

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 684 749**

51 Int. Cl.:

C12N 1/21 (2006.01)

C12N 15/74 (2006.01)

C12N 9/10 (2006.01)

C12N 9/90 (2006.01)

A61K 35/74 (2015.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.08.2005 E 15167706 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.05.2018 EP 2942391**

54 Título: **Métodos para construir vacunas sin resistencia a antibióticos**

30 Prioridad:

13.08.2004 US 601492 P

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

04.10.2018

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**PATERSON, YVONNE y
VERCH, THORSTEN**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 684 749 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 para construir vacunas sin resistencia a antibióticos

Campo de la invención

5 La presente invención proporciona cepas vacunales de *Listeria* que expresan un antígeno heterólogo y una enzima metabólica, y métodos para generar las mismas.

Antecedentes de la invención

10 Las vacunas representan la medida de salud pública más beneficiosa y rentable que se conoce actualmente. Sin embargo, a medida que crece la comprensión de las neoplasias y las enfermedades infecciosas, se ha hecho evidente que las estrategias de vacunas tradicionales pueden no ser eficaces completamente. Las vacunas tradicionales han empleado organismos muertos o atenuados o subunidades de antígeno para producir inmunidad en un animal. Un límite con estos enfoques, especialmente con vacunas inactivadas o de subunidades, es que la respuesta inmunitaria es principalmente de naturaleza humoral y, por lo tanto, no es eficaz para combatir organismos intracelulares o tumores los cuales requieren inmunidad mediada por células para su destrucción. De manera similar, las bacterias atenuadas o inactivadas a menudo solo inducen la inmunización durante un corto período de tiempo y la inmunidad se limita a una respuesta humoral. Además, las vacunas bacterianas atenuadas o inactivadas tradicionales no provocan la respuesta inmunitaria de linfocitos T citotóxicos (CTL, por sus siglas en inglés) necesaria para la lisis de células tumorales y células infectadas con patógenos intracelulares.

25 Las vacunas virales se usan a menudo para inducir una respuesta de CTL en una vacuna. Las vacunas virales son generalmente virus patógenos atenuados mediante pases seriados en cultivo celular o virus muertos mediante calor o inactivación química. Los virus muertos son incapaces de infectar células y, por lo tanto, como las vacunas de subunidades, provocan principalmente una respuesta inmunitaria humoral. Los virus atenuados son capaces de infectar las células, y pueden inducir una respuesta de CTL en un individuo. Sin embargo, las vacunas de virus atenuados no carecen de inconvenientes. En primer lugar, atenuar un virus es a menudo un proceso de ensayo y error. En segundo lugar, existe un serio problema de seguridad en el uso de virus atenuados, especialmente en los niños, los ancianos y las personas inmunodeprimidas. Existe una solución a los problemas de las vacunas bacterianas y virales tradicionales, con los vectores de vacunas bacterianas tales como *Listeria monocytogenes* (LM). LM es un microbio intracelular facultativo grampositivo beta hemolítico.

35 Actualmente, se usan tres métodos para expresar un antígeno heterólogo en *Listeria monocytogenes*, e incluyen sistemas de expresión en base a plásmidos y sistemas de expresión de cromosomas. Un método basado en cromosomas se describe en Frankel y otros (1995, J. Immunol. 155:4775-4782) y Mata y otros. (2001, Vaccine 19:1435-1445). En resumen, se coloca un gen que codifica el antígeno de interés, junto con un promotor adecuado y una secuencia señal, entre dos regiones de ADN homólogas a una región del cromosoma de *Listeria*. Esta recombinación homóloga permite la integración específica del antígeno en el cromosoma de *Listeria*. El casete que comprende el antígeno y el ADN homólogo se liga a un plásmido sensible a la temperatura incapaz de replicarse a temperaturas superiores a 40 °C. El plásmido comprende, además, marcadores de resistencia a fármacos para fines de selección y mantenimiento del plásmido. La manipulación y la replicación de este plásmido tiene lugar generalmente en *E. coli*, debido a su rápida replicación y facilidad de transformación en comparación con la *Listeria*. Debido a que la *Listeria* es un organismo grampositivo y *E. coli* es un organismo gramnegativo, los genes de resistencia a fármacos pueden ser específicos para cada categoría de organismo, o puede haber dos copias del mismo gen de resistencia a los fármacos eficaces en ambos tipos de organismo, pero bajo el control de promotores grampositivos y gramnegativos separados. Después del ensamble, el plásmido se transforma en LM mediante conjugación directa con la *E. coli* que comprende el plásmido, o mediante lisis y aislamiento del plásmido de *E. coli*, seguido de electroporación de LM competente.

50 Para integrar el plásmido en la región deseada del cromosoma de *Listeria*, se sigue el método de intercambio alélico de dos etapas de Camilli y otros. (1992, Mol. Microbiol. 8:143-157). En resumen, la *Listeria* se pasa a más de 40 °C para evitar la replicación del plásmido. La integración del plásmido en el cromosoma de *Listeria* se selecciona por el crecimiento a 40 °C en presencia de un fármaco de selección, por ejemplo, cloranfenicol. Después de la selección de los transformantes, las bacterias se pasan a 30 °C y se seleccionan por sensibilidad al fármaco para detectar la *Listeria* en la cual se ha producido la escisión de secuencias de vector extrañas. La desventaja de este método es que el método de intercambio alélico doble lleva mucho tiempo y requiere la selección de muchos clones para llegar a una cepa vacunal adecuada. Un segundo método cromosómico de producción de cepas de *Listeria* que comprende un antígeno heterólogo se describe por Lauer y otros. (2002, J. Bacteriol. 184:4177-4186). Este método no requiere intercambio alélico, pero en cambio requiere dos vectores de integración en base a fagos. Este método usa uno o dos genes de resistencia a fármacos, lo que resulta en un organismo de *Listeria* que comprende resistencia a uno o más fármacos. La desventaja de los métodos de Lauer y otros es la presencia de genes de resistencia a fármacos, los cuales no se consideran seguros debido a la preocupación por la propagación de la resistencia a antibióticos a microorganismos previamente susceptibles a la terapia con antibióticos. Por lo tanto, la

presencia de genes de resistencia a los antibióticos en un vector vacunal se considera un inconveniente desde una perspectiva de seguridad.

Un tercer método para expresar el antígeno extraño en *Listeria* es expresar el antígeno episómicamente a partir de un plásmido. Este método se describe en Ikonomidis y otros. (1994 J. Exp. Med. 180: 2209 - 2218) y Gunn y otros. (2001, J Immunol 167: 6471-6479). Este método tiene la ventaja de que el gen no tiene que integrarse en el cromosoma y puede expresarse en copias múltiples, lo que puede mejorar la inmunogenicidad. Sin embargo, para seleccionar los transformantes de plásmido y garantizar la retención del plásmido durante la propagación in vitro, es necesario incluir dos genes de resistencia a fármacos en el plásmido, uno para la construcción del plásmido en *E. coli* y otro para la propagación de la *Listeria monocytogenes* transformada.

Por lo tanto, dados los usos demostrados de *Listeria* como un vector vacunal, se necesitan en el campo métodos para construir vectores vacunales de *Listeria* sin resistencia a antibióticos, pero aún capaces de provocar una respuesta inmunitaria fuerte.

El documento WO 99/25376 A1 describe una cepa de *Listeria monocytogenes* que es auxótrofa para D-alanina debido a la inactivación de la alanina racemasa (gen dal) y la D-aminoácido aminotransferasa (gen dat) y describe el uso de esta cepa atenuada como una vacuna y/o vector vacunal. El documento WO 99/25376 no describe una cepa de *Listeria* que es auxótrofa para la síntesis de D-alanina debido a una mutación en el gen D-alanina racemasa y el gen D-aminoácido transferasa y que expresa el antígeno HPV-E7, en donde el antígeno está en un plásmido junto con un gen D-alanina racemasa, es decir, no describe el uso de D-alanina racemasa como marcador de selección para cepas vacunales de *Listeria* que expresan el antígeno HPV-E7.

Thompson R.J. y otros. (1998, Infection and Immunity. vol. 66 (8). págs. 3552-3561) describen una cepa de *Listeria monocytogenes* que es auxótrofa para D-alanina debido a la inactivación de la alanina racemasa (gen dal) y la D-aminoácido aminotransferasa (gen dat). El documento describe el uso de esta cepa atenuada como una vacuna y/o vector vacunal. Sin embargo, Thompson y otros no describen una cepa de *Listeria* que es auxótrofa para la síntesis de D-alanina debido a una mutación en el gen D-alanina racemasa y el gen D-aminoácido transferasa y que expresa el antígeno HPV-E7, en donde el antígeno está en un plásmido junto con un gen D-alanina racemasa, es decir, no describe el uso de D-alanina racemasa como marcador de selección para cepas vacunales de *Listeria* que expresan el antígeno HPV-E7.

Lin Chih-Wei y otros, (2002, International Journal of Cancer. Vol. 102 (6). págs. 629-637) describen una cepa de *L. monocytogenes* que codifica el gen E7 del virus de papiloma humano tipo 16 y el uso de esta como vacuna para el cáncer de cuello uterino. La cepa se construye mediante la integración de un plásmido que contiene el gen E7 del HPV-16 fusionado a la secuencia señal de listeriolisina O (LLO), el gen phoA de *E. coli* y el gen de resistencia a la kanamicina aphA bajo el control del promotor phly mediante recombinación homóloga en el genoma de la cepa de tipo salvaje de *Listeria*. Sin embargo, Lin Chih-Wei y otros no describen una cepa que es auxótrofa para la síntesis de D-alanina debido a una mutación en el gen alanina racemasa y el gen aminoácido transferasa ni un plásmido que contiene un gen E7 y un gen D-alanina racemasa, a la vez que no tiene gen de resistencia a antibióticos.

Breve resumen de la invención

La presente invención proporciona un método para diseñar una cepa vacunal de *Listeria* recombinante para expresar un antígeno heterólogo, el método comprende poner en contacto una cepa de *Listeria* auxótrofa para la síntesis de D-alanina que comprende una mutación en un gen D-alanina racemasa y en un gen D-aminoácido transferasa en el cromosoma de *Listeria* con un plásmido, el plásmido comprende una primera secuencia de ácidos nucleicos que codifican un polipéptido que comprende un antígeno heterólogo, en donde el antígeno heterólogo es un antígeno E7 del virus del papiloma humano (HPV-E7) y una segunda secuencia de ácidos nucleicos que codifica una D-alanina racemasa, en donde el plásmido no confiere resistencia a antibióticos a la cepa vacunal de *Listeria* auxótrofa, de manera que la cepa auxótrofa de *Listeria* absorbe el plásmido, de manera que la D-alanina racemasa complementa la mutación en el gen D-alanina racemasa de la cepa bacteriana de *Listeria*, en donde la cepa auxótrofa de *Listeria* crecerá en ausencia de D-alanina, y en donde la primera secuencia de ácidos nucleicos se une operativamente a un promotor procariota, lo que diseña de esta manera una cepa vacunal de *Listeria* recombinante para expresar un antígeno heterólogo.

La presente invención proporciona, además, una cepa vacunal de *Listeria* recombinante auxótrofa para la síntesis de D-alanina que comprende una mutación en un gen D-alanina racemasa y en un gen D-aminoácido transferasa en el cromosoma de *Listeria*, en donde la *Listeria* comprende además un plásmido, en donde el plásmido comprende una primera secuencia de ácidos nucleicos que codifica un polipéptido, en donde el polipéptido comprende un antígeno heterólogo, donde el antígeno heterólogo es un antígeno E7 del virus del papiloma humano (HPV-E7, por sus siglas en inglés) y una segunda secuencia de ácidos nucleicos que codifica una enzima D-alanina racemasa, en donde el plásmido no confiere resistencia a antibióticos a la cepa vacunal de *Listeria* recombinante, de manera que el gen D-alanina racemasa complementa un gen D-alanina racemasa endógeno que falta en un cromosoma de la cepa vacunal de *Listeria* recombinante, y de manera que el plásmido se mantiene de manera estable en la cepa vacunal de *Listeria* recombinante en ausencia de una selección de antibiótico, en donde la primera secuencia de ácidos

nucleicos se une operativamente a un promotor procariota, y en donde la cepa de *Listeria auxótrofa* crecerá en ausencia de D-alanina.

- 5 En una modalidad, el plásmido comprende un gen *prfA*.
En otra modalidad, el promotor procariótico es un promotor *hly*.

10 En otra modalidad, el polipéptido es una proteína de fusión que comprende el HPV-E7 y un polipéptido adicional, en donde el polipéptido adicional es un fragmento no hemolítico de una proteína LLO, una secuencia de aminoácidos similar a PEST, o una proteína ActA o un fragmento de esta. En una modalidad, el fragmento no hemolítico de una proteína LLO comprende los primeros 441 aminoácidos de la proteína LLO.

15 En una modalidad, la segunda secuencia de ácidos nucleicos se une operativamente a una secuencia promotora/reguladora.

15 En una modalidad, la *Listeria* es una cepa vacunal de *Listeria monocytogenes*.

20 En otra modalidad, la invención proporciona una cepa vacunal de *Listeria* recombinante de la invención para su uso como medicamento. La presente invención proporciona, además, la cepa vacunal de *Listeria* recombinante para su uso en el tratamiento o prevención del cáncer de cuello uterino en un sujeto. En una modalidad, el tratamiento comprende la regresión de un tumor establecido.

Breve descripción de las figuras

25 La Figura 1 es un mapa esquemático de plásmidos lanzadera *E. coli* - *Listeria* pGG55 (lado izquierdo) y pTV3 (lado derecho). CAT(-): *cloranfenicol transferasa de E. coli*; CAT(+): *cloranfenicol transferasa de Listeria*; Ori Lm: origen de replicación para *Listeria*; Ori Ec: origen de replicación de p15 para *E. coli*, *prfA*: *Factor de regulación de la patogenicidad A de Listeria*, LLO: Listeriolisina O truncada en el extremo C lo que incluye su promotor; E7: HPV E7; p60-dal: casete de expresión del promotor p60 y el gen *dal* de *Listeria*. Además, se representan los sitios de restricción seleccionados.

30 Figura 2: Preparación de plásmido de pTV3 de la cepa de *E. coli* MB2159. Se realizó una preparación Midi de Qiagen® de ácidos nucleicos según el protocolo del fabricante. Bandas de izquierda a derecha: Bandas 1 y 7: Marcador de peso molecular, escalera de 100 pb (Invitrogen). Banda 2: pTV3, clon # 15. Banda 3: pTV3, clon # 16. Banda 4: pTV3C, clon # 22. Banda 5: pTV3C, clon # 24. Banda 6: control pGG55.

35 Figura 3. Mantenimiento de plásmidos in vitro (A) e in vivo (B). Para determinar la estabilidad in vitro, las cepas se cultivaron con (GG55-Chl) y sin (GG55-sin Chl) cloranfenicol (LM-LLO-E7) o con y sin D-alanina [Lmdd(pTV3)]. Los cultivos se diluyeron 1:1.000 diariamente en LB fresco. Las UFC de los cultivos se determinaron diariamente en BHI (BHI) y en BHI con cloranfenicol (BHI-Chl) para LM-LLO-E7 o en BHI con D-alanina (BHI-Ala) para Lmdd(pTV3).
40 Todos los medios líquidos y las placas contenían 50 µg adicionales de estreptomina por ml, a la que la cepa 10403S de *Listeria monocytogenes* es resistente naturalmente. Para determinar el mantenimiento in vivo del plásmido, se inyectó LM por vía intraperitoneal a una dosis de 1/10 la DL50 en 50 ratones C57BL/6. Los bazos se cosecharon en diferentes puntos de tiempo después de la inyección y se homogeneizaron en solución salina tamponada con fosfato (PBS). Los recuentos de UFC se prepararon en placas BHI con y sin D-alanina para Lmdd(pTV3), en placas BHI con y sin cloranfenicol para LM-LLO-E7, y en placas BHI únicamente para 10403S de tipo salvaje.
45

50 La Figura 4 representa el crecimiento en placas de agar Luria-Bertani (LB) de la cepa MB2159 de *E. coli* (negativa para alanina racemasa) transformada con el vector pTV3. Las bacterias se pusieron en placas en diferentes medios. Izquierda superior: solo agar. La MB2159-TV3 crece. Derecha superior: agar con alanina. La MB2159-TV3 crece. Izquierda inferior: agar con cloranfenicol. La MB2159-TV3 no crece porque falta el gen CAT. Derecha inferior: agar con cloranfenicol y alanina. La MB2159-TV3 no crece porque falta el gen CAT.

55 La Figura 5 representa el crecimiento en placas de agar LB de la cepa MB2159 de *E. coli* (negativa a alanina racemasa) sin el vector pTV3. Las placas de agar se disponen como en la figura 5. Izquierda superior: La MB2159 no crece. Derecha superior: agar con alanina. La MB2159 crece. Izquierda inferior: agar con cloranfenicol. La MB2159 no crece. Derecha inferior: La MB2159 no crece.

60 La Figura 6 representa el crecimiento en placas de agar LB de la cepa de LM Lmdd(-) transformada con el vector pTV3. Las bacterias se pusieron en placas en diferentes medios: Parte superior: agar con estreptomina, sin alanina añadida. La Lmdd-pTV3 crece (la cepa huésped 10403s es resistente a la estreptomina). Izquierda inferior(agar con cloranfenicol) y derecha inferior (agar con cloranfenicol y alanina): Lmdd-pTV3 no crece porque el gen CAT no está presente en pTV3.

65 La Figura 7 representa el crecimiento en placas de agar LB de la cepa de LM Lmdd(-) sin el vector pTV3. Izquierda superior: agar con estreptomina. La Lmdd(-) no puede crecer en ausencia de d-alanina. Derecha superior: agar con

alanina. La Lmdd(-) crece. Izquierda inferior (agar con cloranfenicol y alanina) y derecha inferior (agar con cloranfenicol): La Lmdd(-) es sensible al cloranfenicol y no crece.

5 La Figura 8 representa el crecimiento bacteriano medido por densidad óptica (600 nanómetros [nm]) representada contra el tiempo. +Ala: el medio contiene D-alanina; +Chl: el medio contiene cloranfenicol.

La Figura 9 representa la regresión tumoral en respuesta a la administración de cepas vacunales de LM (A). Los círculos representan ratones sin tratar, los triángulos invertidos representan ratones a los que se les administró Lmdd-TV3, y las cruces representan ratones a los que se les administró Lm-LLOE7.

10 Descripción detallada de la invención

En la presente descripción se describen cepas vacunales de *Listeria* que expresan un antígeno heterólogo y una enzima metabólica, y métodos para generar las mismas.

15 En una modalidad, la presente invención proporciona un método para diseñar una cepa vacunal de *Listeria* para expresar un antígeno heterólogo, el método comprende poner en contacto una cepa de *Listeria* auxótrofa para la síntesis de D-alanina que comprende una mutación en un gen D-alanina racemasa y en un gen D-aminoácido transferasa en el cromosoma de *Listeria* con un plásmido, el plásmido comprende una primera secuencia de ácidos nucleicos que codifica un polipéptido que comprende un antígeno heterólogo, en donde el antígeno heterólogo es un antígeno E7 del virus del papiloma humano (HPV-E7) y una segunda secuencia de ácidos nucleicos que codifica una D-alanina racemasa, en donde el plásmido no confiere resistencia a antibióticos a la cepa vacunal de *Listeria* auxótrofa, de manera que la cepa auxótrofa de *Listeria* absorbe el plásmido, de manera que la D-alanina racemasa complementa la mutación en el gen D-alanina racemasa de la cepa bacteriana de *Listeria*, en donde la cepa de *Listeria* auxótrofa crecerá en ausencia de D-alanina, y en donde la primera secuencia de ácidos nucleicos se une operativamente a un promotor procariota, lo que modifica de esta manera una cepa vacunal de *Listeria* recombinante para expresar un antígeno heterólogo.

20 Además, se describe en la presente descripción un método para diseñar una cepa vacunal de *Listeria* para expresar un antígeno heterólogo, el método comprende transformar una cepa de *Listeria* auxótrofa con un plásmido que comprende un primer ácido nucleico que codifica el antígeno heterólogo y un segundo ácido nucleico que codifica una enzima metabólica, de manera que la enzima metabólica complementa una deficiencia metabólica de la cepa de *Listeria* auxótrofa, lo que diseña de esta manera una cepa vacunal de *Listeria* para expresar un antígeno heterólogo.

30 "Transformar", en una modalidad, se usa idénticamente al término "transfección", y se refiere a diseñar una célula bacteriana para absorber un plásmido u otra molécula de ADN heteróloga. En otra modalidad, "transformar" se refiere a diseñar una célula bacteriana para expresar un gen de un plásmido u otra molécula de ADN heteróloga.

35 Como se demuestra por los datos proporcionados en la presente descripción, un vector vacunal bacteriano que comprende un plásmido que expresa un antígeno induce una respuesta inmunitaria más fuerte que una proteína de fusión que comprende un antígeno expresado a partir del cromosoma bacteriano. Por lo tanto, se describe un vector vacunal bacteriano que expresa un antígeno de proteína y carece de genes de resistencia a antibióticos.

40 En otra modalidad, el plásmido comprende además un factor de transcripción. En otra modalidad, el factor de transcripción está ausente en la cepa de *Listeria* auxótrofa o en el cromosoma bacteriano de una cepa de *Listeria* de la invención. En una modalidad, el factor de transcripción es prfA (Ejemplos en la presente descripción).

45 En una modalidad, el gen metabólico, factor de transcripción, etcétera, está ausente en un cromosoma de la cepa bacteriana. En otra modalidad, el gen metabólico, factor de transcripción, etcétera, está ausente en todos los cromosomas de la cepa bacteriana. En otra modalidad, el gen metabólico, factor de transcripción, etcétera, está ausente en el genoma de la cepa bacteriana.

En una modalidad, el factor de transcripción puede mutarse en el cromosoma. En otra modalidad, el factor de transcripción se elimina del cromosoma.

50 En otra modalidad, el plásmido no confiere resistencia a antibióticos a la cepa vacunal de *Listeria*. En otra modalidad, el plásmido no contiene un gen de resistencia a antibióticos.

55 En otra modalidad, un polipéptido es una proteína de fusión que comprende el antígeno heterólogo y un polipéptido adicional. En una modalidad, el polipéptido adicional es un fragmento no hemolítico de una proteína LLO (Ejemplos en la presente descripción). En otra modalidad, el polipéptido adicional es una secuencia PEST. En otra modalidad, el polipéptido adicional es una proteína ActA o un fragmento de esta. Se describe que las proteínas ActA y fragmentos de estas aumentan la presentación del antígeno y la inmunidad de una manera similar a LLO.

60 En otra modalidad, la primera secuencia de ácidos nucleicos se une operativamente a una secuencia promotora/reguladora. En otra modalidad, la segunda secuencia de ácidos nucleicos se une operativamente a una

secuencia promotora/reguladora. En otra modalidad, cada una de las secuencias de ácidos nucleicos se unen operativamente a una secuencia promotora/reguladora.

5 En otra modalidad, la enzima metabólica es una enzima de metabolismo de aminoácidos. En otra modalidad, la enzima metabólica es una enzima alanina racemasa (dal). En otra modalidad, la enzima metabólica es una enzima D-aminoácido transferasa (dat). Los genes dal y dat de LM se clonaron y aislaron de LM como se describe en Thompson y otros (Infect Immun 66: 3552-3561, 1998).

10 En otra modalidad, un gen dal usado en la presente invención tiene la secuencia que se expone en el núm. de acceso al GenBank AF038438. En otra modalidad, el gen dal es cualquier otro gen dal conocido en la técnica.

En otra modalidad, un gen dat utilizado en la presente invención tiene la secuencia que se expone en el núm. de acceso al GenBank AF038439. En otra modalidad, el gen dat es cualquier otro gen dat conocido en la técnica.

15 Las bacterias auxótrofas para la síntesis de D-alanina se conocen bien en la técnica, y se describen en, por ejemplo, E. coli, (Strych y otros, 2002, J. Bacteriol. 184:4321-4325), Corynebacterium glutamicum (Tauch y otros, 2002, J. Biotechnol 99:79-91), y *Listeria monocytogenes* (Frankel y otros, Patente de los Estados Unidos 6.099.848)), especies de *Lactococcus* y especies de *Lactobacillus* Bron y otros, (2002, Appl Environ Microbiol, 68: 5663-70).

20 La invención proporciona una cepa vacunal de *Listeria* recombinante auxótrofa para la síntesis de D-alanina que comprende una mutación en un gen D-alanina racemasa y en un gen D-aminoácido transferasa en dicho cromosoma de *Listeria*, en donde dicha *Listeria* comprende además un plásmido, en donde el plásmido comprende: una primera secuencia de ácidos nucleicos que codifica un polipéptido, en donde dicho polipéptido comprende un antígeno heterólogo, en donde dicho antígeno heterólogo es un antígeno E7 del virus del papiloma humano (HPV-
25 E7), y una segunda secuencia de ácidos nucleicos que codifica una enzima D-alanina racemasa, en donde dicho plásmido no confiere resistencia a antibióticos a dicha cepa vacunal de *Listeria* recombinante, de manera que dicho gen D-alanina racemasa complementa un gen D-alanina racemasa endógeno que falta en un cromosoma de dicha cepa vacunal de *Listeria* recombinante, y de manera que dicho plásmido se mantiene establemente en dicha cepa vacunal de *Listeria* recombinante en ausencia de una selección de antibiótico, en donde dicha primera secuencia de
30 ácidos nucleicos se une operativamente a un promotor procariota, y en donde dicha cepa de *Listeria* auxótrofa crecerá en ausencia de D-alanina.

En una modalidad, el gen metabólico D-alanina racemasa endógeno puede mutarse en el cromosoma. En otra modalidad, el gen metabólico endógeno se elimina del cromosoma.

35 En una modalidad, el plásmido no contiene una región de replicación de *Listeria*. Por lo tanto, solo las *Listeria* que contienen una copia que se integra en el genoma se seleccionan al crecer en medio LB. En otra modalidad, el plásmido contiene una región de replicación de *Listeria*.

40 En otra modalidad, el plásmido contiene un gen integrasa que puede expresarse bajo el control del promotor p60 de *Listeria*. En otra modalidad, el gen integrasa se expresa bajo el control de cualquier otro promotor que funcione en *Listeria*.

45 En una modalidad, el plásmido es un plásmido lanzadera.

En otra modalidad, la incorporación del plásmido en el genoma de la cepa de *Listeria* auxótrofa usa intercambio alélico de dos etapas. En otra modalidad, la incorporación usa cualquier otro método de integración conocido en la técnica.

50 En una modalidad, el gen metabólico D-alanina racemasa se expresa bajo un promotor inducible. En otra modalidad, el promotor es un promotor constitutivo. En otra modalidad, el promotor es cualquier otro tipo de promotor conocido en la técnica.

55 En otra modalidad, la presente invención proporciona una cepa vacunal de *Listeria* construida mediante el método de la presente invención.

En una modalidad, la cepa vacunal de *Listeria* recombinante de la presente invención, u obtenida de acuerdo con el método de la presente invención, puede usarse como inmunoterapéutico para el cáncer de cuello uterino.

60 En una modalidad, los vectores descritos en la presente descripción proporcionan los beneficios de un vector vacunal de *Listeria* sin el riesgo de aumentar la resistencia a antibióticos en organismos bacterianos.

65 En otra modalidad, una ventaja de las cepas vacunales de la presente invención es que los plásmidos recombinantes contenidos en ellas no es probable que se retengan tras la transferencia potencial a otras bacterias en el intestino. En otra modalidad, la ventaja es que los plásmidos no confieren una ventaja evolutiva en las células normales. En otra modalidad, la ventaja es que los plásmidos no contienen sistemas de retención activos tales como

secuencias de partición. Por lo tanto, fuera de sus células huésped deficientes, los plásmidos muy probablemente se diluirán fuera de la población y por último se eliminarán con el tiempo.

5 "Alanina racemasa" se refiere, en una modalidad, a una enzima que convierte el isómero L del aminoácido alanina en su isómero D. En otra modalidad, tales enzimas son conocidas por el número EC 5.1.1.1.

10 "Enzima del metabolismo de aminoácidos" se refiere, en una modalidad, a un péptido o proteína que tiene un papel funcional en la conversión de un aminoácido de una forma a otra, tal como, pero no limitado a, alterar la estereoquímica del aminoácido, hidrolizar o añadir grupos a un aminoácido, escindir aminoácidos, y similares.

15 El término "bacteria auxótrofa" se refiere, en una modalidad, a una cepa bacteriana que no es capaz de crecer o replicarse sin la complementación de un factor que permita dicho crecimiento o replicación.

20 "Proteína de fusión" se refiere, en una modalidad, a una proteína que comprende dos o más proteínas unidas entre sí. En una modalidad, las proteínas se unen por enlaces peptídicos. En otra modalidad, las proteínas se unen por otros enlaces químicos. En otra modalidad, las proteínas se unen por uno o más aminoácidos entre las dos o más proteínas, que pueden denominarse como espaciadores.

25 "Homólogo" se refiere a la similitud de la secuencia de subunidades entre dos moléculas poliméricas, por ejemplo, entre dos moléculas de ácido nucleico, por ejemplo, dos moléculas de ADN o dos moléculas de ARN, o entre dos moléculas de polipéptidos. Cuando una posición de subunidad en ambas de las dos moléculas se ocupa por la misma subunidad monomérica, por ejemplo, si una posición en cada una de las dos moléculas de ADN se ocupa por adenina, entonces ellas son homólogas en esa posición. La homología entre dos secuencias es una función directa del número de posiciones coincidentes u homólogas, por ejemplo, si la mitad (por ejemplo, cinco posiciones en un polímero de diez subunidades de longitud) de las posiciones en dos secuencias compuestas son homólogas, entonces las dos secuencias son homólogas al 50 %, si el 90 % de las posiciones, por ejemplo, 9 de 10, son coincidentes u homólogas, las dos secuencias comparten una homología del 90 %. A manera de ejemplo, las secuencias de ADN 3'ATTGCC5' y 3'TATGGC comparten un 50 % de homología. En otra modalidad, "homología" se usa como sinónimo de "identidad". En otra modalidad, cuando los términos "homología" o "identidad" se usan en la presente descripción para referirse a los ácidos nucleicos y proteínas, debe interpretarse que se aplica a la homología o identidad tanto a nivel de la secuencia de ácidos nucleicos como de la secuencia de aminoácidos.

35 En otra modalidad, los términos "gen" y "gen recombinante" se refieren a moléculas de ácido nucleico que comprenden un marco abierto de lectura que codifica un polipéptido de la invención. Dichas variaciones alélicas naturales pueden resultar típicamente en una variación del 1-5 % en la secuencia de nucleótidos de un gen dado. Los alelos alternativos pueden identificarse por secuenciación del gen de interés en una cantidad de individuos u organismos diferentes. Esto puede llevarse a cabo fácilmente mediante el uso de sondas de hibridación para identificar el mismo locus genético en una diversidad de individuos u organismos. Se pretende que todas y cada una de dichas variaciones de nucleótidos y polimorfismos o variaciones de aminoácidos resultantes que resultan de una variación alélica natural y que no alteran la actividad funcional estén dentro del alcance de la invención.

40 Describir dos polinucleótidos como "unidos operativamente" significa, en una modalidad, que un resto de ácido nucleico monocatenario o bicatenario comprende los dos polinucleótidos dispuestos dentro del resto de ácido nucleico de tal manera que al menos uno de los dos polinucleótidos es capaz de ejercer un efecto fisiológico por el que se caracteriza sobre el otro. A manera de ejemplo, un promotor unido operativamente a la región codificante de un gen es capaz de promover la transcripción de la región codificante.

45 "Secuencia promotora/reguladora" se refiere, en una modalidad, a una secuencia de ácidos nucleicos que se requiere para, o mejora, la expresión de un producto génico unido operativamente a la secuencia promotora/reguladora. En otra modalidad, esta secuencia es la secuencia promotora central. En otra modalidad, esta secuencia incluye, además, una secuencia potenciadora y otros elementos reguladores que se requieren para la expresión del producto génico.

55 I. Cepas vacunales de *Listeria*

La cepa de *Listeria* en particular empleada será evidente para el experto en la técnica. Los ejemplos de cepas de *Listeria* que pueden emplearse en la presente invención incluyen *Listeria monocytogenes* (ATCC Núm. 15313).

60 El experto en la técnica, cuando cuente con la presente descripción y los métodos en la presente descripción, comprenderá fácilmente que diferentes promotores transcripcionales, terminadores, vectores portadores o secuencias génicas específicas (por ejemplo, aquellas en vectores de clonación disponibles comercialmente) pueden usarse con éxito en métodos y composiciones de la presente invención. Como se contempla en la presente invención, estas funcionalidades se proporcionan en, por ejemplo, los vectores disponibles comercialmente conocidos como la serie pUC. En otra modalidad, se eliminan secuencias de ADN no esenciales (por ejemplo, genes de resistencia a antibióticos).

En otra modalidad, se usa un plásmido disponible comercialmente en la presente invención. Dichos plásmidos están disponibles en una diversidad de fuentes, por ejemplo, Invitrogen (La Jolla, CA), Stratagene (La Jolla, CA), Clontech (Palo Alto, CA), o pueden construirse mediante el uso de métodos que se conocen bien en la técnica. Otra modalidad es un plásmido tal como pCR2.1 (Invitrogen, La Jolla, CA), que es un vector de expresión procariota con un origen de replicación procariota y elementos promotores/reguladores para facilitar la expresión en un organismo procariota. En otra modalidad, las secuencias de nucleótidos extrañas se eliminan para disminuir el tamaño del plásmido y aumentar el tamaño del casete que puede colocarse en el mismo.

Tales métodos se conocen bien en la técnica, y se describen en, por ejemplo, Sambrook y otros, (1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York) y Ausubel y otros. (1997, Current Protocols in Molecular Biology, Green & Wiley, Nueva York).

Los genes de resistencia a antibióticos se usan en los procesos convencionales de selección y clonación empleados comúnmente en biología molecular y en la preparación de vacunas. Los genes de resistencia a antibióticos contemplados en la presente invención incluyen, pero no se limitan a, productos génicos que confieren resistencia a ampicilina, penicilina, metilicina, estreptomycin I, eritromicina, kanamicina, tetraciclina, cloranfenicol (CAT), neomicina, higromicina, gentamicina y otros que se conocen bien en la técnica.

Los métodos para transformar bacterias se conocen bien en la técnica e incluyen métodos en base a células competentes de cloruro de calcio, métodos de electroporación, transducción mediada por bacteriófagos, técnicas de transformación químicas y físicas (de Boer y otros, 1989, Cell 56:641-649; Miller y otros, 1995, FASEB J., 9:190-199; Sambrook y otros, 1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York; Ausubel y otros, 1997, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Nueva York; Gerhardt y otros, eds., 1994, Methods for General and Molecular Bacteriology, American Society for Microbiology, Washington, DC; Miller, 1992, A Short Course in Bacterial Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.) En otra modalidad, la cepa vacunal de *Listeria* de la presente invención se transforma mediante electroporación.

Se describen plásmidos y otros vectores de expresión útiles en la presente invención en otra parte en la presente descripción, y pueden incluir características tales como una secuencia promotora/reguladora, un origen de replicación para bacterias gramnegativas y grampositivas, un ácido nucleico aislado que codifica una proteína de fusión y un ácido nucleico aislado que codifica un gen de metabolismo de aminoácidos. Además, un ácido nucleico aislado que codifica una proteína de fusión y un gen de metabolismo de aminoácidos tendrá un promotor adecuado para dirigir la expresión de dicho ácido nucleico aislado. Los promotores útiles para dirigir la expresión en un sistema bacteriano se conocen bien en la técnica e incluyen el bacteriófago lambda, el promotor bla del gen de beta-lactamasa de pBR322 y el promotor CAT del gen cloranfenicol acetil transferasa de pBR325. Ejemplos de promotores procariotas adicionales incluyen los promotores derecho e izquierdo principales del bacteriófago lambda (P_L y P_R), los promotores trp, recA, lacZ, lad, y gal de *E. coli*, la alfa-amilasa (Ulmanen y otros, 1985, J. Bacteriol. 162:176-182) y los promotores específicos de S28 de *B. subtilis* (Gilman y otros, 1984 Gene 32:11-20), los promotores de los bacteriófagos de Bacillus (Gryczan, 1982, en: The Molecular Biology of the Bacilli, Academic Press, Inc., Nueva York), y promotores de Streptomyces (Ward y otros, 1986, Mol. Gen. Genet. 203:468-478). Promotores procariotas adicionales contemplados en la presente invención se revisan en, por ejemplo, Glick (1987, J. Ind. Microbiol. 1:277-282); Cenatiempo, (1986, Biochimie, 68:505-516); y Gottesman, (1984, Ann. Rev. Genet. 18:415-442). Ejemplos adicionales de elementos promotores/reguladores contemplados en la presente invención incluyen, pero no se limitan a, el promotor prfA de *Listeria*, el promotor hly de *Listeria*, el promotor p60 de *Listeria* y el promotor ActA de *Listeria* (núm. de acceso al GenBank NC_003210) o fragmentos de estos.

El gen expresado en el plásmido codifica una proteína D-alanina racemasa que complementa el gen D-alanina racemasa endógeno que falta en el mutante auxótrofo.

En otra modalidad, la bacteria auxótrofa es deficiente en las enzimas del metabolismo de aminoácidos para el ácido D-glutámico, un componente de la pared celular. La síntesis de ácido D-glutámico se controla por el gen dat, que se implica en la conversión de D-glu + pir a alfa-cetoglutarato + D-ala, y la reacción inversa. La síntesis de ácido D-glutámico se controla, además, por el gen dga, y un mutante auxótrofo para la síntesis de ácido D-glutámico no crecerá en ausencia de ácido D-glutámico (Pucci y otros, 1995, J. Bacteriol. 177: 336-342). Un ejemplo adicional incluye un gen implicado en la síntesis de ácido diaminopimélico. Dichos genes de síntesis codifican beta-semialdehído deshidrogenasa, y cuando se inactivan, rinden un auxótrofo mutante para esta ruta de síntesis (Sizemore y otros, 1995, Science 270: 299-302).

En otra modalidad, el plásmido comprende un gen que codifica una proteína de fusión. Las proteínas de fusión que comprenden un antígeno pueden prepararse mediante cualquier método adecuado, lo que incluye, por ejemplo, clonación y restricción de secuencias apropiadas o síntesis química directa mediante los métodos descritos más abajo. Alternativamente, las subsecuencias pueden clonarse y las subsecuencias apropiadas escindirise mediante el uso de enzimas de restricción apropiadas. Después, los fragmentos pueden ligarse para producir la secuencia de ADN deseada. En otra modalidad, el ADN que codifica el antígeno se produce mediante el uso de métodos de amplificación de ADN, por ejemplo, reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés). En primer lugar, los segmentos del ADN nativo en cada lado del nuevo extremo se amplifican por separado. El extremo 5' de la secuencia amplificada codifica al enlazador peptídico, mientras que el extremo 3' de la otra secuencia amplificada

también codifica al enlazador peptídico. Dado que el extremo 5' del primer fragmento es complementario al extremo 3' del segundo fragmento, los dos fragmentos (después de una purificación parcial, por ejemplo en LMP agarosa) pueden usarse como una plantilla de superposición en una tercera reacción de PCR. La secuencia amplificada contendrá codones, el segmento en el lado carboxilo del sitio de apertura (que ahora forma la secuencia del amino), el enlazador, y la secuencia en el lado amino del sitio de apertura (que ahora forma la secuencia del carboxilo). El antígeno se liga en un plásmido.

En la presente descripción se describe que alternativamente puede usarse un sistema de integración cromosómico basado en fagos para aplicaciones clínicas. Puede usarse una cepa huésped que es auxótrofa para las enzimas esenciales, lo que incluye, pero no se limita a, d-alanina racemasa, por ejemplo Lmdal(-)dat(-). Para evitar una "etapa de maduración del fago", puede usarse un sistema de integración del fago basado en PSA (Lauer, y otros, 2002 J Bacteriol, 184: 4177-4186). Esto requiere una selección continua de antibióticos para mantener el gen integrado. Por lo tanto, la descripción permite el establecimiento de un sistema de integración cromosómico basado en fagos que no requiere selección con antibióticos. En cambio, se complementa una cepa huésped auxótrofa.

Las proteínas recombinantes pueden sintetizarse mediante el uso de metodología de ADN recombinante. Esto implica, en una modalidad, crear una secuencia de ADN que codifica la proteína de fusión, colocar el ADN en un casete de expresión, tal como el plásmido de la presente invención, bajo el control de un elemento promotor/regulador particular, y expresar la proteína. El ADN que codifica la proteína de fusión (por ejemplo, LLO no hemolítica/antígeno) de la presente invención puede prepararse mediante cualquier método adecuado, lo que incluye, por ejemplo, clonación y restricción de secuencias apropiadas o síntesis química directa mediante métodos tales como el método de fosfotriéster de Narang y otros. (1979, Meth. Enzymol. 68: 90-99); el método fosfodiéster de Brown y otros. (1979, Meth. Enzymol 68: 109-151); el método de dietilfosforamidita de Beaucage y otros. (1981, Tetra. Lett., 22: 1859-1862); y el método de soporte sólido de la patente de Estados Unidos núm. 4,458,066.

Puede usarse la síntesis química para producir un oligonucleótido monocatenario. Este oligonucleótido monocatenario se convierte, en diversas modalidades, en ADN bicatenario mediante hibridación con una secuencia complementaria, o mediante polimerización con una ADN polimerasa mediante el uso de la cadena sencilla como plantilla. Un experto en la técnica reconocería que, mientras la síntesis química de ADN se limita a secuencias de aproximadamente 100 bases, pueden obtenerse secuencias más largas mediante el enlace de secuencias más cortas. Las subsecuencias pueden clonarse y las subsecuencias apropiadas escindirse mediante el uso de enzimas de restricción apropiadas. Después, los fragmentos se ligan para producir la secuencia de ADN deseada.

En otra modalidad, el ADN que codifica la proteína de fusión o la proteína recombinante puede clonarse mediante el uso de métodos de amplificación de ADN tales como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Por lo tanto, el gen para LLO no hemolítica se amplifica por PCR, mediante el uso de un cebador sentido que comprende un sitio de restricción adecuado y un cebador antisentido que comprende otro sitio de restricción, por ejemplo, un sitio de restricción no idéntico para facilitar la clonación. Lo mismo se repite para el ácido nucleico aislado que codifica un antígeno. La ligación de las secuencias de LLO no hemolítica y antígeno y la inserción en un plásmido o vector produce un vector que codifica LLO no hemolítica unida a un extremo del antígeno. Las dos moléculas se unen directamente o mediante un espaciador corto introducido por el sitio de restricción.

En otra modalidad, las secuencias de ácidos nucleicos que codifican las proteínas de fusión o recombinantes se transforman en *Listeria*. El gen de la proteína de fusión recombinante se unirá operativamente a secuencias de control de la expresión apropiadas. Las secuencias promotoras/reguladoras se describen en detalle en otra parte en la presente descripción. En otra modalidad, el plásmido comprende, además, elementos reguladores del promotor adicionales, así como también un sitio de unión al ribosoma y una señal de terminación de la transcripción.

En otra modalidad, una proteína de fusión comprende, *entre otros*, una proteína de LLO no hemolítica de LM. La proteína LLO no hemolítica comprende, en una modalidad, aproximadamente los primeros 400 a 441 aminoácidos de la proteína LLO de longitud completa de 529 aminoácidos, cuya secuencia se describe, por ejemplo, en Mengaud y otros, (1988, Infect). Immun. 56:766-772, núm. de acceso al GenBank P13128). La construcción de una proteína de fusión que comprende un antígeno y una proteína LLO no hemolítica se describe en otra parte en la presente descripción, y en, por ejemplo, Gunn y otros, (2001, J. Immunology 167: 6471-6479).

En otra modalidad, la proteína de fusión comprende una secuencia PEST, ya sea de una proteína LLO o de otro organismo, por ejemplo, un organismo procariota.

En otra modalidad, la proteína de fusión comprende una secuencia ActA de un organismo de *Listeria*. La construcción y el uso de una proteína de fusión que comprende una secuencia PEST o una secuencia ActA pueden proceder esencialmente como se describe en la presente descripción y en la patente de Estados Unidos 6,767,542, el documento WO 01/72329 y la publicación de patente de Estados Unidos núm. 2005/0118184 de Paterson y otros.

Los antígenos de estas y otras enfermedades se conocen bien en la técnica, y el experto en la técnica, cuando cuente con la presente descripción y los métodos y técnicas descritos en la presente descripción, será capaz de construir fácilmente una proteína de fusión que comprenda una proteína LLO no hemolítica y un antígeno para su

uso en la presente invención. En otra modalidad, para seleccionar una bacteria auxótrofa que comprende el plásmido, se cultivan bacterias auxótrofas transformadas en un medio que seleccionará la expresión del gen del metabolismo de aminoácidos. En otra modalidad, una bacteria auxótrofa para la síntesis de D-alanina crecerá en ausencia de D-alanina cuando se transforme y exprese el plásmido de la invención si el plásmido comprende un ácido nucleico aislado que codifica una enzima de metabolismo de aminoácidos para la síntesis de D-alanina. Dichos métodos para preparar medios apropiados que comprenden o carecen de factores de crecimiento, suplementos, aminoácidos, vitaminas, antibióticos y similares necesarios se conocen bien en la técnica, y están disponibles comercialmente (Becton-Dickinson, Franklin Lakes, NJ).

En otra modalidad, una vez que la bacteria auxótrofa que comprende el plásmido descrito en la presente descripción se ha seleccionado en un medio apropiado, las bacterias se propagan en presencia de una presión selectiva. Dicha propagación comprende hacer crecer las bacterias en los medios sin el factor auxótrofo. La presencia del plásmido que expresa una enzima de metabolismo de aminoácidos en las bacterias auxótrofas asegura que el plásmido se replicará junto con la bacteria, lo que selecciona de este modo continuamente a las bacterias que albergan el plásmido. El experto en la técnica, cuando cuente con la presente descripción y los métodos en la presente descripción, podrá aumentar fácilmente la producción del vector vacunal de *Listeria* mediante el ajuste del volumen del medio en el que crece la bacteria auxótrofa que comprende el plásmido.

Sección de detalles experimentales

Ejemplo 1

Provocación de respuestas inmunitarias por vectores bacterianos que llevan constructos que codifican antígenos episómicos

Materiales y métodos experimentales

Transformación y selección

Se usó la cepa de *E. coli* MB2159 para las transformaciones, mediante el uso de protocolos estándar. Las células bacterianas se prepararon para la electroporación mediante lavado con H₂O.

Cultivo bacteriano y pase in vivo de *Listeria*

Se cultivaron *E. coli* mediante el seguimiento de métodos estándar. La *Listeria* se cultivó a 37 °C, mediante la agitación a 250 rpm en medio LB (Difco, Detroit, MI). + 50 µg/ml de estreptomina, y se cosechó durante la fase de crecimiento exponencial. Para Lm-LLOE7, se añadieron al medio 37 µg/ml de cloranfenicol. Para las determinaciones de la cinética de crecimiento, se cultivaron las bacterias durante 16 horas en 10 ml de LB + antibióticos. Se midió la DO_{600 nm} y las densidades de cultivo se normalizaron entre las cepas. El cultivo se diluyó 1:50 en LB + antibióticos adecuados y D-alanina, si procedía.

Pase de LM en ratones

Se inyectaron 1 x 10⁸ UFC por vía intraperitoneal (ip.) en ratones C57BL/6. El día tres, se aislaron los bazos y se homogeneizaron en PBS. Una alícuota de la suspensión de bazos se puso en placas de LB con antibióticos según procedía. Varias colonias se expandieron y se mezclaron para establecer una madre de inyección.

Generación del plásmido pGG55

El punto de partida para la subclonación de pGG55 fue el plásmido pDP1659. Se generó pDP1659 mediante amplificación por PCR (reacción en cadena de la polimerasa) a partir de ADN genómico de LM el fragmento de ADN que codifica los primeros 420 aminoácidos de LLO junto con las secuencias reguladoras aguas arriba y el promotor, y después se ligó el fragmento en pUC19. El fragmento de ADN que codifica el antígeno NP se amplificó por PCR, mediante el uso del plásmido pAPR501, proporcionado por el Dr. Peter Palese, como plantilla, y se ligó en pUC19 como una fusión de traducción dentro del marco aguas abajo del fragmento de LLO. La proteína de fusión se subclonó después en pAM401, un vector lanzadera capaz de replicar tanto en bacterias gramnegativas como en bacterias grampositivas (Wirth R, An FY, Clewell DB. Highly efficient protoplast transformation system for *Streptococcus faecalis* and a new *Escherichia coli*-*S. faecalis* shuttle vector. *J Bacteriol* 165(3): 831-6, 1986). El promotor *hly* y el fragmento génico se generaron mediante el uso de los cebadores 5'-GGGGGCTAGCCCTCCTTTGATTAGTATATTC-3' (sec. con núm. de ident.: 3) y 5'-CTCCCTCGAGATCATAATTTACTTCATC-3' (sec. con núm. de ident.: 4).

A continuación, se construyó el plásmido pDP2028 mediante la clonación del gen *prfA* en el sitio *SaiI* de pDP1659. El gene *prfA* se amplificó por PCR mediante el uso de los cebadores siguientes:

5'-GACTACAAGGACGATGACCCACAAGTGATAACCCGGGAT CTAATAAATCCGTTT-3' (sec. con núm. de ident.:5) y

5'-CCCGTGCACCAGCTCTTCTTGGTGAAG-3' (sec. con núm. de ident.:6).

Después se creó pGG34 a partir de pDP2028 y pGG49. pGG49 contiene un inserto que consiste en el promotor *hly*, un gen que codifica un fragmento de LLO N-terminal fusionado con gp70 de VIH, y el gen *prfA* de *Listeria*. pGG49 se digirió con *NheI* y *SalI* para eliminar el inserto, que se ligó a pD2028 digerido con *XbaI* y *SalI* para producir pGG34.

Después se generó pGG55 a partir de pGG34 de la siguiente manera: El gen E7 del virus del papiloma humano se amplificó por PCR mediante el uso de los cebadores 5'-GGCTCGAGCATGGAGATACACC-3' (sec. con núm. de ident.: 1) y 5'-GGGGACTAGTTTATGGTTTCTGAGAACA-3' (sec. con núm. de ident.: 2), se digirió con *XhoI* y *SpeI* (New England Biolabs, Beverly, MA), y se ligó en pGG34 digerido de manera similar, lo que fusiona de esta manera el gen E7 con el gen *hly* que se encuentra aguas arriba de *XhoI*. El plásmido resultante es pGG55 que contiene un casete multigénico de *hly*, el antígeno E7 y *prfA*. El promotor *hly* dirige la expresión de los primeros 441 aminoácidos del producto génico *hly*, LLO, que se une por el sitio *XhoI* al gen E7. Mediante la eliminación del extremo C hemolítico de LLO, se neutraliza la actividad hemolítica de la proteína de fusión. El factor de transcripción pluripotente, *prfA*, se incluye, además, en pGG-55 con su expresión dirigida por su promotor natural.

Generación de GG-L74

Se creó GG-L74 a partir de la cepa 10403S de *Listeria* mediante intercambio alélico doble en el dominio *orfZ*, mediante el uso de un plásmido lanzadera sensible a la temperatura, como se describe en Gunn y otros (2001, *J. Immunology* 167: 6471-6479). Se generó GG-L74 mediante la introducción de un casete de expresión que contenía el gen de fusión *hly-E7* en el dominio *orfZ* del genoma de *L. monocytogenes*. El promotor *hly* dirige la expresión de los primeros 441 aminoácidos del producto génico *hly*, LLO, que se une, por el sitio *XhoI*, al gen E7. El resultado es un gen de fusión *hly-E7* que se transcribió y secretó como LLO-E7. El gen *hly-E7* se ligó al vector lanzadera pKSV7 en la orientación inversa para evitar la integración en el gen *hly*. El plásmido resultante, GG-L74, es un sistema de expresión que incluye el casete de expresión descrito previamente insertado en el medio de una secuencia de 1,6 Kb que corresponde al dominio *orfX*, Y, Z del genoma de *L. monocytogenes*. La cepa 10403S de *L. monocytogenes* se transformó con pGG-74. Los dominios de homología permiten la inserción del casete del gen LLO-E7 en el dominio *orfZ* por recombinación homóloga como se describe en Gunn y otros (2001, *J. Immunology* 167: 6471-6479). Los clones se cribaron para la integración del casete del gen LLO-E7 en el dominio *orfZ*.

Diseño experimental

Se implantaron por vía subcutánea 2×10^5 TC-1 (ATCC, Manassas, VA) en ratones (n=8) y se dejaron crecer durante aproximadamente 7 días, después de lo cual los tumores fueron palpables. TCI es una línea de células epiteliales de C57BL/6 que se inmortalizó con HPV E6 y E7 y se transformó con ras activado, lo que forma tumores tras la implantación subcutánea. Los ratones se inmunizaron con la cepa de *Listeria* apropiada los días 7 y 14 después de la implantación de las células tumorales. Además, se incluyó un grupo control no inmunizado (sin tratar). El crecimiento del tumor se midió con calibres electrónicos.

Resultados

Se evaluaron dos vectores vacunales de *Listeria*, cada uno expresa una fusión de un fragmento de LLO no hemolítica con el antígeno E7 del virus del papiloma humano a partir de un constructo episomal (GG-L55) o el cromosoma de *Listeria* (GG-L74), por su capacidad para inducir inmunidad a tumores, evitar la tumorigénesis e inhibir el crecimiento tumoral en animales. GG-L55 y GGL74 tienen una DL₅₀ en ratones de 10^9 y 10^6 UFC, respectivamente. Las células TC-1 se implantaron por vía subcutánea en ratones y se dejaron crecer hasta que los tumores fueron palpables (aproximadamente 5 mm de tamaño). Después, los ratones se inmunizaron con 0,1 DL₅₀ de GG-L55, GG-L74 o 0,001 DL₅₀ de GG-L55 (para determinar el efecto de la carga de inmunización).

El día 28 después de la inyección de las células tumorales TC-1, cinco de los ocho animales que recibieron GG-L55 no tenían tumor y permanecieron así hasta el final del estudio. Todos los animales no tratados y animales inmunizados con GG-L74 tenían tumores grandes. A los animales que recibieron la dosis más pequeña de GG-L55 también les crecieron tumores, pero estos fueron significativamente más pequeños que aquellos en el grupo inmunizado con GG-L74 (Figura 1).

Por lo tanto, los constructos de antígenos expresados a partir de un plásmido confieren una respuesta inmunitaria más fuerte y más protectora que los constructos de antígenos expresados a partir del cromosoma de *Listeria*.

Ejemplo 2

Un plásmido que contiene una enzima de metabolismo de aminoácidos en lugar de un gen de resistencia a antibióticos se retiene en *E. coli* y LM tanto in vitro como in vivo.

Materiales y métodos experimentales

Construcción del plásmido pTV3 sin el factor de resistencia a antibióticos

5 Construcción del casete p60-dal. La primera etapa en la construcción del vector sin gen de resistencia a antibióticos fue la construcción de una fusión de un promotor p60 truncado con respecto al gen dal. El gen alanina racemasa (dal) de LM (cebador directo: 5'-CCA TGG TGA CAG GCT GGC ATC-3'; sec. con núm. de ident.: 8) (cebador inverso: 5'-GCT AGC CTA ATG GAT GTA TTT TCT AGG-3'; sec. con núm. de ident.: 9) y una secuencia de promotor p60 mínimo (cebador directo: 5'-TTA ATT AAC AAA TAG TTG GTA TAG TCC-3'; sec. con núm. de ident.: 22) (cebador inverso: 5'-GAC GAT GCC AGC CTG TCA CCA TGG AAA ACT CCT CTC-3'; sec. con núm. de ident.: 23) se aislaron mediante amplificación por PCR a partir del genoma de la cepa de LM 10403S. Los cebadores introdujeron un sitio *PacI* aguas arriba de la secuencia p60, un sitio *NheI* aguas abajo de la secuencia dal (sitios de restricción en negrita), y una secuencia dal solapante (los primeros 18 pb) aguas abajo del promotor p60 para la posterior fusión de p60 y dal mediante empalme por prolongación con solapamiento (SOE, por sus siglas en inglés)-PCR. La secuencia del promotor p60 truncado fue:

15 CAAATAGTTGGTATAGTCCTCTTTAGCCTTTGGAGTATTATCTCATCATTTGTTTTT
TAGGTGAAAACCTGGGTAAACTTAGTATTATCAATATAAAAATTAATTCTCAAATAC
TTAATTACGACTGGGATTTTCTGAAAAAGAGAGGAGTTTTCC (sec. con núm. de ident.: 7, Kohler y otros, J Bacteriol 173: 4668-74, 1991). Mediante el uso de SOE-PCR, los productos de PCR p60 y dal se fusionaron y se clonaron en el vector de clonación pCR2.1 (Invitrogen, La Jolla, CA).

Eliminación de los genes de resistencia a antibióticos de pGG55. La estrategia de clonación posterior para eliminar los genes de cloranfenicol acetiltransferasa (CAT) de pGG55 e introducir el casete p60-dal resultó intermitentemente, además, en la eliminación de la región de replicación grampositiva (*oriRep*; Brantl y otros, Nucleic Acid Res 18: 4783-4790, 1990). Para introducir de nuevo el *oriRep* grampositivo, el *oriRep* se amplificó por PCR a partir de pGG55, mediante el uso de un cebador 5' que añadió un sitio *NarI*/*EheI* aguas arriba de la secuencia (GGCGCCACTAACTCAACGCTAGTAG, sec. con núm. de ident.: 10) y un cebador 3' que añadió un sitio *NheI* aguas abajo de la secuencia (GCTAGCCAGCAAAGAAAAACAAACACG, sec. con núm. de ident.: 11). El producto de PCR se clonó en el vector de clonación pCR2.1 y se verificó la secuencia.

Para incorporar la secuencia p60-dal en el vector pGG55, el casete de expresión p60-dal se eliminó de pCR-p60dal mediante la digestión doble con *PacI*/*NheI*. La región de replicación para bacterias grampositivas en pGG55 se amplificó a partir de pCR-*oriRep* por PCR (cebador 1, 5'-GTC GAC GGT CAC CGG CGC CAC TAA CTC AAC GCT AGT AG-3'; sec. con núm. de ident.: 20); (cebador 2, 5'-TTA ATT AAG CTA GCC AGC AAA GAA AAA CAA ACA CG-3'; sec. con núm. de ident.: 21) para introducir sitios de restricción adicionales para *EheI* y *NheI*. El producto de PCR se ligó a pCR2.1-TOPO (Invitrogen, Carlsbad, CA) y se verificó la secuencia. La región de replicación se eliminó mediante digestión con *EheI*/*NheI*, y el vector pGG55 se digirió doblemente con *EheI* y *NheI*, lo que eliminó simultáneamente ambos genes CAT del plásmido. Los dos insertos, p60-dal y *oriRep*, y el fragmento pGG55 se ligaron juntos, lo que produjo pTV3.

Preparación de ADN para PCR en tiempo real

El ADN total de *Listeria* se preparó mediante el uso del kit ADN Total de Masterpure (Epicentre, Madison, WI). En resumen, se cultivó *Listeria* durante 24 horas a 37 °C y se agitó a 250 rpm en 25 ml de caldo Luria-Bertani (LB). Las células bacterianas se sedimentaron por centrifugación, se resuspendieron en PBS suplementado con 5 mg/ml de lisozima y se incubaron durante 20 minutos a 37 °C, después de lo cual se aisló el ADN.

Para obtener el ADN objetivo estándar para PCR en tiempo real, el gen LLO-E7 se amplificó por PCR a partir de pGG55 (5'-ATGAAAAAATAATGCTAGTTTTTATTAC-3' (sec. con núm. de ident.: 12); 5'-GCGGCCGCTTAATGATGATGATGATGATGTTGTTCTG AGAACAGATG-3' (sec. con núm. de ident.: 13)) y se clonó en el vector pETblue1 (Novagen, San Diego, CA). De manera similar, el amplicón *plcA* se clonó en pCR2.1. Se transformaron *E. coli* con pET-LLOE7 y pCR-*plcA*, respectivamente, y se preparó ADN de plásmido purificado para su uso en PCR en tiempo real.

PCR en tiempo real

Los conjuntos sonda-cebador Taqman (Applied Biosystems, Foster City, CA) se diseñaron mediante el uso del software ABI PrimerExpress (Applied Biosystems) con E7 como plásmido objetivo, mediante el uso de los cebadores siguientes: 5'-GCAAGTGTGACTCTACGCTTCG-3' (sec. con núm. de ident.: 14); 5'-TGCCCATTAACAGGTCTTCCA-3' (sec. con núm. de ident.: 15); 5'-FAM-TGCGTA CAAAGCACACACGTAGACATTCGTAC-TAMRA-3' (sec. con núm. de ident.: 16) y el gen de una copia *plcA* (TGACATCGTTTGTGTTGAGCTAG -3' (sec. con núm. de ident.: 17), 5'-GCAGCGCTCTCTATACCAGGTAC-3' (sec. con núm. de ident.: 18); 5'-TET-TTAATGTCCATGTTA TGTCTCCGTTATAGCTCATCGTA-TAMRA-3'; sec. con núm. de ident.: 19) como un objetivo del genoma de *Listeria*.

Se mezclaron el cebador 0,4 µM y la sonda 0,05 mM con perlas PuRE Taq RTG PCR (Amersham, Piscataway, NJ) según se recomienda por el fabricante. Se prepararon curvas estándar para cada objetivo con ADN de plásmido

purificado, pET-LLOE7 y pCR-plcA (patrón interno) y se usaron para calcular los números de copias de genes en muestras desconocidas. Se calcularon las relaciones medias de las copias de E7/copias de plcA basado en las curvas estándar y se calibraron mediante la división de los resultados para Lmdd-TV3 y Lm-LLOE7 con los resultados de Lm-E7, una cepa de *Listeria* con una copia única del gen E7 integrado en el genoma. Todas las muestras se realizaron por triplicado en cada ensayo de qPCR, que se repitió tres veces. La variación entre muestras se analizó por ANOVA de dos vías mediante el uso del software KyPlot. Los resultados se consideraron estadísticamente significativos si $p < 0,05$.

Mediciones de crecimiento

Las bacterias se cultivaron a 37 °C, mediante la agitación a 250 rpm en medio Luria Bertani (LB) +/- 100 microgramos (μg)/ml de D-alanina y/o cloranfenicol 37 μg /ml. El inóculo de partida se ajustó basado en las mediciones de DO_{600} nm para que fuera el mismo para todas las cepas.

Resultados

Se usó un sistema de complementación auxótrofa basado en D-alanina racemasa para mediar la retención de plásmidos en LM sin el uso de un gen de resistencia a antibióticos. La cepa de *E. coli* MB2159 es un mutante deficiente en *alr* (-)/*dadX* (-) que no puede sintetizar D-alanina racemasa. De manera similar, la cepa de *Listeria* Lm *dal*(-)/*dat*(-) (Lmdd) no es capaz de sintetizar D-alanina racemasa debido a deleciones parciales de los genes *dal* y *dat*. El plásmido pGG55, que se basa en el vector lanzadera de *E. coli* - *Listeria* pAM401, se modificó mediante la eliminación de ambos genes de CAT y su reemplazo con un casete de expresión de p60-dal bajo el control del promotor p60 de *Listeria*, como se describió en la sección de Métodos (Figura 1). El ADN se purificó de varias colonias (Figura 2).

Para determinar la estabilidad del plásmido *in vitro*, se cultivaron LM-LLOE7 y Lmdd (pTV3) durante 70 generaciones en presencia y ausencia de presión selectiva. Las UFC se determinaron diariamente en placas selectivas y no selectivas para cada cultivo. En este sistema, la pérdida de plásmido resulta en un mayor número de colonias que crecen en placas no selectivas (BHI más D-alanina para Lmdd (pTV3), BHI únicamente para LM-LLOE7) frente a placas selectivas (BHI únicamente para Lmdd (pTV3), BHI más cloranfenicol para LM-LLOE7). No se detectó diferencia en las UFC entre las placas no selectivas y selectivas (Figura 3A), lo que indica un mantenimiento estable del plásmido en todo el cultivo durante al menos 70 generaciones, cuando se terminó el experimento.

Además, se probó la estabilidad del plásmido *in vivo* en ratones C57BL/6 mediante el aislamiento de bacterias viables en diferentes puntos de tiempo después de la inyección. De nuevo, se usaron los recuentos de UFC en placas selectivas y no selectivas para determinar el mantenimiento del plásmido entre las bacterias aisladas (Figura 3B). No se detectaron diferencias en UFC en placas selectivas y no selectivas para cada constructo, lo que indica la presencia estable del plásmido recombinante en todas las bacterias aisladas. Dado que se aislaron bacterias Lmdd(pTV3) viables al menos hasta el día 5, la pérdida de plásmido *in vivo* seguida de eliminación temprana de bacterias inyectadas podría excluirse como una razón posible para la virulencia baja observada para las bacterias Lmdd(pTV3) (Ejemplo 3).

En resumen, pTV3 se mantuvo de manera estable en *E. coli*, así como también en *Listeria*, tanto *in vitro* como *in vivo*. El crecimiento bacteriano en medio LB que no se complementó con D-alanina adicional indicó que el casete de expresión *dal* estaba, además, activo en *E. coli* gram-negativa. Tanto *E. coli*-pTV3 como Lmdd-pTV3 permanecieron sensibles al cloranfenicol, lo que indica la eliminación con éxito de ambos genes CAT del plásmido. Las placas representativas se representan en las Figuras 4-7.

El número de copias de pTV3 por célula se comparó entre Lm-LLOE7 en presencia de cloranfenicol y Lmdd-TV3 en ausencia de cloranfenicol mediante PCR en tiempo real de las secuencias E7, tanto en *Listeria* como en *E. coli*. Lm-LLOE7 expresa la proteína de fusión LLO/E7 de pGG55. Los números de copias de plásmidos de Lmdd-TV3 y Lm-LLOE7 no difirieron significativamente entre sí, lo que muestra una retención estable del plásmido pTV3 tanto en *Listeria* como en *E. coli*.

Para verificar la complementación de las funciones bacterianas, se comparó la cinética de crecimiento *in vitro* entre Lmdd, Lmdd-TV3 y Lm-LLOE7. Lmdd-TV3, pero no Lmdd no-complementado fue capaz de crecer en medio sin alanina (Figura 8). De hecho, Lmdd-TV3 alcanzó la fase de crecimiento logarítmico antes tanto de Lm-LLOE7 como de Lmdd complementada con D-alanina exógena. Esta atenuación del crecimiento de Lm-LLOE7 se debió parcialmente a la carga metabólica de la expresión de CAT. Sin embargo, incluso en ausencia de cloranfenicol, Lm-LLOE7 aún creció más lentamente *in vitro* que Lmdd-TV3.

Ejemplo 3

Los plásmidos que contienen una enzima metabólica no aumentan la virulencia de las bacterias

Materiales y métodos experimentales

Ensayo de lisis hemolítica

Se descongelaron 4×10^9 UFC de *Listeria*, se sedimentaron por centrifugación (1 minuto, 14.000 rpm) y se resuspendieron en 100 μ l de PBS, pH 5,5 con cisteína 1M. Las bacterias se diluyeron serialmente 1:2 y se incubaron durante 45 minutos a 37 °C para activar la LLO secretada. La sangre total de oveja desfibrinada (Cedarlane, Hornby, Ontario, Canadá) se lavó dos veces con 5 volúmenes de PBS y de tres a cuatro veces con 6 volúmenes de PBS-cisteína hasta que el sobrenadante quedó transparente, se sedimentaron las células a 3.000 x g durante 8 minutos entre las etapas de lavado, después se resuspendió a una concentración final del 10 % (v/v) en PBS-Cisteína. Se mezclaron 100 μ l de células sanguíneas lavadas al 10 % con 100 μ l de suspensión de *Listeria* y se incubaron durante 45 minutos adicionales a 37 °C. Después, las células sanguíneas no lisadas se sedimentaron por centrifugación (10 minutos, 1.000 x g). Se transfirieron 100 μ l de sobrenadante a una placa nueva y se determinó la DO₅₃₀ nm y se representó frente a la dilución de la muestra.

Resultados

Como la virulencia se liga a la función de LLO, se comparó la actividad de lisis hemolítica entre Lmdd-TV3 y Lm-LLOE7. Este ensayo prueba la función de LLO mediante la lisis de glóbulos rojos y puede realizarse con el sobrenadante de cultivo, LLO purificada o células bacterianas. Lmdd-TV3 mostró una mayor actividad de lisis hemolítica que Lm-LLOE7.

Además, se midió la virulencia *in vivo* mediante la determinación de los valores de DL50, un medio más directo y, por lo tanto, preciso para medir la virulencia. La DL50 de Lmdd-TV3 ($0,75 \times 10^9$) fue muy cercana a la de Lm-LLOE7 (1×10^9), lo que demuestra que los plásmidos que contienen una enzima metabólica no aumentan la virulencia de las bacterias.

Ejemplo 4

Las cepas vacunales que llevan plásmidos que contienen una enzima metabólica median la expresión de antígeno

La expresión de antígeno del plásmido que contiene la enzima metabólica se probó *in vitro* mediante electrotransferencia. Al analizar cantidades iguales de proteína total de sobrenadantes de cultivo bacterianos, los cultivos de Lmdd-TV3 contenían aproximadamente el doble de la cantidad de antígeno total que los cultivos de Lm-LLOE7. Esta diferencia puede ser el resultado de una mayor carga metabólica global en Lm-LLOE7, debido al tamaño mayor del plásmido (12,8 kB) en comparación con Lmdd-TV3 (7,6 kB).

Por lo tanto, pueden usarse enzimas metabólicas en lugar de genes de resistencia a antibióticos para mediar en la retención de plásmidos en bacterias auxótrofas. Además, dichos plásmidos tienen utilidad en la expresión de proteínas heterólogas en las bacterias.

Ejemplo 5

Inducción de inmunidad antitumoral por plásmidos que contienen una enzima metabólica

La eficacia del plásmido que contiene una enzima metabólica como vacuna contra el cáncer se determinó en un modelo de regresión tumoral, como se describió en el Ejemplo 1. Se usó el modelo de línea celular TC-1, que se caracterizó bien para el desarrollo de la vacuna contra el VPH y que permitió una comparación controlada de la regresión de tumores establecidos de tamaño similar después de la inmunización con Lmdd-TV3 o Lm-LLOE7. En dos experimentos separados, la inmunización de ratones con Lmdd-TV3 y Lm-LLOE7 resultó en una regresión tumoral similar (Figura 9) sin diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$) entre los grupos vacunados. Todos los ratones inmunizados aún seguían vivos después de 63 días, mientras que los ratones no inmunizados debieron sacrificarse cuando sus tumores alcanzaron un diámetro de 20 mm. Los ratones curados permanecieron libres de tumor hasta la finalización del experimento.

Por lo tanto, los plásmidos que contienen enzimas metabólicas son eficaces como una vacuna terapéutica contra el cáncer. Debido a que las respuestas inmunitarias requeridas para una vacuna terapéutica contra el cáncer son más fuertes que las requeridas para una vacuna profiláctica contra el cáncer, estos resultados demuestran utilidad también para una vacuna profiláctica contra el cáncer.

Ejemplo 6

Los plásmidos que contienen una enzima metabólica inducen células T infiltrantes de tumor. específicas de antígeno

Materiales y métodos experimentales

Análisis de células T

Las células T del bazo y las células T infiltrantes de tumor se analizaron para los marcadores de superficie CD8 y CD4 y la especificidad de E7 de acuerdo con los protocolos estándar (Gunn y otros. (2001, J. Immunol, 167: 6471-6479). Se inmunizaron ip. ratones C57BL/6 7 y 14 días después de la implantación del tumor con Lmdd-TV3 o Lm-LLOE7. Los esplenocitos y los tumores se cosecharon 5 días después de la segunda inyección, y se tiñeron a temperatura ambiente con tetrámeros H-2D^b cargados con el péptido E7 (RAHYNIVTF, sec. con núm. de ident.: 19) o un péptido control (HIV-Gag) en una dilución 1:200. Los tetrámeros se proporcionaron por el National Institute of Allergy and Infectious Diseases Tetramer Core Facility y el National Institutes of Health AIDS Research and Reference Reagent Program.

La citometría de flujo de tres colores para CD8 (53-6.7, conjugado con PE) y el tetrámero E7 H-2D^b se realizó mediante el uso de un citómetro de flujo FACSCalibur® con el software CellQuest® (Becton Dickinson, Mountain View, CA). La tinción de interferón gamma intracelular (IFN-γ) se realizó en un segundo subconjunto de células. Antes de la tinción para los antígenos de la superficie celular y la producción de IFN, los linfocitos se estimularon in vitro mediante su cultivo en presencia de monensina (BD Biosciences) para acumular el IFN-γ intracelular en el aparato de Golgi. Después del cultivo durante 5 horas en RP-10 complementado con interleucina-2 (50 U/ml) y 1 μl de brefeldina A (monensina) por ml, las células se tiñeron superficialmente para marcadores efectoras a 4 °C durante 20 min con anti-CD8 conjugado con ficoeritrina (PharMingen) y MEL-14 conjugado con células presentadoras de antígeno (ligando anti-CD62). Las células se clasificaron en (seleccionaron para) el ligando CD62 bajo para seleccionar las células activadas antes de analizar las poblaciones CD8⁺ IFN-γ.

Resultados

La eficacia antitumoral de una vacuna a menudo se une a su capacidad para inducir linfocitos infiltrantes de tumor específicos de antígeno. Para caracterizar adicionalmente la eficacia de Lmdd-TV3, se analizaron por tanto las células T citotóxicas (CTL) infiltrantes de tumor para la especificidad del antígeno E7. Tanto Lmdd-TV3 como Lm-LLOE7 inducen un porcentaje significativo de células T específicas del tetrámero E7 que se infiltran en el tumor (Tabla 1). No se observaron diferencias significativas en los porcentajes de células T CD8⁺ productoras de IFN-γ en ratones inmunizados con LLO-E7 de L. monocytogenes frente a ratones tratados con Lmdd(pTV3). Por lo tanto, tanto Lmdd-TV3 como Lm-LLOE7 indujeron CTL específicos de antígeno infiltrantes de tumor que controlaron el crecimiento tumoral.

Grupo	Dosis	CD8 ⁺ , E7-tetrámero ⁺ , CD62 ⁺ Experimento A	CD8 ⁺ , E7-tetrámero ⁺ , CD62 ⁺ Experimento B
Sin tratar	0	8,81	4,86
Lmdd-TV3	0,75 x 10 ⁸	20,72	14,86
Lm-LLOE7	1 x 10 ⁸	27,43	20,82

Tabla 1: Grupos de tres ratones se les inyectó 1 x 10⁵ células tumorales de TC-1 en una suspensión de matrigel al día. Las células se tiñeron con anticuerpo anti-CD8- y el tetrámero E7 y se sometieron a análisis FACS. Después de activar (seleccionar) CD8⁺/E7-tetrámero⁺/CD62⁺, se calculó el porcentaje de células CD8⁺/E7-tetrámero⁺/CD62⁺ del total de células vivas.

Ejemplo 7

Integración cromosómica de genes recombinantes basados en un sistema de integración de fago

Se construye un plásmido lanzadera que contiene (1) un gen de replicación para *E. coli*, (2) un sitio de integración PSA attPP', (3) un gen dal de *Listeria* bajo el control de su promotor natural, y (4) un gen PSA integrasa bajo el control del promotor p60 de *Listeria*. El experto en la materia apreciará que pueden usarse otros promotores o casetes de expresión policistrónicos para dirigir la expresión de los genes introducidos, en particular el gen dal y el gen PSA integrasa. El gen PSA integrasa y el sitio de integración de PSA attPP' de pPL2 (Lauer y otros, 2002, J Bacteriol, 2002. 184: 4177-4186) se modifica mediante PCR para contener sitios de restricción en el extremo 5' y el extremo 3' que son compatibles con la clonación de estos ácidos nucleicos en el plásmido lanzadera pTV3. Durante esta etapa, se elimina la región de replicación de *Listeria* de pTV3, lo que resulta en el plásmido pTV6. Este plásmido contiene funciones de replicación para su amplificación en *E. coli*, un gen dal para la complementación de dal auxótrofo de *E. coli* y *Listeria*, y las funciones de integración (PSA integrasa, sitio attPP') para la integración del plásmido en el genoma de *Listeria*. El plásmido se amplifica en la cepa de *E. coli* MB2159 dal auxótrofa (Strych y otros), se aísla y posteriormente se electropora en *Listeria*.

Alternativamente, en lugar de la cepa LM de tipo salvaje 10403S, se usa dal auxótrofo Lmdal(-) dat(-) (Ejemplos previos) como una cepa huésped. Debido a que el plásmido no contiene una región de replicación de *Listeria*, únicamente se selecciona *Listeria* que contiene una copia que se integra en el genoma al crecer en el medio LB.

En resumen, esta invención permite la sustitución de la selección con antibióticos por una selección que usa complementación de cepas mutantes auxótrofas. El experto en la materia apreciará que pueden adoptarse otras cepas auxótrofas y sistemas de complementación para su uso con esta invención.

5 Ejemplo 8

Creación de un vector de lanzadera general basado en pTV3

10 pTV3 se digiere con KasI o Ehel y AatII, lo que elimina el gen prfA, el gen de fusión LLO-E7 y la mayor parte del promotor LLO. Se introduce un sitio de clonación múltiple que consiste de BamHI, XhoI, XbaI, NotI, SpeI, SmaI y SacI mediante la ligación de los siguientes oligonucleótidos apareados a la cadena principal del vector:

5'-CGG ATC CCT CGA GCT CAG AGC GGC CGC ACT AGT CCC GGG GAG CTC G (sec. con núm. de ident.: 24).

15 5'-TCG ACG AGC TCC CCG GGA CTA GTG CGG CCG CTC TGA GCT CGA GGG ATC CGA CGT(sec. con núm. de ident.: 25; los extremos sobresalientes que son compatibles con los sitios de vector restringidos con AatI y SacI están en cursiva).

20 Después, se liga un casete de antígeno de interés en el sitio de clonación múltiple. Después, el plásmido se usa para crear una cepa vacunal que expresa el antígeno codificado en este.

Ejemplo 9

Creación de un vector lanzadera general basado en un plásmido de expresión

25 El casete de expresión p60-dal (Ejemplo 2) se introduce en un plásmido de expresión. Por ejemplo, puede usarse un plásmido comercial (por ejemplo, pCR2.1). Posteriormente, los genes de resistencia a antibióticos se eliminan del plásmido. Después, el plásmido se usa para crear una cepa vacunal que expresa el antígeno codificado en este.

30 Listado de secuencias

<110> The Trustees of the University of Pennsylvania

<120> Métodos para construir vacunas sin resistencia a antibióticos

35 <130> P-7924-EP2

<150> EP 05808671.1

<151> 2005-08-15

40 <150> PCT/US05/28895
<151> 2005-08-15

45 <150> US 60/601,492
<151> 2004-08-13

<160> 26

<170> PatentIn versión 3.3

50 <210> 1

<211> 22

<212> ADN

<213> Artificial

55 <220>

<223> Cebador

<400> 1

60 ggctcgagca tggagataca cc 22

<210> 2

<211> 28

<212> ADN

65 <213> Artificial

ES 2 684 749 T3

<220>
 <223> Cebador

5 <400> 2
 ggggactagt ttatggttc tgagaaca 28

<210> 3
 <211> 31
 10 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Cebador

15 <400> 3
 gggggctagc cctccttga ttagtatatt c 31

<210> 4
 <211> 28
 20 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Cebador

25 <400> 4
 ctcctcgag atcataatt acttcatc 28

<210> 5
 <211> 55
 30 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Cebador

<400> 5
 40 gactacaagg acgatgaccg acaagtgata acccgggatc taataaatc cgtt 55

<210> 6
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Artificial

45 <220>
 <223> Cebador

<400> 6
 50 cccgtcgacc agctcttctt ggtgaag 27

<210> 7
 <211> 156
 <212> ADN
 55 <213> Listeria monocytogenes

<400> 7
 caaatagttg gtatagtcct ctttagcctt tggagtatta tctcatcatt tgtttttttag 60
 gtgaaaactg ggtaaaactta gtattatcaa tataaaatta atttctcaaat acttaattac 120
 gtactgggat tttctgaaaa aagagaggag ttttcc 156

60 <210> 8

<211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial

5 <220>
 <223> Cebador

<400> 8
 ccatggtgac aggctggcat c 21

10 <210> 9
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Artificial

15 <220>
 <223> Cebador

<400> 9
 gctagcctaa tggatgtatt ttctagg 27

20 <210> 10
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Artificial

25 <220>
 <223> Cebador

<400> 10
 30 ggcgccacta actcaacgct agtag 25

<210> 11
 <211> 27
 <212> ADN

35 <213> Artificial

<220>
 <223> Cebador

<400> 11
 40 gctagccagc aaagaaaaac aaacacg 27

<210> 12
 <211> 29
 <212> ADN

45 <213> Artificial

<220>
 <223> Cebador

50 <400> 12
 atgaaaaaaa taatgctagt ttttattac 29

<210> 13
 <211> 48
 <212> ADN

55 <213> Artificial

<220>
 <223> Cebador

<400> 13
 60 gcggccgctt aatgatgatg atgatgatgt ggtttctgag aacagatg 48

65 <210> 14
 <211> 22

ES 2 684 749 T3

<212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 5 <223> Cebador

 <400> 14
 gcaagtgga ctctacgctt cg 22
 <210> 15
 10 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 15 <223> Cebador

 <400> 15
 tgcccattaa caggtctcc a 21

 20 <210> 16
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Artificial

 25 <220>
 <223> Cebador

 <400> 16
 30 tgcgtacaaa gcacacacgt agacattcgt ac 32
 <210> 17
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Artificial
 35
 <220>
 <223> Cebador

 <400> 17
 40 tgacatcgtt tggtttgag ctag 24

 <210> 18
 <211> 23
 <212> ADN
 45 <213> Artificial

 <220>
 <223> Cebador

 <400> 18
 50 gcagcgctct ctataccagg tac 23

 <210> 19
 <211> 38
 55 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Cebador
 60
 <400> 19
 ttaatgccca tggatgtct ccggtatagc tcatcgta 38

 <210> 20
 65 <211> 38

ES 2 684 749 T3

<212> ADN
<213> Artificial

<220>
5 <223> Cebador

<400> 20
gtcgacggtc accggcgcca ctaactcaac gctagtag 38
<210> 21
10 <211> 33
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
15 <223> Cebador

<400> 21
ttaattaagc tagccagcaa agaaaaaca aca 33

20 <210> 22
<211> 27
<212> ADN
<213> Artificial

25 <220>
<223> Cebador

<400> 22
30 ttaattaaca aatagttggt atagtcc 27

<210> 23
<211> 36
<212> ADN
<213> Artificial

35 <220>
<223> Cebador

<400> 23
40 gacgatgcca gcctgtcacc atggaact cctctc 36

<210> 24
<211> 46
<212> ADN
45 <213> Artificial

<220>
<223> Cebador

50 <400> 24
cggatccctc gagctcagag cggccgact agtcccggg agctcg 46

<210> 25
<211> 54
55 <212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador

60 <400> 25
tcgacgagct ccccgact agtgccgccc ctctgagct gagggatccg acgt 54

<210> 26
65 <211> 9

<212> PRT

<213> Virus del Papiloma humano

<400> 26

Arg Ala His Tyr Asn Ile Val Thr Phe
1 5

5

REIVINDICACIONES

1. Un método para diseñar una cepa vacunal recombinante de *Listeria* para expresar un antígeno heterólogo, el método comprende:
 - 5 poner en contacto una cepa auxótrofa de *Listeria* para la síntesis de D-alanina que comprende una mutación en un gen D-alanina racemasa y en un gen D-aminoácido transferasa en dicho cromosoma de *Listeria* con un plásmido, dicho plásmido comprende:
 - 10 una primera secuencia de ácidos nucleicos que codifica un polipéptido que comprende un antígeno heterólogo, en donde dicho antígeno heterólogo es un antígeno E7 del virus del papiloma humano (HPV-E7), y
 - una segunda secuencia de ácidos nucleicos que codifica una D-alanina racemasa, en donde dicho plásmido no confiere resistencia a antibióticos a dicha cepa vacunal auxótrofa de *Listeria*, de manera que dicha cepa de *Listeria* auxótrofa absorbe dicho plásmido, de manera que dicha D-alanina racemasa complementa dicha mutación en dicho gen D-alanina racemasa de dicha cepa bacteriana de *Listeria*, en donde dicha cepa auxótrofa de *Listeria* crecerá en ausencia de D-alanina, y en donde dicha primera secuencia de ácidos nucleicos se une operativamente a un promotor procarionta, con lo que se diseña una cepa vacunal recombinante de *Listeria* para expresar un antígeno heterólogo.
- 20 2. Una cepa vacunal recombinante de *Listeria* auxótrofa para la síntesis de D-alanina que comprende una mutación en un gen D-alanina racemasa y en un gen D-aminoácido transferasa en dicho cromosoma de *Listeria*, en donde dicha *Listeria* comprende además un plásmido, en donde el plásmido comprende:
 - 25 una primera secuencia de ácidos nucleicos que codifica un polipéptido, en donde dicho polipéptido comprende un antígeno heterólogo, en donde dicho antígeno heterólogo es un antígeno E7 del virus del papiloma humano (HPV-E7), y
 - una segunda secuencia de ácidos nucleicos que codifica una enzima D-alanina racemasa, en donde dicho plásmido no confiere resistencia a antibióticos a dicha cepa vacunal recombinante de *Listeria*, de manera que dicho gen D-alanina racemasa complementa un gen D-alanina racemasa endógeno que falta en un cromosoma de dicha cepa vacunal de *Listeria* recombinante, y de manera que dicho plásmido se mantiene estable en dicha cepa vacunal recombinante de *Listeria* en ausencia de una selección de antibiótico, en donde dicha primera secuencia de ácidos nucleicos se une operativamente a un promotor procarionta, y en donde dicha cepa de *Listeria* auxótrofa crecerá en ausencia de D-alanina.
- 35 3. La cepa vacunal recombinante de *Listeria* obtenida de acuerdo con el método de la reivindicación 1 o la cepa vacunal recombinante de *Listeria* de la reivindicación 2, en donde dicho plásmido comprende el gen apifA.
- 40 4. La cepa vacunal recombinante de *Listeria* obtenida de acuerdo con el método de cualquiera de las reivindicaciones 1 y 3 o la cepa vacunal recombinante de *Listeria* de cualquiera de las reivindicaciones 2 y 3, en donde dicho promotor procarionta es un promotor *hly*.
- 45 5. La cepa vacunal recombinante de *Listeria* obtenida de acuerdo con el método de cualquiera de las reivindicaciones 1 y 3-4 o la cepa vacunal recombinante de *Listeria* de cualquiera de las reivindicaciones 2-4, en donde dicho polipéptido es una proteína de fusión que comprende dicho HPV-E7 y un polipéptido adicional, en donde dicho polipéptido adicional es un fragmento no hemolítico de una proteína LLO, una secuencia de aminoácidos similar a PEST, o una proteína ActA o un fragmento de esta.
- 50 6. La cepa vacunal recombinante de *Listeria* obtenida de acuerdo con el método de la reivindicación 5 o la cepa vacunal recombinante de *Listeria* de la reivindicación 5, en donde dicho fragmento no hemolítico de una proteína LLO comprende los primeros 441 aminoácidos de dicha proteína LLO.
- 55 7. La cepa vacunal recombinante de *Listeria* obtenida de acuerdo con el método de conformidad con una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 3-6 o la cepa vacunal recombinante de *Listeria* de conformidad con una cualquiera de las reivindicaciones 2-6, en donde dicha segunda secuencia de ácido nucleico se une operativamente a una secuencia promotora/reguladora.
8. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 y 3-7 o la cepa vacunal recombinante de *Listeria* de conformidad con una cualquiera de las reivindicaciones 2-7, en donde dicha *Listeria* es una cepa vacunal de *Listeria monocytogenes*.
- 60 9. Una cepa vacunal recombinante de *Listeria* obtenida de acuerdo con el método de cualquiera de las reivindicaciones 1 y 3-8, para su uso como medicamento.
- 65 10. Una cepa vacunal recombinante de *Listeria* de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2-8, para su uso como medicamento.

11. Una cepa vacunal recombinante de *Listeria* obtenida de acuerdo con el método de cualquiera de las reivindicaciones 1 y 3-8, para su uso en el tratamiento o prevención del cáncer de cuello uterino en un sujeto
 12. Una cepa vacunal recombinante de *Listeria* de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2-8, para su uso en el tratamiento o prevención del cáncer de cuello uterino en un sujeto.
- 5
13. La cepa vacunal recombinante de *Listeria* de las reivindicaciones 11 o 12, en donde dicho tratamiento comprende la regresión de un tumor establecido.

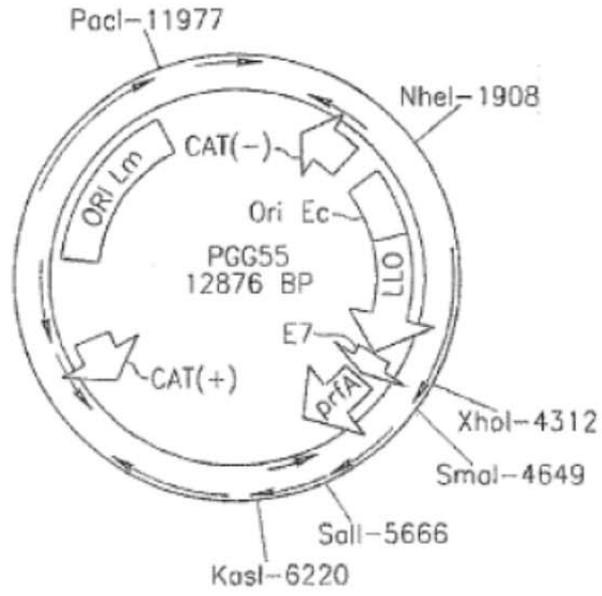


Figura 1A

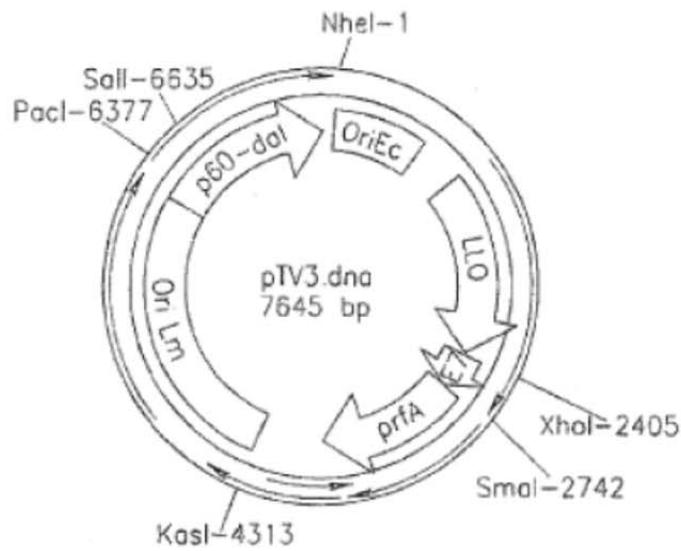
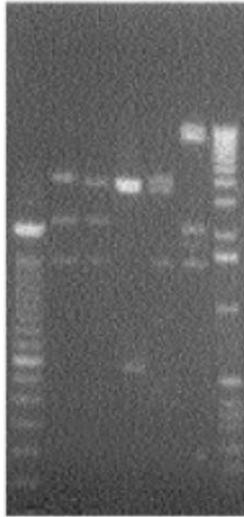


Figura 1B

Figura 2



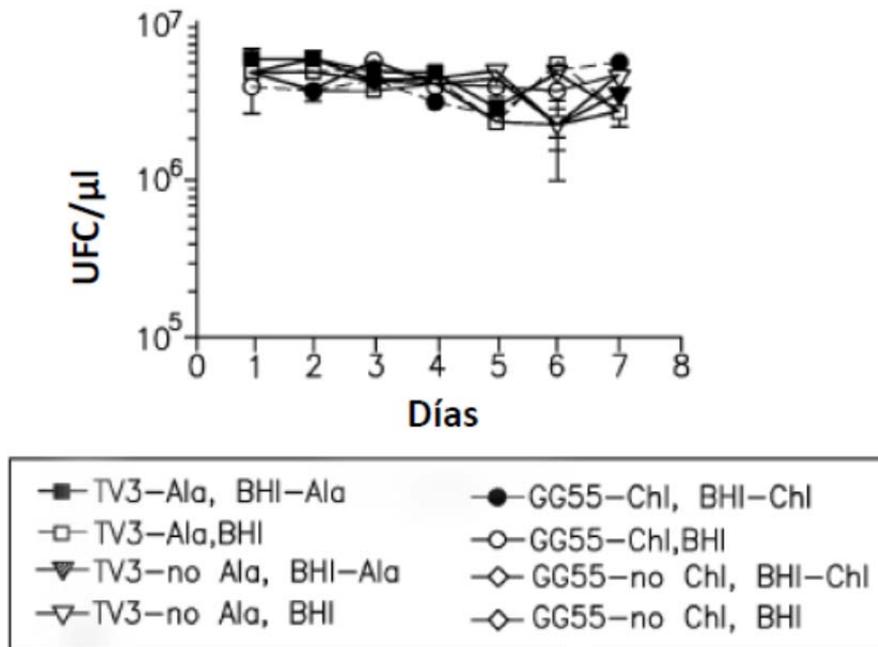


Figura 3A

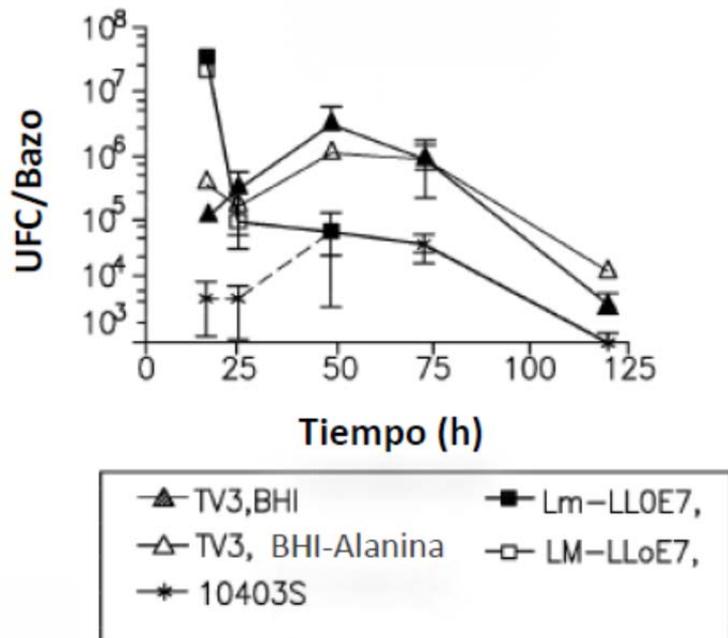


Figura 3B

Figura 4

Figura 4A

Figura 4B

Figura 4C

Figura 4D



Figura 5

Figura 5A

Figura 5B

Figura 5C

Figura 5D

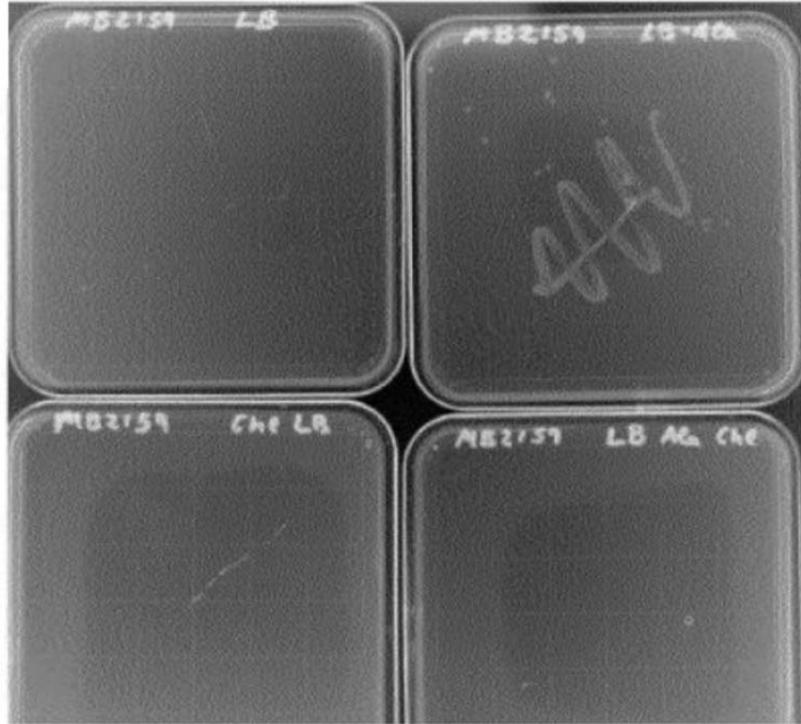


Figura 6

Figura 6A

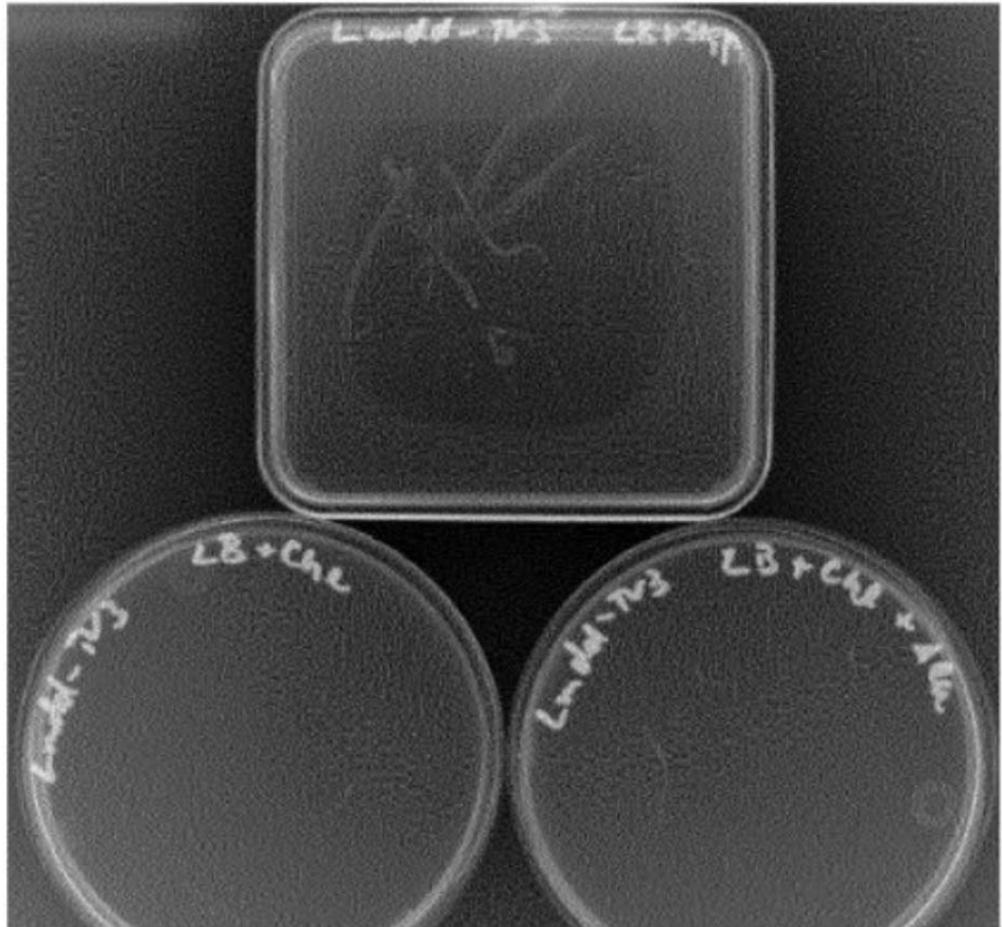


Figura 6B

Figura 6C

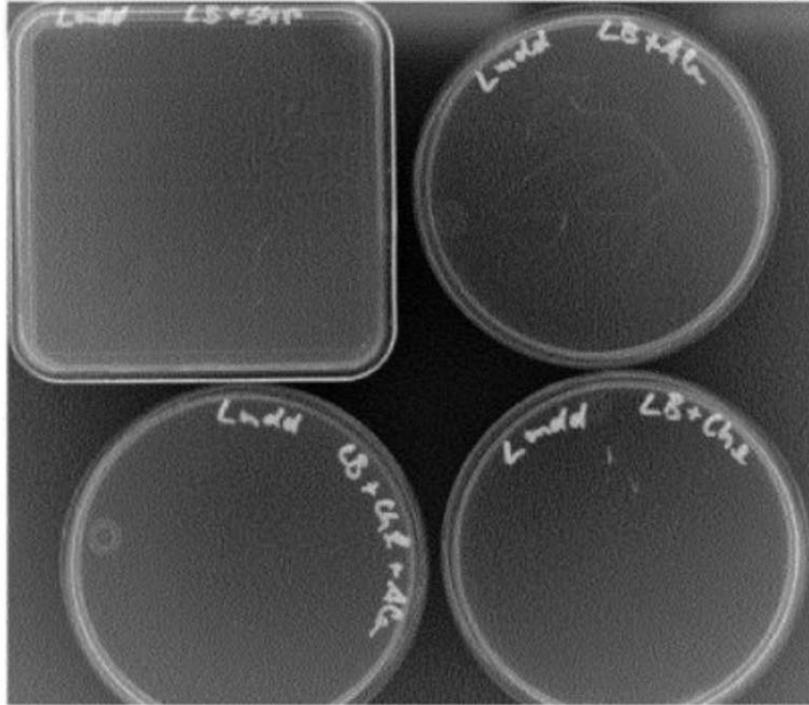
Figura 7

Figura 7A

Figura 7B

Figura 7C

Figura 7D



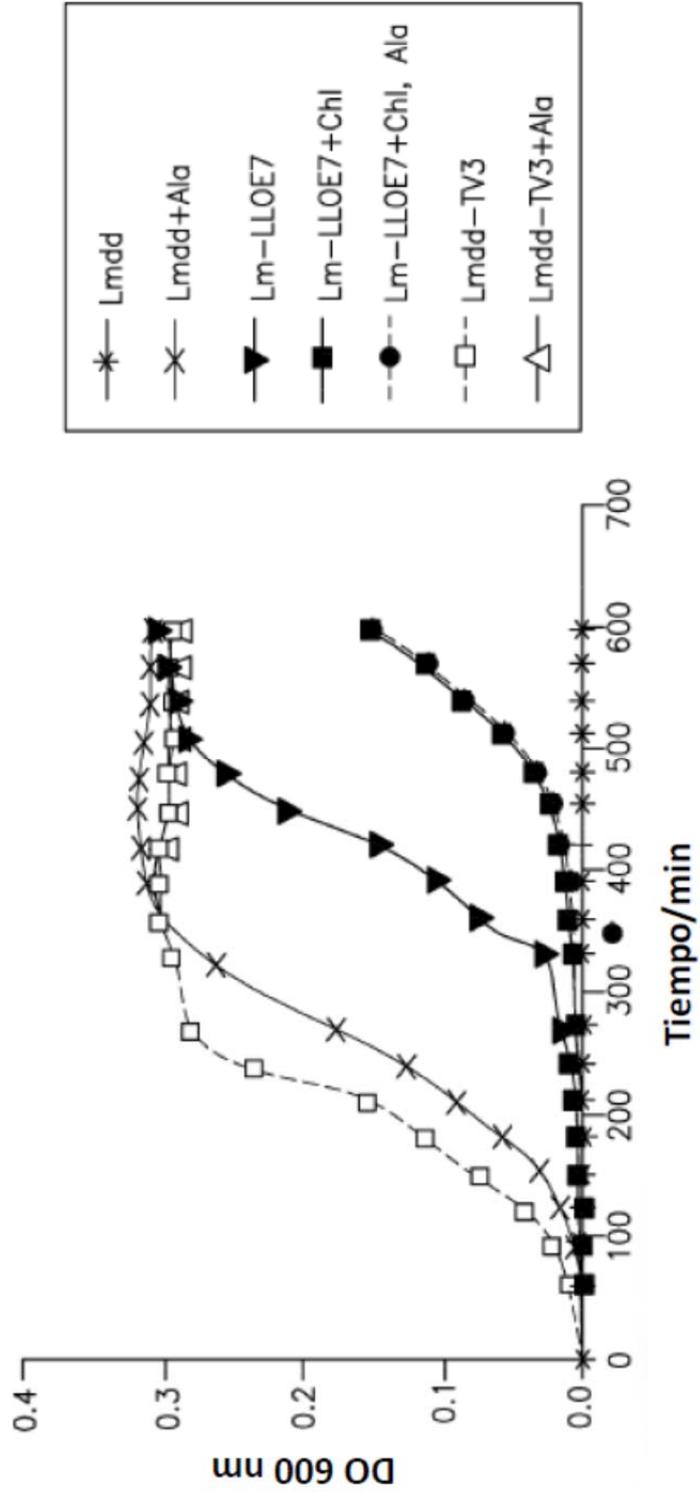


Figura 8

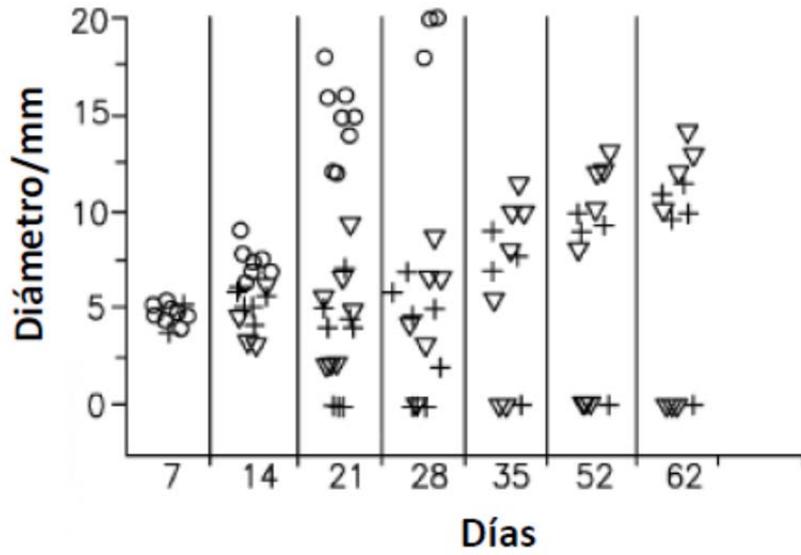


Figura 9A

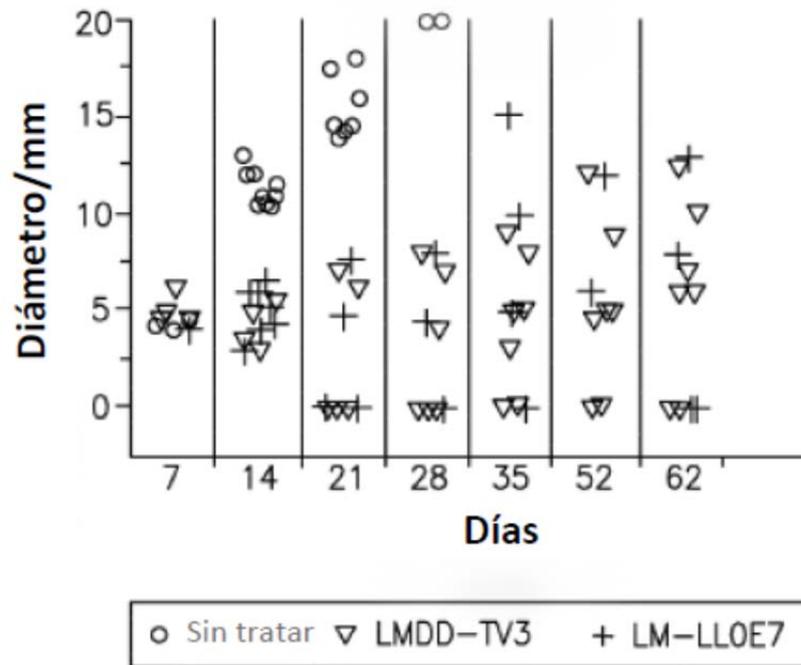


Figura 9B