o unido a otro resto, tal como una macromolécula, lípidos, oligo o polisacárido y/o un polipéptido. Cuando se incorpora un péptido en una cadena polipeptídica, el término "péptido" todavía puede usarse para referirse específicamente a la secuencia corta de aminoácidos. Un
- 5 "péptido" puede estar conectado a otro resto por medio de un enlace peptídico o algún otro tipo de enlace. Un péptido tiene al menos dos aminoácidos de longitud y generalmente menos de aproximadamente 25 aminoácidos de longitud, donde la longitud máxima es una función de la costumbre o el contexto. Los términos "péptido" y "oligopéptido" pueden usarse indistintamente.
- 10 "Proteína" generalmente se refiere a la secuencia de aminoácidos que comprende una cadena polipeptídica. La proteína también puede referirse a una estructura tridimensional del polipéptido. "Proteína desnaturalizada" se refiere a un polipéptido parcialmente desnaturalizado, que tiene alguna estructura tridimensional residual o, como alternativa, a una estructura tridimensional esencialmente aleatoria, es decir, totalmente desnaturalizada. La invención incluye reactivos de, y métodos que usan, variantes polipeptídicas, por ejemplo, que implican glicosilación,
- 15 fosforilación, sulfatación, formación de enlaces disulfuro, desamidación, isomerización, puntos de escisión en el procesamiento de la secuencia señal o líder, cofactores unidos de forma covalentes y no covalente, variantes oxidadas, y similares. La formación de proteínas unidas a disulfuro se describe (véase, por ejemplo, Woycechowsky y Raines (2000) *Curr. Opin. Chem. Biol.* 4:533-539; Creighton, *et al.* (1995) *Trends Biotechnol.* 13:18-23).
- 20 "Recombinante" cuando se utiliza en referencia, por ejemplo, a un ácido nucleico, célula, animal, virus, plásmido, vector o similar, indica modificación mediante la introducción de un ácido nucleico exógeno no nativo, alteración de un ácido nucleico nativo o por derivación en su totalidad o en parte de un ácido nucleico recombinante, célula, virus, plásmido o vector. La proteína recombinante se refiere a una proteína derivada, por ejemplo, de un ácido nucleico recombinante, virus, plásmido, vector o similar. "Bacteria recombinante" abarca una bacteria en la que el genoma se modifica por ingeniería genética mediante métodos recombinantes, por ejemplo, mediante una mutación, delección,
- 25 inserción y/o reordenación. "Bacteria recombinante" también abarca una bacteria modificada para que incluya un ácido nucleico extragenómico recombinante, por ejemplo, un plásmido o un segundo cromosoma, o una bacteria en la que se altera un ácido nucleico extragenómico existente.
- 30 "Muestra" se refiere a una muestra de un ser humano, animal, placebo o muestra de investigación, por ejemplo, una célula, tejido, órgano, fluido, gas, aerosol, suspensión, coloide o material coagulado. La "muestra" puede analizarse *in vivo*, por ejemplo, sin eliminación del ser humano o animal, o puede probarse *in vitro*. La muestra se puede analizar después del procesamiento, por ejemplo, mediante métodos histológicos. "Muestra" también se refiere, por ejemplo, a una célula que comprende una muestra de fluido o de tejido o una célula separada de una muestra de
- 35 fluido o tejido. "Muestra" también se refiere a una célula, tejido, órgano o fluido recién extraído de un ser humano o animal, o a una célula, tejido, órgano o fluido que se procesa o almacena.
- Un "marcador seleccionable" abarca un ácido nucleico que permite seleccionar a favor o en contra de una célula que contiene el marcador seleccionable. Los ejemplos de marcadores seleccionables incluyen, sin limitación, por
- 40 ejemplo: (1) Un ácido nucleico que codifica un producto que proporciona resistencia a un compuesto por lo demás tóxico (por ejemplo, un antibiótico) o que codifica susceptibilidad a un compuesto inofensivo (por ejemplo, sacarosa); (2) Un ácido nucleico que codifica un producto que, de otro modo, está ausente en la célula receptora (por ejemplo, genes de ARNt, marcadores auxotróficos); (3) Un ácido nucleico que codifica un producto que suprime una actividad de un producto génico; (4) Un ácido nucleico que codifica un producto que puede identificarse fácilmente (por
- 45 ejemplo, marcadores fenotípicos tales como beta-galactosidasa, proteína fluorescente verde (GFP), proteínas de superficie celular, un marcador de epítipo, un marcador FLAG); (5) Un ácido nucleico que puede identificarse mediante técnicas de hibridación, por ejemplo, PCR o balizas moleculares.
- "Específicamente" o "selectivamente" se une, cuando se refiere a un ligando/receptor, ácido nucleico/ácido nucleico
- 50 complementario, anticuerpo/antígeno u otro par de unión (por ejemplo, una citocina a un receptor de citocina) indica una reacción de unión que es determinante de la presencia de la proteína en una población heterogénea de proteínas y otros productos biológicos. Por lo tanto, en las condiciones designadas, el ligando especificado se une a un receptor concreto y no se une en una cantidad significativa a otras proteínas presentes en la muestra. La unión específica también puede significar, por ejemplo, que el compuesto de unión, el ligando de ácido nucleico, el
- 55 anticuerpo o la composición de unión derivada del sitio de unión a antígeno de un anticuerpo, del método contemplado se une a su objetivo con una afinidad que a menudo es al menos un 25 % mayor, más a menudo al menos un 50 % mayor, más a menudo al menos un 100 % (2 veces) mayor, normalmente al menos diez veces mayor, más normalmente al menos 20 veces mayor y la mayoría de las veces al menos 100 veces mayor que la afinidad con cualquier otro compuesto de unión.
- 60 En una realización típica, un anticuerpo tendrá una afinidad que es mayor que aproximadamente 10^9 litros/mol, tal como se determina, por ejemplo, mediante análisis de Scatchard (Munsen, *et al.* (1980) *Analyt. Biochem.* 107:220-239). El experto en la técnica reconoce que algunos compuestos de unión pueden unirse específicamente a más de un objetivo, por ejemplo, un anticuerpo se une específicamente a su antígeno, a lectinas por medio del oligosacárido
- 65 del anticuerpo, y/o a un receptor de Fc por medio de la región Fc del anticuerpo.

La "propagación" de una bacteria abarca la "propagación de célula a célula", es decir, la transmisión de la bacteria de una primera célula huésped a una segunda célula huésped, tal como está mediada, por ejemplo, por una vesícula. Las funciones relacionadas con la propagación incluyen, pero sin limitación, por ejemplo, la formación de una cola de actina, la formación de una extensión de tipo pseudópodo y la formación de una vacuola de doble membrana.

El término "sujeto", como se usa en el presente documento, se refiere a un organismo humano o no humano. Por lo tanto, los métodos y composiciones descritos en el presente documento son aplicables tanto a enfermedades humanas como a enfermedades veterinarias. En determinadas realizaciones, los sujetos son "pacientes", es decir, seres humanos vivos que están recibiendo atención médica para una enfermedad o afección. Esto incluye personas sin una enfermedad definida que están siendo investigadas por signos de patología. Se prefieren los sujetos que tienen una neoplasia maligna que expresa EGFRvIII. En determinadas realizaciones, el sujeto padece un glioma (por ejemplo, un GBM), un carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello, un cáncer colorrectal o un cáncer de mama.

El "sitio diana" de una recombinasa es la secuencia o región de ácido nucleico que es reconocida, unida y/o sobre la que actúa la recombinasa (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos n.º 6.379.943 emitida a Graham, et al.; Smith y Thorpe (2002) *Mol. Microbiol.* 44:299, 307; Groth y Calos (2004) *J. Mol. Biol.* 335:667-678; Nunes-Duby, et al. (1998) *Nucleic Acids Res.* 26:391-406).

"Cantidad terapéuticamente efectiva" se define como una cantidad de un reactivo o composición farmacéutica que es suficiente para mostrar un beneficio para el paciente, es decir, para causar una disminución, prevención o mejora de los síntomas de la afección que se está tratando. Cuando el agente o composición farmacéutica comprende un agente de diagnóstico, una "cantidad diagnóstica eficaz" se define como una cantidad que es suficiente para producir una señal, imagen u otro parámetro de diagnóstico. Las cantidades eficaces de la formulación farmacéutica variarán de acuerdo con factores tales como el grado de susceptibilidad del individuo, la edad, el sexo y el peso del individuo, y las respuestas idiosincrásicas del individuo (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos n.º 5,888,530 emitida a Netti, *et al.*).

"Tratamiento" o "tratar" (con respecto a una afección o una enfermedad) es un enfoque para obtener resultados beneficiosos o deseados, incluyendo, y preferiblemente, resultados clínicos. Para los fines de la presente invención, los resultados beneficiosos o deseados con respecto a una enfermedad incluyen, pero sin limitación, uno o más de los siguientes: mejorar una afección asociada con una enfermedad, curar una enfermedad, disminuir la gravedad de una enfermedad, retrasar la progresión de una afección., aliviar uno o más síntomas asociados con una enfermedad, aumentar la calidad de vida de una persona que padece una enfermedad y/o prolongar la supervivencia. Asimismo, para los fines de la presente invención, los resultados beneficiosos o deseados con respecto a una afección incluyen, pero sin limitación, uno o más de los siguientes: mejorar una afección, curar una afección, disminuir la gravedad de una afección, retrasar la progresión de una afección, aliviar uno o más síntomas asociados con una afección, aumentar la calidad de vida de una persona que padece una afección y/o prolongar la supervivencia.

"Vacuna" abarca vacunas preventivas. La vacuna también abarca vacunas terapéuticas, por ejemplo, una vacuna administrada a un mamífero que comprende una afección o trastorno asociado con el antígeno o epítipo proporcionado por la vacuna.

2. Antígenos de EGFRvIII de ejemplo

El antígeno EGFRvIII puede comprender una secuencia que codifica al menos un epítipo de MHC de clase I y/o al menos un epítipo de MHC de clase II. El algoritmo predictivo "BIMAS" clasifica los posibles epítopos de unión a HLA de acuerdo con la disociación a la mitad predictiva de los complejos péptido/HLA. El algoritmo "SYFPEITHI" clasifica los péptidos de acuerdo con una puntuación que da cuenta de la presencia de residuos de anclaje de unión a HLA primarios y secundarios. Ambos algoritmos computarizados puntúan epítopos candidatos basados en secuencias de aminoácidos dentro de una proteína dada que tienen motivos de unión similares a los epítopos de unión a HLA publicados previamente. Otros algoritmos también se pueden usar para identificar candidatos para pruebas biológicas adicionales.

Tal como se ha señalado anteriormente, los péptidos antigénicos del EGFRvIII comprenden una pluralidad (2, 3, 4, 5 o más copias) de secuencias polipeptídicas de EGFRvIII, cuya secuencia polipeptídica comprende EEKKGNYV (SEQ ID NO: 3). Esta secuencia representa un epítipo restringido a H2-Kk. Una secuencia de EGFRvIII preferida comprende una pluralidad de copias de la secuencia PASRALEEKKGNYVVDHGSC (SEQ ID NO: 4), denominada en el presente documento EGFRvIII₂₀₋₄₀. Esta secuencia 21-AA se superpone a la nueva unión creada por la delección 267-AA relativa al EGFR nativo. Esto también aumenta la posibilidad de encontrar un epítipo de unión de clase I que incluye la nueva glicina en el sitio de corte y empalme de EGFRvIII (45 únicos neopéptidos de 7 a 11-AA dentro de EGFRvIII₂₀₋₄₀ frente a 22 posibles péptidos de unión de clase I en PEPvIII), sin incluir cantidades excesivas de la secuencia de EGFR nativa. Además, este péptido de EGFRvIII expandido aumenta el número de epítopos potenciales de unión de clase II (30 neopéptidos > 9-AA en EGFRvIII₂₀₋₄₀ frente a 11 en PEPvIII) aunque la potencia de la vacuna no depende necesariamente de la presencia de epítopos restringidos de clase II específicos de

EGFRvIII.

Como se describe a continuación en el presente documento, la dosificación de antígeno es un determinante crítico de la potencia de la vacuna. Para maximizar el número de complejos de MHC-péptido EGFRvIII después de la vacunación, se prefiere que se incluyan al menos 5 copias de la secuencia polipeptídica de EGFRvIII en una única construcción de proteína, con cada copia separada por una secuencia que se ha predicho que facilita la escisión proteasómica. Como ejemplo, dicha secuencia de aminoácidos puede ser ASKVLPASRALEEKKGNYVVDHGSCADGSVKTSASKVAPASRALEEKKGNYV VTDHGSCGDGSIKLSKVLPASRALEEKKGNYVVDHGSCADGSVKASKVAPASR ALEEKKGNYVVDHGSCGDGSIKLSKVLPASRALEEKKGNYVVDHGSCADGS VKTS (SEQ ID NO: 15). En aras de la claridad, en esta secuencia, las secuencias polipeptídicas derivadas de EGFRvIII a modo de ejemplo están subrayadas, y las secuencias "escindibles" de ejemplo no están subrayadas.

Por "inmunogénico" como se usa este término en el presente documento se entiende que el antígeno es capaz de provocar una respuesta humoral o de células T específica de antígeno (CD4+ y/o CD8+). La selección de uno o más antígenos o derivados de los mismos para su uso en las composiciones de vacuna de la presente invención se puede realizar de varias formas, incluida una evaluación de la capacidad de una bacteria de elección para expresar y secretar con éxito el (los) antígeno (s) recombinante (s); y/o la capacidad del (los) antígeno (s) recombinante (s) para iniciar una respuesta de células T CD4+ y/o CD8+ específicas de antígeno. Como se trata adicionalmente más adelante, para llegar a una selección final del(los) antígeno (s) para su uso con un vehículo de administración bacteriana particular, estos atributos del (los) antígeno (s) recombinante (s) se combinan, preferentemente, con la capacidad de la plataforma de vacuna completa (es decir, el sistema de expresión bacteriana para el (los) antígeno (s) seleccionado (s)) para iniciar tanto la respuesta inmune innata como también una respuesta de célula T específica de antígeno contra el antígeno (s) expresado recombinantemente. Se puede realizar una determinación inicial de antígenos adecuados seleccionando antígeno (s) o fragmento (s) de antígeno que se expresan recombinantemente de forma satisfactoria por el huésped bacteriano de elección (por ejemplo, *Listeria*), y que son inmunogénicos.

La detección directa de la expresión del antígeno recombinante por transferencia Western se puede realizar usando un anticuerpo que detecta la secuencia antigénica que se produce recombinantemente, o usando un anticuerpo que detecta una secuencia incluida (un "marcador") que se expresa con el antígeno derivado de EGFRvIII como una proteína de fusión. Por ejemplo, el (los) antígeno (s) se pueden expresar como fusiones con una porción N-terminal de la proteína ActA de *Listeria* y un anticuerpo anti-ActA producido contra un péptido sintético (ATDSEDSSLNTDEWEEEEK (SEQ ID NO: 27)) correspondiente a los 18 aminoácidos N terminales maduros de ActA pueden usarse para detectar el producto proteico expresado.

Los ensayos para probar la inmunogenicidad de antígenos se describen en este documento y son bien conocidos en la técnica. Como ejemplo, un antígeno producido recombinantemente por una bacteria de elección puede construirse opcionalmente de modo que contenga la secuencia de nucleótidos que codifica un péptido de ocho aminoácidos SIINFEKL (SEQ ID NO: 28) (también conocido como SL8 y ovoalbúmina²⁵⁷⁻²⁶⁴), colocado en el marco en el extremo carboxilo del antígeno. Las composiciones tales como el epítipo C-terminal SL8 sirven como sustituto (i) para demostrar que el antígeno recombinante se expresa en su totalidad desde el extremo N al extremo C, y (ii) para demostrar la capacidad de las células presentadoras de antígeno para presentar el antígeno recombinante a través de la vía del MHC de clase I, utilizando un ensayo de presentación de antígeno *in vitro*. Tal ensayo de presentación se puede realizar usando la línea de células dendríticas derivada de C57BL/6 DC2.4 junto con la línea celular de hibridoma de células T B3Z como se describe más adelante.

Como alternativa, o además, la inmunogenicidad se puede analizar usando un ensayo ELISPOT como se describe más adelante. Los ensayos ELISPOT se desarrollaron originalmente para enumerar las células B que secretan anticuerpos específicos de antígeno, pero posteriormente se han adaptado para diversas tareas, especialmente la identificación y enumeración de células productoras de citoquinas a nivel de célula individual. Los bazos se pueden recoger de animales inoculados con una vacuna bacteriana apropiada y los esplenocitos aislados se pueden incubar durante la noche con o sin péptidos derivados del uno o más antígenos de EGFRvIII expresados por la vacuna bacteriana. Un anticuerpo inmovilizado captura cualquier IFN- γ secretado, lo que permite la medición posterior de IFN- γ secretado y la evaluación de la respuesta inmune a la vacuna.

3. Sistemas de expresión recombinante: la "plataforma de la vacuna"

La selección de una plataforma de vacuna para la administración de antígenos es un componente crítico para una vacuna eficaz. Los vectores recombinantes se preparan usando técnicas estándar conocidas en la materia y contienen elementos de control adecuados unidos operativamente a la secuencia de nucleótidos que codifica el antígeno diana. Véase, por ejemplo, Plotkin, *et al.* (eds.) (2003) *Vaccines*, 4ª ed., W.B. Saunders, Co., Phila., PA.; Sikora, *et al.* (eds.) (1996) *Tumor Immunology* Cambridge University Press, Cambridge, Reino Unido; Hackett y Harn (eds.) *Vaccine Adjuvants*, Humana Press, Totowa, NJ; Isaacson (eds.) (1992) *Recombinant DNA Vaccines*, Marcel Dekker, NY, NY; Morse, *et al.* (eds.) (2004) *Handbook of Cancer Vaccines*, Humana Press, Totowa, NJ), Liao, *et al.* (2005) *Cancer Res.* 65:9089-9098; Dean (2005) *Expert Opin. Drug Deliv.* 2:227-236; Arlen, *et al.* (2003) *Expert Rev.*

Vaccines 2:483-493; Dela Cruz, *et al.* (2003) Vaccine 21:1317-1326; Johansen, *et al.* (2000) Eur. J. Pharm. Biopharm. 50:413-417; Excler (1998) Vaccine 16:1439-1443; Disis, *et al.* (1996) J. Immunol. 156:3151-3158). Se describen vacunas peptídicas (véase, por ejemplo, McCabe, *et al.* (1995) Cancer Res. 55:1741-1747; Minev, *et al.* (1994) Cancer Res. 54:4155-4161; Snyder, *et al.* (2004) J. Virology 78:7052-7060.

5 Los vectores de administración de antígenos derivados de virus adecuados incluyen virus, virus modificados y partículas víricas. Los vectores derivados de virus pueden administrarse directamente a un sujeto mamífero, o pueden introducirse *ex vivo* en una célula presentadora de antígeno (APC), donde la APC se administra luego al sujeto. Los vectores virales pueden basarse en, por ejemplo, togavirus, incluyendo alfavirus y flavivirus; alfavirus, tal como el virus Sindbis, la cepa SAAR86 de Sindbis, el virus del bosque Semliki (SFV), la encefalitis equina venezolana (EEV), la encefalitis equina oriental (EEE), la encefalitis equina occidental, el virus Ross River, el virus Sagiyami, el virus O'Nyong-nyong, El virus Highlands J. flavivirus, tales como el virus de la fiebre amarilla, la cepa 17D de la fiebre amarilla, encefalitis japonesa, encefalitis de San Luis, encefalitis transmitida por garrapatas, el virus del dengue, el virus del Nilo occidental, el virus Kunjin (subtipo del virus del Nilo occidental); arterivirus, tal como el virus de la arteritis equina; y rubivirus, tales como virus de la rubéola, herpesvirus, vaccinia Ankara modificado (MVA); vector viral de viruela aviar; vector de la viruela de las aves de corral; vector de virus vaccinia; vector del virus de la gripe; vector adenoviral, vector del virus del papiloma humano; vector del virus del papiloma bovino y así sucesivamente. Los vectores víricos pueden basarse en un ortopoxvirus, tal como el virus de variola (viruela), el virus vaccinia (vacuna contra la viruela), Ankara (MVA) o la cepa Copenhagen, la viruela del camello, la viruela del simio o la viruela bovina. Los vectores víricos pueden basarse en un virus avipoxvirus, tal como el virus de la viruela aviar o el virus de la viruela del canario.

Se encuentran disponibles vectores adenovirales y vectores de virus adenoasociados (AAV), donde los vectores adenovirales incluyen adenovirus de serotipo 5 (adeno5; Ad5), adeno6, adeno11 y adeno35. Están disponibles al menos 51 serotipos de adenovirus humanos, clasificados en seis subgrupos (subgrupos A, B, C, D, E y F). Las proteínas de adenovirus útiles, por ejemplo, para evaluar la respuesta inmune a un vector adenoviral "vacío", incluyen proteína hexónica, tales como la proteína hexónica 3, proteína de fibra y proteínas de base pentónica, y se han descrito respuestas inmunes humanas a proteínas adenovirales (véase, por ejemplo, Wu, *et al.* (2002) J. Virol. 76:12775-12782; Mascola (2006) Nature 441:161-162; Roberts, *et al.* (2006) Nature 441:239-243). La siguiente tabla describe vectores de vacuna derivados de virus a modo de ejemplo para su uso en la presente invención:

vectores adenovirales y vectores asociados con adenovirus (AAV).	Polo y Dubensky (2002) Drug Discovery Today 7:719-727; Xin, <i>et al.</i> (2005) Gene Ther. 12:1769-1777; Morenweiser (2005) Gene Ther. 12 (Suppl. 1) S103-S110; Casimiro, <i>et al.</i> (2005) J. Virol. 79:15547, 15555; Ferreira, <i>et al.</i> (2005) Gene Ther. 12 Suppl. 1:S73-S83; Baez-Astua, <i>et al.</i> (2005) J. Virol. 79:12807-12817; Vanniasinkam y Ert1 (2005) Curr. Gene Ther. 5:203-212; Tatsis y Ert1 (2004) Mol. Ther. 10:616-629; Santosuosso, <i>et al.</i> (2005) Viral Immunol. 18:283-291; Zhou, <i>et al.</i> (1996) J. Virol. 70:7030-7038; Zhou, <i>et al.</i> (2002) J. Gene Med. 4:498-509.
Virus vaccinia	Kim, <i>et al.</i> (2005) Hum. Gen. Ther. 16:26-34; Kaufman, <i>et al.</i> (2005) J. Clin. Invest. 115:1903-1912; Kaufman, <i>et al.</i> (2004) J. Clin. Oncol. 22:2122-2132; Marshall, <i>et al.</i> (2005) J. Clin. Invest. 23:720-731; Hwang y Sanda (1999) Curr. Opin. Mol. Ther. 1:471-479; Baldwin, <i>et al.</i> (2003) Clin. Cancer Res. 9:5205-5213;
Vaccinia Ankara modificado (MVA)	Mackova, <i>et al.</i> (2006) Cancer Immunol. Immunother. 55:39-46; Meyer, <i>et al.</i> (2005) Cancer Immunol. Immunother. 54:453-467; Palmowski, <i>et al.</i> (2002) J. Immunol. 168:4391-4398;
Vaccinia derivative NYVAC	Paoletti (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:11349-11353;
Virus de la viruela, incluyendo viruela aviar, por ejemplo, viruela aviar y viruela del canario	Kaufman (2005) J. Clin. Oncol. 23:659-661; Kudo-Saito, <i>et al.</i> (2004) Clin. Cancer Res. 10:1090-1099; Greiner, <i>et al.</i> (2002) Cancer Res. 62:6944-6951; Marshall, <i>et al.</i> (2005) J. Clin. Invest. 23:720, 731; Hwang y Sanda (1999) Curr. Opin. Mol. Ther. 1:471-479; Hodge, <i>et al.</i> (1997) Vaccine 15:759-768; Skinner, <i>et al.</i> (2005) Expert Rev. Vaccines 4:63-76; Rosenberg, <i>et al.</i> (2003) Clin. Cancer Res. 9:2973-2980.
Células presentadoras de antígenos transducidas con un vector derivado de virus.	Di Nicola, <i>et al.</i> (2004) Clin. Cancer Res. 10:5381-5390;
Vectores derivados de alfavirus, por ejemplo, virus Sindbis, virus del bosque Semliki y virus de la encefalitis equina venezolana (VEE).	Polo y Dubensky (2002) Drug Discovery Today 7:719-727; Polo, <i>et al.</i> (1999) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96:4598-4603; Schlesinger (2001) Expert Opin. Biol. Ther. 1:177-191; Pan, <i>et al.</i> (2005) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102:11581-11588; Lundstrom (2003) Expert Rev. Vaccines 2:447-459; Shafferman, <i>et al.</i> (1996) Adv. Exp. Med. Biol. 397:41-47; Yamanaka (2004) Int. J. Oncol. 24:919-923; Atkins, <i>et al.</i> (2004) Curr. Cancer Drug Targets 4:597-607.

Vectores derivados de virus quiméricos, tales como alfavirus quiméricos.	virus Sindbis/virus de la encefalitis equina venezolana (SING/VEEV) (véase, por ejemplo, Perri, <i>et al.</i> (2003) <i>J. Virol.</i> 77:10394-10403; Paessler, <i>et al.</i> (2003) <i>J. Virol.</i> 77:9278-9286).
Herpesvirus, incluyendo el virus del herpes simple y	Hellebrand, <i>et al.</i> (2006) <i>Gene Ther.</i> 13:150-162; Lauterbach, <i>et al.</i> (2005) <i>J. Gen. Virol.</i> 86:2401-2410; Zibert, <i>et al.</i> (2005) <i>Gene Ther.</i> 12:1707-1717; Thiry, <i>et al.</i> (2006) <i>Vet. Microbiol.</i> 113:171-177;
Vectores derivados del virus de Epstein-Barr	Trapp, <i>et al.</i> (2005) <i>J. Virol.</i> 79:5445-5454.
Rhinovirus	Dollenmaier, <i>et al.</i> (2001) <i>Virology</i> 281:216-230; Arnold, <i>et al.</i> (1996) <i>Intervirology</i> 39:72-78.
Lentivirus	DePolo, <i>et al.</i> (2000) <i>Mol. Ther.</i> 2:218-222; Pellinen, <i>et al.</i> (2004) <i>Int. J. Oncol.</i> 25:1753-1762; Esslinger, <i>et al.</i> (2003) <i>J. Clin. Invest.</i> 111:1673-1681; Kikuchi, <i>et al.</i> (2004) <i>Clin. Cancer Res.</i> 10:1835, 1842; Kim, <i>et al.</i> (2005) <i>Hum. Gene Ther.</i> 16:1255-1266.
Vacunas de partículas víricas	Polo y Dubensky (2002) <i>Drug Discovery Today</i> 7:719-727; Cheng, <i>et al.</i> (2002) <i>Hum. Gene Ther.</i> 13:553-568; Lin, <i>et al.</i> (2003) <i>Mol. Ther.</i> 8:559-566; Balasuriya, <i>et al.</i> (2000) <i>J. Virol.</i> 74:10623-10630; Goldberg, <i>et al.</i> (2005) <i>Clin. Cancer Res.</i> 11:8114-8121; Johnston, <i>et al.</i> (2005) <i>Vaccine</i> 23:4969-4979; Quinnan, <i>et al.</i> (2005) <i>J. Virol.</i> 79:3358-3369; Casseti, <i>et al.</i> (2004) <i>Vaccine</i> 22:520-527; Williamson, <i>et al.</i> (2003) <i>AIDS Res. Hum. Retroviruses</i> 19:133-144; Perri, <i>et al.</i> (2003) <i>J. Virol.</i> 77:10394-10403; Da Silva, <i>et al.</i> (2003) <i>Vaccine</i> 21:3219-3227;

- Los vectores de células presentadoras de antígeno (APC), tal como un vector de células dendríticas (DC), incluyen células que están cargadas con un antígeno, cargadas con un lisado tumoral o transfectadas con una composición que comprende un ácido nucleico, donde el ácido nucleico puede ser, por ejemplo, un plásmido, ARN o virus. Las vacunas de fusión de DC/tumor también pueden usarse. Véase, por ejemplo, Di Nicola, *et al.* (2004) *Clin. Cancer Res.* 10:5381-5390; Cerundolo, *et al.* (2004) *Nature Immunol.* 5:7-10; Parmiani, *et al.* (2002) *J. Natl. Cancer Inst.* 94:805-818; Kao, *et al.* (2005) *Immunol. Lett.* 101:154-159; Geiger, *et al.* (2005) *J. Transl. Med.* 3:29; Osada, *et al.* (2005) *Cancer Immunol. Immunother.* 5 y 1-10 de noviembre [epub previa a la impresión]; Malowany, *et al.* (2005) *Mol. Ther.* 13:766-775; Morse y Lyerly (2002) *World J. Surg.* 26:819, 825; Gabrilovich (2002) *Curr. Opin. Mol. Ther.* 4:454-458; Morse, *et al.* (2003) *Clin. Breast Cancer* 3 Suppl.4:S164-S172; Morse, *et al.* (2002) *Cancer Chemother. Biol. Respuesta Modif.* 20:385-390; Arlen, *et al.* (2003) *Expert Rev. Vaccines* 2:483-493; Morse y Lyerly (1998) *Expert Opin. Investig. Drugs* 7:1617-1627; Hirschowitz, *et al.* (2004) *J. Clin. Oncol.* 22:2808-2815; Vasir, *et al.* (2005) *Br. J. Haematol.* 129:687-700; Koido, *et al.* (2005) *Gynecol. Oncol.* 99:462-471.
- Las células tumorales, por ejemplo, células tumorales autólogas y alogénicas, están disponibles como vacunas (Arlen, *et al.* (2005) *Semin. Oncol.* 32:549-555). Una vacuna también puede comprender una célula tumoral modificada, por ejemplo, un lisado de células tumorales o una célula tumoral irradiada. La célula tumoral también se puede modificar incorporando un ácido nucleico que codifica una molécula tal como una citocina (GM-CSF, IL-12, IL-15 y similares), un ligando de NKG2D, CD40L, CD80, CD86 y similares (véase, por ejemplo, Dranoff (2002) *Immunol. Rev.* 188, 147, 154; Jain, *et al.* (2003) *Ann. Surg. Oncol.* 10:810-820; Borrello y Pardoll (2002) *Cytokine Growth Factor Rev.* 13:185-193; Chen, *et al.* (2005) *Cancer Immunol. Immunother.* 27:1-11; Kjaergaard, *et al.* (2005) *J. Neurosurg.* 103:156-164; Tai, *et al.* (2004) *J. Biomed. Sci* 11: 228-238; Schwaab, *et al.* (2004) *J. Urol.* 171:1036-1042; Friese, *et al.* (2003) *Cancer Res.* 63:8996-9006; Briones, *et al.* (2002) *Cancer Res.* 62:3195-3199; Vieweg y Dannull (2003) *Urol. Clin. North Am.* 30:633-643; Mincheff, *et al.* (2001) *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 39:125-132).
- Las plataformas de expresión de antígeno también pueden proporcionarse usando vectores de ADN desnudo y vectores de ARN desnudo. Estas vacunas que contienen ácidos nucleicos se pueden administrar mediante una pistola génica, electroporación, fantasmas bacterianos, microesferas, micropartículas, liposomas, nanopartículas policatiónicas y similares (véase, por ejemplo, Donnelly, *et al.* (1997) *Ann. Rev. Immunol.* 15:617-648; Mincheff, *et al.* (2001) *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 39:125-132; Song, *et al.* (2005) *J. Virol.* 79:9854-9861; Estcourt, *et al.* (2004) *Immunol. Rev.* 199:144-155). Se encuentran disponibles reactivos y metodologías para la administración de ácidos nucleicos desnudos, por ejemplo, mediante una pistola génica, métodos intradérmicos, intramusculares y electroporación. Las vacunas a base de ácido nucleico pueden comprender un ácido nucleico bloqueado (LNA), donde el LNA permite la unión de un resto funcional al ADN plasmídico y donde el resto funcional puede ser un adyuvante (véase, por ejemplo, Fensterle, *et al.* (1999) *J. Immunol.* 163:4510-4518; Strugnell, *et al.* (1997) *Immunol. Cell Biol.* 75:364-369; Hertoughs, *et al.* (2003) *Nucleic Acids Res.* 31:5817-5830; Trimble, *et al.* (2003) *Vaccine* 21:4036-4042; Nishitani, *et al.* (2000) *Mol. Urol.* 4:47-50; Tuting (1999) *Curr. Opin. Mol. Ther.* 1:216, 225). Las vacunas de ácidos nucleicos pueden usarse en combinación con reactivos que promueven la migración de células dendríticas inmaduras hacia la vacuna y un reactivo que promueve la migración de CD maduras al ganglio linfático drenante donde puede producirse la sensibilización, donde estos reactivos abarcan MIP-1alfa y Flt3L (véase, por ejemplo, Kutzler y Weiner (2004) *J. Clin. Invest.* 114:1241-1244; Sumida, *et al.* (2004) *J. Clin. Invest.* 114:1334-1342).

Se han desarrollado varias especies bacterianas para usar como vacunas y se pueden usar como vacunas en la presente invención, incluyendo, pero sin limitación, *Shigella flexneri*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella typhi* o especies de *mycobacterium*. Esta lista no pretende ser limitante. Véase, por ejemplo, el documento WO04/006837; el documento WO07/103225; y el documento WO07/117371. El vector bacteriano usado en la composición de la vacuna puede ser un vector bacteriano intracelular facultativo. La bacteria puede usarse para administrar un polipéptido descrito en el presente documento a células presentadoras de antígeno en el organismo huésped. Como se describe en el presente documento, *L. monocytogenes* proporciona una plataforma de vacuna preferida para la expresión de los antígenos de la presente invención.

Tanto los microorganismos atenuados como comensales se han utilizado con éxito como vehículos de antígenos de vacunas, pero los vehículos bacterianos para los antígenos están muertos o atenuados opcionalmente pero son metabólicamente activos (KBMA). Los antecedentes genéticos de la cepa vehículo utilizada en la formulación, el tipo de mutación seleccionada para lograr la atenuación y las propiedades intrínsecas del inmunógeno se pueden ajustar para optimizar el alcance y la calidad de la respuesta inmune provocada. Los factores generales a considerar para optimizar la respuesta inmune estimulada por el vehículo bacteriano incluyen: selección del vehículo; la cepa de fondo específica, la mutación atenuante y el nivel de atenuación; la estabilización del fenotipo atenuado y el establecimiento de la dosis óptima. Otros factores relacionados con el antígeno a considerar incluyen: las propiedades intrínsecas del antígeno; el sistema de expresión, la forma de presentación del antígeno y la estabilización del fenotipo recombinante; la coexpresión de moléculas moduladoras y los programas de vacunación.

Una característica preferida de la plataforma de vacuna es la capacidad para iniciar tanto la respuesta inmune innata como una respuesta de células T específica de antígeno frente al o los antígenos expresados de manera recombinante. Por ejemplo, *L. monocytogenes* que expresa el o los antígenos descritos en el presente documento puede inducir interferón intrahepático de tipo 1 (IFN- α/β) y una cascada corriente abajo de quimiocinas y citocinas. En respuesta a esta estimulación inmune intrahepática, las células NK y las células presentadoras de antígenos (APC) se reclutan en el hígado. En determinadas realizaciones, la plataforma de vacuna de la presente invención induce un aumento a las 24 horas después de la administración de la plataforma de vacuna al sujeto en la concentración sérica de una o más, y preferiblemente todas, las citoquinas y quimiocinas seleccionadas del grupo que consiste en IL-12p70, IFN- γ , IL-6, TNF α , y MCP-1; e induce una respuesta de células T CD4+ y/o CD8+ específicas de antígeno contra uno o más antígenos derivados de EGFRvIII expresados por la plataforma de vacuna. En otras realizaciones, la plataforma de vacuna de la presente invención también induce la maduración de células NK hepáticas inmaduras residentes como se demuestra por la regulación positiva de marcadores de activación tales como DX5, CD11b y CD43 en un sistema modelo de ratón, o por actividad citolítica mediada por células NK medida usando células YAC-1 marcadas con ^{51}Cr que se usaron como células diana.

En diversas realizaciones, las vacunas y composiciones inmunogénicas de la presente invención pueden comprender *Listeria monocytogenes* configurada para expresar el o los antígenos derivados de EGFRvIII deseados. La capacidad de *L. monocytogenes* para servir como un vector de vacuna se ha revisado en Wesikirch, *et al.*, *Immunol. Rev.* 158, 159-169 (1997). Una serie de características deseables de la biología natural de *L. monocytogenes* hacen de ella una plataforma atractiva para la aplicación a una vacuna terapéutica. La razón fundamental es que el ciclo de vida intracelular de *L. monocytogenes* permite la estimulación efectiva de la inmunidad de las células T CD4+ y CD8+. Los receptores de patrón molecular asociado a múltiples patógenos (PAMP) que incluyen TLR (TLR2, TLR5, TLR9) y los dominios de oligomerización de unión a nucleótidos (NOD) se activan en respuesta a la interacción con macromoléculas de *L. monocytogenes* tras la infección, lo que da como resultado la panactivación de efectores inmunes innatos y la liberación de citocinas polarizadoras Th-1, lo que ejerce un profundo impacto en el desarrollo de una respuesta de células T CD4+ y CD8+ contra los antígenos expresados.

Las cepas *L. monocytogenes* se han desarrollado recientemente como vehículos eficaces de administración intracelular de proteínas heterólogas que proporcionan administración de antígenos al sistema inmunitario para inducir una respuesta inmune a afecciones clínicas que no permiten la inyección del agente causante de la enfermedad, tal como cáncer y VIH. Véase, por ejemplo, LA patente de EE.UU. N.º 6.051.237; Gunn *et al.*, *J. Immunol.*, 167:6471-6479 (2001); Liau, *et al.*, *Cancer Research*, 62: 2287-2293 (2002); LA patente de EE.UU. N.º 6.099.848; documento WO 99/25376; documento WO 96/14087; y la patente de Estados Unidos n.º 5.830.702). También se ha demostrado que una vacuna de *L. monocytogenes* recombinante que expresa un antígeno del virus de la coriomeningitis linfocítica (LCMV) induce inmunidad mediada por células protectoras contra el antígeno (Shen *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92: 3987-3991 (1995).

Se han producido formas atenuadas y muertas pero metabólicamente activas de *L. monocytogenes* útiles en las composiciones inmunogénicas. Documento WO07/103225; y documento WO07/117371). La proteína ActA de *L. monocytogenes* es suficiente para promover el reclutamiento de actina y los eventos de polimerización responsables del movimiento intracelular. Un estudio de seguridad humana ha informado que la administración oral de una forma atenuada con delección de actA/plcB de *L. monocytogenes* no causó secuelas graves en adultos (Angelakopoulos *et al.*, *Infection and Immunity*, 70:3592-3601 (2002)). Otros tipos de formas atenuadas de *L. monocytogenes* también se han descrito (véase, por ejemplo, el documento WO 99/25376 y la patente de Estados Unidos n.º 6,099,848, que describen cepas auxotróficas atenuadas de *Listeria* que expresan antígenos heterólogos).

En determinadas realizaciones, el *L. monocytogenes* usado en las composiciones de vacuna de la presente invención es una cepa atenuada in vivo que comprende una mutación atenuante en *actA* y/o *inlB*, y, preferiblemente, una delección de todo o una porción de *actA* y *inlB* (referido aquí como "*Lm ΔactA/ΔinlB*"), y contiene ADN recombinante que codifica la expresión de antígeno o antígenos derivados de EGFRvIII de interés. El o los antígenos derivados de EGFRvIII están, preferiblemente, bajo el control de secuencias de expresión bacterianas y están integrados de manera estable en el genoma de *L. monocytogenes*. Por tanto, dicha cepa de vacuna de *L. monocytogenes* no emplea elementos transcripcionales o traduccionales eucariotas.

La invención también contempla una *Listeria* atenuada en al menos un factor regulador, por ejemplo, un promotor o un factor de transcripción. Lo siguiente concierne a los promotores. La expresión de *ActA* está regulada por dos promotores diferentes (Vazwuez-Boland, et al. (1992) Infect. Immun. 60:219-230). Conjuntamente, la expresión de *InlA* e *InlB* está regulada por cinco promotores (Lingnau, et al. (1995) Infect. Immun. 63:3896-3903). El factor de transcripción *prfA* es necesario para la transcripción de varios genes de *L. monocytogenes*, por ejemplo, *hly*, *plcA*, *ActA*, *mpl*, *prfA* y *iap*. Las propiedades reguladoras de *PrfA* están mediadas por, por ejemplo, el promotor dependiente de *PrfA* (*PinlC*) y la caja *PrfA*. La presente invención, en determinadas realizaciones, proporciona un ácido nucleico que codifica inactivado, mutado o delecionado en al menos uno de promotor *ActA*, promotor *inlB*, *PrfA*, *PinlC*, caja *PrfA* y similares (véase, por ejemplo, Lalic Mullthaler, et al. (2001) Mol. Microbiol. 42:111-120; Shetron-Rama, et al. (2003) Mol. Microbiol. 48:1537-1551; Luo, et al. (2004) Mol. Microbiol. 52:39-52). *PrfA* puede hacerse constitutivamente activo mediante una mutación Gly145Ser, una mutación Gly155Ser o una mutación Glu77Lys (véase, por ejemplo, Mueller y Freitag (2005) Infect. Immun. 73:1917-1926; Wong y Freitag (2004) J. Bacteriol. 186:6265-6276; Ripio, et al. (1997) J. Bacteriol. 179:1533, 1540).

La atenuación puede efectuarse mediante, por ejemplo, tratamiento térmico o modificación química. La atenuación también puede efectuarse por modificación genética de un ácido nucleico que modula, por ejemplo, metabolismo, el crecimiento extracelular o el crecimiento intracelular, la modificación genética de un ácido nucleico que codifica un factor de virulencia, tal como *Listeria*1 *prfA*, *actA*, listeriolisina (LLO), un factor de mediación de la adhesión (por ejemplo, una internalina tal como *inlA* o *inlB*), *mpl*, fosfatidilcolina fosfolipasa C (PC-PLC), fosfolipasa C específica de fosfatidilinositol (PI PLC; *geb plcA*), cualquier combinación de los anteriores, y similares. La atenuación se puede evaluar comparando una función biológica de una *Listeria* atenuada con la función biológica correspondiente mostrada por una *Listeria* parental adecuada.

La presente invención, en otras realizaciones, proporciona una *Listeria* que se atenúa tratando con un agente de direccionamiento de ácido nucleico, tal como un agente de reticulación, un psoraleno, una mostaza de nitrógeno, cisplatino, un aducto voluminoso, luz ultravioleta, irradiación gamma, cualquier combinación de los mismos, y similares. Normalmente, la lesión producida por una molécula de agente de reticulación implica la reticulación de ambas cadenas de la doble hélice. La *Listeria* de la invención también se puede atenuar mutando al menos un gen de reparación de ácido nucleico, por ejemplo, *uvrA*, *uvrB*, *uvrAB*, *uvrC*, *uvrD*, *uvrAB*, *phrA* y/o un gen que media en la reparación de recombinación, por ejemplo, *recA*. Además, la invención proporciona una *Listeria* atenuada por un agente de dirección de ácido nucleico y por mutación de un gen de reparación de ácido nucleico. Adicionalmente, la invención abarca el tratamiento con un agente de direccionamiento de ácido nucleico sensible a la luz, tal como un psoraleno, y/o un agente de reticulación de ácido nucleico sensible a la luz, tal como psoraleno, seguido de la exposición a luz ultravioleta.

Las *Listeria* atenuadas útiles en la presente invención se describen en, por ejemplo, la publicación de patente de Estados Unidos N.º 2004/0228877 y 2004/0197343. Se proporcionan varios ensayos para evaluar si una cepa particular de *Listeria* tiene la atenuación deseada, por ejemplo, en la publicación de patente de Estados Unidos N.º 2004/0228877, 2004/0197343, y 2005/0249748.

En otras realizaciones, la *L. monocytogenes* utilizada en las composiciones de vacuna de la presente invención es una plataforma muerta pero metabólicamente activa (KBMA) derivada de *Lm ΔactA/ΔinlB*, y también con delección de *uvrA* y *uvrB*, los genes que codifican las enzimas reparadoras de ADN de la ruta de reparación por escisión de nucleótidos (NER) y contiene ADN recombinante que codifica la expresión del antígeno o antígenos derivados de EGFRvIII de interés. El antígeno o antígenos derivados de EGFRvIII están, preferiblemente, bajo el control de secuencias de expresión bacterianas y están integrados de manera estable en el genoma de *L. monocytogenes*. La plataforma KBMA es exquisitamente sensible a la inactivación fotoquímica mediante el tratamiento combinado con psoraleno sintético, S-59 y luz ultravioleta de onda larga. Aunque muertas, las vacunas *Lm* de KBMA pueden expresar transitoriamente sus productos génicos, lo que les permite escapar del fagolisosoma e inducir inmunidad celular funcional y protección contra la exposición a *Lm* de tipo WT de tipo salvaje y al virus vaccinia.

En determinadas realizaciones, una cepa de vacuna de *L. monocytogenes* KBMA atenuada comprende un gen *prfA* activo de forma constitutiva (denominado en el presente documento mutantes *PrfA**). *PrfA* es un factor de transcripción activado intracelularmente que induce la expresión de genes de virulencia y antígenos heterólogos codificados (*Ags*) en cepas de vacunas diseñadas de manera apropiada. Tal como se ha señalado anteriormente, la expresión del gen *actA* es sensible a *PrfA*, y el promotor *actA* es un elemento regulador sensible a *PrfA*. La inclusión de un alelo de *prfA* G155S puede conferir potencia de vacuna potenciada significativamente de las vacunas vivas atenuadas o KBMA. Los mutantes de *PrfA* preferidos se describen en la solicitud de patente provisional de Estados

Unidos 61/054.454, titulada COMPOSICIONES QUE COMPRENEN EL MUTANTE PRFA* DE LISTERIA Y MÉTODOS DE USO DE LOS MISMOS, presentada el lunes, 19 de mayo de 2008.

5 La secuencia de PrfA de *L. monocytogenes*, que incluye una glicina en el residuo 155, es la siguiente (SEQ ID NO: 16):

```
MNAQAEEFFKK YLETNGIKPK QFHKKELIFN QWDPQEYCF LYDGITKLTS 50
ISENGTIMNL QYYKGAFVIM SGFIDTETSV GYYNLEWISE QATAYVIKIN 100
ELKELLSKNL THFFYVFQTL QKQVSYSLAK FNDFSINGKL GSICGQLLIL 150
TYVYGKETPD GIKITLDNLT MQELGYSSGI AHSSAVSRII SKLKQEKVIV 200
YKNSCFYVQN LDYLKRYAPK LDEWFYLACP ATWGKLN 237
```

10 La secuencia de PrfA* de *L. monocytogenes*, que incluye una serina en el residuo 155, es la siguiente (SEQ ID NO: 17):

```
MNAQAEEFFKK YLETNGIKPK QFHKKELIFN QWDPQEYCF LYDGITKLTS 50
ISENGTIMNL QYYKGAFVIM SGFIDTETSV GYYNLEWISE QATAYVIKIN 100
ELKELLSKNL THFFYVFQTL QKQVSYSLAK FNDFSINGKL GSICGQLLIL 150
TYVYSKETPD GIKITLDNLT MQELGYSSGI AHSSAVSRII SKLKQEKVIV 200
YKNSCFYVQN LDYLKRYAPK LDEWFYLACP ATWGKLN 237
```

15

4. Construcciones antigénicas

La construcción antigénica expresada por la cepa vacunal de la presente invención comprende como mínimo un ácido nucleico que codifica una secuencia secretora operable dentro de la plataforma de vacuna para soportar la secreción, fusionada al antígeno o antígenos derivados de EGFRvIII a expresar. En el caso de una plataforma bacteriana, la proteína de fusión resultante está unida operativamente a secuencias reguladoras (por ejemplo, un promotor) necesaria para la expresión de la proteína de fusión por la plataforma de vacuna bacteriana. La presente invención no se limita a los antígenos de polipéptidos y péptidos que se secretan, sino que también abarca polipéptidos y péptidos que no se secretan o no se pueden secretar a partir de una bacteria de *Listeria* u otra bacteria. Pero, preferentemente, el antígeno o antígenos derivados de EGFRvIII se expresan en una forma secretada soluble por una cepa de vacuna bacteriana cuando la cepa se inocula en un receptor.

La Tabla 1 divulga una serie de ejemplos no limitantes de péptidos señal para su uso en la fusión con una secuencia asociada de proteína de fusión, tal como un antígeno heterólogo. Los péptidos señal tienden a contener tres dominios: un extremo N terminal cargado positivamente (1-5 residuos de longitud); un dominio hidrofóbico central (7-15 residuos de longitud); y un dominio en el extremo C-terminal neutro pero polar.

Tabla 1. Vía de señal bacteriana. Los péptidos de señal se identifican por el sitio de señal peptidasa.

Sitio de peptidasa señal (sitio de escisión representado por ')	Gen	Género/especie
Vía secA1		
TEA'KD (SEQ ID NO: 18)	<i>hly</i> (LLO)	<i>Listeria monocytogenes</i>
VYA'DT (SEQ ID NO: 19)	Usp45	<i>Lactococcus lactis</i>
IQA'EV (SEQ ID NO: 20)	<i>pag</i> (antígeno protector)	<i>Bacillus anthracis</i>
Vía secA2		
ASA'ST (SEQ ID NO: 21)	<i>iap</i> (proteína asociada con la invasión) p60	<i>Listeria monocytogenes</i>
VGA'FG (SEQ ID NO: 22)	NamA lmo2691 (autolisina)	<i>Listeria monocytogenes</i>
AFA'ED (SEQ ID NO: 23)	* BA_0281 (Familia NLP/P60)	<i>Bacillus anthracis</i>
VQA'AE (SEQ ID NO: 24)	* <i>atl</i> (autolisina)	<i>Staphylococcus aureus</i>
Vía Tat		
DKA'LT (SEQ ID NO: 25)	lmo0367	<i>Listeria monocytogenes</i>
VGA'FG (SEQ ID NO: 26)	PhoD (fosfatasa alcalina)	<i>Bacillus subtilis</i>

* Autolisinas bacterianas secretadas por la vía sec (no se determina si la secA1 o la secA2). Las secuencias secretoras están abarcadas por los ácidos nucleicos indicados codificados por el genoma de EGD de *Listeria* (número de acc. en GenBank NC_003210) en, por ejemplo, nucleótidos 45434-456936 (inIA); nucleótidos 457021-457125 (inIB); nucleótidos 1860200-1860295 (inIC); nucleótidos 286219-287718 (inIE); nucleótidos 205819-205893 (gen hly; LLO) (véase también GenBank Acc. No. P13128); nucleótidos 209470-209556 (ActA) (véase también GenBank Acc. No. S20887).

En ciertas realizaciones a modo de ejemplo descritas en el presente documento, la o las secuencias derivadas de EGFRvIII pueden expresarse como un único polipéptido fusionado a una porción amino-terminal de la proteína ActA de *L. monocytogenes* que permite la expresión y secreción de una proteína de fusión de la bacteria dentro del huésped vacunado. En estas realizaciones, la construcción antigénica puede ser un polinucleótido que comprende un promotor unido operativamente a una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína de fusión, donde la proteína de fusión comprende (a) ActA modificado y (b) uno o más epítopos derivados de EGFRvIII para expresar como proteína de fusión siguiendo la secuencia modificada de ActA.

Por "ActA modificada" se entiende una parte contigua de la proteína ActA de *L. monocytogenes* que comprende al menos la secuencia señal ActA, pero no comprende la totalidad de la secuencia ActA, o que tiene al menos aproximadamente un 80 % de identidad de secuencia, al menos aproximadamente un 85% de similitud de secuencia, al menos aproximadamente un 90% de similitud de secuencia, al menos aproximadamente un 95 % de identidad de secuencia o al menos aproximadamente un 98 % de identidad de secuencia con dicha secuencia de ActA. La secuencia de señal de ActA es MGLNRFMRAMVVFITANCITINPDIIFA (SEQ ID NO: 27). En algunas realizaciones, el promotor es el promotor ActA del documento WO07/103225; y el documento WO07/117371.

A modo de ejemplo, el ActA modificado puede comprender al menos los primeros 59 aminoácidos de ActA o una secuencia que tiene al menos aproximadamente un 80 % de identidad de secuencia, al menos aproximadamente un 85% de similitud de secuencia, al menos aproximadamente un 90% de similitud de secuencia, al menos aproximadamente un 95 % de identidad de secuencia o al menos aproximadamente un 98 % de identidad de secuencia con al menos los primeros 59 aminoácidos de ActA. En algunas realizaciones, el ActA modificado puede comprender al menos los primeros 100 aminoácidos de ActA o una secuencia que tiene al menos aproximadamente un 80 % de identidad de secuencia, al menos aproximadamente un 85% de similitud de secuencia, al menos aproximadamente un 90% de similitud de secuencia, al menos aproximadamente un 95 % de identidad de secuencia o al menos aproximadamente un 98 % de identidad de secuencia con los primeros 100 aminoácidos de ActA. En otras palabras, en algunas realizaciones, la secuencia de ActA modificada corresponde a un fragmento N-terminal de ActA (que incluye la secuencia señal de ActA) que está truncada en el residuo 100 o posteriormente.

ActA-N100 tiene la siguiente secuencia (SEQ ID NO: 28):

VGLNRFMRAM MVVFITANCI TINPDIIFAA TSEDSSLNT DEWEEKTEE 50

QPSEVNTGPR YETAREVSSR DIEELEKSNK VKNTNKADLI AMLKAKAEKG 100

En esta secuencia, el primer residuo se representa como una valina; el polipéptido es sintetizado por *Listeria* con una metionina en esta posición. Por lo tanto, ActA-N100 puede tener también la siguiente secuencia (SEQ ID NO:29):

MGLNRFMRAM MVVFITANCI TINPDIIFAA TSEDSSLNT DEWEEKTEE 50

QPSEVNTGPR YETAREVSSR DIEELEKSNK VKNTNKADLI AMLKAKAEKG 100

ActA-N100 también puede comprender uno o más residuos adicionales que se encuentran entre el residuo C-terminal de ActA modificada y la secuencia del antígeno derivado de EGFRvIII. En las siguientes secuencias, ActA-N100 se amplía mediante dos residuos añadidos mediante la inclusión de un sitio BamH1:

VGLNRFMRAM MVVFITANCI TINPDIIFAA TSEDSSLNT DEWEEKTEE 50

QPSEVNTGPR YETAREVSSR DIEELEKSNK VKNTNKADLI AMLKAKAEKG 100

GS (SEQ ID NO: 30)

que, cuando se sintetiza con un primer residuo de metionina, tiene la secuencia:

ES 2 684 684 T3

MGLNRFMRAM MVVFITANCI TINPDIIFAA TDSedSSLNT DEWEEEEKTEE 50
QPSEVNTGPR YETAREVSSR DIEELEKSNK VKNTNKADLI AMLKAKAEKG 100
GS (SEQ ID NO: 31).

Por lo tanto, una construcción de ejemplo es la siguiente:

vglnrfrmram mvvfitanci tinpdiifaa tdsedsslnt deweeektee 50
qpsevntgpr yetarevssr dieeleksnk vkntnkadli amlkakaekg 100
5 gsASKVLPAS RALEEKKGNY VVDHGSCAD GSVKTSASKV APASRALEEK 150
KGNYVVTDHG SCGDGSIKLS KVLPASRALE EKKGNYVVD HGSCADGSVK 200
ASKVAPASRA LEEKKGNYVV TDHGSCGDGS IKLSKVLPAS RALEEKKGNY 250
VVDHGSCAD GSVKTS (SEQ ID NO: 32).

10 En esta secuencia, la secuencia de ActA-N100 está en minúscula, las secuencias de antígenos derivados de EGFRvIII están subrayadas y las secuencias "escindibles" del enlazador no están subrayadas. Una secuencia de ADN correspondiente es como sigue:

gtgggattaaatagatttatgcggtgcgatgatggtagttttcattactgccaaactgcatt
acgattaacccccgacataaatatttgcagcgcagatagcgaagattccagtctaacaca
gatgaatgggaagaagaaaaacagaagagcagccaagcgaggtaaatacgggaccaaga
tacgaaactgcacgtgaagtaagttcacgtgatattgaggaactagaaaaatcgaataaa
gtgaaaaatacgaacaaagcagacctaataagcaatggtgaaagcaaaagcagagaaaggt
ggatccGCAAGCAAAGTATTGCCAGCTAGTCGTGCATTAGAGGAGAAAAAGGGGAATTAC
GTGGTGACGGATCATGGATCGTGTGCCGATGGCTCAGTAAAGACTAGTGCGAGCAAAGTG
GCCCCTGCATCACGAGCACTTGAAGAGAAAAAGGAAACTATGTTGTGACCGATCATGGT
AGCTGCGGAGATGGTTCAATTAAATTATCAAAGTCTTACCAGCATCTAGAGCTTTAGAG
GAAAAGAAGGGTAACTATGTCGTAACAGATCATGGAAGTTGTGCTGACGGAAGTGTTAAA
GCGTCGAAAGTAGCTCCAGCTTCTCGCGCATTAGAAGAAAAGAAAGGCAATTATGTTGTA
ACAGACCATGGTAGTTGTGGTGATGGCTCGATCAAATTGTCAAAGTTCTACCGGCTTCT
CGTGCGCTAGAAGAGAAGAAAGGAAATTACGTAGTTACAGACCACGGCTCTTGCGCGGAT
GGTCCGTTAAAAGT (SEQ ID NO: 33).

15 En esta secuencia, la secuencia de ActA-N100 está en minúscula, un sitio de clonación BamHI está subrayado y las secuencias "escindibles" de antígeno y enlazador derivadas de EGFRvIII no están subrayadas. Esta secuencia puede estar precedida por una secuencia de promotor de ActA, tal como

gggaagcagttgggggtaactgattaacaaatgtagagaaaaattaattctccaagtga
 tattcttaaaataattcatgaatattttttcttatattagctaattaagaagataattaa
 ctgctaatccaatttttaacggaataaattagtgaaaatgaaggccgaattttccttgtt
 ctaaaaagggttgatttagcgtatcacgaggagggtataa (SEQ ID NO: 34).

Las construcciones a modo de ejemplo se describen a continuación y en el documento WO07/103225. ANZ-100 (antes conocido como CRS-100; BB-IND 12884 y clinicaltrials.gov identificador NCT00327652) consiste en una plataforma Δ actA/ Δ inIB de *L. monocytogenes* sin secuencias de expresión de antígeno exógenas. En las construcciones de ejemplo descritas en el documento WO07/103225, esta plataforma se ha modificado genéticamente para expresar la mesotelina humana como una fusión con ActA-N100. La vacuna de expresión de mesotelina se ha evaluado en sujetos con carcinoma avanzado con metástasis hepática usando CRS-207 (BB-IND 13389 y clinicaltrials.gov identificador NCT00585845). La presente invención contempla la modificación de esta vacuna reemplazando las secuencias de mesotelina con secuencias de antígeno derivados de EGFRVIII.

Como las secuencias codificadas por un organismo no son necesariamente optimizadas por codones para la expresión óptima en una cepa bacteriana de la plataforma de vacuna elegida, la presente invención también proporciona ácidos nucleicos que se alteran mediante codones optimizados para la expresión de una bacteria tal como *L. monocytogenes*.

En diversas realizaciones, al menos un uno por ciento de cualquier codón no óptimo se cambia para proporcionar codones óptimos, más normalmente se cambia al menos un cinco por ciento, más normalmente se cambia al menos un diez por ciento, a menudo se cambia al menos un 20 %, más a menudo se cambian al menos un 30 %, más al menudo se cambian al menos un 40 %, normalmente al menos un 50 %, más normalmente se cambia al menos un 60 %, más normalmente se cambia al menos un 70 %, óptimamente se cambia al menos un 80 %, más óptimamente se cambia al menos un 90 %, de la forma más óptima se cambia al menos un 95 % y, convencionalmente, el 100 % de cualquier codón no óptimo son codones optimizados para la expresión en *Listeria* (Tabla 2).

Tabla 2. Codones óptimos para expresión en *Listeria*.

Aminoácido	A	R	N	D	C	Q	E	G	H	I
Codón óptimo de <i>Listeria</i>	GCA	CGU	AAU	GAU	UGU	CAA	GAA	GGU	CAU	AUU
Aminoácido	L	K	M	F	P	s	T	W	Y	V
Codón óptimo de <i>Listeria</i>	UUA	AAA	AUG	UUU	CCA	AGU	ACA	UGG	UAU	GUU

La invención proporciona una serie de especie de *Listeria*¹ especies y cepas para fabricar o modificar genéticamente una plataforma de vacuna de la presente invención. La presente invención no debe estar limitada por las especies y cepas descritas en la Tabla 3.

Tabla 3. Cepas de *Listeria* adecuadas para uso en la presente invención, por ejemplo, como una vacuna o como fuente de ácidos nucleicos.

<i>L. monocytogenes</i> 10403S silvestre.	Bishop y Hinrichs (1987) J. Immunol. 139:2005-2009; Lauer, et al. (2002) J. Bact. 184:4177-4186.
<i>L. monocytogenes</i> DP-L4056 (curado por fago). La cepa 10403S curada por el profago se denomina DP-L4056.	Lauer, et al. (2002) J. Bact. 184:4177-4186.
<i>L. monocytogenes</i> DP-L4027, que es DP-L2161, curado por fago, con delección del gen hly.	Lauer, et al. (2002) J. Bact. 184:4177-4186; Jones y Portnoy (1994) Infect. Immunity 65:5608-5613.
<i>L. monocytogenes</i> DP-L4029, que es DP- L3078, curado por fago, con delección de ActA.	Lauer, et al. (2002) J. Bact. 184:4177-4186; Skoble, et al. (2000) J. Cell Biol. 150:527, 538.
<i>L. monocytogenes</i> DP-L4042 (delta PEST)	Brockstedt, et al. (2004) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101:13832-13837; que soporta información.
<i>L. monocytogenes</i> DP-L4097 (LLO-S44A).	Brockstedt, et al. (2004) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101:13832-13837; que soporta información.
<i>L. monocytogenes</i> DP-L4364 (delta lplA; lipoato proteína ligasa).	Brockstedt, et al. (2004) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101:13832-13837; que soporta información.
<i>L. monocytogenes</i> DP-L4405 (delta inIA).	Brockstedt, et al. (2004) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101:13832-13837; que soporta información.
<i>L. monocytogenes</i> DP-L4406 (delta inIB).	Brockstedt, et al. (2004) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101:13832-13837; que soporta información.

<i>L. monocytogenes</i> CS-L0001 (delta ActA-delta inlB).	Brockstedt, <i>et al.</i> (2004) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101:13832-13837; que soporta información.
<i>L. monocytogenes</i> CS-L0002 (delta ActA-delta lplA).	Brockstedt, <i>et al.</i> (2004) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101:13832-13837; que soporta información.
<i>L. monocytogenes</i> CS-L0003 (L461T-delta lplA).	Brockstedt, <i>et al.</i> (2004) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101:13832-13837; que soporta información.
<i>L. monocytogenes</i> DP-L4038 (delta ActA-LLO L461T).	Brockstedt, <i>et al.</i> (2004) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101:13832-13837; que soporta información.
<i>L. monocytogenes</i> DP-L4384 (S44A-LLO L461T).	Brockstedt, <i>et al.</i> (2004) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101:13832-13837; que soporta información.
<i>L. monocytogenes</i> . Mutación en la lipoato proteína ligasa (LplA1).	O'Riordan, <i>et al.</i> (2003) Science 302:462- 464.
<i>L. monocytogenes</i> DP-L4017 (10403S hly (L461T) mutación puntual en el gen de hemolisina.	Solicitud de patente provisional de Estados Unidos n.º de serie 60/490,089 presentada el 24 de julio de 2003.
<i>L. monocytogenes</i> EGD.	n.º acc. en GenBank AL591824.
<i>L. monocytogenes</i> EGD-e.	n.º acc. en GenBank NC_003210. n.º acc. en ATCC BAA-679.
cepa EGD de <i>L. monocytogenes</i> , genoma completo, segmento 3/12	n.º acc. en GenBank AL591975
<i>L. monocytogenes</i> .	N.º en ATCC 13932; 15313; 19111-19120; 43248-43251; 51772-51782.
<i>L. monocytogenes</i> DP-L4029 con delección en <i>uvrAB</i> .	Solicitud de patente provisional de Estados Unidos n.º de serie 60/541.515 presentada el 2 de febrero de 2004; Solicitud de patente provisional de Estados Unidos n.º de serie 60/490,080 presentada el 24 de julio de 2003.
<i>L. monocytogenes</i> DP-L4029 con delección en <i>uvrAB</i> tratado con un psoraleno.	Solicitud de patente provisional de Estados Unidos n.º de serie 60/541,515 presentada el lunes, 2 de febrero de 2004.
<i>L. monocytogenes</i> delta <i>actA</i> delta <i>inlB</i> delta <i>uvrAB</i>	Brockstedt (2005) Nature Medicine y patente de KBMA
<i>L. monocytogenes</i> delta <i>actA</i> delta <i>inlB</i> delta <i>uvrAB</i> tratada con psoraleno	Brockstedt (2005) Nature Medicine y patente de KBMA
<i>L. monocytogenes</i> delta <i>actA</i> delta <i>inlB</i> delta <i>uvrAB</i> <i>prfA</i> (G155S)	Lauer et al, (2008) Infect. Immun. y el documento WO 2009/143085
<i>L. monocytogenes</i> delta <i>actA</i> delta <i>inlB</i> delta <i>uvrAB</i> <i>prfA</i> (G155S) tratado con psoraleno	Lauer et al, (2008) Infect. Immun. y el documento WO 2009/143085
<i>L. monocytogenes</i> ActA-/inlB- mutante doble.	Depositado en la ATCC el 3 de octubre de 2003. N.º de acc. PTA-5562.
<i>L. monocytogenes</i> mutante lplA p mutante hly.	solicitud de patente de Estados Unidos n.º 20040013690 de Portnoy, <i>et al.</i>
<i>L. monocytogenes</i> DAL/DAT doble mutante.	solicitud de patente de Estados Unidos n.º 20050048081 de Frankel y Portnoy.
<i>L. monocytogenes</i> str. 4b F2365.	n.º acc. en GenBank NC_002973.
<i>Listeria ivanovii</i>	n.º de ATCC 49954
<i>Listeria innocua</i> Clip11262.	n.º acc. en GenBank NC_003212; AL592022.
<i>Listeria innocua</i> , una cepa hemolítica de origen natural que contiene el grupo de genes de virulencia regulados por PrfA.	Johnson, <i>et al.</i> (2004) Appl. Environ. Microbiol. 70:4256-4266.
<i>Listeria seeligeri</i> .	Howard, <i>et al.</i> (1992) Appl. Environ. Microbiol. 58:709-712.
<i>Listeria innocua</i> con genes de islote de patogenicidad de <i>L. monocytogenes</i> .	Johnson, <i>et al.</i> (2004) Appl. Environ. Microbiol. 70:4256-4266.
<i>Listeria innocua</i> con el gen de internalina A de <i>L. monocytogenes</i> , por ejemplo, como un plásmido o como ácido nucleico genómico.	Véase, por ejemplo, Lingnau, <i>et al.</i> (1995) Infection Immunity 63:3896-3903; Gaillard, <i>et al.</i> (1991) Cell 65:1127-1141).

La presente invención abarca reactivos y métodos que comprenden las cepas de *Listeria*¹ anteriores, así como estas cepas que están modificadas, por ejemplo, por un plásmido y/o por integración genómica, para que contengan un ácido nucleico que codifica uno de, o cualquier combinación de, los siguientes genes: hly (LLO; listeriolisina); iap (p60); inlA; inlB; inlC; dal (alanina racemasa); daaA (dat; D-aminoácido aminotransferasa); plcA; plcB; ActA; o cualquier ácido nucleico que media el crecimiento, propagación, ruptura de una sola vesícula de pared sencilla, ruptura de una vesícula de doble pared, unión a una célula huésped, absorción por una célula huésped. La presente invención no debe estar limitada por las cepas concretas divulgadas anteriormente.

Dirigir los antígenos a los receptores endocíticos en las células presentadoras de antígenos (APC) profesionales también representa una estrategia atractiva para mejorar la eficacia de las vacunas. Dichas vacunas dirigidas a APC tienen una capacidad excepcional para guiar antígenos proteicos exógenos en vesículas que procesan eficazmente el antígeno para la presentación del complejo mayor de histocompatibilidad DE clase I y clase II. Una orientación eficiente no solo requiere una alta especificidad para el receptor que se expresa abundantemente en la superficie de las APC, sino que también la capacidad de ser rápidamente internalizado y cargado en compartimentos que contienen elementos de la maquinaria de procesamiento de antígeno. En estas realizaciones, los antígenos de la presente invención se proporcionan como construcciones de fusión que incluyen un polipéptido antigénico derivado de EGFRvIII inmunogénico y un resto dirigido a receptor endocítico deseado. Los receptores endocíticos de APC adecuados incluyen DEC-205, receptor de manosa, CLEC9, receptor de Fc. Esta lista no pretende ser limitante. Un resto que se dirige al receptor se puede acoplar a un polipéptido antigénico derivado de EGFRvIII inmunogénico por recombinación o usando reticulación química.

4. Composiciones terapéuticas.

Las composiciones de vacuna descritas en el presente documento se pueden administrar individualmente, solo o en combinación con un excipiente farmacéuticamente aceptable, en una cantidad suficiente para inducir una respuesta inmune apropiada. La respuesta inmune puede comprender, sin limitación, respuesta inmune específica, respuesta inmune no específica, respuesta específica y no específica, respuesta innata, respuesta inmune primaria, inmunidad adaptativa, respuesta inmune secundaria, respuesta inmune de memoria, activación de células inmunitarias, proliferación de células inmunitarias, diferenciación de células inmunitarias y expresión de citocinas. Las vacunas de la presente invención se pueden almacenar, *por ejemplo*, congeladas, liofilizadas, como una suspensión, como una pasta celular, o en complejos con una matriz sólida o matriz de gel.

En determinadas realizaciones, después de administrar al sujeto una dosis eficaz de una vacuna que contiene los polipéptidos antigénicos derivados del EGFRvIII inmunogénico para provocar la respuesta inmune, se administra una segunda vacuna. Esto se conoce en la técnica como un régimen de "sensibilización-refuerzo". En dicho régimen, las composiciones y los métodos de la presente invención se pueden usar como la administración "de sensibilización", como la administración de "refuerzo" o como tanto "de sensibilización" como "refuerzo".

Como ejemplo, una primera vacuna compuesta por *Listeria* muerta pero metabólicamente activa que codifica y expresa el polipéptido o polipéptidos antigénicos pueden administrarse como "sensibilización", y una segunda vacuna compuesta por *Listeria* atenuada (viva o muerta pero metabólicamente activa) que codifica el polipéptido o polipéptidos antigénicos pueden administrarse como el "refuerzo". Debería entenderse, sin embargo, que cada uno de la sensibilización y refuerzo no requiere utilizar los métodos y composiciones de la presente invención. Más bien, la presente invención contempla el uso de otras modalidades de vacuna junto con los métodos y composiciones de vacunas bacterianas de la presente invención. Los siguientes son ejemplos de regímenes mixtos de sensibilización-refuerzo adecuados: una vacuna de ADN (por ejemplo, plásmido) vacuna bacteriana de sensibilización/de refuerzo; una vacuna vírica de sensibilización/ vacuna bacteriana de refuerzo; una vacuna proteica de sensibilización/vacuna bacteriana de refuerzo; un ADN de sensibilización/vacuna bacteriana de refuerzo más vacuna proteica de refuerzo; una vacuna bacteriana de sensibilización/vacuna de ADN de refuerzo; una vacuna bacteriana de sensibilización/vacuna vírica de refuerzo; una vacuna bacteriana de sensibilización/ vacuna proteica de refuerzo; una vacuna bacteriana de sensibilización/vacuna bacteriana de refuerzo más vacuna proteica de refuerzo; etc. Esta lista no pretende ser limitativa

La vacuna de sensibilización y la vacuna de refuerzo pueden administrarse por la misma vía o por diferentes rutas. El término "vías diferentes" abarca, aunque sin limitación, diferentes sitios sobre el cuerpo, por ejemplo, un sitio que es oral, no oral, enteral, parenteral, rectal, intraganglionar (ganglio linfático), intravenosa, arterial, subcutánea, intramuscular, intratumoral, peritumoral, infusión, en la mucosa, nasal, en el espacio cerebroespinal o líquido cefalorraquídeo, y así sucesivamente, así como por diferentes modos, por ejemplo, oral, intravenoso e intramuscular.

Se puede administrar una dosis efectiva de una vacuna de sensibilización o de refuerzo en una dosis, pero no se limita a una dosis. Por lo tanto, la administración puede ser dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece, catorce, quince, dieciséis, diecisiete, dieciocho, diecinueve, veinte, o más, administraciones de la vacuna. Cuando hay más de una administración de una vacuna o vacunas en los presentes métodos, las administraciones pueden separarse por intervalos de un minuto, dos minutos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez o más minutos, en intervalos de aproximadamente una hora, dos horas, tres, cuatro, cinco, seis, siete,

- ocho, nueve, diez, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 horas y así sucesivamente. En el contexto de horas, el término "aproximadamente" significa más o menos cualquier intervalo de tiempo dentro de los 30 minutos. Las administraciones también pueden espaciarse por intervalos de tiempo de un día, dos días, tres días, cuatro días, cinco días, seis días, siete días, ocho días, nueve días, diez días, 11 días, 12 días, 13 días, 14 días, 15 días, 16 días, 17 días, 18 días, 19 días, 20 días, 21 días y combinaciones de los mismos. La invención no está limitada a intervalos de dosificación que están separados igualmente en el tiempo, sino que abarcan dosis a intervalos no iguales, tales como un calendario de sensibilización que consiste en la administración 1 día, 4 días, 7 días y 25 días, solo para proporcionar un ejemplo no limitante.
- 5
- 10 En determinadas realizaciones, la administración de la vacuna de refuerzo puede iniciarse aproximadamente 5 días después de que se inicia la vacunación de sensibilización; aproximadamente 10 días después de que se inicia la vacunación de sensibilización; aproximadamente 15 días; aproximadamente 20 días; aproximadamente 25 días; aproximadamente 30 días; aproximadamente 35 días; aproximadamente 40 días; aproximadamente 45 días; aproximadamente 50 días; aproximadamente 55 días; aproximadamente 60 días; aproximadamente 65 días;
- 15 aproximadamente 70 días; aproximadamente 75 días; aproximadamente 80 días, aproximadamente 6 meses y aproximadamente 1 año después de iniciada la administración de la vacunación de sensibilización. Preferiblemente, una o ambas vacunaciones de sensibilización y refuerzo comprenden la administración de una composición de la presente invención.
- 20 Un "excipiente farmacéuticamente aceptable" o "excipiente diagnósticamente aceptable" incluye, pero no se limita a los mismos, agua destilada estéril, solución salina, soluciones tamponadas con fosfato, tampones basados en aminoácidos o soluciones tamponadas con bicarbonato. Un excipiente seleccionado y la cantidad de excipiente utilizado dependerán del modo de administración. La administración puede ser oral, intravenosa, subcutánea, dérmica, intradérmica, intramuscular, en la mucosa, parenteral, intraorgánica, intralesional, intranasal, inhalación,
- 25 intraocular, intramuscular, intravascular, intranodal, por escarificación, rectal, intraperitoneal o cualquiera o una combinación de diversas vías de administración bien conocidas. La administración puede comprender una inyección, infusión o una combinación de los mismos.
- 30 La administración de la vacuna de la presente invención por una vía no oral puede evitar la tolerancia. Los métodos se conocen en la técnica para la administración intravenosa, por vía subcutánea, intramuscular, intraperitoneal, por vía oral, mucosal, a través del tracto urinario, a través de un tracto genital, a través del tracto gastrointestinal o por inhalación.
- 35 Una cantidad eficaz para un paciente en particular puede variar dependiendo de factores tales como la afección que se trata, la salud general del paciente, la vía y la dosis de administración y la gravedad de los efectos secundarios. Se encuentra disponible una guía para los métodos de tratamiento y diagnóstico (véase, por ejemplo, Maynard, et al. (1996) A Handbook of SOPs for Good Clinical Practice, Interpharm Press, Boca Ratón, FL; Dent (2001) Good Laboratory y Good Clinical Practice, Urch Publ., Londres, Reino Unido).
- 40 Las vacunas de la presente invención se pueden administrar en una dosis o dosificaciones, donde cada dosis comprende al menos 100 células bacterianas/kg de peso corporal o más; en ciertas realizaciones 1000 células bacterianas/kg de peso corporal o más; normalmente al menos 10.000 células; más normalmente al menos 100.000 células; más normalmente al menos 1 millón de células; a menudo al menos 10 millones de células; más a menudo al menos 100 millones de células; normalmente al menos 1 billón de células; normalmente al menos 10 billones de células;
- 45 células; convencionalmente al menos 100 billones de células; y a veces al menos 1 trillón de células/kg de peso corporal. La presente invención proporciona las dosis anteriores donde las unidades de administración bacteriana son unidades formadoras de colonias (UFC), el equivalente de UFC antes del tratamiento con psoraleno, o donde las unidades son número de células bacterianas.
- 50 Las vacunas de la presente invención se pueden administrar en una dosis o dosificaciones, donde cada dosis comprende entre 10^7 y 10^8 bacterias por 70 kg de peso corporal (o por 1,7 metros cuadrados de superficie; o por 1,5 kg de peso del hígado); 2×10^7 y 2×10^8 bacterias por 70 kg de peso corporal (o por 1,7 metros cuadrados de superficie; o por 1,5 kg de peso del hígado); 5×10^7 y 5×10^8 bacterias por 70 kg de peso corporal (o por 1,7 metros cuadrados de superficie; o por 1,5 kg de peso del hígado); 10^8 y 10^9 bacterias por 70 kg de peso corporal (o por 1,7 metros cuadrados de superficie; o por 1,5 kg de peso del hígado); entre $2,0 \times 10^8$ y $2,0 \times 10^9$ bacterias por 70 kg de peso corporal (o por 1,7 metros cuadrados de superficie o por 1,5 g de peso del hígado); entre $5,0 \times 10^8$ y $5,0 \times 10^9$ bacterias por 70 kg de peso corporal (o por 1,7 metros cuadrados de superficie o por 1,5 g de peso del hígado); entre 10^9 y 10^{10} bacterias por 70 kg de peso corporal (o por 1,7 metros cuadrados de superficie o por 1,5 g de peso del hígado); entre 2×10^9 y 2×10^{10} bacterias por 70 kg de peso corporal (o por 1,7 metros cuadrados de superficie o por 1,5 g de peso del hígado); entre 5×10^9 y 5×10^{10} bacterias por 70 kg de peso corporal (o por 1,7 metros cuadrados de superficie o por 1,5 g de peso del hígado); entre 10^{11} y 10^{12} bacterias por 70 kg de peso corporal (o por 1,7 metros cuadrados de superficie o por 1,5 g de peso del hígado); entre 2×10^{11} y 2×10^{12} bacterias por 70 kg de peso corporal (o por 1,7 metros cuadrados de superficie o por 1,5 g de peso del hígado); entre 5×10^{11} y 5×10^{12} bacterias por 70 kg de peso corporal (o por 1,7 metros cuadrados de superficie o por 1,5 g de peso del hígado); entre 10^{12} y 10^{13} bacterias por 70 kg de peso corporal (o por 1,7 metros cuadrados de superficie); entre 2×10^{12} y 2×10^{13} bacterias por 70 kg de peso corporal (o por 1,7 metros cuadrados de superficie o por 1,5 g de peso del
- 65

- hígado); entre 5×10^{12} y 5×10^{13} bacterias por 70 kg de peso corporal (o por 1,7 metros cuadrados de superficie o por 1,5 g de peso del hígado); entre 10^{13} y 10^{14} bacterias por 70 kg de peso corporal (o por 1,7 metros cuadrados de superficie o por 1,5 g de peso del hígado); entre 2×10^{13} y 2×10^{14} bacterias por 70 kg de peso corporal (o por 1,7 metros cuadrados de superficie o por 1,5 g de peso del hígado); 5×10^{13} y 5×10^{14} bacterias por 70 kg de peso corporal (o por 1,7 metros cuadrados de superficie o por 1,5 g de peso del hígado); entre 10^{14} y 10^{15} bacterias por 70 kg de peso corporal (o por 1,7 metros cuadrados de superficie o por 1,5 g de peso del hígado); entre 2×10^{14} y 2×10^{15} bacterias por 70 kg de peso corporal (o por 1,7 metros cuadrados de superficie o por 1,5 g de peso del hígado); y así sucesivamente, de peso húmedo.
- 10 También se proporciona una o más de las dosis anteriores, donde la dosis se administra por medio de una inyección cada día, una inyección cada dos días, una inyección cada tres días, una inyección cada cuatro días, una inyección cada cinco días, una inyección cada seis días o una inyección cada siete días, donde se mantiene el programa de inyecciones, durante, por ejemplo, un día solamente, dos días, tres días, cuatro días, cinco días, seis días, siete días, dos semanas, tres semanas, cuatro semanas, cinco semanas o más. La invención también abarca combinaciones de las dosis y programas anteriores, *por ejemplo*, una dosis bacteriana inicial relativamente grande, seguida de dosis posteriores relativamente pequeñas, o una dosis inicial relativamente pequeña seguida de una dosis grande.
- 15 Un programa de dosificación de, por ejemplo, una vez/semana, dos veces/semana, tres veces/ semana, cuatro veces/ semana, cinco veces/ semana, seis veces/ semana, siete veces/ semana, una vez cada dos semanas, una vez cada tres semanas, una vez cada cuatro semanas, una vez cada cinco semanas y similares, está disponible para la invención. Los programas de dosificación abarcan la dosificación durante un período total de, por ejemplo, una semana, dos semanas, tres semanas, cuatro semanas, cinco semanas, seis semanas, dos meses, tres meses, cuatro meses, cinco meses, seis meses, siete meses, ocho meses, nueve meses, diez meses, once meses y doce meses.
- 20 Se proporcionan ciclos de los programas de dosificación anteriores. El ciclo puede repetirse aproximadamente, por ejemplo, cada siete días; cada 14 días; cada 21 días; cada 28 días; cada 35 días; 42 días; cada 49 días; cada 56 días; cada 63 días; cada 70 días; y similares. Puede producirse un intervalo de no dosificación entre un ciclo, donde el intervalo puede ser aproximadamente, por ejemplo, siete días; 14 días; 21 días; 28 días; 35 días; 42 días; 49 días; 56 días; 63 días; 70 días; y similares. En este contexto, el término "aproximadamente" significa más o menos un día, más o menos dos días, más o menos tres días, más o menos cuatro días, más o menos cinco días, más o menos seis días, o más o menos siete días.
- 30 La presente invención abarca un método de administración de *Listeria* que es oral. También se proporciona un método de administración de *Listeria* que es intravenoso. Además, se proporciona un método de administración de *Listeria* que es oral, intramuscular, intravenosa, intradérmica y/o subcutánea. La invención proporciona una bacteria de *Listeria* o cultivo o suspensión de bacterias de *Listeria*, preparadas cultivando en un medio basado en carne o que contiene polipéptidos derivados de un producto cárnico o animal. La presente invención también suministra una bacteria *Listeria* o cultivo o suspensión de bacterias *Listeria*, preparadas cultivando en un medio que no contiene carne ni productos animales, preparadas cultivando en un medio que contiene polipéptidos vegetales, preparadas cultivando un medio que no se basa en productos de levadura, o preparadas cultivando un medio que contiene polipéptidos de levadura.
- 35 Methods for co-administration with an additional therapeutic agent are well known in the art (Hardman, et al. (eds.) (2001) Goodman y Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 10ª ed., McGraw-Hill, Nueva York, NY; Poole y Peterson (eds.) (2001) Pharmacotherapeutics for Advanced Practice: A Practical Approach, Lippincott, Williams & Wilkins, Phila., PA; Chabner y Longo (eds.) (2001) Cancer Chemotherapy y Biotherapy, Lippincott, Williams & Wilkins, Phila., PA).
- 40 También se pueden usar agentes adicionales que son beneficiosos para producir respuesta de células T citolíticas. Dichos agentes se denominan en este documento vehículos. Estos incluyen, sin limitación, molécula coestimulante B7, interleucina-2, interferón- γ , GM-CSF, antagonistas de CTLA-4, ligando de OX-40/OX-40, ligando de CD40/CD40, sargramostim, levamisol, virus vaccinia, bacilo de Calmette-Guerin (BCG), liposomas, alumbre, adyuvante completo o incompleto de Freund, endotoxinas destoxificadas, aceites minerales, sustancias tensioactivas, tales como lipolecitina, polioles plurónicos, polianiones, péptidos y emulsiones de aceite o hidrocarburo. Se prefieren vehículos para inducir una respuesta inmune de células T que estimule, preferentemente, una respuesta de células T citolíticas frente a una respuesta de anticuerpos, aunque también pueden usarse aquellos que estimulan ambos tipos de respuesta. En los casos en que el agente es un polipéptido, se puede administrar el polipéptido en sí mismo o un polinucleótido que codifica el polipéptido. El vehículo puede ser una célula, tal como una célula presentadora de antígeno (APC) o una célula dendrítica. Las células presentadoras de antígeno incluyen tales tipos de células como macrófagos, células dendríticas y células B. Otras células presentadoras de antígenos profesionales incluyen monocitos, células de Kupffer de zona marginal, microglía, células de Langerhans, células dendríticas interdigitantes, células dendríticas foliculares y células T. También se pueden usar células presentadoras de antígeno facultativas.
- 45 Los ejemplos de células presentadoras de antígeno facultativos incluyen astrocitos, células foliculares, endoteliales y fibroblastos. El vehículo puede ser una célula bacteriana que se transforma para expresar el polipéptido o para

administrar un polinucleótido que posteriormente se expresa en las células del individuo vacunado. Se pueden agregar para aumentar la capacidad de la vacuna para desencadenar, mejorar o prolongar una respuesta inmune adyuvantes, tales como hidróxido de aluminio o fosfato de aluminio. Materiales adicionales, tales como citocinas, quimiocinas y secuencias de ácidos nucleicos bacterianos, como CpG, un agonista del receptor Toll-like (TLR) 9 así como agonistas adicionales para TLR 2, TLR 4, TLR 5, TLR 7, TLR 8, TLR9, incluyendo lipoproteína, LPS, monofosforil lípido A, ácido lipoteicoico, imiquimod, resiquimod y otros inmunomoduladores similares utilizados por separado o en combinación con las composiciones descritas también son posibles coadyuvantes. Otros ejemplos representativos de adyuvantes incluyen el adyuvante sintético QS-21 que comprende una saponina homogénea purificada de la corteza de Quillaja saponaria y *Corynebacterium parvum* (McCune et al., Cancer, 1979; 43: 1619). Se entenderá que el adyuvante está sujeto a optimización. En otras palabras, el experto en la técnica puede participar en la experimentación de rutina para determinar el mejor adyuvante a usar.

Una cantidad eficaz de un agente terapéutico es aquella que disminuirá o mejorará los síntomas normalmente en al menos un 10 %, más normalmente en al menos un 20 %, más normalmente en al menos un 30 %, normalmente en al menos un 40 %, más normalmente en al menos un 50 %, más normalmente en al menos un 60%, a menudo en al menos un 70 %, más a menudo en al menos un 80 % y más a menudo en al menos un 90 %, convencionalmente en al menos un 95 %, más convencionalmente en al menos un 99 % y más convencionalmente en al menos un 99,9 %.

Los reactivos y métodos de la presente invención proporcionan una vacuna que comprende solo una vacunación; o que comprende una primera vacunación; o que comprende al menos una vacuna de refuerzo; al menos dos vacunaciones de refuerzo; o al menos tres vacunas de refuerzo. Se dispone de orientación sobre los parámetros para las vacunaciones de refuerzo. Véase, por ejemplo, Marth (1997) *Biologicals* 25:199-203; Ramsay, et al. (1997) *Immunol. Cell Biol.* 75:382, 388; Gherardi, et al. (2001) *Histol. Histopathol.* 16:655-667; Leroux-Roels, et al. (2001) *Acta Clin. Belg.* 56:209-219; Greiner, et al. (2002) *Cancer Res.* 62:6944-6951; Smith, et al. (2003) *J. Med. Virol.* 70:Suppl.I:S38-S41; Sepulveda-Amor, et al. (2002) *Vaccine* 20:2790-2795).

Las formulaciones de agentes terapéuticos se pueden preparar para el almacenamiento mezclando con vehículos, excipientes o estabilizantes fisiológicamente aceptables en forma de, por ejemplo, polvos liofilizados, suspensiones acuosas, soluciones o suspensiones acuosas (véase, por ejemplo, Hardman, et al. (2001) Goodman y Gilman's *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, McGraw-Hill, Nueva York, NY; Gennaro (2000) *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*, Lippincott, Williams, y Wilkins, Nueva York, NY; Avis, et al. (eds.) (1993) *Pharmaceutical Dosage Forms: Parenteral Medications*, Marcel Dekker, NY; Lieberman, et al. (eds.) (1990) *Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets*, Marcel Dekker, NY; Lieberman, et al. (eds.) (1990) *Pharmaceutical Dosage Forms: Disperse Systems*, Marcel Dekker, NY; Weiner y Kotkoskie (2000) *Excipient Toxicity and Safety*, Marcel Dekker, Inc., New York, NY).

Ejemplos

Los siguientes ejemplos sirven para ilustrar la presente invención.

Ejemplo 1. Cepas bacterianas y selección de antígenos

Las cepas de la vacuna Lm se construyeron en dos antecedentes de cepas, atenuadas in vivo (Lm11, aka Lm $\Delta actA/\Delta inlB$) y KBMA PrfA* (Lm677, aka Lm $\Delta actA/\Delta inlB/\Delta uvrAB/prfA$ G155S). Los casetes de expresión se diseñaron para que contengan 1 y 5 copias de la secuencia PASRALEEKKGNYVVDHGSC (SEQ ID NO: 4) (denominada PvIII en la Fig. 1), cada copia flanqueada por una secuencia de escisión del proteasoma (recuadros negros en la Figura 1). Los casetes de expresión se optimizaron por codones para la expresión en *L. monocytogenes* y se clonaron como fragmentos BamHI-SpeI aguas abajo del promotor de *actA* y en marco con los 100 aminoácidos terminales de ActA ("ActA-N100") y marcados en el extremo carboxi con SIINFEKL (SL8), un epítipo de células T sustituto que facilita la evaluación de la expresión y secreción de antígenos heterólogos codificados. Las construcciones se clonaron en un derivado del vector de integración pPL2 y se integraron de forma estable en el locus ARNt^{Arg} del cromosoma bacteriano.

Las cepas probadas se resumen en la siguiente tabla:

Cepa	Construcción	Antecedentes
BH137	ActAN100-AH1A5-OVA	Lm11 ($\Delta actA/\Delta inlB$)
Lm11	Control negativo	
PL712	ActAN100+PepVIIIx5+SL8	Lm11
PL714	ActAN100+PepVIIIx5+SL8	Lm677 (prfA*)
PL716	ActAN100+PepVIIIx1+SL8	Lm11
PL717	ActAN100+PepVIIIx1+SL8	Lm677 (prfA*)

Ejemplo 2. Cultivo de células *in vitro*

Las células de hibridoma J774 se cultivaron en medio de células T (medio RPMI (Invitrogen, Carlsbad, CA) suplementado con 10 % de FBS (Hyclone, Logan, UT), penicilina/estreptomina (Mediatech, Manassas, VA), 1x aminoácidos no esenciales (Mediatech, Manassas, VA), L-glutamina 2 mM (Mediatech, Manassas, VA), tampón HEPES (Invitrogen, Carlsbad, CA), piruvato sódico 1 mM (Sigma, St. Louis, MO) y β -mercaptoetanol 50 μ M (Sigma, St. Louis, MO)). Las células de hibridoma B3Z se cultivaron en medio de células T sin penicilina/estreptomina.

Ejemplo 4. Inmunizaciones

Se obtuvieron ratones C3H/HeJ hembra de 6-12 semanas de edad de Charles River Laboratories (Wilmington, MA). Los estudios se realizaron con protocolos de animales aprobados por el Comité de Cuidado y Uso de Animales Institucional apropiado. Se prepararon bacterias atenuadas vivas para la inmunización de cultivos de una noche cultivados en medios de extracto de levadura. Las bacterias se diluyeron en solución salina equilibrada de Hank (HBSS) para inyección. Se administraron bacterias atenuadas vivas i.v. en la vena de la cola en un volumen de 200 μ l. Se sembraron en placas reservas de inyección de bacterias atenuadas vivas para confirmar las unidades formadoras de colonias (UFC). Los animales eran hembras sensibilizadas y con refuerzo con 1×10^7 UFC de *Lm* Δ actA Δ inlBprfA*5xEGFRvIII₂₀₋₄₀ separados por 30 días, y la frecuencia de células T CD8+ específicas de EGFRvIII determinadas por tinción de citocina intracelular. (Fig. 3).

Ejemplo 5. Evaluación de la expresión de antígeno y la respuesta inmune

a. Transferencias Western

Las transferencias Western del cultivo en caldo se realizaron en cantidades equivalentes de sobrenadantes precipitados con TCA de cultivos bacterianos cultivados en medios de extracto de levadura a una DO₆₀₀ de 0,7 (registro tardío). Para las transferencias Western de células DC2.4 infectadas con *Lm*, las células se inocularon con una multiplicidad de infección (MOI) de 10 durante 1 hora, las células se lavaron 3 veces con PBS y medio DMEM suplementado con 50 μ g/ml de gentamicina. Las células se cosecharon 7 horas después de la infección. Las células se lisaron con tampón de muestra SDS, se recogieron y pasaron por geles de poliacrilamida al 4-12 % y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa para el análisis de transferencia Western. Todas las transferencias de Western utilizaron un anticuerpo policlonal generado contra el extremo N maduro de la proteína ActA y se normalizaron para la expresión de p60 (una proteína *Lm* no relacionada) con un anticuerpo monoclonal anti-p60. La detección del antígeno se visualizó mediante quimioluminiscencia potenciada (ECL) o se visualizó y cuantificó con el sistema de detección IR Licor Odyssey (Figura 2)

b. Ensayo B3Z

Las células DC2.4 se infectaron con las cepas seleccionadas y se incubaron con el hibridoma de células T específicas de OVA₂₅₇₋₂₆₄, B3Z. La presentación del epítipo SIINFEKL en moléculas H-2 K^b de clase I se evaluó midiendo la expresión de β -galactosidasa usando un sustrato cromogénico (Fig. 4).

c. Reactivos para citometría de flujo

CD4 FITC (clon GK1.5) y MHC clase II FITC (clon M5/114.15.2) se adquirieron en eBioscience (San Diego, CA). El anticuerpo CD8a PerCP (clon 53-6.7) se adquirió en BD Biosciences (San Jose, CA). El tetrámero Kk-EEKKNYV (SEQ ID NO: 3) se plegó con el Tetramer Core NIH y se conjugó con APC.

d. Tinción de tetrámero de células T específicas de EGFRvIII

Se incubaron esplenocitos (linfocitos del bazo) con tetrámero anti-CD4, anti-CD8, anti-MHC de clase II y Kk-EGFRvIII durante 15 minutos a temperatura ambiente. Las células se lavaron tres veces con HBSS. Las muestras se adquirieron usando un citómetro de flujo LSRII (BD Biosciences). Los datos se seleccionaron para incluir exclusivamente eventos CD8+, eventos de CD4-clase II, se determinó el porcentaje de estas células que se unen al tetrámero Kk-EEKKNYV (SEQ ID NO: 3). Los datos se analizaron utilizando el software FlowJo (Treestar, Ashland, OR).

Ejemplo 6: Resultados

Como puede observarse en la figura 2, todas las construcciones de EGFRvIII₂₀₋₄₀ se detectaron dentro de macrófagos J774. Además, se descubrió que aumentando las copias de EGFRvIII₂₀₋₄₀ parece mejorar la secreción intracelular (Fig. 2). La cantidad de 5xEGFRvIII₂₀₋₄₀ secretada excedió la de la ovoalbúmina "de referencia". En animales, que recibieron 5x la construcción EGFRvIII₂₀₋₄₀, más del 30 % de las células T CD8+ en el bazo eran específicas de EGFRvIII 5 días después de la inmunización de refuerzo (Fig. 3). Todas las demás construcciones EGFRvIII₂₀₋₄₀ probadas son reconocidas por la célula T B3Z, lo que indica una expresión y presentación exitosas de epítopos de células T por parte de las cepas de *L. monocytogenes* a un nivel aproximadamente equivalente al

antígeno modelo de ovoalbúmina (Fig. 4).

Estos datos sugieren que la construcción de expresión de EGFRvIII₂₀₋₄₀, y particularmente, una construcción de expresión EGFRvIII₂₀₋₄₀, es muy adecuada para su uso dentro de esta plataforma de vacunas de *L. monocytogenes*.

5

Ejemplo 7: Evaluación de una respuesta inmune con EEKKGNYV (SEQ ID NO: 3)

La identificación precisa de epítomos restringidos de clase I proporciona un método optimizado para evaluar la inmunogenicidad *in vivo*, simplificando las comparaciones de nuestros candidatos a vacuna. Para identificar epítomos restringidos a clase I de ratón, así como para realizar una evaluación superficial de inmunogenicidad, se inmunizó a ratones C57BL/6 (H-2^b), BALB/c (H-2^d), C3H/HeJ (H-2^k) y SJL (H-2^s) con 1x10⁷ unidades formadoras de colonias (CFU) de cada cepa que expresa EGFRvIII₂₀₋₄₀ y la frecuencia y especificidad de las células T específicas de EGFRvIII se determinó mediante tinción de la citocina intracelular IFN-γ (ICS). Esta biblioteca utiliza péptidos 15-AA que se superponen con 14-AA, posible debido a la corta secuencia del EGFRvIII₂₀₋₄₀ péptido en nuestra vacuna y deseable debido a los problemas conocidos de procesamiento N-terminal asociados con estas bibliotecas. La mayor respuesta fue en la cepa de ratón C3H (H-2^k), donde > 1 % del total de células T CD8+ en el bazo respondió a uno de los péptidos 15-AA (datos no mostrados).

10

15

Para confirmar este hallazgo y refinar la secuencia exacta del péptido de unión de clase I, una cohorte de ratones C3H se sensibilizó y reforzó con la cepa Lm-EGFRvIIIx5, y luego se cribó de nuevo con la biblioteca de péptidos. Además, se incluyeron péptidos refinados del 15-mer identificados en el ensayo de inmunogenicidad primaria. Las células T CD8+ de estos ratones sensibilizados y reforzados reconocieron varios de los péptidos 15-AA, y la reactividad fue dependiente de dos residuos de ácido glutámico N-terminal. Suponiendo que estos dos residuos de ácido glutámico fueran necesarios para la unión a MHC, se usaron 7-, 8 y 9-meros de esta secuencia y se cribaron para determinar su reactividad (figura 5).

20

25

Identificación de un epítomo de EGFRvIII restringido a clase I en ratones C3H. Ratones C3H hembra se sensibilizaron y reforzaron con Lm-EGFRvIIIx5, y, a continuación, cinco días más tarde se extrajeron los bazos y se analizó su reactividad con la biblioteca de péptidos EGFRvIII, así como también los 7-, 8 y 9 meros derivados del péptido con el mayor reactividad en un cribado preliminar. Los datos representan el % de eventos IFN-γ + dentro del acotamiento de las células T CD8+. Estos experimentos demostraron que el péptido 8-AA EEKKGNYV (SEQ ID NO: 3) es reconocido por las células T CD8+ de los ratones C3H inmunizados

30

Las células T2 deficientes en TAP no pueden cargar moléculas de clase I con péptidos, lo que provoca inestabilidad y reciclaje de la superficie de la célula. Cuando se añaden péptidos exógenos que pueden unirse a la molécula de MHC expresada, esa molécula se estabiliza en la superficie de la célula con Lm-EGFRvIII. Para confirmar unión K^k del péptido EEKKGNYV (SEQ ID NO: 3), se usó un ensayo de células T2 que mide dicha inducción de la expresión de clase I tras la unión del péptido sustancialmente como describen Hansen y Myers (2003) Peptide induction of surface expression of class I MHC, pág. 18.11.1-18.11.8 *En* J. E. Colgan, A. M. Kruisbeer, D. H. Marguiles, y W. Strober (ed.), Current Protocols in Immunology, vol. 4. John Wiley & Sons, Nueva York, N.Y. Las células T2 que expresan K^k se incubaron durante la noche con la concentración de cada péptido EGFRvIII como se indica en la Fig. 6. Las células se lavaron y se tiñeron para la expresión de K^k en la superficie usando un anticuerpo específico de clase I. Los datos demuestran que EEKKGNYV se une a K^k y es óptimo con respecto a los péptidos más grandes que también contienen esta secuencia. Estos datos apoyan el uso del péptido EEKKGNYV definido para ensayos celulares *ex vivo* basados en su capacidad para unir K^k y proporcionan complejos de MHC-péptido que pueden ser reconocidos por las células T CD8+.

35

40

45

Usando este péptido restringido de clase I definido, se comparó la magnitud de la respuesta de células T CD8+ específicas de EGFRvIII después de la inmunización con cada cepa. Se inmunizó a ratones hembra C3H con 1x10⁵ UFC de las cepas 1x o 5x, y siete días después se recogieron los bazos y la frecuencia de células T CD8+ específicas de EGFRvIII₂₆₋₃₃ se determinó mediante ICS. De acuerdo con nuestra hipótesis, la inclusión de copias múltiples de EGFRvIII₂₀₋₄₀ condujo a una sensibilización de células T CD8+ potenciada en relación con la variante de copia única (figura 7).

50

Estos datos demuestran la capacidad para expresar una construcción que codifica secuencias de epítomos repetidas, pero alterando el uso de codones para maximizar la estabilidad genética y la expresión/secreción de antígenos. Este enfoque permite aumentar la potencia sin aumentar los riesgos potenciales para el paciente (es decir, administrando grandes dosis de vacuna).

55

La invención que se describe ilustrativamente en el presente documento se puede poner en práctica adecuadamente en ausencia de cualquier elemento o elementos, limitación o limitaciones, que no se divulga específicamente en el presente documento. Por lo tanto, por ejemplo, en cada caso en el presente documento, cualquiera de los términos "que comprende", "que consiste esencialmente en" y "que consiste en" puede ser reemplazado por cualquiera de los otros dos términos. Los términos y expresiones que se han empleado se usan como términos de descripción y no como limitación y no hay intención de que al usar dichos términos y expresiones se excluya cualquier equivalente de las características mostradas y descritas o porciones de las mismas, pero se reconoce que son posibles varias

60

65

modificaciones dentro del alcance de la invención. Por lo tanto, debe entenderse que aunque la presente invención se ha divulgado específicamente mediante realizaciones preferidas y características opcionales, los expertos en la técnica pueden recurrir a modificaciones y variaciones de los conceptos divulgados en el presente documento y que dichas modificaciones y variaciones se consideran dentro del alcance de la presente invención, como se define en las reivindicaciones adjuntas.

Otras formas de realización se exponen en las reivindicaciones siguientes.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un polipéptido inmunogénico, cuya secuencia de aminoácidos comprende una pluralidad de secuencias de polipéptidos EGFRvIII, cuya secuencia polipeptídica comprende EEKKGNYV (SEQ ID NO: 3), en donde cada secuencia de polipéptido EGFRvIII está flanqueada por una secuencia que está configurada para su escisión por el proteasoma.
- 10 2. El polipéptido de la reivindicación 1, en donde dicha pluralidad de secuencias de polipéptidos EGFRvIII comprende una o más secuencias de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en LEEKKGNYV (SEQ ID NO: 4), LEEKKGNYVVDH (SEQ ID NO: 2) y PASRALEEKKGNYVVDHGSC (SEQ ID NO: 5).
- 15 3. El polipéptido de las reivindicaciones 1 o 2, en donde dicha pluralidad de secuencias del polipéptido EGFRvIII comprende al menos tres copias de PASRALEEKKGNYVVDHGSC (SEQ ID NO: 5), o al menos cinco copias de PASRALEEKKGNYVVDHGSC (SEQ ID NO: 5).
- 20 4. El polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende además un resto configurado para dirigir dicho polipéptido a un receptor de superficie celular de una célula presentadora de antígeno.
- 25 5. Una molécula de ácido nucleico aislada que codifica el polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
6. La molécula de ácido nucleico aislada de la reivindicación 5, en donde la molécula de ácido nucleico está optimizada por codones para la expresión por *Listeria monocytogenes*.
7. La molécula de ácido nucleico aislada de las reivindicaciones 5 o 6, en donde dicha molécula de ácido nucleico codifica dicho polipéptido inmunogénico como una proteína de fusión que comprende una secuencia señal secretora.
- 30 8. La molécula de ácido nucleico aislada de la reivindicación 7, en donde la secuencia de señal secretora es una secuencia señal ActA de *Listeria monocytogenes*, o una secuencia en marco de ActA-N100 seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30 y SEQ ID NO: 31, o una secuencia de aminoácidos que tiene a al menos un 90 % de identidad de secuencia con dicha secuencia de ActA-N100.
- 35 9. Una composición que comprende una bacteria o un virus que comprenden el ácido nucleico de una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 8.
- 40 10. La composición de la reivindicación 9, en la que la bacteria es una bacteria *Listeria monocytogenes* opcionalmente muerta o atenuada pero metabólicamente activa (KBMA). que comprende dicho ácido nucleico integrado en el genoma de dicha bacteria.
- 45 11. La composición de la reivindicación 10, en donde dicho ácido nucleico ha sido integrado en un gen de virulencia de dicha bacteria y la integración de dicha secuencia de ácido nucleico interrumpe la expresión del gen de virulencia o interrumpe una secuencia codificante del gen de virulencia, opcionalmente, en donde el gen de virulencia es *actA* o *inIB*.
- 50 12. La composición de la reivindicación 11, en donde la bacteria es *Lm ΔactA/ΔinIB*.
- 55 13. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 9 o 12, donde la bacteria comprende además una mutación genética que atenúa la capacidad de la bacteria para reparar el ácido nucleico, opcionalmente, en donde la mutación genética está en uno o más genes seleccionados de *phrB*, *uvrA*, *uvrB*, *uvrC*, *uvrD* y *recA*.
- 60 14. Una composición farmacéutica que comprende la composición de una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 13 o ácido nucleico de una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 8.
15. La composición farmacéutica de la reivindicación 14 para su uso en un método de inducción de una respuesta de células T a EGFRvIII en un sujeto, comprendiendo dicho método expresar el ácido nucleico de cualquiera de las reivindicaciones 5 a 8 en dicho sujeto en condiciones seleccionadas para inducir dicha respuesta de células T en dicho sujeto.
16. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 15, en donde dicho sujeto tiene una neoplasia maligna que expresa EGFRvIII, tal como un glioma.

Fig. 1

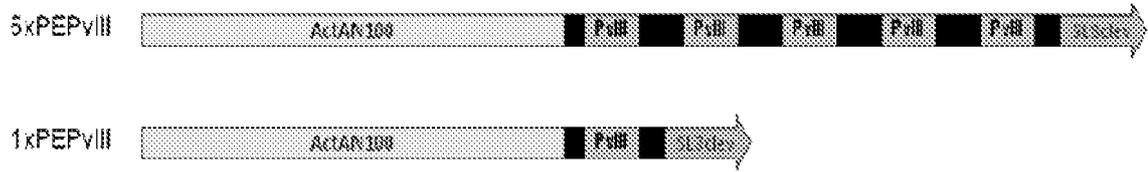


Fig. 2

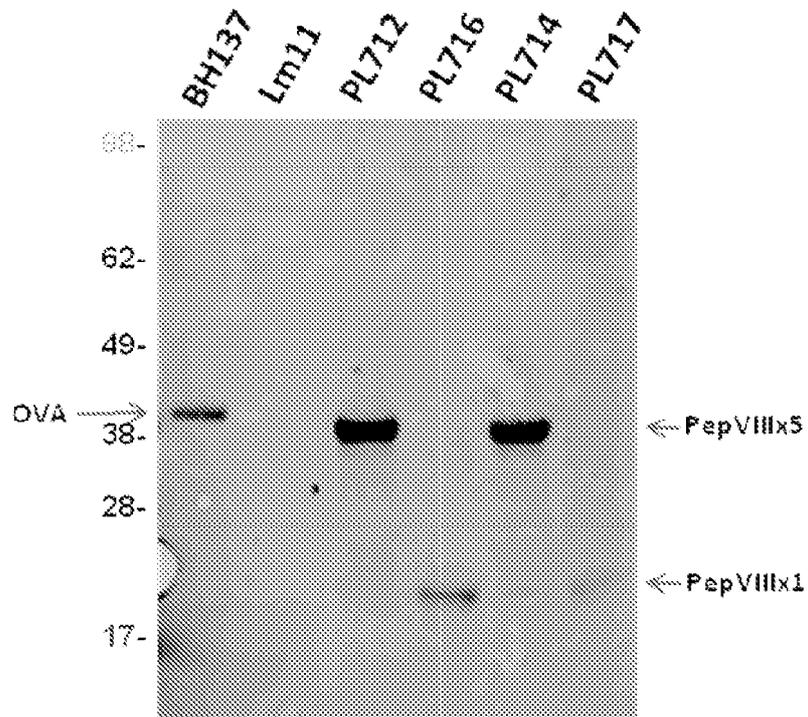


Fig. 3

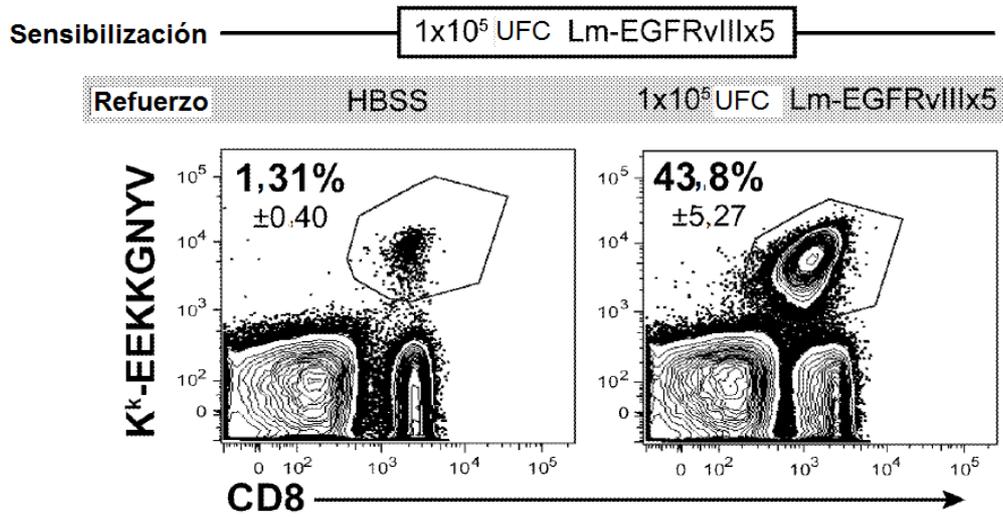


Fig. 4

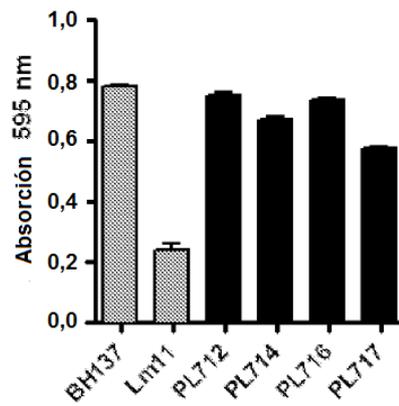


Fig. 5

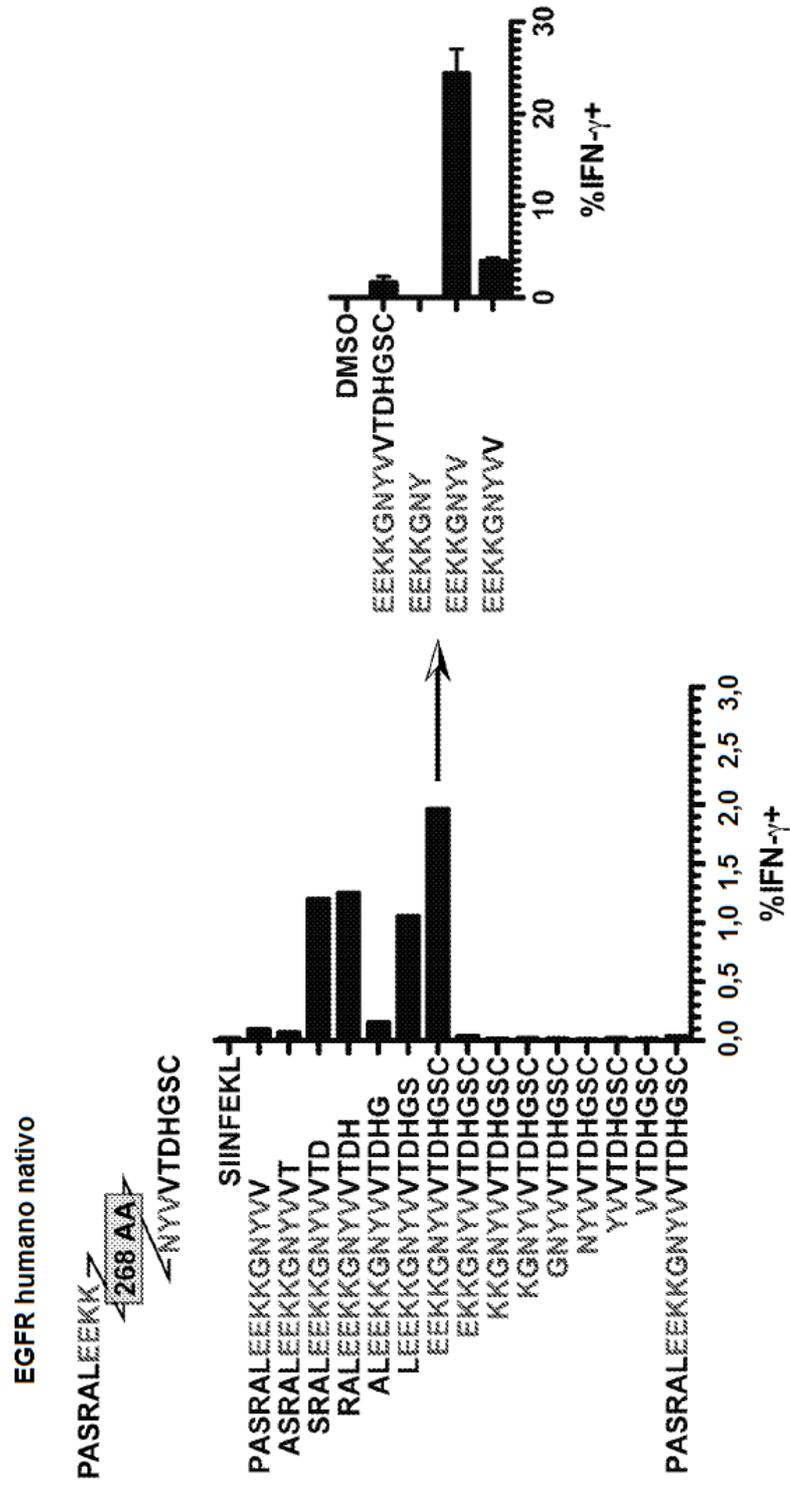


Fig. 6

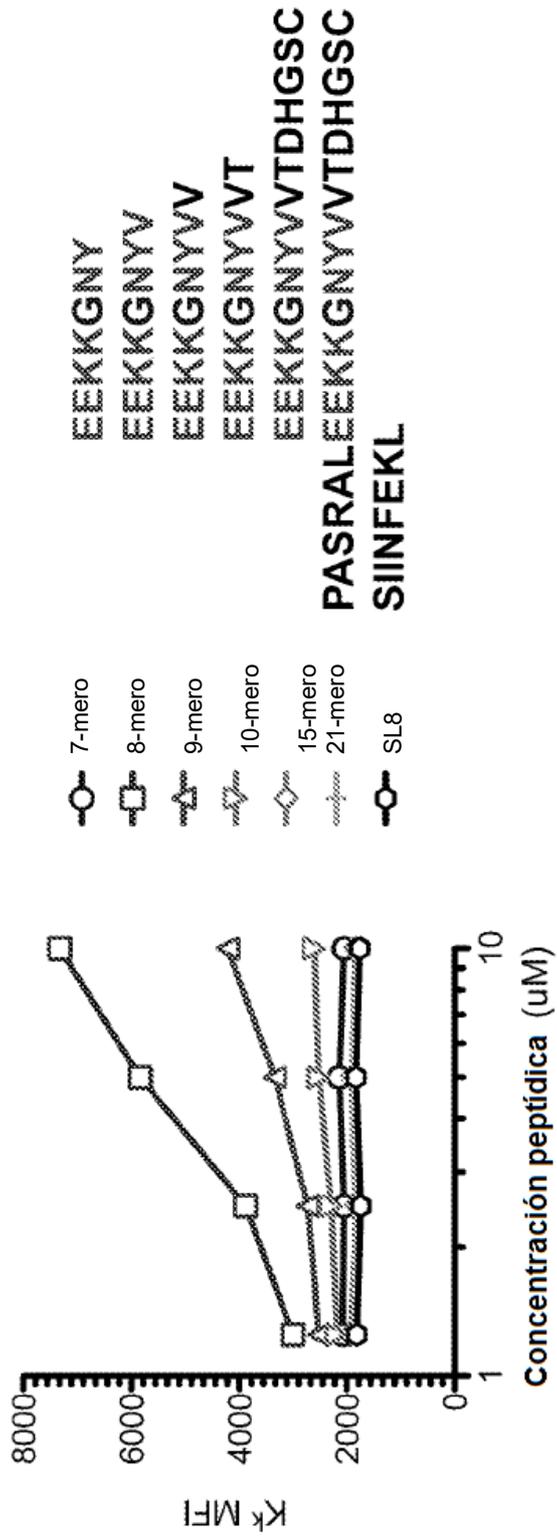


Fig. 7

