

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 719 832**

51 Int. Cl.:

C07K 14/195 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61K 39/42 (2006.01)

C12N 15/09 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.06.2009 E 15168932 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.12.2018 EP 2942355**

54 Título: **Proteínas de fusión LLO no hemolíticas y usos de las mismas**

30 Prioridad:

23.06.2008 US 213696

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

16.07.2019

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**PATERSON, YVONNE y
MACIAG, PAULO**

74 Agente/Representante:

CAMPELLO ESTEBARANZ, Reyes

ES 2 719 832 T3

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

DESCRIPCIÓN

Proteínas de fusión LLO no hemolíticas y usos de las mismas

5 CAMPO DE LA INVENCION

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

15 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

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

El documento de patente WO 2008/008311 describe el uso de una proteína LLO mutada no hemolítica y una proteína antigénica de interés fusionada o incrustada dentro de la proteína LLO mutada no hemolítica, con una delección de todo el dominio de unión al colesterol (CBD) o con una mutación puntual única dentro del CBD, para inducir una respuesta inmune contra la proteína antigénica de interés.

Michel et al., *Molecular Microbiology* 4(12): 2167-2178 (1990), mide la actividad hemolítica de cepas de *Listeria* mutantes de un solo punto.

El documento de patente WO 2007/130455 divulga un péptido recombinante que comprende una proteína LLO o un fragmento de la misma y un receptor de linfocitos B (BCR) para inducir una respuesta inmune contra el linfoma de linfocitos B, en la que el péptido LLO se convierte en no hemolítico mediante la eliminación de todo el dominio de activación (incluido el CBD) o por una mutación o eliminación de un solo punto dentro del CBD.

Gunn et al., *Journal of Immunology* 167(11): 6471-6479 (2001), divulga una cepa de *Listeria monocytogenes* recombinante que secreta la proteína E7 del HPV-16 fusionada a una proteína LLO truncada, no hemolítica, que se convierte en no hemolítica por delección del dominio hemolítico ubicado en el extremo C-terminal de la proteína y que abarca todo el CBD.

Jaeger et al., *Journal of Experimental Medicine* 191(4): 625-630 (2000), divulgan los péptidos NY-ESO-1.

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

50 RESUMEN DE LA INVENCION

La presente invención proporciona una proteína recombinante que comprende una proteína listeriolisina O (LLO), en la que la proteína LLO comprende una mutación dentro del dominio de unión al colesterol (CBD) de la misma (SEQ ID NO: 18), en la que dicha mutación consiste en la sustitución de todos los residuos de aminoácidos en las posiciones 2, 9 y 10 de la SEQ ID NO: 18, y en la que la proteína recombinante presenta una reducción de más de 100 veces en la actividad hemolítica con respecto a una proteína LLO de tipo silvestre; y opcionalmente, en la que la proteína recombinante comprende además un péptido heterólogo que comprende un péptido antigénico.

En una forma de realización, la secuencia de proteína LLO de tipo silvestre se expone en la SEQ ID NO: 37.

En una forma de forma de realización, la proteína LLO mutada comprende una deleción de la secuencia del péptido señal de la misma. En otra forma de forma de realización, la proteína LLO mutada comprende la secuencia del péptido señal de la misma.

5

En otra forma de forma de realización, la proteína recombinante comprende un péptido heterólogo de interés. En otra forma de forma de realización, la proteína recombinante comprende un péptido diferente de LLO, que, en una forma de forma de realización, comprende dicho péptido heterólogo de interés. En otra forma de forma de realización, el péptido heterólogo de interés comprende un péptido antigénico. En una forma de forma de realización, el péptido antigénico es una proteína NY-ESO-1. En otra forma de forma de realización, el péptido antigénico es una proteína E7 del virus del papiloma humano (HPV). En otra forma de forma de realización, el péptido antigénico es una proteína del receptor de linfocitos B (BCR). En otra forma de realización, el péptido heterólogo de interés es un péptido antigénico. En otra forma de realización, el péptido antigénico es un péptido NY-ESO-1. En otra forma de realización, el péptido antigénico es un péptido E7 del virus del papiloma humano. En otra forma de realización, el péptido antigénico es un péptido del receptor de linfocitos B (BCR). En otra forma de realización, el péptido antigénico es un antígeno E6 del virus del papiloma humano (HPV)-16, un antígeno E7 de HPV-16, un antígeno E6 de HPV-18, un antígeno E7 de HPV-18, un péptido NY-ESO-1, un receptor de linfocitos B (BCR), un antígeno específico de próstata (PSA), un antígeno de células madre de próstata (PSCA), un antígeno de la enzima quimotriptica de estrato córneo (SCCE), un antígeno 1 de tumor de Wilms (WT-1), transcriptasa inversa de telomerasa humana (hTERT), proteinasa 3, proteína 2 relacionada con tirosinasa (TRP2), antígeno asociado a melanoma de alto peso molecular (HMW-MAA), sarcoma sinovial, X (SSX)-2, antígeno carcinoembrionario (CEA), MAGE-A, receptor alfa de interleucina-13 (IL13-R alfa), anhidrasa carbónica IX (CAIX), survivina, GP100 o péptido testisina.

10

15

20

25 En una forma de realización, el péptido antigénico o antígeno heterólogo está fusionado genéticamente a la proteína LLO. En otra forma de realización, el péptido antigénico o antígeno heterólogo está conjugado químicamente a la proteína LLO.

30 En una forma de realización, la presente invención proporciona una molécula nucleotídica que codifica la proteína recombinante. En otra forma de realización, la presente invención proporciona un vector de vacuna recombinante que codifica la proteína recombinante.

En otra forma de realización, la presente invención proporciona una cepa de *Listeria* recombinante que comprende la proteína recombinante.

35

En otra forma de realización, la presente invención proporciona una composición de vacuna que comprende la proteína recombinante o la molécula nucleotídica, en la que la proteína recombinante comprende además dicho péptido heterólogo que comprende un péptido antigénico, y un adyuvante. En otra forma de realización, el adyuvante comprende una proteína del factor estimulante de colonias de granulocitos/macrófagos (GM-CSF), una molécula nucleotídica que codifica una proteína GM-CSF, saponina QS21, monofosforil lípido A, o un oligonucleótido que contiene CpG no metilado. En otra forma de realización, la presente invención proporciona una composición que comprende la proteína recombinante y un péptido heterólogo de interés, en la que dicha proteína recombinante no está unida covalentemente a dicho péptido heterólogo de interés. En otra forma de realización, la presente invención proporciona una vacuna que comprende tal composición y un adyuvante. En otra forma de realización, la presente invención proporciona un vector de vacuna recombinante que codifica la proteína recombinante. En otra forma de realización, la presente invención proporciona una molécula nucleotídica que codifica la proteína recombinante.

40

45

En otra forma de realización, la presente invención proporciona una vacuna que comprende la molécula nucleotídica. En otra forma de realización, la presente invención proporciona una cepa de *Listeria* recombinante que comprende la proteína o péptido recombinante. En otra forma de realización, la presente invención proporciona proteínas recombinantes, moléculas nucleotídicas, vectores de vacunas recombinantes, o cepas de *Listeria* recombinantes de la invención, en los que la proteína recombinante comprende además el péptido heterólogo que comprende el péptido antigénico, para su uso como un medicamento.

50

55 En otra forma de realización, la presente invención proporciona proteínas recombinantes, moléculas nucleotídicas, vectores de vacuna recombinantes, o cepas de *Listeria* recombinantes de la invención, en los que la proteína recombinante comprende además el péptido heterólogo que comprende el péptido antigénico, comprendiendo dicho péptido antigénico un antígeno E6 de HPV o un antígeno E7 de HPV, para su uso en la prevención o tratamiento de la infección de HPV en un sujeto.

En otra forma de realización, la presente invención proporciona proteínas recombinantes, moléculas nucleotídicas, vectores de vacuna recombinantes, o cepas de *Listeria* recombinantes de la invención, en los que la proteína recombinante comprende además el péptido heterólogo que comprende el péptido antigénico, en el que el péptido antigénico comprende un antígeno E7 de HPV, para su uso en el tratamiento, inhibición, supresión, inducción de la regresión de, reducción de la incidencia de, o protección contra un tumor que expresa HPV-E7 en un sujeto. En una forma de realización, el tumor que expresa HPV E-7 es un tumor cervical o un tumor de cabeza y cuello.

En otra forma de realización, la presente invención proporciona proteínas recombinantes, moléculas nucleotídicas, vectores de vacuna recombinantes, o cepas de *Listeria* recombinantes de la invención, en los que la proteína recombinante comprende además el péptido heterólogo que comprende el péptido antigénico, en el que dicho péptido antigénico comprende un antígeno NY-ESO-1, para su uso en el tratamiento, inhibición, supresión, inducción de la regresión de, reducción de la incidencia de, o protección contra un tumor que expresa NY-ESO-1 en un sujeto, en el que el tumor que expresa NY-ESO-1 es un melanoma de ovario o cáncer de pulmón.

En otra forma de realización, la presente invención proporciona proteínas recombinantes, moléculas nucleotídicas, vectores de vacuna recombinantes, o cepas de *Listeria* recombinantes de la invención, en los que la proteína recombinante comprende además el péptido heterólogo que comprende el péptido antigénico, en el que dicho péptido antigénico comprende un receptor de linfocitos B (BCR), para su uso en el tratamiento, supresión, inducción de la regresión de, reducción de la incidencia de, o protección contra un linfoma que expresa BCR en un sujeto.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Figura 16. Translocación nuclear de NF-kappaB después de la estimulación con Dt-LLO. La línea celular de macrófagos J774 se usó como sistema modelo para las células presentadoras de antígenos (APC). Se sembraron 5×10^5 células por pocillo (placa de 6 pocillos) en un volumen total de 1 ml. Las células se tiñeron con anti-NF-kB (P65) - FITC (fluorescencia verde) y DAPI para el núcleo (fluorescencia azul). En B, D, y F, las células también se tiñeron después de 24 horas con anticuerpo anti-CD11B-PE (M1/170, eBioscience). La micrografía fluorescente se muestra a un aumento de 40x. NF-kappaB se ubica en el

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

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

- 10 La presente invención proporciona proteínas recombinantes y péptidos que comprenden una proteína listeriolisina O (LLO), en la que la proteína LLO comprende una mutación dentro del dominio de unión al colesterol (CBD) de la misma (SEQ ID NO: 18), en la que dicha mutación consiste en la sustitución de todos los residuos de aminoácidos en las posiciones 2, 9 y 10 de la SEQ ID NO: 18, y en la que dicha proteína recombinante presenta una reducción de más de 100 veces en la actividad hemolítica con respecto a una proteína LLO de tipo silvestre; y opcionalmente, en
 15 la que la proteína recombinante comprende además un péptido heterólogo que comprende un péptido antigénico, así como péptidos de fusión que comprenden los mismos, moléculas nucleotídicas que los codifican, y vectores de vacuna que comprenden o codifican los mismos. La presente invención también proporciona cepas de *Listeria* recombinantes que comprenden la proteína recombinante y composiciones de vacuna que comprenden proteínas recombinantes o moléculas nucleotídicas.
- 20 En una forma de realización, la presente invención proporciona una proteína o polipéptido recombinantes que comprende la proteína de listeriolisina O (LLO), en la que dicha proteína LLO comprende una mutación de sustitución de los residuos C484, W491, y W492, del dominio de unión al colesterol (CBD) de dicha proteína LLO. En una forma de realización, dichos residuos C484, W491, y W492 son los residuos C484, W491, y W492 de SEQ ID
 25 NO: 37, mientras que, en otra forma de realización, son residuos correspondientes como pueden deducirse utilizando alineamientos de secuencia. En una forma de realización, el polipéptido diferente de LLO es de la misma longitud que la región mutada. En otra forma de realización, el polipéptido diferente de LLO es más corto, o en otra forma de realización, más largo que la región mutada.
- 30 En una forma de realización, la sustitución en la proteína LLO es una mutación inactivadora con respecto a la actividad hemolítica.
- Un péptido recombinante para su uso en las composiciones de la presente invención presenta una reducción de más de 100 veces en la actividad hemolítica con respecto a la LLO de tipo silvestre. En otra forma de realización, el
 35 péptido recombinantes es no hemolítico. Como se divulga en el presente documento, se creó una proteína LLO mutante en la que los residuos C484, W491, y W492 de LLO se sustituyeron con residuos de alanina (Ejemplo 1). La proteína LLO mutada, mutLLO, pudo expresarse y purificarse en un sistema de expresión de *E. coli* (Ejemplo 3) y mostró una actividad hemolítica sustancialmente reducida con respecto a la LLO de tipo silvestre (Ejemplo 4).
- 40 En otra forma de realización, la presente invención proporciona una vacuna que comprende un adyuvante, una proteína o polipéptido recombinantes de la presente invención, y un péptido heterólogo de interés. En otra forma de realización, la presente invención proporciona una composición que comprende un adyuvante, una proteína o polipéptido recombinantes de la presente invención, y un péptido antigénico heterólogo de interés. En otra forma de realización, la proteína o polipéptido recombinante no está unido covalentemente al péptido heterólogo de interés.
- 45 En una forma de realización, el péptido antigénico heterólogo está fusionado genéticamente a la proteína LLO. En otra forma de realización, el péptido antigénico heterólogo está conjugado químicamente a la proteína LLO.

La región mutada de composiciones de la presente invención consiste, en otra forma de realización, en el residuo C484 de la SEQ ID NO: 37, el residuo W491 de la SEQ ID NO: 37, y el residuo W492 de SEQ ID NO: 37. En otra
 50 forma de realización, la región mutada comprende los residuos correspondientes de una proteína LLO homóloga.

La región mutada de composiciones de la presente invención consiste en sustituciones en el dominio de unión al colesterol de la proteína LLO mutada o fragmento de la misma. Por ejemplo, como se proporciona en el presente documento, los residuos C484, W491 y W492, cada uno de los cuales es un fragmento del CBD, se mutaron a
 55 residuos de alanina (Ejemplo 1). Además, como se proporciona en el presente documento, un fragmento del CBD, los residuos 484-492, se reemplazó con una secuencia heteróloga de NY-ESO-1 (Ejemplo 2). La mutación de sustitución de la proteína recombinante de la presente invención es, en otra forma de realización, una mutación en la que la región mutada de la proteína LLO se reemplaza por un número igual de aminoácidos heterólogos (AA), es decir, una sustitución. Por ejemplo, la mutación de sustitución es una mutación puntual de 3 residuos.

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

5

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

10

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

15

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

20

25

30

En otra forma de realización, la reducción es de al menos 100 veces. En otra forma de realización, la reducción es de al menos 120 veces. En otra forma de realización, la reducción es de al menos 150 veces. En otra forma de realización, la reducción es de al menos 200 veces. En otra forma de realización, la reducción es de al menos 250 veces. En otra forma de realización, la reducción es de al menos 300 veces. En otra forma de realización, la reducción es de al menos 400 veces. En otra forma de realización, la reducción es de al menos 500 veces. En otra forma de realización, la reducción es de al menos 600 veces. En otra forma de realización, la reducción es de al menos 800 veces. En otra forma de realización, la reducción es de al menos 1000 veces. En otra forma de realización, la reducción es de al menos 1200 veces. En otra forma de realización, la reducción es de al menos 1500 veces. En otra forma de realización, la reducción es de al menos 2000 veces. En otra forma de realización, la reducción es de al menos 3000 veces. En otra forma de realización, la reducción es de al menos 5000 veces.

35

40

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

45

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

50

La secuencia del dominio de unión al colesterol de las composiciones de la presente invención se expone en la SEQ ID NO: 18.

55

En otra forma de realización, la proteína LLO mutada de la presente invención comprende el péptido señal de la misma. En otra forma de realización, la proteína LLO mutada o fragmento de la misma comprende un péptido señal de una proteína LLO de tipo silvestre. En otra forma de realización, el péptido señal es una cadena peptídica corta

(3-60 aminoácidos de longitud) que dirige el transporte postraduccional de una proteína. En otra forma de realización, los péptidos señal son, además, señales de direccionamiento, secuencias señal, péptidos de tránsito, o señales de localización. En otra forma de realización, las secuencias de aminoácidos de los péptidos señal dirigen las proteínas a determinados orgánulos tales como el núcleo, matriz mitocondrial, retículo endoplásmico, cloroplasto, 5 apoplasto o peroxisoma. En otra forma de realización, la proteína LLO mutada contiene una secuencia señal de una proteína LLO de tipo silvestre. En otra forma de realización, la proteína LLO mutada carece de un péptido señal. En otra forma de realización, la proteína LLO mutada carece de una secuencia señal. En otra forma de realización, el péptido señal no se modifica con respecto a la proteína LLO de tipo silvestre a partir de la cual se derivó la proteína LLO mutada o un fragmento de la misma. En otra forma de realización, el péptido señal está en el extremo N- 10 terminal de la proteína o polipéptido recombinantes.

En otra forma de realización, la proteína LLO mutada o fragmento de la misma de composiciones de la presente invención comprende una secuencia peptídica tipo PEST. En otra forma de realización, la secuencia peptídica tipo PEST es una secuencia peptídica tipo PEST de LLO. En otra forma de realización, la secuencia de aminoácidos de 15 la secuencia peptídica tipo PEST se expone en la SEQ ID NO: 63.

Las secuencias PEST son secuencias ricas en prolina (P), ácidos glutámicos (E), serinas (S) y treoninas (T), generalmente, pero no siempre, flanqueadas por grupos que contienen varios aminoácidos cargados positivamente, con cortas semividas intracelulares (Rogers et al., 1986, Science 234:364-369). Las secuencias PEST dirigen la 20 proteína a la vía ubiquitina-proteosoma para la degradación (Rechsteiner y Rogers TIBS 1996 21:267-271), que además es una vía usada por las células eucariotas para generar péptidos inmunogénicos que se unen al MHC clase I. Las secuencias PEST son abundantes entre las proteínas eucariotas que producen péptidos inmunogénicos (Realini et al. FEBS Lett. 1994 348:109-113). Aunque las secuencias PEST se encuentran usualmente en proteínas eucariotas, una secuencia tipo PEST rica en los aminoácidos prolina (P), ácido glutámico (E), serina (S) y treonina 25 (T) se identificó en el extremo amino de la proteína LLO de *Listeria procariota* y demostró ser esencial para la patogenicidad de *L. monocytogenes* (Decatur, A. L. y Portnoy, D. A. Science 2000 290:992-995). La presencia de esta secuencia tipo PEST en LLO dirige la proteína a su destrucción por la maquinaria proteolítica de la célula huésped de manera que una vez que la LLO ha cumplido su función y facilitado el escape de *L. monocytogenes* de la vacuola fagolisosómica, es destruida antes de que dañe las células.

30 La identificación de secuencias tipo PEST se conoce bien en la técnica, y se describe, por ejemplo, en Rogers S et al (Amino acid sequences common to rapidly degraded proteins: the PEST hypothesis. Science 1986; 234(4774):364-8) y Rechsteiner M et al (PEST sequences and regulation by proteolysis. Trends Biochem Sci 1996; 21(7): 267-71). "Secuencia de tipo PEST" se refiere, en otra forma de realización, a una región rica en prolina (P), 35 ácido glutámico (E), serina (S), y treonina (T). En otra forma de realización, la secuencia de tipo PEST está flanqueada por uno o más grupos que contienen varios aminoácidos cargados positivamente. En otra forma de realización, la secuencia tipo PEST media la degradación intracelular rápida de las proteínas que la contienen. En otra forma de realización, la secuencia de tipo PEST se ajusta a un algoritmo desvelado en Rogers et al. En otra forma de realización, la secuencia de tipo PEST se ajusta a un algoritmo desvelado en Rechsteiner et al. En otra 40 forma de realización, la secuencia de tipo PEST contiene uno o más sitios de fosforilación interna, y la fosforilación en estos sitios precede a la degradación de la proteína.

En una forma de realización, las secuencias de tipo PEST de organismos procariotas se identifican de acuerdo con métodos tales como los descritos, por ejemplo, por Rechsteiner y Rogers (1996, Trends Biochem. Sci. 21:267-271) 45 para *LM* y en Rogers S et al (Science 1986; 234(4774):364-8). Como alternativa, las secuencias de AA tipo PEST de otros organismos procariotas pueden identificarse también basándose en este método. Otros organismos procariotas en los que se esperaría que las secuencias de AA tipo PEST incluyan, pero sin limitación, otras especies de *Listeria*. En una forma de realización, la secuencia de tipo PEST se ajusta a un algoritmo desvelado en Rogers et al. En otra forma de realización, la secuencia de tipo PEST se ajusta a un algoritmo desvelado en Rechsteiner et al. 50 En otra forma de realización, la secuencia de tipo PEST se identifica usando el programa PEST-find.

En otra forma de realización, la identificación de los motivos PEST se logra mediante un escaneo inicial de AA R, H, y K cargados positivamente dentro de la secuencia proteica especificada. Todos los AA entre los flancos cargados positivamente se cuentan y solo se consideran adicionalmente estos motivos, que contienen un número de 55 AA igual o superior al parámetro de tamaño de ventana. En otra forma de realización, una secuencia tipo PEST debe contener al menos 1 P, 1 D o E, y al menos 1 S o T.

En otra forma de realización, la calidad de un motivo PEST se refina por medio de un parámetro de puntuación basado en el enriquecimiento local de AA críticos, así como en la hidrofobicidad de los motivos. El enriquecimiento

de D, E, P, S y T se expresa en porcentaje en masa (p/p) y se corrige para 1 equivalente de D o E, 1 de P y 1 de S o T. En otra forma de realización, el cálculo de hidrofobicidad sigue en principio el método de J. Kyte y R.F. Doolittle (Kyte, J y Doolittle, RF. J. Mol. Biol. 157, 105 (1982). Para los cálculos simplificados, los índices de hidratación de Kyte-Doolittle, que originalmente oscilaban entre -4,5 para la arginina y +4,5 para la isoleucina, se convierten en enteros positivos, usando la siguiente transformación lineal, que produjo valores de 0 para arginina a 90 para isoleucina.

$$\text{Índice de hidropatía} = 10 * \text{índice de hidropatía de Kyte-Doolittle} + 45$$

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

$$15 \quad \text{Puntuación de PEST} = 0,55 * \text{DEPST} - 0,5 * \text{índice de hidrofobicidad.}$$

En otra forma de realización, la "secuencia PEST", "secuencia de tipo PEST" o "péptido de secuencia de tipo PEST" se refiere a un péptido que tiene una puntuación de al menos +5, usando el algoritmo anterior. En otra forma de realización, el término se refiere a un péptido que tiene una puntuación de al menos 6. En otra forma de realización, el péptido tiene una puntuación de al menos 7. En otra forma de realización, la puntuación es de al menos 8. En otra forma de realización, la puntuación es de al menos 9. En otra forma de realización, la puntuación es de al menos 10. En otra forma de realización, la puntuación es de al menos 11. En otra forma de realización, la puntuación es de al menos 12. En otra forma de realización, la puntuación es de al menos 13. En otra forma de realización, la puntuación es de al menos 14. En otra forma de realización, la puntuación es de al menos 15. En otra forma de realización, la puntuación es de al menos 16. En otra forma de realización, la puntuación es de al menos 17. En otra forma de realización, la puntuación es de al menos 18. En otra forma de realización, la puntuación es de al menos 19. En otra forma de realización, la puntuación es de al menos 20. En otra forma de realización, la puntuación es de al menos 21. En otra forma de realización, la puntuación es de al menos 22. En otra forma de realización, la puntuación es de al menos 22. En otra forma de realización, la puntuación es de al menos 24. En otra forma de realización, la puntuación es de al menos 24. En otra forma de realización, la puntuación es de al menos 25. En otra forma de realización, la puntuación es de al menos 26. En otra forma de realización, la puntuación es de al menos 27. En otra forma de realización, la puntuación es de al menos 28. En otra forma de realización, la puntuación es de al menos 29. En otra forma de realización, la puntuación es de al menos 30. En otra forma de realización, la puntuación es de al menos 32. En otra forma de realización, la puntuación es de al menos 35. En otra forma de realización, la puntuación es de al menos 38. En otra forma de realización, la puntuación es de al menos 40. En otra forma de realización, la puntuación es de al menos 45.

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

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

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

50 En la presente invención, el péptido diferente de LLO que reemplaza la región mutada de la proteína o polipéptido recombinante opcionalmente comprende además un péptido heterólogo que comprende un péptido antigénico de interés.

55 En una forma de realización, la proteína recombinante comprende además un péptido heterólogo que comprende un péptido antigénico o antígeno. En otra forma de realización, el péptido antigénico es un antígeno E6 del virus del papiloma humano (HPV)-16, un antígeno E7 de HPV-16, un antígeno E6 de HPV-18, un antígeno E7 de HPV-18, un péptido NY-ESO-1, un receptor de linfocitos B (BCR), un antígeno específico de próstata (PSA), un antígeno de células madre de próstata (PSCA), un antígeno de la enzima quimotriptica de estrato córneo (SCCE), un antígeno 1

de tumor de Wilms (WT-1), transcriptasa inversa de telomerasa humana (hTERT), proteinasa 3, proteína 2 relacionada con tirosinasa (TRP2), antígeno asociado a melanoma de alto peso molecular (HMW-MAA), sarcoma sinovial, X (SSX)-2, antígeno carcinoembrionario (CEA), MAGE-A, receptor alfa de interleucina-13 (IL13-R alfa), anhidrasa carbónica IX (CAIX), survivina, GP100 o péptido testisina. En una forma de realización, el péptido 5 antigénico o antígeno heterólogo está fusionado genéticamente a la proteína LLO. En otra forma de realización, el péptido antigénico o antígeno heterólogo está conjugado químicamente a la proteína LLO.

En otra forma de realización, la presente invención proporciona una vacuna que comprende un adyuvante y una proteína o polipéptido recombinantes de la presente invención, en la que opcionalmente, la proteína recombinante 10 comprende además un péptido heterólogo que comprende un péptido antigénico de interés. En otra forma de realización, la presente invención proporciona una composición de vacuna que comprende la proteína o polipéptido recombinante.

En otra forma de realización, la presente invención proporciona una molécula nucleotídica que codifica una proteína 15 o polipéptido recombinantes de la presente invención, en la que un péptido antigénico de interés reemplaza la región mutada.

En una forma de realización, la proteína o polipéptido recombinante de la presente invención comprende una LLO 20 mutada fusionada o conjugada con un péptido antigénico o proteína.

En otra forma de realización, la presente invención proporciona una vacuna que comprende un adyuvante y una proteína o polipéptido recombinantes de la presente invención, en la que opcionalmente, la proteína recombinante 25 comprende además un péptido heterólogo que comprende un péptido antigénico.

En otra forma de realización, la presente invención proporciona una molécula nucleotídica que codifica una proteína 30 o polipéptido recombinantes de la presente invención, opcionalmente, en la que la proteína o polipéptido recombinante comprende además un péptido heterólogo que comprende un péptido antigénico.

Como se divulga, la proteína LLO o fragmento de la misma de composiciones de la presente invención puede estar 35 en el extremo N-terminal de una proteína o polipéptido recombinantes de la presente invención. Como alternativa, la proteína LLO o fragmento de la misma está en cualquier otra posición en la proteína o polipéptido recombinante.

En otra forma de realización, la presente invención proporciona la proteína recombinante de la presente invención y un péptido antigénico heterólogo de interés. En otra forma de realización, la proteína o polipéptido recombinante no 40 está unido covalentemente al péptido heterólogo de interés. En una forma de realización, el péptido antigénico heterólogo está fusionado genéticamente a la proteína LLO. En otra forma de realización, el péptido antigénico heterólogo está conjugado químicamente a la proteína LLO.

En otra forma de realización, la presente invención proporciona una composición de vacuna que comprende un adyuvante, una proteína recombinante de la presente invención o molécula nucleotídica que codifica la proteína 45 recombinante de la presente invención, y un péptido heterólogo que comprende un péptido antigénico, en la que la proteína recombinante comprende además un péptido heterólogo que comprende un péptido antigénico, junto con un adyuvante, en el que el adyuvante comprende una proteína del factor estimulante de colonias de granulocitos/macrófagos (GM-CSF), una molécula nucleotídica que codifica una proteína GM-CSF, saponina QS21, 50 monofosforil lípido A, o un oligonucleótido que contiene CpG no metilado.

En otra forma de realización, la presente invención proporciona una molécula nucleotídica que codifica una proteína 55 o polipéptido recombinantes de la presente invención.

En otra forma de realización, la presente invención proporciona un vector de vacuna recombinante que codifica una proteína recombinante de la presente invención.

En otra forma de realización, la presente invención proporciona una cepa de *Listeria* recombinante que comprende una proteína recombinante de la presente invención. En otra forma de realización, la presente invención proporciona 60 una cepa de *Listeria* recombinante que expresa una proteína o polipéptido recombinantes de la presente invención. En otra forma de realización, la presente invención proporciona una cepa de *Listeria* recombinante que codifica una proteína o polipéptido recombinantes de la presente invención. En otra forma de realización, la presente invención proporciona una cepa de *Listeria* recombinante que comprende un nucleótido recombinante que codifica un polipéptido recombinante de la presente invención. En otra forma de realización, la cepa de la vacuna contra *Listeria*

es la especie *Listeria monocytogenes* (LM).

En otra forma de realización, la presente invención proporciona una célula que comprende un vector de la presente invención. Los métodos para producir células que comprenden vectores y/o ácidos nucleicos exógenos se conocen bien en la técnica. Véase, por ejemplo, Sambrook et al. (1989, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York), y en Ausubel et al. (1997, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Nueva York).

El adyuvante utilizado en las composiciones de la presente invención es, en otra proteína, una proteína del factor estimulante de colonias de granulocitos/macrófagos (GM-CSF). En otra forma de realización, el adyuvante comprende una proteína GM-CSF. En otra forma de realización, el adyuvante es una molécula nucleotídica que codifica GM-CSF. En otra forma de realización, el adyuvante comprende una molécula nucleotídica que codifica GM-CSF. En otra forma de realización, el adyuvante es saponina QS21. En otra forma de realización, el adyuvante comprende saponina QS21. En otra forma de realización, el adyuvante es monofosforil lípido A. En otra forma de realización, el adyuvante comprende monofosforil lípido A. En otra forma de realización, el adyuvante es un oligonucleótido que contiene CpG no metilado. En otra forma de realización, el adyuvante comprende un oligonucleótido que contiene CpG no metilado.

En otra forma de realización, el péptido heterólogo comprende un péptido antigénico. En una forma de realización, la proteína es una proteína NY-ESO-1. En otra forma de realización, la proteína es una proteína E7 del virus de papiloma humano (HPV). En otra forma de realización, la proteína es una proteína del receptor de linfocitos B (BCR). Como se divulga en el presente documento, el péptido heterólogo de interés puede ser un péptido antigénico.

En otra forma de realización, la presente invención proporciona una proteína recombinante de la presente invención o una molécula nucleotídica que codifica una proteína recombinante de la presente invención o un vector de vacuna recombinante que codifica una proteína recombinante de la presente invención, o una cepa de *Listeria* recombinante que comprende una proteína recombinante de la presente invención, en la que la proteína recombinante comprende además un péptido heterólogo que comprende un péptido antigénico, para su uso como un medicamento.

El péptido antigénico de interés, en otra forma de realización, es un péptido NY-ESO-1.

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

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

En una forma de realización, la presente invención proporciona una proteína recombinante de la presente invención o un nucleótido que codifica una proteína recombinante de la presente invención o un vector de vacuna recombinante que codifica una proteína recombinante de la presente invención o una cepa de *Listeria* que comprende una proteína recombinante de la presente invención, en la que la proteína recombinante comprende además un antígeno heterólogo que comprende un péptido antigénico, en el que el péptido antigénico comprende un antígeno NY-ESO-1, para su uso en el tratamiento, inhibición, supresión, inducción de la regresión de, reducción de la incidencia de, o protección contra un tumor que expresa NY-ESO-1 en un sujeto, en el que el tumor que expresa NY-ESO-1 es un melanoma de ovario o un cáncer de pulmón.

Un epítipo NY-ESO-1 para su uso en las composiciones de la presente invención es ASGPGGGAPR: 53-62 (A31),

ARGPESRLL: 80-88 (Cw6), LAMPFATPM: 92-100 (Cw3), MPFATPMEA: 94-102 (B35, B51), TVSGNILTR: 127-136 (A68), TVSGNILT: 127-135 (Cw15), SLLMWITQC: 157-165 (A2; Ejemplo 2), u otro epítipo NY-ESO-1 conocido en la técnica.

- 5 Como se divulga en el presente documento, la administración al sujeto de un péptido, proteína o polipéptido recombinante que contiene el antígeno NY-ESO-1 de la presente invención induce una respuesta inmunológica contra una célula diana que expresa NY-ESO-1. La célula diana puede ser una célula de melanoma de ovario. La célula diana puede ser una célula de cáncer de pulmón.
- 10 La célula cancerosa o tumor diana que expresa NY-ESO-1 puede ser una célula o tumor de cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC). La célula cancerosa que expresa NY-ESO-1 puede ser una célula o tumor de adenocarcinoma de pulmón. La célula cancerosa que expresa NY-ESO-1 puede ser una célula o tumor de carcinoma bronquioloalveolar (BAC). La célula cancerosa que expresa NY-ESO-1 puede ser una célula o tumor de un adenocarcinoma con características bronquioloalveolares (AdenoBAC). La célula cancerosa o tumor que expresa NY-ESO-1 puede ser de un carcinoma de células escamosas del pulmón.

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

- MQAEGRGTGGSTGDADGPGGGPIPDGPGGNAGGPGEAGATGGRGPRGAGAARASGPGGGAPRGPHGGAASGL
 20 NGCCRCGARGPESRLLLEFYLAMPFATPMEAELARRSLAQDAPPLVPGVLLKEFTVSGNILTIRLTAADHRQLQLSISS
 CLQQLSLLMWITQCFLPVFLAQPPSGQRR (SEQ ID NO: 1; N.º de Acceso al GenBank NM_001327). En otra forma de realización, la proteína NY-ESO-1 es un homólogo de SEQ ID NO: 1. En otra forma de realización, la proteína NY-ESO-1 es un variante de SEQ ID NO: 1. En otra forma de realización, la proteína NY-ESO-1 es un isómero de SEQ ID NO: 1. En otra forma de realización, la proteína NY-ESO-1 es un fragmento de SEQ ID NO: 1.
 25 de realización, la proteína NY-ESO-1 es un fragmento de un homólogo de SEQ ID NO: 1. En otra forma de realización, la proteína NY-ESO-1 es un fragmento de una variante de SEQ ID NO: 1. En otra forma de realización, la proteína NY-ESO-1 es un fragmento de un isómero de SEQ ID NO: 1.

- En otra forma de realización, el péptido NY-ESO-1 de la presente invención se deriva de cualquier otra proteína NY-ESO-1 conocida en la técnica. En otra forma de realización, el antígeno NY-ESO-1 es un péptido que tiene la secuencia: SLLMWITQC (SEQ ID NO: 2). En otra forma de realización, la secuencia es SLLMWITQCFL (SEQ ID NO: 3). En otra forma de realización, la secuencia es SLLMWITQCFLP (SEQ ID NO: 4). En otra forma de realización, la secuencia es SLLMWITQCFLPV (SEQ ID NO: 5). En otra forma de realización, la secuencia es SLLMWITQCFLPVFL (SEQ ID NO: 6). En otra forma de realización, la secuencia es SLLMWITQCFLPVFL (SEQ ID NO: 7). En otra forma de realización, la secuencia es WITQCFLPVFLAQPPSGQRR (SEQ ID NO: 8). En otra forma de realización, la secuencia es YLAMPFATPMEAELARRSLA (SEQ ID NO: 9). En otra forma de realización, la secuencia es ASGPGGGAPR (SEQ ID NO: 10). En otra forma de realización, la secuencia es MPFATPMEA (SEQ ID NO: 11). En otra forma de realización, la secuencia es LAMPFATPM (SEQ ID NO: 12). En otra forma de realización, la secuencia es ARGPESRLL (SEQ ID NO: 13). En otra forma de realización, la secuencia es LLMWITQCF (SEQ ID NO: 14). En otra forma de realización, la secuencia es SLLMWITQV (SEQ ID NO: 15). En una forma de realización, el antígeno NY-ESO-1 es un péptido que comprende las posiciones 157-165 del péptido NY-ESO-1 de tipo silvestre. En otra forma de realización, el antígeno NY-ESO-1 es un péptido que comprende las posiciones 53-62 del péptido NY-ESO-1 de tipo silvestre. En otra forma de realización, el antígeno NY-ESO-1 es un péptido que comprende las posiciones 94-102 del péptido NY-ESO-1 de tipo silvestre. En otra forma de realización, el antígeno NY-ESO-1 es un péptido que comprende las posiciones 92-100 del péptido NY-ESO-1 de tipo silvestre. En otra forma de realización, el antígeno NY-ESO-1 es un péptido que comprende las posiciones 80-88 del péptido NY-ESO-1 de tipo silvestre. En otra forma de realización, el antígeno NY-ESO-1 es un péptido que comprende las posiciones 158-166 del péptido NY-ESO-1 de tipo silvestre. En otra forma de realización, el antígeno NY-ESO-1 es una variante de un péptido NY-ESO-1 de tipo silvestre. Un ejemplo de una variante es SLLMWITQV (SEQ ID NO: 16).
 50 16).

- En otra forma de realización, el péptido antigénico es un péptido E7 del virus del papiloma humano (HPV). En otra forma de realización, el péptido antigénico es una proteína E7 completa. En otra forma de realización, el péptido antigénico es un fragmento de una proteína E7.
 55

Las proteínas E6 y E7 son dos de siete proteínas tempranas no estructurales, algunas de las cuales desempeñan un papel en la replicación viral (E1, E2, E4) y/o en la maduración del virus (E4). Las proteínas E6 y E7 son oncoproteínas que son críticas para la replicación viral, así como para la inmortalización y transformación de las células huésped. Las proteínas virales E6 y E7 no se expresan en el epitelio escamoso cervical normal. Se necesita

la expresión de los genes de E6 y E7 en las células madre epiteliales de la mucosa para iniciar y mantener la carcinogénesis cervical. Además, la progresión de las lesiones preneoplásicas a cánceres cervicales invasivos se asocia con un aumento continuo de la expresión de las oncoproteínas E6 y E7. Por lo tanto, E6 y E7 se expresan en cánceres cervicales. El potencial oncogénico de E6 y E7 puede provenir de sus propiedades de unión a las proteínas de las células huésped. Por ejemplo, E6 se une a la proteína supresora de tumor p53 lo que conduce a una degradación de la proteína, dependiente de ubiquitina, y E7 se une y promueve la degradación de la proteína de retinoblastoma supresora de tumor (pRb). Por lo tanto, en una forma de realización, las composiciones de la presente invención que comprenden HPV-E7 son particularmente útiles en la prevención o tratamiento de los cánceres mencionados anteriormente.

10

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

15

En otra forma de realización, la presente invención proporciona una proteína recombinante de la presente invención o una molécula nucleotídica que codifica una proteína recombinante de la presente invención o un vector de vacuna recombinante que codifica una proteína recombinante de la presente invención o una cepa de *Listeria* recombinante que comprende una proteína recombinante de la presente invención, en la que la proteína recombinante comprende además un péptido heterólogo que comprende un péptido antigénico, comprendiendo el péptido antigénico un antígeno E6 de HPV o un antígeno E7 de HPV, para su uso en la prevención o tratamiento de la infección de HPV en un sujeto.

20

25

En otra forma de realización, la presente invención proporciona una proteína recombinante de la presente invención o una molécula nucleotídica que codifica una proteína recombinante de la presente invención o un vector de vacuna recombinante que codifica una proteína recombinante de la presente invención o una cepa de *Listeria* recombinante que comprende una proteína recombinante de la presente invención, en la que la proteína recombinante comprende además un péptido heterólogo que comprende un péptido antigénico, en el que el péptido antigénico comprende un antígeno E7 de HPV, para su uso en el tratamiento, inhibición, supresión, inducción de la regresión de, reducción de la incidencia de, o protección contra un tumor que expresa HPV-E7 en un sujeto. En otra forma de realización, el tumor que expresa HPV E7 es un tumor cervical o un tumor de cabeza y cuello.

30

35

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

40

La presente solicitud también divulga un método para inducir una respuesta inmune en un sujeto contra un antígeno E7 de HPV, que comprende la etapa de administrar al sujeto una HPV-E7 que contiene un péptido, proteína o polipéptido recombinante de la presente invención, induciendo de este modo una respuesta inmune contra un antígeno E7 de HPV.

45

La presente solicitud también divulga un método para inducir una respuesta inmune en un sujeto contra una célula diana que expresa E7 de HPV, que comprende la etapa de administrar al sujeto una HPV-E7 que contiene un péptido, proteína o polipéptido recombinante de la presente invención, induciendo de este modo una respuesta inmune contra una célula diana que expresa E7 de HPV.

50

La presente solicitud también divulga un método para inducir una respuesta inmune en un sujeto contra una célula diana que expresa E7 de HPV, que comprende la etapa de administrar al sujeto un vector de vacuna que codifica un péptido, proteína o polipéptido recombinante que contiene HPV-E7 de la presente invención, induciendo de este modo una respuesta inmune contra una célula diana que expresa E7 de HPV.

55

En una forma de realización, la célula diana es una célula de cáncer del cuello del útero. En otra forma de realización, la célula diana es una célula de cáncer de cabeza y cuello. En otra forma de realización, la célula diana es cualquier otro tipo de célula que expresa HPV E7 conocida en la técnica.

En una forma de realización, el tumor es un tumor cervical. En otra forma de realización, el tumor es un tumor de

cabeza y cuello. En otra forma de realización, el tumor es cualquier otro tipo de tumor que expresa HPV E7 conocido en la técnica.

5 El tumor cervical dirigido por las proteínas recombinantes, moléculas nucleotídicas, vectores de vacunas recombinantes, o cepas de *Listeria* de la presente invención es, en otra forma de realización, un carcinoma de células escamosas. En otra forma de realización, el tumor cervical es un adenocarcinoma. En otra forma de realización, el tumor cervical es un carcinoma adenoescamoso. En otra forma de realización, el tumor cervical es un carcinoma de células pequeñas. En otra forma de realización, el tumor cervical es cualquier otro tipo de tumor cervical conocido en la técnica.

10 En una forma de realización, el tumor dirigido por las proteínas recombinantes, moléculas nucleotídicas, vectores de vacuna recombinantes, o cepas de *Listeria* de la presente invención es un carcinoma de cabeza y cuello. En otra forma de realización, el tumor es un carcinoma anal. En otra forma de realización, el tumor es un carcinoma vulvar. En otra forma de realización, el tumor es un carcinoma vaginal.

15 En una forma de realización, las proteínas recombinantes, moléculas nucleotídicas, vectores de vacuna recombinantes, o cepas de *Listeria* de la presente invención que se proporcionan en el presente documento pueden usarse junto con otras rutas de tratamiento, inhibición, o supresión del cáncer del cuello del útero, incluyendo, entre otros, cirugía, radioterapia, quimioterapia, observación, adyuvante (adicional), o una combinación de estos
20 tratamientos.

La proteína E7 que se utiliza (ya sea entera o como la fuente de los fragmentos) en la presente invención tiene, en otra forma de realización, la secuencia

25 MHGDTPTLHEYMLDLQPETTDLYCYEQLNDSSEEEDEIDGPAGQAEPDRAHYNIVTFCKCDSTLRLCVQSTHVDIRT
LEDLLMGTGLGIVCPICSQKP (SEQ ID NO: 17). En otra forma de realización, la proteína E7 es un homólogo de SEQ
ID NO: 17. En otra forma de realización, la proteína E7 es un variante de SEQ ID NO: 17. En otra forma de
realización, la proteína E7 es un isómero de SEQ ID NO: 17. En otra forma de realización, la proteína E7 es un
fragmento de SEQ ID NO: 17. En otra forma de realización, la proteína E7 es un fragmento de un homólogo de SEQ
30 ID NO: 17. En otra forma de realización, la proteína E7 es un fragmento de una variante de SEQ ID NO: 17. En otra
forma de realización, la proteína E7 es un fragmento de un isómero de SEQ ID NO: 17.

En una forma de realización, el dominio de unión al colesterol de LLO (ECTGLAWEWWR; SEQ ID NO: 18) está
sustituido con un epítipo E7 (RAHYNIVTF; SEQ ID NO: 19).

35 En otra forma de realización, la secuencia de la proteína E7 es:

MHGPKATLQDIVLHLEPQNEIPVDLLCHEQLSDSEEEDEIDGVNHQHLPARRAEPQRHTMLCMCKCEARIELLVES
SADDLRAFQQLFLNTLSFVCPWCASQQ (SEQ ID NO: 20). En otra forma de realización, la proteína E7 es un
40 homólogo de SEQ ID NO: 20. En otra forma de realización, la proteína E7 es un variante de SEQ ID NO: 20. En otra
forma de realización, la proteína E7 es un isómero de SEQ ID NO: 20. En otra forma de realización, la proteína E7
es un fragmento de SEQ ID NO: 20. En otra forma de realización, la proteína E7 es un fragmento de un homólogo de
SEQ ID NO: 20. En otra forma de realización, la proteína E7 es un fragmento de una variante de SEQ ID NO: 20. En
otra forma de realización, la proteína E7 es un fragmento de un isómero de SEQ ID NO: 20.

45 En otra forma de realización, la proteína E7 tiene una secuencia expuesta en una de las siguientes entradas de
GenBank: M24215, NC_004500, V01116, X62843, o M14119. En otra forma de realización, la proteína E7 es un
homólogo de una secuencia de una de las entradas de GenBank anteriores. En otra forma de realización, la proteína
E7 es una variante de una secuencia de una de las entradas de GenBank anteriores. En otra forma de realización, la
50 proteína E7 es un isómero de una secuencia de una de las entradas de GenBank anteriores. En otra forma de
realización, la proteína E7 es un fragmento de una secuencia de una de las entradas de GenBank anteriores. En
otra forma de realización, la proteína E7 es un fragmento de un homólogo de una secuencia de una de las entradas
de GenBank anteriores. En otra forma de realización, la proteína E7 es un fragmento de una variante de una
secuencia de una de las entradas de GenBank anteriores. En otra forma de realización, la proteína E7 es un
55 fragmento de un isómero de una secuencia de una de las entradas de GenBank anteriores.

En una forma de realización, el antígeno E7 de HPV16 es un péptido que tiene la secuencia: TLGIVCPI (SEQ ID
NO: 21). En otra forma de realización, el antígeno E7 de HPV16 es un péptido que tiene la secuencia: LLMGTGLGIV
(SEQ ID NO: 22). En otra forma de realización, el antígeno E7 de HPV16 es un péptido que tiene la secuencia:

YMLDLQPETT (SEQ ID NO: 23). En una forma de realización, el antígeno E7 de HPV16 es un péptido que comprende las posiciones 86-93 del antígeno E7 de HPV16 de tipo silvestre. En una forma de realización, el antígeno E7 de HPV16 es un péptido que comprende las posiciones 82-90 del antígeno E7 de HPV16 de tipo silvestre. En una forma de realización, el antígeno E7 de HPV16 es un péptido que comprende las posiciones 11-20 del antígeno E7 de HPV16 de tipo silvestre. En otra forma de realización, el antígeno E7 de HPV16 es un péptido que consiste en las posiciones 86-93, 82-90, u 11-20 del antígeno E7 de HPV16 de tipo silvestre. En otra forma de realización, el antígeno E7 de HPV16 es una variante de un péptido E7 de HPV16 de tipo silvestre. En otra forma de realización, el antígeno E7 de HPV16 es cualquier antígeno E7 de HPV16 descrito en Rensing et al., J Immunol 1995 154(11):5934-43.

10

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

15 La proteína E6 que se utiliza (ya sea entera o como la fuente de los fragmentos) en la presente invención tiene, en otra forma de realización, la secuencia

MHQKRTAMFQDPQERPRKLPQLCTELQTTIHDIILECVYCKQQLLRREVDFAFRDLCIVYRDGNPYAVCDKCLKFYK
KISEYRHYCYSLYGTTLEQQYNKPLCDLLIRCINCQKPLCPEEKQRHLDKKQRFHNIIRGRWTGRCMSSCRSSRTRE

20 TQL (SEQ ID NO: 24). En otra forma de realización, la proteína E6 es un homólogo de SEQ ID NO: 24. En otra forma de realización, la proteína E6 es un variante de SEQ ID NO: 24. En otra forma de realización, la proteína E6 es un isómero de SEQ ID NO: 24. En otra forma de realización, la proteína E6 es un fragmento de SEQ ID NO: 24. En otra forma de realización, la proteína E6 es un fragmento de un homólogo de SEQ ID NO: 24. En otra forma de realización, la proteína E6 es un fragmento de una variante de SEQ ID NO: 24. En otra forma de realización, la proteína E6 es un fragmento de un isómero de SEQ ID NO: 24.

25

En otra forma de realización, la secuencia de la proteína E6 es:

MARFEDPTRRPYKLPDLCTELNTSLQDIEITCVYCKTVLELTVFEFAFKDLFVVYRDSIPHAACHKCIDFYSRIRELRH
30 YSDSVYGDITLEKLTNTGLYNLLIRCLRCQKPLNPAEKLRLHNEKRRFHNIAGHYRGQCHSCCNRRARQERLQRRRETQ

V (SEQ ID NO: 25). En otra forma de realización, En otra forma de realización, la proteína E6 es un homólogo de SEQ ID NO: 25. En otra forma de realización, la proteína E6 es un variante de SEQ ID NO: 25. En otra forma de realización, la proteína E6 es un isómero de SEQ ID NO: 25. En otra forma de realización, la proteína E6 es un fragmento de SEQ ID NO: 25. En otra forma de realización, la proteína E6 es un fragmento de un homólogo de SEQ
35 ID NO: 25. En otra forma de realización, la proteína E6 es un fragmento de una variante de SEQ ID NO: 25. En otra forma de realización, la proteína E6 es un fragmento de un isómero de SEQ ID NO: 25.

40

En otra forma de realización, la proteína E6 tiene una secuencia expuesta en una de las siguientes entradas de GenBank: M24215, M14119, NC_004500, V01116, X62843, o M14119. En otra forma de realización, la proteína E6 es un homólogo de una secuencia de una de las entradas de GenBank anteriores. En otra forma de realización, la proteína E6 es una variante de una secuencia de una de las entradas de GenBank anteriores. En otra forma de realización, la proteína E6 es un isómero de una secuencia de una de las entradas de GenBank anteriores. En otra forma de realización, la proteína E6 es un fragmento de una secuencia de una de las entradas de GenBank anteriores. En otra forma de realización, la proteína E6 es un fragmento de un homólogo de una secuencia de una
45 de las entradas de GenBank anteriores. En otra forma de realización, la proteína E6 es un fragmento de una variante de una secuencia de una de las entradas de GenBank anteriores. En otra forma de realización, la proteína E6 es un fragmento de un isómero de una secuencia de una de las entradas de GenBank anteriores.

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

En una forma de realización, un factor etiológico muy importante en la génesis del carcinoma cervical es la infección por los papilomavirus humanos (HPV), que, en una forma de realización, son virus pequeños de ADN que infectan las células epiteliales de la piel o la mucosa. En una forma de realización, las neoplasias malignas relacionadas con

el HPV incluyen los cánceres oral, cervical, anogenital, y cervical, así como papilomatosis respiratoria. En una forma de realización, el HPV expresa seis o siete proteínas no estructurales y dos proteínas estructurales, cada una de las cuales puede servir como un objetivo en los enfoques inmunoproliféricos o inmunoterapéuticos descritos en el presente documento. En una forma de realización, las proteínas de la cápside vírica L1 y L2 son proteínas 5 estructurales tardías. En una forma de realización, L1 es la proteína principal de la cápside, cuya secuencia de aminoácidos está muy conservada entre diferentes tipos de HPV.

En otra forma de realización, el péptido antigénico de interés de las composiciones de la presente invención es un idiotipo de BCR.

10

En una forma de realización, los "receptores de linfocitos B" o "BCR" son el receptor de la superficie celular de linfocitos B para un antígeno específico. En otra forma de realización, el BCR está compuesto por una molécula transmembrana de inmunoglobulina asociada con las cadenas Ig α e Ig β invariantes en un complejo no covalente. En otra forma de realización, la señalización del receptor de linfocitos B (BCR) regula varias decisiones del destino de 15 los linfocitos B a lo largo del desarrollo. En otra forma de realización, la expresión continuada de las subunidades de señalización del BCR es necesaria para la supervivencia de los linfocitos B maduros. En otra forma de realización, las alteraciones en la señalización del BCR pueden apoyar la linfomagénesis. En una forma de realización, las células tienen la proteína CD20 en el exterior de la célula. En otra forma de realización, los linfocitos B cancerosos portan, además, la proteína CD20. En otra forma de realización, CD20 tiene un alto nivel de expresión en al menos 20 el 95% de los linfomas de linfocitos B. En una forma de realización, el BCR se expresa en los linfomas de linfocitos B. En otra forma de realización, el BCR se expresa en linfoma folicular, linfoma de células pequeñas no escindidas, linfoma de zona marginal, linfoma esplénico con linfocitos vellosos, linfoma de células de manto, linfoma de células grandes, linfoma difuso de células grandes, linfoma linfocítico pequeño, linfoma de Burkitt endémico, linfoma de Burkitt esporádico, linfoma no de Burkitt, tejido linfoide asociado a las mucosas MALT/MALToma (extranodal), 25 linfoma monocitoide de linfocitos B (nodal), linfoma inmunoblástico difuso de celularidad mixta, linfoma medial primario de linfocitos B, linfoma angiocéntrico - linfocitos B pulmonares. En otra forma de realización, CD20 se expresa en el linfoma folicular, linfoma de células pequeñas no escindidas, linfoma de zona marginal, linfoma esplénico con linfocitos vellosos, linfoma de células de manto, linfoma de células grandes, linfoma difuso de células grandes, linfoma linfocítico pequeño, linfoma de Burkitt endémico, linfoma de Burkitt esporádico, linfoma no de 30 Burkitt, tejido linfoide asociado a las mucosas MALT/MALToma (extranodal), linfoma monocitoide de linfocitos B (nodal), célula mixta difusa, linfoma medial primario de linfocitos B, linfoma angiocéntrico - linfocitos B pulmonares. Por lo tanto, en una forma de realización, las composiciones de la presente invención que comprenden BCR son particularmente útiles en la prevención o tratamiento de los cánceres mencionados anteriormente.

35 Se han demostrado estudios citogenéticos que algunos subtipos histológicos e inmunológicos de NHL tienen anomalías cromosómicas con translocaciones recíprocas, que implican frecuentemente genes para el receptor de linfocitos B y un oncogén. La linfomagénesis da como resultado una expansión clonal del linfocito B transformado, expresando cada célula hija el BCR en la superficie celular, así como los péptidos derivados del BCR asociados con moléculas MHC clase I y II. El BCR tiene una conformación única formada por las regiones 40 hipervariables de las cadenas pesada y ligera, esto se denomina como el "idiotipo", que es el mismo para cada célula hija dentro del tumor, y no está presente en cantidades significativas de células normales. Por lo tanto, el idiotipo es un antígeno específico del tumor y un objetivo para la terapia de linfomas.

En una forma de realización, la presente invención proporciona una proteína recombinante de la presente invención 45 o una molécula nucleotídica que codifica una proteína recombinante de la presente invención o un vector de vacuna recombinante que codifica una proteína recombinante de la presente invención o una cepa de *Listeria* recombinante que comprende una proteína recombinante de la presente invención, en la que la proteína recombinante comprende además un antígeno heterólogo que comprende un péptido antigénico, en el que el péptido antigénico comprende un receptor de linfocitos B (BCR), para su uso en el tratamiento, inhibición, supresión, inducción de la regresión de, 50 reducción de la incidencia de, o protección contra un linfoma que expresa BCR en un sujeto.

Como se proporciona en el presente documento, la presente invención ha producido una proteína de fusión conformacionalmente intacta que comprende una proteína LLO y un idiotipo de BCR (sección de Detalles Experimentales en el presente documento).

55

En otra forma de realización, la presente solicitud también divulga un método para inducir una respuesta inmunológica contra un linfoma en un sujeto, que comprende la etapa de administrar al sujeto un péptido, proteína o polipéptido recombinante que contiene un idiotipo de BCR de la presente invención, o una molécula nucleotídica que codifica una proteína recombinante de la presente invención, o un vector de vacuna recombinante que codifica una

proteína recombinante de la presente invención, o una cepa de *Listeria* recombinante que comprende una proteína recombinante de la presente invención, induciendo de este modo una respuesta inmunológica contra un linfoma.

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

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

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

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

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

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

La presente solicitud también divulga un método para superar una tolerancia inmunitaria a un linfoma en un sujeto, que comprende la etapa de administrar al sujeto una molécula nucleotídica de la presente invención, superando de este modo una tolerancia inmunológica a un linfoma.

"Tolerancia" se refiere, en otra forma de realización, a la falta de capacidad de respuesta del huésped a un antígeno. En otra forma de realización, el término se refiere a la falta de una capacidad de respuesta detectable del huésped a un antígeno. En otra forma de realización, el término se refiere a la falta de inmunogenicidad de un antígeno en un huésped. En otra forma de realización, la tolerancia se mide por la falta de capacidad de respuesta en un ensayo de muerte de CTL *in vitro*. En otra forma de realización, la tolerancia se mide por la falta de capacidad de respuesta en un ensayo de hipersensibilidad de tipo tardía. En otra forma de realización, la tolerancia se mide por la falta de capacidad de respuesta en cualquier otro ensayo adecuado conocido en la técnica. En otra forma de realización, la tolerancia se determina o se mide como se representa en los Ejemplos en el presente documento.

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

en el presente documento.

Por lo tanto, la presente solicitud divulga un método para reducir una incidencia de recaída de un linfoma en un sujeto en remisión del linfoma, que comprende la etapa de administrar al sujeto un péptido o proteína recombinante, nucleótido, vector de vacuna, o cepa de *Listeria* de la presente invención, lo que reduce de esta manera una incidencia de recaída de un linfoma en un sujeto en remisión del linfoma.

La presente solicitud divulga un método para reducir la incidencia de recaída de un linfoma en un sujeto en remisión del linfoma, que comprende administrar al sujeto una molécula nucleotídica de la presente invención, reduciendo de este modo la incidencia de recaída de un linfoma en un sujeto en remisión del linfoma.

La presente solicitud divulga un método para suprimir una formación de un linfoma, que comprende la etapa de administrar un péptido, proteína, polipéptido recombinante, molécula nucleotídica, vector de vacuna, o cepa de *Listeria* de la presente invención, suprimiendo de este modo una formación de un linfoma.

La presente solicitud divulga un método para inducir una remisión de una enfermedad de linfoma de linfocitos B residual, que comprende administrar una proteína recombinante, molécula nucleotídica, vector de vacuna, o cepa de *Listeria* de la presente invención, induciendo de este modo una remisión de una enfermedad de linfoma de linfocitos B residual.

La presente solicitud divulga un método para eliminar una enfermedad de linfoma de linfocitos B residual mínima, que comprende administrar una proteína recombinante, molécula nucleotídica, vector de vacuna, o cepa de *Listeria* de la presente invención, eliminando de este modo una enfermedad de linfoma de linfocitos B residual mínima.

La presente solicitud divulga un método para reducir un tamaño de un linfoma de linfocitos B, que comprende administrar una proteína recombinante, molécula nucleotídica, vector de vacuna, o cepa de *Listeria* de la presente invención, reduciendo de este modo un tamaño de un linfoma de linfocitos B.

La presente solicitud divulga un método para reducir un volumen de un linfoma de linfocitos B, que comprende administrar una proteína recombinante, molécula nucleotídica, vector de vacuna, o cepa de *Listeria* de la presente invención, reduciendo de este modo un volumen de un linfoma de linfocitos B.

En otra forma de realización, el linfoma que es un objetivo de la proteína recombinante, molécula nucleotídica, vector de vacuna, o cepa de *Listeria* de la presente invención es, en otra forma de realización, un linfoma no Hodgkin. En otra forma de realización, un linfoma es un linfoma de linfocitos B. En otra forma de realización, un linfoma es un linfoma de bajo grado. En otra forma de realización, un linfoma es un NHL de bajo grado. En otra forma de realización, un linfoma es una enfermedad residual de uno de los tipos de linfoma anteriores. En otra forma de realización, el linfoma es cualquier otro tipo de linfoma conocido en la técnica. En otra forma de realización, el linfoma es un linfoma de Burkitt. En otra forma de realización, el linfoma es un linfoma folicular. En otra forma de realización, el linfoma es un linfoma de zona marginal. En otra forma de realización, el linfoma es un linfoma de células de manto. En otra forma de realización, el linfoma es un linfoma indolente de células de manto. En otra forma de realización, el linfoma es cualquier otro tipo conocido de linfoma que exprese un BCR.

En otra forma de realización, las células del tumor que se dirige por la proteína recombinante, molécula nucleotídica, vector de vacuna, o cepa de *Listeria* de la presente invención, expresan un BCR. En otra forma de realización, el tumor se asocia con un BCR. En otra forma de realización, el BCR tiene un idiotipo que es característico del tumor. En otra forma de realización, el BCR expresado por una célula tumoral es el objetivo de las respuestas inmunológicas inducidas por las composiciones de la presente invención.

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

Las proteínas recombinantes, moléculas nucleotídicas, vectores de vacuna, y cepas de *Listeria* de la presente invención se aplican igualmente a cualquier BCR de un linfoma no Hodgkin y cualquier idiotipo del mismo. Las secuencias de BCR se conocen bien en la técnica, y se obtienen fácilmente a partir de muestras de linfomas.

Una secuencia ejemplar de un precursor de cadena pesada de inmunoglobulina (Ig) de un BCR es:
 MKLWLNWIFLVTLLNGIQCEVKLVESGGGLVQPGGSLSLSCAASGFTFTDYMSWVRQPPGKALEWLALIRNKANGY
 TTEYSASVKGRFTISRDNQSILYLQMNALRAEDSATYYCARDPNYYDGSYEGYFDYWAQGTTLTVSS (SEQ ID NO:
 26; N.º de Acceso al GenBank X14096).

5

Una secuencia ejemplar de un precursor de una cadena ligera de Ig de un BCR es:
 LLLISVTIVSNGEIVLTQSPTTMAASPGEKITITCSASSSISNYLHWYQQKPGFSPKLLIYRTSNLASGVPARFSGSGS
 GTSYSLTIGTMEADVATYYCQQGSSIPRGVTFGSGTKLEIKR (SEQ ID NO: 27; N.º de Acceso al GenBank
 X14097).

10

Otra secuencia ejemplar de un precursor de una cadena ligera de Ig de un BCR es:
 GFLISVTIVLTNGEIVLTQSPAIIAASPGEKVTITCSASSSVSYMNWYQQKPGSSPKIWIYGISNLASGVPARFSGSGS
 TSFSTINSMEADVATYYCQQRSSYPFTFGSGTKLEIKRADAAPT VSHLP (SEQ ID NO: 28; N.º de Acceso al
 GenBank X14098).

15

Otra secuencia ejemplar de un precursor de una cadena ligera de Ig de un BCR es:
 LLLISVTIVSNGEIVLTQSPTTMAASPGEKITITCSASSSISNYLHWYQQKPGFSPKLLIYRTSNLASGVPARFSGSGS
 GTSYSLTIGTMEADVATYYCQQGSSIPRTFGSGTKLEIKRA (SEQ ID NO: 29; N.º de Acceso al GenBank X14099).

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

MEFGLSWVFLVAILKGVCCEMQLVESGGGLVQPGESLKLSCAASGFSFGSTIHWVRQASGRGLEWVGRSRKAD
 NFMTSYAPSIKGFIISSRDDSSNMLYLQMNLLKTEDTAVYFCTRNFTSLDSTGNSFGPWGQGLTVTVSSGSASAPTLF
 PLVS (SEQ ID NO: 30; cadena pesada de IgM de linfoma folicular humano; N.º de Acceso al GenBank X70200).

25 Otra secuencia ejemplar de una cadena pesada de Ig de un BCR es:

MEFGLSWVFLVAILKGVCCEMQLVESGGGLVQPGESFKLSCAASGFSFGSTIHWVRQASGRGLEWVGRSRKAD
 NFMTSYAPSIKGFIISSRDDSSNMMYLQMNLLKNETAVYFCTRNFTSLDSTGNSFGPWGQGLTVTVSSGSASAPTL
 FPLVS (SEQ ID NO: 31; cadena pesada de IgM de linfoma folicular humano; N.º de Acceso al GenBank X70199).

30 Otra secuencia ejemplar de una cadena pesada de Ig de un BCR es:

MEFGLSWVFLVAILKGVCCEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTVSSNYMSWVRQAPGKGLEWVSVIYSGGST
 YYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCARHTVRGGHCAPRHKPSLQERWGNQRQALRS (SEQ
 ID NO: 32; cadena pesada de IgM de linfoma folicular humano; N.º de Acceso al GenBank X70208).

35 Otra secuencia ejemplar de una cadena pesada de Ig de un BCR es:

MEFGLSWVFLVAILKGVCCEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFGSGSAMHWVRQASGKGLEWVGHIRDKAN
 SYATTYAASVKGRFTISRDDSKNTAYLQMNLSLKIEDTAVYFCTRNFTSLDSTGNSFGPW (SEQ ID NO: 33; cadena
 pesada de IgM de linfoma folicular humano; N.º de Acceso al GenBank X70207).

40 Otra secuencia ejemplar de una cadena ligera de Ig de un BCR es:

SELTQDPVVSVALGQTVRITCQGDSLRSYYASWYQQKPGQAPVLYIYKNNRPSGIPDRFSGSSSGNTASLTITGAQ
 AEDEADYYCNSRDSSGNLPLFGGGTKLTVLG (SEQ ID NO: 34; cadena ligera de inmunocitoma
 linfoplasmacítico/linfoplasmacitoide humano; N.º de Acceso al GenBank AAD14088).

45 Otra secuencia ejemplar de una cadena ligera de Ig de un BCR es:

DIQMTQSPDSLTVSLGERATINCKSSQSILYSSNDKNYLAWYQQKAGQPPKLLIYWASTRESGVDPDRFSGSGSATDFT
 LTISSLQAEDVAIYYCQYYSTPLTFGGGKVEIKR (SEQ ID NO: 35; cadena ligera de linfoma folicular humano; N.º
 de Acceso al GenBank Y09250).

50 Otra secuencia ejemplar de una cadena ligera de Ig de un BCR es:

DIQMTQSPSTLSASVGRVTITCRASQSISTWLAWYQQKPGKAPKLLIYEASSLESVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQ
 PDDFVYYCQYNTFSSYTFGGGTKVEIK (SEQID NO: 36; cadena ligera de linfoma esplénico de zona marginal
 humano; N.º de Acceso al GenBank AAX93805).

55 Las secuencias de otras cadenas ligeras de Ig de BCR ilustrativas se encuentran en los N.º de acceso al GenBank
 AAX93769-93802, CAA25477, AAB31509, CAE52829-CAE52832, AAF79132-79143, y otras secuencias
 encontradas en el GenBank.

Las secuencias de otras cadenas pesadas de Ig de BCR ilustrativas se encuentran en los N.º de acceso al GenBank

CAA73044-73059, AAX93809-AAX93842, AAQ74129, CAC39369, AAB52590-AAB52597, y otras secuencias encontradas en el GenBank.

Los métodos para determinar las regiones determinantes de complementariedad (cdr) de un BCR se conocen bien en la técnica. Por ejemplo, la CDR1 de la SEQ ID NO: 26 consiste en los residuos 50-54; la CDR2 consiste en los residuos 66-87; el segmento D consiste en los residuos 120-130; y el segmento J consiste en los residuos 131-145. La CDR1 de la SEQ ID NO: 30 consiste en los residuos 148-162; la FR2 consiste en los residuos 163-204; la CDR2 consiste en los residuos 205-261; la FR3 consiste en los residuos 262-357; la CDR3 consiste en los residuos 358-432; y la CH1 consiste en los residuos 433-473. En otra forma de realización, las regiones del marco (regiones diferentes de las cdr) se determinan por homología con regiones del marco conocidas de otras moléculas de inmunoglobulinas de la misma especie.

En otra forma de realización, un idiotipo se identifica mediante la determinación de la cdr de un BCR de composiciones de la presente invención.

En otra forma de realización, se incluye o se utiliza un BCR completo en composiciones de la presente invención. En otra forma de realización, se incluye o se utiliza un fragmento de un BCR. En otra forma de realización, el fragmento de BCR contiene el idiotipo del mismo. En otra forma de realización, el fragmento de BCR contiene un epítipo de linfocitos T. En otra forma de realización, el fragmento de BCR contiene un epítipo de anticuerpo. En otra forma de realización, el término "antígeno" se usa en el presente documento para referirse al BCR o fragmento del mismo que es el objetivo de las respuestas inmunológicas inducidas por las composiciones de la presente invención.

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

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

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

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

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

En otra forma de realización, la enfermedad residual de un linfoma de linfocitos B o enfermedad mínima residual de un linfoma de linfocitos B tratada por una composición de la presente invención es la que queda después de una terapia de citorreducción. Los métodos para la terapia de citorreducción se conocen bien en la técnica, y se describen, por ejemplo, en Winter JN et al (Low-grade lymphoma. Hematology (Am Soc Hematol Educ Program). 2004;:203-20) y Buske C et al (Current status and perspective of antibody therapy in follicular lymphoma.

Haematologica. 2006 Jan;91(1):104-12).

- El péptido antigénico heterólogo utilizado en la presente invención es, en otra forma de realización, una proteína antigénica. En otra forma de realización, el péptido antigénico es un fragmento de una proteína antigénica. En otra forma de realización, el péptido antigénico es un péptido inmunogénico que se deriva de un tumor. En otra forma de realización, el péptido antigénico es un péptido inmunogénico que se deriva de una metástasis. En otra forma de realización, el péptido antigénico es un péptido inmunogénico que se deriva de células cancerosas. En otra forma de realización, el péptido antigénico es un péptido inmunogénico proangiogénico.
- 10 En otra forma de realización, el polipéptido antigénico es un antígeno E7 del virus del papiloma humano (HPV-E7), que en una forma de realización, es de HPV16 (en una forma de realización, N.º de Acceso al GenBank AAD33253) y en otra forma de realización, de HPV18 (en una forma de realización, N.º de Acceso al GenBank P06788). En otra forma de realización, el polipéptido antigénico es HPV-E6, que, en una forma de realización, es de HPV16 (en una forma de realización, N.º de Acceso al GenBank AAD33252, AAM51854, AAM51853, o AAB67615) y en otra forma de realización, de HPV18 (en una forma de realización, N.º de Acceso al GenBank P06463). En otra forma de realización, el polipéptido antigénico es antígeno prostático específico (PSA) (en una forma de realización, N.º de Acceso al GenBank CAD30844, CAD54617, AAA58802, o NP_001639). En otra forma de realización, el polipéptido antigénico es antígeno de la enzima quimotriptica del estrato córneo (SCCE) (en una forma de realización, N.º de Acceso al GenBank AAK69652, AAK69624, AAG33360, AAF01139, o AAC37551). En otra forma de realización, el polipéptido antigénico es el antígeno 1 del tumor de Wilms, que en otra forma de realización es la telomerasa de WT-1 (N.º de Acceso al GenBank P49952, P22561, NP_659032, CAC39220.2, o EAW68222.1). En otra forma de realización, el polipéptido antigénico es hTERT o Telomerasa (N.º de Acceso al GenBank NM003219 (variante 1), NM198255 (variante 2), NM_198253 (variante 3), o NM_198254 (variante 4)). En otra forma de realización, el polipéptido antigénico es la Proteinasa 3 (en una forma de realización, N.º de Acceso al GenBank M29142, M75154, M96839, X55668, NM_00277, M96628 o X56606). En otra forma de realización, el polipéptido antigénico es la proteína 2 relacionada con tirosinasa (TRP2) (en una forma de realización, N.º de Acceso al GenBank NP_001913, AB173976, AAP33051, o Q95119). En otra forma de realización, el polipéptido antigénico es el antígeno de alto peso molecular asociado a melanoma (HMW-MAA) (en una forma de realización, N.º de Acceso al GenBank NP_001888, AA128111, o AAQ62842). En otra forma de realización, el polipéptido antigénico es testisina (en una forma de realización, N.º de Acceso al GenBank AAF79020, AAF79019, AAG02255, AAK29360, AAD41588, o NP_659206). En otra forma de realización, el polipéptido antigénico es el antígeno NY-ESO-1 (en una forma de realización, N.º de Acceso al GenBank CAA05908, P78358, AAB49693, o NP_640343). En otra forma de realización, el polipéptido antigénico es PSCA (en una forma de realización, N.º de Acceso al GenBank AAH65183, NP_005663, NP_082492, O43653, o CAB97347). En otra forma de realización, el polipéptido antigénico es el receptor alfa de la interleucina (IL) 13 (en una forma de realización, N.º de Acceso al GenBank NP_000631, NP_001551, NP_032382, NP_598751, NP_001003075, o NP_999506). En otra forma de realización, el polipéptido antigénico es la anhidrasa carbónica IX (CAIX) (en una forma de realización, N.º de Acceso al GenBank CAI13455, CAI10985, EAW58359, NP_001207, NP_647466, o NP_001101426). En otra forma de realización, el polipéptido antigénico es el antígeno carcinoembrionario (CEA) (en una forma de realización, N.º de Acceso al GenBank AAA66186, CAA79884, CAA66955, AAA51966, AAD15250, o AAA51970.). En otra forma de realización, el polipéptido antigénico es MAGE-A (en una forma de realización, N.º de Acceso al GenBank NP_786885, NP_786884, NP_005352, NP_004979, NP_005358, o NP_005353). En otra forma de realización, el polipéptido antigénico es survivina (en una forma de realización, N.º de Acceso al GenBank AAC51660, AAY15202, ABF60110, NP_001003019, o NP_001082350). En otra forma de realización, el polipéptido antigénico es GP100 (en una forma de realización, N.º de Acceso al GenBank AAC60634, YP_655861, o AAB31176). En otra forma de realización, el péptido antigénico de la presente invención comprende una porción inmunógena del polipéptido antigénico.

En otras formas de realización, el antígeno se deriva de un virus.

- 50 En otras formas de realización descritas en el presente documento, el antígeno es uno de los siguientes antígenos tumorales: los antígenos 16/18 y E6/E7 de HPV asociados con cánceres cervicales, NY-ESO-1 (por ejemplo, N.º de Acceso al GenBank U87459), WT-1 (por ejemplo, N.º de acceso al GenBank NM000378 (variante A), NM024424 (variante B), NM_024425 (variante C), y NM024426 (variante D)), sarcoma sinovial X (SSX)-2; (N.º de Acceso al GenBank NP_003138, NP_783629, NP_783729, NP_066295), y enzima quimotriptica del estrato córneo (SCCE; N.º de Acceso al GenBank NM_005046 y NM_139277).

Los métodos para evaluar la producción de una respuesta inmunológica por un sujeto a un antígeno se conocen en la técnica, y en una forma de realización, se describen a continuación en el presente documento en la sección de Ejemplos.

La proteína LLO utilizada para construir las vacunas, incluyendo los vectores de vacuna y composiciones, tiene, en otra forma de realización, la secuencia:

5 MKKIMLVFITLILVSLPIAQQTEAKDASAFNKENSISSMAPPASPPASPKTPIEKKHADEIDKYIQGLDYNKNNVLVYHGD
 AVTNVPPRKGKYGKDGNEYIVVEKKKKSINQNNADIQ
 VVNAISSLTYPGALVKANSELVENQPDVLPVKRDSLTLSDLPGMTNQDNKIVVKNA
 TKSNNVNAVNTLVERWNEKYAQAYPNVSAKIDYDDEMAYSESQLIKFGTAFKAVNNSLVNFGAISEGKMQEEVISF
 KQIYYNVNVNEPTRPSRFFGKAVTKEQLQALGVN
 AENPPAYISSVAYGRQVYLKSTNSHSTKVKAADFDAVSGKSVSGDVELTNIKNSSF
 10 KAVIYGGSAKDEVDQIIDGNLGLDRDILKKGATFNRETPGVPIAYTTNFLKDNELAVIKNNSEYIETTSKAYTDGKINIDHS
 GGYVAQFNISWDEVNYDPEGNEIVQHKNWSENNK
 SKLAHFTSSIYLPGNARNINVYAKECTGLAWEWVRTVIDDRNLPLVKNRNISIWGTT LYPKYSNKVDNPIE (N.º de
 Acceso al GenBank P13128; SEQ ID NO: 37; la secuencia de ácido nucleico se expone en el N.º de acceso al
 GenBank X15127). Los primeros 25 AA de la proproteína que corresponde a esta secuencia son la secuencia señal
 15 y se escinden en LLO cuando es secretada por la bacteria. Por lo tanto, en esta forma de realización, la proteína
 LLO activa de longitud completa tiene 504 residuos de largo. En otra forma de realización, la proteína LLO es un
 homólogo de SEQ ID NO: 37. En otra forma de realización, la proteína LLO es una variante de SEQ ID NO: 37.

En otra forma de realización, la proteína LLO utilizada para construir vacunas, incluyendo vectores de vacuna,
 20 incluyendo vectores de vacuna y composiciones, tiene la secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 46 (Ejemplo
 1 a continuación en el presente documento). En otra forma de realización, la proteína LLO es una variante de SEQ
 ID NO: 46.

En otra forma de realización, la proteína LLO utilizada para construir vacunas como se proporciona en el presente
 25 documento es una LLO detoxificada (DTLLO). En otra forma de realización, LLO se detoxifica reemplazando la
 región de unión al colesterol con un péptido antígeno o epítipo del mismo. En otra forma de realización, LLO se
 detoxifica al reemplazar la región de unión al colesterol con el epítipo E7. En otra forma de realización, LLO se
 detoxifica al eliminar la porción de secuencia de señal de LLO. En otra forma de realización, DTLLO se utiliza en
 fusiones genéticas o químicas para dirigirse a antígenos para aumentar la inmunogenicidad del antígeno. En otra
 30 forma de realización, detoxLLO se fusiona con un antígeno. En otra forma de realización, DTLLO se fusiona con un
 péptido antigénico de las composiciones descritas en el presente documento.

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

En el presente documento se divulgan ejemplos en los que la proteína LLO es un ctLLO, que es una LLO de longitud
 completa en la que el CBD se ha reemplazado por un péptido antígeno o epítipo del mismo a través de una
 40 mutación de sustitución. También se describen en el presente documento ejemplos en los que la proteína LLO es un
 mutLLO. Un mutLLO es uno en el que el CBD ha sido mutado, por ejemplo, mutLLO es uno en el que los
 aminoácidos en el CBD se han mutado, por ejemplo, por una sustitución. En otra forma de realización, la proteína
 LLO mutada comprende cualquier combinación de deleciones, sustituciones o mutaciones puntuales en el CBD y/o
 45 deleciones de la secuencia de señal de LLO. En otra forma de realización, la mutación del CBD reduce la actividad
 hemolítica de LLO. En otra forma de realización, el CBD se reemplaza por epítopos restringidos de clase I conocidos
 de HLA para ser usados como una vacuna. En otra forma de realización, la LLO mutada se expresa y se purifica a
 partir de sistemas de expresión de *E. coli*.

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

Como se describe en el presente documento, "fragmento de LLO" o "ΔLLO" se refiere a un fragmento de LLO que
 comprende el dominio tipo PEST de la misma. En otra forma de realización, los términos se refieren a un fragmento
 de LLO que comprende una secuencia PEST.

55 En otra forma de realización, un péptido, proteína o polipéptido recombinante de la presente invención comprende
 además un polipéptido marcador detectable. En otra forma de realización, no se incluye un polipéptido marcador
 detectable. En otras formas de realización, el polipéptido marcador es la proteína fluorescente verde (GFP), myc,
 myc-piruvato cinasa (myc-PK), His6, proteína de unión a la maltosa (MBP), un polipéptido marcador de

hemaglutinina del virus de influenza, un polipéptido marcador flag (FLAG), y un polipéptido marcador de glutatión-S-transferasa (GST). Sin embargo, no debe interpretarse de ninguna manera que la invención se limita a los ácidos nucleicos que codifican los polipéptidos marcadores mencionados anteriormente. En otra forma de realización, la presente invención utiliza cualquier secuencia de ácido nucleico que codifique un polipéptido que funcione en una
5 manera sustancialmente similar a estos polipéptidos marcadores.

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

En otra forma de realización, un nucleótido de la presente invención se une operativamente a una secuencia promotora/reguladora que conduce la expresión del péptido codificado en las células en las que se introduce el vector. Las secuencias promotoras/reguladoras útiles para conducir la expresión constitutiva de un gen en una célula
25 procarionta se conocen bien en la técnica e incluyen, por ejemplo, el promotor de p60 de *Listeria*, el promotor de inIA (codifica internalina), el promotor de hly, y se usa el promotor de ActA. En otra forma de realización, se usa cualquier otro promotor de gram positivos. Las secuencias promotoras/reguladoras útiles para dirigir la expresión constitutiva de un gen en una célula eucariota (por ejemplo, para una vacuna de ADN) se conocen bien en la técnica e incluyen, pero sin limitación, por ejemplo, la secuencia potenciadora inmediata del promotor temprano de citomegalovirus, el
30 promotor temprano de SV40, y el promotor del virus del sarcoma de Rous. En otra forma de realización, la expresión inducible y tejido específica del ácido nucleico que codifica un péptido de la presente invención se logra mediante la introducción de un ácido nucleico que codifica al péptido bajo el control de una secuencia promotora/reguladora inducible o específica del tejido. Los ejemplos de secuencias promotoras/reguladoras específicas de tejidos o
inducibles que son útiles para este propósito incluyen, pero sin limitación, el promotor inducible LTR del MMTV, y el
35 potenciador/promotor tardío de SV40. En otra forma de realización, se utiliza un promotor que se induce en respuesta a agentes inductores tales como metales, glucocorticoides, y similares. Por lo tanto, se apreciará que la invención incluye el uso de cualquier secuencia promotora/reguladora, que se conozca o no, y que sea capaz de conducir la expresión de la proteína deseada unida operativamente a la misma.

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

Como se divulga en el presente documento, la presente solicitud divulga un método para mejorar la
45 inmunogenicidad de un antígeno, que comprende fusionar una proteína LLO o fragmento de la misma al antígeno. Como demuestran los datos divulgados en el presente documento, fusionar una proteína LLO mutada a un antígeno mejora la inmunogenicidad del antígeno.

En otra forma de realización divulgada, una proteína de fusión LLO contiene una secuencia de AA tipo PEST de la
50 presente invención. Como se divulga en el presente documento, se demostró una mejor inmunidad mediada por células para las proteínas de fusión que comprenden un antígeno y LLO que contiene la secuencia de AA tipo PEST KENSISMAPPASPPASPKTPIEKKHAEIDK (SEQ ID NO: 63). En otra forma de realización, la fusión de un antígeno a una LLO no hemolítica que incluye la secuencia de AA tipo PEST, SEQ ID NO: 1, puede mejorar la inmunidad mediada por células y antitumoral del antígeno.

55 En otra forma de realización, la proteína LLO no hemolítica o un fragmento de la misma no necesariamente son las que se exponen exactamente en las secuencias expuestas en el presente documento, sino que pueden llevarse a cabo otras alteraciones, modificaciones, o cambios que retengan las características funcionales de una LLO fusionada a un antígeno como se expone en otra parte en el presente documento. En otra forma de realización, la

presente invención utiliza un análogo de una proteína LLO o un fragmento de la misma de la presente invención. Los análogos difieren, en otra forma de realización, de las proteínas o péptidos de origen natural por diferencias conservadoras de la secuencia de AA o por modificaciones que no afectan a la secuencia, o por ambas.

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

- Debe entenderse que, en una forma de realización, un componente de las composiciones de la presente invención, tal como en una forma de realización, una secuencia de LLO, una secuencia de un dominio de unión al colesterol, o una secuencia de un antígeno, tal como, en una forma de realización, un NY-ESO-1, una secuencia de E7, o una secuencia de BCR, puede tener homología con una secuencia específica descrita en el presente documento. En una forma de realización, "homología" se refiere a una identidad de más del 70%. En otra forma de realización, "homología" se refiere a una identidad de más del 72%. En otra forma de realización, "homología" se refiere a una identidad de más del 75%. En otra forma de realización, "homología" se refiere a una identidad de más del 78%. En otra forma de realización, "homología" se refiere a una identidad de más del 80%. En otra forma de realización, "homología" se refiere a una identidad de más del 82%. En otra forma de realización, "homología" se refiere a una identidad de más del 83%. En otra forma de realización, "homología" se refiere a una identidad de más del 85%. En otra forma de realización, "homología" se refiere a una identidad de más del 87%. En otra forma de realización, "homología" se refiere a una identidad de más del 88%. En otra forma de realización, "homología" se refiere a una identidad de más del 90%. En otra forma de realización, "homología" se refiere a una identidad de más del 92%. En otra forma de realización, "homología" se refiere a una identidad de más del 93%. En otra forma de realización, "homología" se refiere a una identidad de más del 95%. En otra forma de realización, "homología" se refiere a una identidad de más del 96%. En otra forma de realización, "homología" se refiere a una identidad de más del 97%. En otra forma de realización, "homología" se refiere a una identidad de más del 98%. En otra forma de realización, "homología" se refiere a una identidad de más del 99%. En otra forma de realización, "homología" se refiere a una identidad del 100%.

- En otra forma de realización de la presente invención, "ácidos nucleicos" o "nucleótido" se refiere a una cadena de al menos dos combinaciones de base-azúcar-fosfato. El término incluye, en una forma de realización, ADN y ARN.
- 45 "Nucleótidos" se refiere, en una forma de realización, a las unidades monoméricas de polímeros de ácido nucleico. El ARN, en una forma de realización, está en la forma de ARNt (ARN de transferencia), ARNsn (ARN nuclear pequeño), ARNr (ARN ribosómico), ARNm (ARN mensajero), ARN antisentido, ARN inhibidor pequeño (ARNsi), micro ARN (ARNmi) y ribozimas. Se ha descrito el uso de ARNsi y ARNmi (Caudy AA et al, Genes & Devel 16: 2491-96 y referencias citadas en la presente). En otras formas de realización, el ADN puede estar en forma de ADN plasmídico, ADN vírico, ADN lineal o ADN cromosómico o derivados de estos grupos. Además, estas formas de ADN y ARN pueden estar trenzadas sencillas, dobles, triples o cuádruples. El término también incluye, en otra forma de realización, ácidos nucleicos artificiales que contienen otros tipos de estructuras principales pero las mismas bases. En una forma de realización, el ácido nucleico artificial es un PNA (ácido nucleico peptídico). El PNA contiene estructuras principales peptídicos y bases de nucleótidos y, en una forma de realización, son capaces de unirse a tanto moléculas de ADN como de ARN. En otra forma de realización, el nucleótido se modifica con un grupo oxetano. En otra forma de realización, el nucleótido se modifica por reemplazo de uno o más enlaces fosfodiéster con un enlace fosforotioato. En otra forma de realización, el ácido nucleico artificial contiene cualquier otra variante del esqueleto de fosfato de los ácidos nucleicos nativos conocidos en la técnica. El uso de ácidos nucleicos de fosfotiorato y PNA se conocen por los expertos en la técnica, y se describen, por ejemplo, en Neilsen PE, Curr Opin

Struct Biol 9:353-57; y Raz NK et al Biochem Biophys Res Commun. 297: 1075-84. La producción y uso de ácidos nucleicos se conoce por los expertos en la técnica y se describe, por ejemplo, en Molecular Cloning, (2001), Sambrook y Russell, eds. y Methods in Enzymology: Methods for molecular cloning in eukaryotic cells (2003) Purchio y G. C. Fareed.

5

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

Un péptido, proteína o polipéptido recombinante de la presente invención puede prepararse mediante un proceso que comprende la etapa de conjugar químicamente un péptido que comprende la proteína LLO o un fragmento de la misma con un péptido que comprende el antígeno. Como alternativa, una proteína LLO o un fragmento de la misma se conjuga químicamente con un péptido que comprende el antígeno. Como alternativa, un péptido que comprende la proteína LLO o un fragmento de la misma se conjuga químicamente con el antígeno. Como alternativa, la proteína LLO o fragmento de la misma se conjuga químicamente el antígeno.

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

En una forma de realización, el término "proteína" o "polipéptido" es una cadena de aminoácidos que comprende múltiples subunidades peptídicas, incluyendo una proteína de longitud completa, oligopéptidos, y fragmentos de los mismos, en la que los residuos de aminoácidos se unen por enlaces peptídicos covalentes. En una forma de realización, una proteína descrita en la presente invención puede ser, como alternativa, un polipéptido de la presente invención.

Como se usa en el presente documento en la memoria descriptiva y en la sección de ejemplos que sigue el término "péptido" incluye péptidos nativos (productos de degradación, péptidos sintetizados sintéticamente o péptidos recombinantes) y peptidomiméticos (típicamente, péptidos sintetizados sintéticamente), tales como peptoides y semipeptoides que son análogos peptídicos, que pueden tener, por ejemplo, modificaciones que hacen a los péptidos más estables mientras están en un cuerpo o más capaces de penetrar en células bacterianas. Dichas modificaciones incluyen, pero sin limitación, modificación del extremo N, modificación del extremo C, modificación del enlace peptídico, incluyendo, pero sin limitación, CH₂-NH, CH₂-S, CH₂-S=O, O=C-NH, CH₂-O, CH₂-CH₂, S=C-NH, CH=CH o CF=CH, modificaciones de cadena principal, y modificación de residuos. Se conocen bien en la técnica métodos para preparar compuestos peptidomiméticos y se especifican, por ejemplo, en Quantitative Drug Design, C.A. Ramsden Gd., Capítulo 17.2, F. Choplin Pergamon Press (1992). Se proporcionan posteriormente en el presente documento detalles adicionales a este respecto.

45

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

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

55

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

Además de lo anterior, los péptidos de la presente invención también pueden incluir uno o más aminoácidos

modificados o uno o más monómeros no aminoácidos (por ejemplo, ácidos grasos, carbohidratos complejos, etc.).

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

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

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

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

25 Como se divulga en el presente documento, un péptido de fusión de la presente invención puede sintetizarse mediante el uso de técnicas estándar de síntesis química de péptidos. En otra forma de realización, la molécula química se sintetiza como un solo polipéptido contiguo. En otra forma de realización, la proteína LLO; y el BCR o un fragmento del mismo se sintetizan por separado, después se fusionan por condensación del extremo amino de una molécula con el extremo carboxilo de la otra molécula, formando de este modo un enlace peptídico. En otra forma de realización, la proteína LLO y el antígeno se condensan cada uno con un extremo de una molécula espaciadora peptídica, formando de este modo una proteína de fusión contigua.

35 En otra forma de realización, las proteínas de fusión de la presente invención se preparan mediante cualquier método adecuado, incluyendo, por ejemplo, clonación y restricción de secuencias adecuadas o síntesis química directa mediante los métodos analizados a continuación. En otra forma de realización, las subsecuencias se clonan y las subsecuencias apropiadas se escinden usando enzimas de restricción apropiadas. Los fragmentos se ligan entonces, en otra forma de realización, para producir la secuencia de ADN deseada. En otra forma de realización, el ADN que codifica la proteína de fusión se produce utilizando métodos de amplificación de ADN, por ejemplo, reacción en cadena de la polimerasa (PCR). En primer lugar, los segmentos del ADN nativo a cada lado del nuevo extremo se amplifican por separado. El extremo 5' de una secuencia amplificada codifica el enlazador peptídico, mientras que el extremo 3' de la otra secuencia amplificada también codifica el enlazador peptídico. Dado que el extremo 5' del primer fragmento es complementario al extremo 3' del segundo fragmento, los dos fragmentos (después de la purificación parcial, por ejemplo, sobre LMP agarosa) se pueden usar como plantilla solapante en una tercera reacción de PCR. La secuencia amplificada contendrá codones, el segmento en el lado carboxi del sitio de apertura (que ahora forma la secuencia amino), el enlazador y la secuencia en el lado amino del sitio de apertura (que ahora forma la secuencia carboxilo). El inserto se liga a continuación en un plásmido.

40 En otra forma de realización, un péptido, proteína o polipéptido recombinantes de la presente invención se sintetizan mediante el uso de técnicas estándar de síntesis química de péptidos. En otra forma de realización, la molécula química se sintetiza como un solo polipéptido contiguo. En otra forma de realización, la proteína LLO no hemolítica o un fragmento de la misma; y el antígeno se sintetizan por separado, después se fusionan por condensación del extremo amino de una molécula con el extremo carboxilo de la otra molécula, formando de este modo un enlace peptídico. En otra forma de realización, la proteína LLO y el antígeno se condensan cada uno con un extremo de una molécula espaciadora peptídica, formando de este modo una proteína de fusión contigua.

45 En otra forma de realización, los péptidos y proteínas de la presente invención se preparan mediante síntesis de péptidos en fase sólida (SPPS) como se describe por Stewart et al. en Solid Phase Peptide Synthesis, 2ª Edición, 1984, Pierce Chemical Company, Rockford, Ill.; o como se describe por Bodanszky y Bodanszky (The Practice of

Peptide Synthesis, 1984, Springer-Verlag, Nueva York). En otra forma de realización, un residuo de AA protegido adecuadamente se une a través de su grupo carboxilo a un soporte polimérico derivatizado, insoluble, tal como resina de poliamida o poliestireno reticulado. "Protegido adecuadamente" se refiere a la presencia de grupos protectores tanto en el grupo alfa-amino del aminoácido, como en cualquier grupo funcional de las cadenas laterales.

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

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

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

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

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

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

La síntesis en fase sólida en la que el AA del extremo C-terminal de la secuencia se une a un soporte insoluble seguido de la adición secuencial de los AA restantes en la secuencia se usa, en otra forma de realización, para la síntesis química de los péptidos de esta invención. Las técnicas para la síntesis en fase sólida se describen por 5 Barany y Merrifield en *Solid-Phase Peptide Synthesis*; págs. 3-284 en *The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology*. Vol. 2: *Special Methods in Peptide Synthesis, Part A.*, Merrifield, et al. *J. Am. Chem. Soc.*, 85: 2149-2156 (1963), y Stewart et al., *Solid Phase Peptide Synthesis*, 2ª ed. Pierce Chem. Co., Rockford, Ill. (1984).

En otra forma de realización, las proteínas de fusión de la presente invención se sintetizan mediante el uso de una 10 metodología de ADN recombinante. En otra forma de realización, el ADN que codifica la proteína de fusión de la presente invención se prepara mediante cualquier método adecuado, que incluye, por ejemplo, la clonación y restricción de secuencias adecuadas o la síntesis química directa mediante métodos tales como el método de fosfotriéster de Narang et al. (1979, *Meth. Enzymol.* 68: 90-99); el método de fosfodiéster de Brown et al. (1979, *Meth. Enzymol.* 68: 109-151); el método de dietilfosforamidita de Beaucage et al. (1981, *Tetra. Lett.*, 22: 1859-1862); 15 y el método de soporte sólido de la Pat. de Estados Unidos N.º 4.458.066.

En otra forma de realización, los péptidos de la presente invención incorporan residuos de AA que se modifican sin afectar a la actividad. En otra forma de realización, los extremos terminales se derivatizan para incluir grupos 20 bloqueadores, es decir sustituyentes químicos adecuados para proteger y/o estabilizar los extremos N y C-terminales de una "degradación no deseada", un término que pretende abarcar cualquier tipo de ruptura enzimática, química o bioquímica del compuesto en sus extremos terminales que probablemente afecte la función del compuesto, es decir una degradación secuencial del compuesto en un extremo terminal del mismo.

En otra forma de realización, los grupos bloqueadores incluyen grupos protectores usados convencionalmente en la 25 técnica de la química de péptidos que no afectarán negativamente a las actividades *in vivo* del péptido. Por ejemplo, los grupos bloqueadores del extremo N-terminal adecuados pueden introducirse por alquilación o acilación del extremo N-terminal. Los ejemplos de grupos bloqueadores del extremo N-terminal adecuados incluyen grupos alquilo C₁-C₅ ramificados o no ramificados, grupos acilo tales como grupos formilo y acetilo, así como formas sustituidas de estos, tales como el grupo acetamidometilo (Acm). Los análogos de desamino AA también son grupos 30 bloqueadores del extremo N-terminal útiles, y pueden acoplarse al extremo N-terminal del péptido o usarse en lugar del residuo N-terminal. Los grupos bloqueadores del extremo C-terminal adecuados, en los que el grupo carboxilo del extremo C-terminal se incorpora o no, incluyen ésteres, cetonas o amidas. Los grupos alquilo formadores de cetona o éster, particularmente los grupos alquilo inferiores tales como metilo, etilo y propilo, y los grupos amino formadores de amida tales como aminas primarias (-NH₂), y grupos mono- y di-alquilamino tales como metilamino, 35 etilamino, dimetilamino, dietilamino, metiletilamino y similares son ejemplos de grupos bloqueadores del extremo C-terminal. Los análogos de AA descarboxilados tales como agmatina también son grupos bloqueadores del extremo C-terminal útiles y pueden acoplarse al residuo del extremo C-terminal del péptido o pueden usarse en lugar de este. En otra forma de realización, los grupos amino y carboxilo libres en los extremos terminales se eliminan totalmente 40 del péptido para producir formas desaminadas y descarboxiladas del mismo sin afectar a la actividad del péptido.

En otra forma de realización, se incorporan otras modificaciones sin afectar negativamente a la actividad. En otra 45 forma de realización, tales modificaciones incluyen, pero sin limitación, sustitución de uno o más de los AA en la forma L-isomérica natural con AA D-isoméricos. En otra forma de realización, el péptido incluye uno o más residuos de D-aminoácidos, o comprende AA que están todos en la forma D. Se contemplan además las formas retroinversas de los péptidos de acuerdo con la presente invención, por ejemplo, los péptidos invertidos en los que todos los aminoácidos se sustituyen con las formas de D-aminoácidos.

En otra forma de realización, las sales de adición de ácidos de los péptidos de la presente invención se utilizan como 50 equivalentes funcionales de los mismos. En otra forma de realización, un péptido de acuerdo con la presente invención tratado con un ácido inorgánico tal como clorhídrico, bromhídrico, sulfúrico, nítrico, fosfórico, y similares, o un ácido orgánico tal como acético, propiónico, glicólico, pirúvico, oxálico, málico, malónico, succínico, maleico, fumárico, tartárico, cítrico, benzoico, cinámico, mandélico, metanosulfónico, etanosulfónico, p-toluenosulfónico, salicílico y similares, para proporcionar una sal del péptido soluble en agua, es adecuado para su uso en la 55 invención.

En otra forma de realización, las modificaciones (que no modifican normalmente la secuencia primaria) incluyen la derivatización química de los polipéptidos *in vivo*, o *in vitro*, por ejemplo, acetilación, o carboxilación. Se incluyen, además, modificaciones de glucosilación, por ejemplo, las que se producen por modificación de los patrones de glucosilación de un polipéptido durante su síntesis y procesamiento o en etapas de procesamiento adicionales; por

ejemplo, por exposición del polipéptido a enzimas que afectan a la glucosilación, por ejemplo, enzimas de glucosilación o desglucosilación de mamíferos. Se incluyen además secuencias que tienen residuos de AA fosforilados, por ejemplo, fosfotirosina, fosfoserina, o fosfotreonina.

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

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

En otra forma de realización, la cepa de *Listeria* de la presente invención es una cepa recombinante de *Listeria seeligeri*. En otra forma de realización, la cepa de *Listeria* es una cepa recombinante de *Listeria grayi*. En otra forma de realización, la cepa de *Listeria* es una cepa recombinante de *Listeria ivanovii*. En otra forma de realización, la
20 cepa de *Listeria* es una cepa recombinante de *Listeria murrayi*. En otra forma de realización, la cepa de *Listeria* es una cepa recombinante de *Listeria welshimeri*. En otra forma de realización, la cepa de *Listeria* es una cepa recombinante de cualquier otra especie de *Listeria* conocida en la técnica.

En otra forma de realización, una cepa de *Listeria* recombinante de la presente invención ha sido pasada a través de un huésped animal. En otra forma de realización, el pase maximiza la eficacia de la cepa como un vector de vacuna.
25 En otra forma de realización, el pase estabiliza la inmunogenicidad de la cepa de *Listeria*. En otra forma de realización, el pase estabiliza la virulencia de la cepa de *Listeria*. En otra forma de realización, el pase aumenta la inmunogenicidad de la cepa de *Listeria*. En otra forma de realización, el pase aumenta la virulencia de la cepa de *Listeria*. En otra forma de realización, el pasaje elimina las subcepas inestables de la cepa de *Listeria*. En otra forma
30 de realización, el pase reduce la prevalencia de subcepas inestables de la cepa de *Listeria*. En otra forma de realización, la cepa de *Listeria* contiene una inserción genómica del gen que codifica un péptido, proteína o polipéptido recombinantes de la presente invención. En otra forma de realización, la cepa de *Listeria* lleva un plásmido que comprende el gen que codifica un péptido, proteína o polipéptido recombinantes de la presente invención. Los métodos para pasar una cepa de *Listeria* recombinante a través de un huésped animal se conocen
35 bien en la técnica y se describen, por ejemplo, en la Solicitud de Patente de los Estados Unidos con el N.º 2006/0233835. En otra forma de realización, el pase se realiza mediante cualquier otro método conocido en la técnica.

En otra forma de realización, la cepa de *Listeria* recombinante utilizada en la presente invención se ha almacenado en un banco de células congeladas. En otra forma de realización, la cepa de *Listeria* recombinante se ha
40 almacenado en un banco de células liofilizadas. Los métodos para producir, cultivar, y conservar vectores de vacunas de listeria se conocen en la técnica, y se describen, por ejemplo, en la Publicación Internacional PCT N.º WO 2007/061848.

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

En una forma de realización, "tratar" se refiere al tratamiento terapéutico o a medidas profilácticas o preventivas, en

- los que el objeto es prevenir o disminuir la afección o trastorno patológico diana como se ha descrito anteriormente. Por lo tanto, en una forma de realización, el tratamiento puede incluir afectar directamente o curar, suprimir, inhibir, prevenir, reducir la gravedad, retrasar la aparición de, reducir síntomas asociados con la enfermedad, trastorno o afección, o una combinación de los mismos. Por lo tanto, en una forma de realización, "tratar" se refiere entre otros a
- 5 retrasar el avance, acelerar la remisión, inducir la remisión, aumentar la remisión, acelerar la recuperación, aumentar la eficacia o disminuir la resistencia a productos terapéuticos alternativos, o una combinación de los mismos. En una forma de realización, "prevenir" se refiere, entre otros, a retrasar la aparición de los síntomas, prevenir la recaída de una enfermedad, disminuir el número o frecuencia de episodios de recaída, aumentar la latencia entre episodios sintomáticos, o una combinación de los mismos. En una forma de realización, "suprimir" o "inhibir", se refiere, entre
- 10 otros, a reducir la gravedad de los síntomas, reducir la gravedad de un episodio agudo, reducir el número de síntomas, reducir la incidencia de síntomas relacionados con la enfermedad, reducir la latencia de los síntomas, mejorar los síntomas, reducir los síntomas secundarios, reducir las infecciones secundarias, prolongar la supervivencia del paciente, o una combinación de los mismos.
- 15 En una forma de realización, "funcional" dentro del significado de la invención, se usa en el presente documento para referirse a la capacidad innata de una proteína, péptido, ácido nucleico, fragmento o una variante de estos para mostrar una actividad o función biológicas. En una forma de realización, tal función biológica es su propiedad de unión a una pareja de interacción, por ejemplo, un receptor asociado a la membrana, y en otra forma de realización, su propiedad de trimerización. En el caso de los fragmentos funcionales y las variantes funcionales de la invención,
- 20 estas funciones biológicas pueden de hecho cambiar, por ejemplo, con respecto a su especificidad o selectividad, pero con retención de la función biológica básica.

En una forma de realización, "genéticamente fusionado" como se proporciona en el presente documento pretende dar como resultado un ADN quimérico que contiene, cada uno en su propia forma de realización distinta, un

25 promotor y una secuencia codificante que no se asocian en la naturaleza.

En la medida en que, los siguientes Ejemplos no se refieren a una proteína recombinante que comprende una proteína listeriolisina O (LLO), en la que la proteína LLO comprende una mutación dentro del dominio de unión al colesterol (CBD) de la misma (SEQ ID NO: 18), en la que dicha mutación consiste en la sustitución de todos los

30 residuos de aminoácidos en las posiciones 2, 9 y 10 de la SEQ ID NO: 18 y en la que dicha proteína recombinante presenta una reducción de más de 100 veces en la actividad hemolítica con respecto a una proteína LLO de tipo silvestre; y opcionalmente, en la que la proteína recombinante comprende además un péptido heterólogo que comprende un péptido antigénico, como se reivindica, son ejemplos comparativos.

35 **SECCIÓN DE DETALLES EXPERIMENTALES**

MATERIALES Y MÉTODOS EXPERIMENTALES

Líneas celulares

40 El tumor TC-1 singénico de C57BL/6 se immortalizó con E6 y E7 de HPV-16 y se transformó con el oncogén c-Ha-ras. TC-1 expresa bajos niveles de E6 y E7 y es altamente tumorigénico. TC-1 se hizo crecer en RPMI 1640, FCS al 10%, L-glutamina a 2 mM, penicilina a 100 U/ml, estreptomycin a 100 µg/ml, aminoácidos no esenciales a 100 µM, piruvato de sodio a 1 mM, 2-ME a 50 micromolar (mM), G418 a 400 microgramos (mcg)/ml, y 10% de medio de

45 cultivo 109 de la Colección Nacional de Tipos de Cultivos a 37°C con 10% de CO₂. C3 es una célula embrionaria de ratón de ratones C57BL/6, immortalizada con el genoma completo de HPV 16 y transformada con pEJ-ras. EL-4/E7 es el timoma EL-4 transducido de manera retroviral con E7.

Cepas y propagación de *L. monocytogenes*

50 Las cepas de *Listeria* usadas fueron Lm-LLO-E7 (gen de fusión hly-E7 en un sistema de expresión episomal; Figura 1), Lm-E7 (casete del gen E7 de una sola copia integrado en el genoma de *Listeria*), Lm-LLO-NP ("DP-L2028"; gen de fusión hly-NP en un sistema de expresión episomal), y Lm-Gag ("ZY-18"; casete del gen Gag de VIH-1 de una sola copia integrado en el cromosoma). E7 se amplificó por PCR usando los cebadores 5'-

55 GGCTCGAGCATGGAGATACACC-3' (SEQ ID NO: 38; el sitio XhoI está subrayado) y 5'-GGGACTAGITTTATGGTTTCTGAGAACA-3' (SEQ ID NO: 39; el sitio SpeI está subrayado) y ligó a pCR2.1 (Invitrogen, San Diego, CA). E7 se escindió de pCR2.1 por digestión con XhoI/SpeI y se ligó en pGG-55. El gen de fusión hly-E7 y el factor de transcripción pluripotencial prfA se clonaron en pAM401, un plásmido lanzadera multicopias (Wirth R et al, J Bacteriol, 165: 831, 1986), lo que generó pGG-55. El promotor de hly conduce la

expresión de los primeros 441 AA del producto génico hly, (que carece del C-terminal hemolítico, denominado a continuación como "ΔLLO", y que tiene la secuencia que se expone en la SEQ ID NO: 17), que se une mediante el sitio XhoI al gen E7, lo que produce un gen de fusión hly-E7 que se transcribe y se secreta como LLO-E7. La transformación de una cepa de *Listeria* prfA negativa, XFL-7 (proporcionada por el Dr. Hao Shen, Universidad de Pensilvania), con pGG-55 se seleccionó para la retención del plásmido *in vivo* (Figuras 1A-B). El promotor de hly y el fragmento génico se generaron mediante el uso de los cebadores 5'-GGGGGCTAGCCCTCCTTTGATTAGTATATTC-3' (SEQ ID NO: 40; el sitio NheI está subrayado) y 5'-CTCCCTCGAGATCATAATTTACTTCATC-3' (SEQ ID NO: 41; el sitio XhoI está subrayado). El gen prfA se amplificó con PCR usando los cebadores 5'-GACTACAAGGACGATGACCGACAAGTGATAACCCGGGATCTAAATAAATCCGTT T-3' (SEQ ID NO: 42; el sitio XbaI está subrayado) y 5'-CCCCTCGACCAGCTCTTCTTGGTGAAG-3' (SEQ ID NO: 43; el sitio Sail está subrayado). Lm-E7 se generó mediante la introducción de un casete de expresión que contiene el promotor y la secuencia señal de hly que dirige la expresión y secreción de E7 en el dominio orfZ del genoma de LM. E7 se amplificó por PCR usando los cebadores 5'-GCGGATCCCATGGAGATACACCTAC-3' (SEQ ID NO: 44; el sitio BamHI está subrayado) y 5'-GCTCTAGATTATGGTTTCTGAG-3' (SEQ ID NO: 45; el sitio XbaI está subrayado). Después E7 se ligó al vector lanzadera pZY-21. La cepa de LM 10403S se transformó con el plásmido resultante, pZY-21-E7, que incluye un casete de expresión insertado en el medio de una secuencia de 1,6 kb que corresponde al dominio orfX, Y, Z del genoma de LM. El dominio de homología permite la inserción del casete del gen E7 en el dominio orfZ por recombinación homóloga. Los clones se cribaron para determinar la integración del casete del gen E7 en el dominio orfZ. Las bacterias se cultivaron en medio de infusión de cerebro y corazón con cloranfenicol (20 µg/ml) (Lm-LLO-E7 y Lm-LLO-NP) o sin cloranfenicol (Lm-E7 y ZY-18). Las bacterias se congelaron en alícuotas a -80°C. La expresión se verificó por transferencia Western (Figura 2).

Transferencia Western

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

Medición del crecimiento tumoral

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

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

Los ratones C57BL/6 de seis a 8 semanas de edad (Charles River) recibieron 2 x 10⁵ células TC-1 por vía s.c. en el costado izquierdo. Una semana después de la inoculación del tumor, los tumores habían alcanzado un tamaño palpable de 4-5 mm de diámetro. Grupos de ocho ratones se trataron después con 0,1 LD₅₀ i.p. de Lm-LLO-E7 (10⁷ UFC), Lm-E7 (10⁶ UFC), Lm-LLO-NP (10⁷ UFC), o Lm-Gag (5 x 10⁵ UFC) los días 7 y 14.

Ensayo de liberación de ⁵¹Cr

Los ratones C57BL/6, de 6-8 semanas de edad, se inmunizaron por vía i.p. con 0,1 LD₅₀ de Lm-LLO-E7, Lm-E7, LmLLO-NP, o Lm-Gag. Diez días después de la inmunización, se extrajeron los bazo. Los esplenocitos se establecieron en cultivo con células TC-1 irradiadas (100:1, esplenocitos:TC-1) como células alimentadoras; se estimularon *in vitro* durante 5 días, después se usaron en un ensayo de liberación de ⁵¹Cr estándar, con el uso de los siguientes objetivos: EL-4, EL-4/E7, o EL-4 pulsado con el péptido E7 H-2b (RAHYNIVTF; SEQ ID NO: 19). Las relaciones celulares E:T, llevadas a cabo por triplicado, fueron 80:1, 40:1, 20:1, 10:1, 5:1, y 2,5:1. Después de una incubación de 4 h a 37°C, las células se sedimentaron, y se eliminaron 50 µl del sobrenadante de cada pocillo. Las muestras se sometieron a ensayo con un contador de centelleo Wallac 1450 (Gaithersburg, MD). El porcentaje de lisis específica se determinó como [(recuentos experimentales por minuto - recuentos espontáneos por

minuto)/(recuentos totales por minuto - recuentos espontáneos por minuto)] x 100.

Proliferación específica de TC-1

5 Los ratones C57BL/6 se inmunizaron con 0,1 LD₅₀ y se reforzaron mediante inyección i.p. 20 días más tarde con 1 LD₅₀ de Lm-LLO-E7, Lm-E7, Lm-LLO-NP, o Lm-Gag. Seis días después del refuerzo, se cosecharon los bazo de los ratones inmunizados y sin tratar. Los esplenocitos se establecieron en cultivo a 5 x 10⁵/pocillo en placas de 96 pocillos de fondo plano con 2,5 x 10⁴, 1, 25 x 10⁴, 6 x 10³, o 3 x 10³ células TC-1 irradiadas/pocillo como una fuente de E7 Ag, o sin células TC-1 o con 10 µg/ml de Con A. Las células se sometieron a un pulso 45 h más tarde con 0,5
10 µCi [³H]timidina/pocillo. Las placas se cosecharon 18 h más tarde mediante el uso de un recolector Tomtec 96 (Orange, CT), y la proliferación se evaluó con un contador de centelleo Wallac 1450. El cambio en los recuentos por minuto se calculó como recuentos experimentales por minuto - sin recuentos de Ag por minuto.

Análisis de citometría de flujo

15 Los ratones C57BL/6 se inmunizaron por vía intravenosa (i.v.) con 0,1 LD₅₀ de Lm-LLO-E7 o Lm-E7 y se reforzaron 30 días más tarde. La citometría de flujo de tres colores para CD8 (53-6.7, conjugado con PE), ligando de CD62 (CD62L; MEL-14, conjugado con APC), y tetrámero E7 H-2Db se realizó mediante el uso de un citómetro de flujo FACSCalibur® con el software CellQuest® (Becton Dickinson, Mountain View, CA). Los esplenocitos cosechados 5
20 días después del refuerzo, se tiñeron a temperatura ambiente (ta) con los tetrámeros H2Db cargados con el péptido E7 (RAHYNIVTF; SEQ ID NO: 19) o un péptido de control (Gag de VIH). Los tetrámeros se usaron a una dilución de 1/200 y se proporcionaron por el Dr. Larr y R. Pease (Mayo Clinic, Rochester, MN) y por el National Institute of Allergy and Infectious Diseases Tetramer Core Facility and the National Institutes of Health AIDS Research and Reference Reagent Program. Se analizaron las células tetrámero⁺, CD8⁺, CD62L^{bajo}.

Agotamiento de componentes inmunológicos específicos

25 Las células CD8⁺, las células CD4⁺ y el IFN se agotaron en los ratones portadores de TC-1 al inyectar a los ratones con 0,5 mg por ratón de mAb: 2.43, GK1.5, o xmg1.2, respectivamente, los días 6, 7, 8, 10, 12, y 14 después de la
30 exposición tumoral. Las poblaciones celulares CD4⁺ y CD8⁺ se redujeron en un 99% (análisis de citometría de flujo). Las células CD25⁺ se agotaron por la inyección i.p. de 0,5 mg/mAb anti-CD25 de ratón (PC61, proporcionado por Andrew J. Caton) los días 4 y 6. El TGF se agotó por la inyección i.p. del mAb anti-TGF (2G7, proporcionado por H. I. Levitsky), en ratones portadores de TC-1 los días 6, 7, 8, 10, 12, 14, 16, 18 y 20. Los ratones se trataron con 10⁷
Lm-LLO-E7 o Lm-E7 el día 7 después de la exposición tumoral.

Transferencia adoptiva

35 Los ratones C57BL/6 donantes se inmunizaron y se reforzaron 7 días más tarde con 0,1 LD₅₀ de Lm-E7 o Lm-Gag. Los esplenocitos donantes se recolectaron y se pasaron sobre columnas de lana y nylon para el enriquecimiento de
40 linfocitos T. Los linfocitos T CD8⁺ se agotaron *in vitro* por la incubación con 0,1 µg de mAb 2.43 anti-CD8 durante 30 min a ta. Las células marcadas se trataron después con complemento de conejo. Los esplenocitos donantes eran >60% de linfocitos T CD4⁺ (análisis de citometría de flujo). Los ratones receptores portadores de tumores TC-1 se inmunizaron con 0,1 LD₅₀ 7 días después de la exposición tumoral. Los esplenocitos donantes enriquecidos con
45 CD4⁺ (10⁷) se transfirieron 9 días después de la exposición tumoral a los ratones receptores mediante inyección por vía i.v.

Experimento de B16F0-Ova

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

Estadística

55 Para la comparación de los diámetros de los tumores, se determinó la media y DE del tamaño tumoral para cada grupo, y la significación estadística se determinó mediante la prueba t de Student. p ≤ 0,05 se consideró significativo.

EJEMPLO 1: MUTAGÉNESIS DE SITIO DIRIGIDO DEL DOMINIO DE UNIÓN AL COLESTEROL DE LLO

La mutagénesis de sitio dirigido se realizó en LLO para introducir mutaciones puntuales de inactivación en el CBD,

mediante la siguiente estrategia. La proteína resultante se denomina "mutLLO":

Subclonación de LLO en pET29b

5 La secuencia de aminoácidos de LLO de tipo silvestre es:

MKKIMLVFITLILVSLPIAQOTEAKDASAFNKENSISVAPPASPPASPKTPIEKKHADEIDKYIQGLDYNKNNVLVYHGD
AVTNVPPRKGYKDGNEYIVVEKKKKKSINQNNADIQVNAISSLTYPGALVKANSELVENQPDVLPVKRDSLTLSDILPG
 MTNQDNKIVVKNATKSNVNAVNTLVERWNEKYAQAYSNVSAKIDYDDEMAYSESQLIKFGTAFKAVNNSLNVNFG

10 AISEGKMQUEEVISFKQIYYNVNVNEPTRPSRFFGKAVTKEQLQALGVNAENPPAYISSVAYGRQVYLKLTNSHSTKV
KAAFDAAVSGKSVSGDVELTNIKNSSKAVIYGGSAKDEVQIIDGNLGLDRDILKKGATFNRETPGVPIAYTTNFKDN
 ELAVIKNSEYIETTSKAYTDGKINIDHSGGYVAQFNISWDEVNYDPEGNEIVQHKNWSENKSKLAHFTSSIYLPGNA
 RNINVYAKECTGLAWE **WWRT**VIDDRNLPLVKNRNISIWGTTLYPKYSNKVDNPIE (SEQ ID NO: 46). El péptido señal
 y el dominio de unión al colesterol (CBD) están subrayados, con 3 residuos críticos en el CBD (C484, W491, y
 W492) en letras negras y cursivas.

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

MKKIMLVFITLILVSLPIAQOTEAKDASAFNKENSISVAPPASPPASPKTPIEKKHADE
IDKYIQGLDYNKNNVLVYHGDAVTNVPPRKGYKDGNEYIVVEKKKKKSINQNNADIQ
 VVNAISSLTYPGALVKANSELVENQPDVLPVKRDSLTLSDILPGMTNQDNKIVVKN
 TKNVNAVNTLVERWNEKYAQAYSNVSAKIDYDDEMAYSESQLIKFGTAFKAV
 NNSLNVNFGAISEGKMQUEEVISFKQIYYNVNVNEPTRPSRFFGKAVTKEQLQALGVN
 AENPPAYISSVAYGRQVYLKLTNSHSTKVKAAFDAAVSGKSVSGDVELTNIKNS
 SKAVIYGGSAKDEVQIIDGNLGLDRDILKKGATFNRETPGVPIAYTTNFKDNELAVIK
 NSEYIETTSKAYTDGKINIDHSGGYVAQFNISWDEVNYDPEGNEIVQHKNWSENK
 SKLAHFTSSIYLPGNARNINVYAKECTGLAWE **WWRT**VIDDRNLPLVKNRNISIWGTT
 LYPKYSNKVDNPIEHHHHHH (SEQ ID NO: 47).

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

catatgaaggatgcatctcaataaagaaaattcaattcatccgtggcaccaccagcatctccgctgcaagtctca
agacgccaatcgaaaagaacacgcggatgaaatcgataagtatatacaaggattggattacaataaaaaacaatgtattgataaccac
 25 ggagatgcagtgacaaatgtccgccaagaaaaggttacaagatggaaatgaatattgttgaggaaaaagaagaatccatca
atcaaaataatgcagacattcaagttgtaagcaatttcgagcctaacctaccaggtgctctgtaaaagcgaattcgaattagtaga
aatcaaccagatgtctccctgtaaacctgattcattcaactcagcattgattgccaggtatgactaatcaagacaataaaatagttg
aaaaatgccactaaatcaaacgtaacaacgcagtaaatatagtgaaagatggaatgaaaaatgctcaagcttattcaaatgta
agtgcaaaaattgattatgatgacgaaatggcttacagtgatcaaatgcaaatgcaaatggtacagcattaaagctgtaataatag
 30 cttgaatgtaaacctcgcccaatcagtgaaagggaaaatgcaagaagaagtcattagtttaacaaattactataacgtgaaatgtaag
aacctacaagacctccagattttcggcaaacgctgtactaaagagcagttgcaagcgttgagtgaaatgcagaaaatcctcctgcat
atatctcaagtggtggcgtatggcgtcaagttattgaaatatacaactaattcccatagtaactaaagtaaaagctgctttgatgctgccgt
aagcggaaaatctgtctcaggtgatgtagaactaacaataatcatcaaaaattctcctcaaaagccgtaatttacggagggtccgcaaaa
gatgaagtcaaatcatcgacggcaacctcgggactacgcatatgtgaaaaaagcgcacttttaacgagaaacaccaggagtt
 35 ccattgcttatacaaaaactcctaaaagacaatgaatagcgttattaaaaacaactcagaatataatgaaacaactcctaaaagcctat
acagatggaaaaattaacatgatcactctggaggatagctgcaattcaacatttctgggatgaagtaaatatgatctgaaggtaa
cgaattgtcaacataaaaactggagcgaaaaacaataaaagcaagctagctcatttcacatcgctcatctattgctgtaacgcgag
aaatataatgttacgctaagaatgacactggtttacgttgggaaatggtggagaacggtaattgatgaccggaactaccactgtgaaa
aatagaataatctccatctggggcaccacgctttatccgaaatagtaataaaagtagataatcaatcgaacaccaccaccaccacc taataaggatcc

40 (SEQ ID NO: 48). Las secuencias subrayadas son, a partir del comienzo de la secuencia, el sitio NdeI, el sitio NheI,
 la región que codifica al CBG, la etiqueta de His 6x, y el sitio BamHI. Los residuos del CBD que van a mutar en la
 siguiente etapa están en letras negras y cursivas.

Corte y empalme por PCR de extensión de solapamiento (SOE)

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

Ciclo de la reacción de PCR N.º 1: A) 94°C 2 min 30 s, B) 94°C 30 s, C) 55°C 30 s, D) 72°C 1 min, Etapas de repetición B a D 29 veces (30 ciclos en total), E) 72°C 10 min.

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

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

20

Secuencias de cebador:

Cebador 1: GCTAGCTCATTTCACATCGT (SEQ ID NO: 49; la secuencia de NheI está subrayada).

25

Cebador 2: TCTTGCAGCTTCCCAAGCTAAACCAGT**CGCTTCTTTAGCGTAAACATTAATATT** (SEQ ID NO: 50; la secuencia que codifica CBD está subrayada; los codones mutados están en letras negritas y en cursiva).

Cebador 3: GAAGCGACTGGTTTAGCTTGGGAAGCTGCAAGAACGGTAATTGATGACCGGAAC (SEQ ID NO: 51; la secuencia que codifica CBD está subrayada; los codones mutados están en letras negritas y en cursiva).

30

Cebador 4: GGATCCTTATTAGTGGTGGTGGTGGTGGTTCGATTGG (SEQ ID NO: 52; la secuencia BamHI está subrayada).

La secuencia CBD de tipo silvestre es ECTGLAWEWWR (SEQ ID NO: 18).

35 La secuencia CBD mutada es EATGLAWEAAR (SEQ ID NO: 53).

La secuencia del fragmento NheI-BamHI mutado es:

GCTAGCTCATTTCACATCGTCCATCTATTTGCCTGGTAACGCGAGAAATA
TTAATGTTTACGCTAAAGAAGCGACTGGTTTAGCTTGGGAAGCTGCAAGAACGGT
AATTGATGACCGGAACCTTACCACTTGTGAAAAATAGAAATATCTCCATCTGGGGC
ACCACGCTTTATCCGAAATATAGTAATAAAGTAGATAATCCAATCGAACACCACC
ACCACCACCACTAATAAGGATCC (SEQ ID NO: 54).

40 **EJEMPLO 2: REEMPLAZO DE PARTE DEL CBD DE LLO CON UN EPÍTOPO DE CTL**

La mutagénesis de sitio dirigido se realizó en LLO para sustituir 9 aminoácidos (AA) del CBD con un epítipo de CTL del antígeno NY-ESO-1. La secuencia del CBD (SEQ ID NO: 18) se reemplazó con la secuencia ESLLMWITOCR (SEQ ID NO: 55; los residuos mutados están subrayados), que contiene el epítipo restringido a HLA-A2 157-165 de NY-ESO-1, denominado "ctLLO."

45

La estrategia de subclonación usada fue similar a la del Ejemplo anterior.

Los cebadores usados fueron los siguientes:

50

Cebador 1: GCTAGCTCATTTCACATCGT (SEQ ID NO: 56; la secuencia NheI está subrayada).

Cebador 2: TCTGCACTGGGTGATCCACATCAGCAGGCTTCTTTAGCGTAAACATTAATATT (SEQ ID

NO: 57; la secuencia que codifica CBD está subrayada; los codones mutados (NY-ESO-1) están en letras negritas y en cursiva).

Cebador 3: GAAAGCCTGCTGATGTGGATCACCCAGTGCAGAACGGTAATTGATGACCGGAAC (SEQ ID NO: 58; la secuencia que codifica CBD está subrayada; los codones mutados (NY-ESO-1) están en letras negritas y en cursiva).

Cebador 4: GGATCCTTATTAGTGGTGGTGGTGGTGGTTCGATTGG (SEQ ID NO: 59; la secuencia BamHI está subrayada).

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

GCTAGCTCATTTCACATCGTCCATCTATTTGCCTGGTAACGCGAGAAATATTAAT
GTTTACGCTAAAGAAAGCCTGCTGATGTGGATCACCCAGTGCAGAACGGTAATTG
 ATGACCGGAACCTTACCACTTGTGAAAAATAGAAATATCTCCATCTGGGGCACCAC
 GCTTTATCCGAAATATAGTAATAAAGTAGATAATCCAATCGAACACCACCACCAC

10 CACCACTAATAAGGATCC (SEQ ID NO: 60).

EJEMPLO 3: mutLLO Y ctLLO PUEDEN EXPRESARSE Y PURIFICARSE EN SISTEMAS DE EXPRESIÓN DE *E. coli*

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

EJEMPLO 4: mutLLO Y ctLLO PRESENTAN UNA REDUCCIÓN SIGNIFICATIVA EN LA ACTIVIDAD HEMOLÍTICA

25 **MATERIALES Y MÉTODOS EXPERIMENTALES**

Ensayo de hemólisis

30 1. Las LLO mutada y de tipo silvestre se diluyeron hasta las diluciones indicadas en las Figuras 3A-B en 900 µl de PBS 1x-cisteína (PBS ajustado a pH 5,5 con clorhidrato de cisteína 0,5 M o se ajustó a 7,4). 2. La LLO se activó mediante la incubación a 37°C durante 30 minutos. 3. Los glóbulos rojos de oveja (200 µl/muestra) se lavaron dos veces en PBS-cisteína y de 3 a 5 veces en PBS 1x hasta que el sobrenadante estuviese relativamente transparente. 4. El sedimento final de los glóbulos rojos de oveja se resuspendió en
 35 PBS-cisteína y se añadieron 100 µl de la suspensión celular a los 900 µl de la solución de LLO (solución final al 10%). 5. Se añadieron 50 µl de glóbulos rojos de oveja a 950 µl de agua + Tween 20 al 10% (Control positivo para la lisis, contendrá el 50% de la cantidad de células lisadas con respecto a la cantidad total de células añadidas a los otros tubos; "control al 50%"). 6. Todos los tubos se mezclaron cuidadosamente y se incubaron a 37°C durante 45 minutos. 7. Los glóbulos rojos se centrifugaron en una microcentrifuga durante
 40 10 minutos a 1500 rpm. 8. Una alícuota de 200 µl del sobrenadante se transfirió a una placa de ELISA de 96 pocillos y se leyó a 570 nm para medir la concentración de hemoglobina liberada después de la hemólisis, y las muestras se titularon de acuerdo con el control al 50%.

RESULTADOS

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

50 Por lo tanto, la mutación puntual (mutLLO) o por sustitución (ctLLO) de los residuos de CBD de LLO, incluyendo C484, W491, y W492, anula o reduce grandemente la actividad hemolítica. Además, la sustitución del CBD con un péptido antigénico heterólogo es un medio eficaz para crear un vehículo inmunogénico de un epitopo heterólogo,

con una actividad hemolítica reducida significativamente con respecto a la LLO de tipo silvestre.

EJEMPLO 5: CONSTRUCCIÓN Y PRUEBAS DE VACUNAS mutLLO-38C13 BCR Y ctLLO-38C13 BCR

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

10 EJEMPLO 6: CONSTRUCCIÓN Y PRUEBAS DE VACUNAS mutLLO-E7 Y ctLLO-E7

Las vacunas mutLLO-E7 y ctLLO-E7 se construyen a partir de ADN que codifica mutLLO, ctLLO, y E7 como se describe en la Publicación de Patente de Estados Unidos 2006-0269561. Las vacunas se ensayan como se describe en la Publicación de Patente de Estados Unidos 2006-0269561, y presentan actividad protectora antitumoral.

15

EJEMPLO 7: EL EFECTO DE LA INMUNIZACIÓN CON LLO DETOX-E7 EN COMPARACIÓN CON LOS CONTROLES SOBRE EL CRECIMIENTO DE TC-1

Preparación de vacunas.

20

El E7 recombinante y detox LLO que comprende mutaciones o deleciones en el CBD se purificaron en una columna de níquel y el LPS se eliminó en una columna Norgen Proteospin de acuerdo con las instrucciones del fabricante. E7 se conjugó químicamente con la LLO mediante la mezcla de 2 mg de detox LLO con 500 µg de E7 y adición de paraformaldehído a una concentración final del 1%. La mezcla se agitó en un agitador rotatorio durante 40 minutos a 25 temperatura ambiente y después se dializó a 4°C durante una noche en PBS.

Regresión tumoral

30

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

EL EFECTO DE LA INMUNIZACIÓN CON LLO DETOX QUÍMICAMENTE CONJUGADA CON E7 Y LLO DETOX + E7 EN EL CRECIMIENTO DE TC-1

35

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

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

45

EL EFECTO DE LA INMUNIZACIÓN CON PROTEÍNA E7 O LLO EN EL CRECIMIENTO DE TC-1

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

50

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

55 EL EFECTO DE LA INMUNIZACIÓN CON DTLLO FUSIONADA GENÉTICAMENTE A LA SECUENCIA COMPLETA DE E7 Y LLO DETOXIFICADA MEDIANTE EL REEMPLAZO DE LA REGIÓN DE UNIÓN A COLESTEROL CON EL EPÍTOPO E7 EN EL CRECIMIENTO DE TC-1

Los ratones se inmunizaron por vía subcutánea a lo largo del lomo con 250 µl de PBS que contenía: DTLLO-E7

recombinante completa (secuencia completa de E7 fusionada genéticamente a DTLLO; 250 µg), quimera DTLLO-E7 (LLO detoxificada por sustitución de CBD con el epítipo de E7; 250 µg) o PBS solamente (sin tratar).

DTLLO-E7 completa y la quimera DTLLO-E7 retrasaron la aparición de los tumores en comparación con los 5 controles sin tratar (Figura 6). La quimera DTLLO-E7 demostró una mayor inhibición del crecimiento tumoral (8/8 libres de tumor en el día 49 después de la inoculación del tumor) en comparación con DTLLO-E7 completa (5/8 libres de tumor el día 49 después de la inoculación del tumor; Figura 6 y Tabla 1). Se obtuvieron resultados comparables en experimentos repetidos (Figuras 7-9). Se establecieron 2×10^5 células tumorales TC-1 por vía s.c. en 8 ratones por grupo de vacuna. Los ratones se inmunizaron por vía s.c. con 50 µg de E7, 200 µg de DTLLO, 250 10 µg de DTLLOE7, o 50 µg de E7 más 200 µg de DTLLO en los días 3 y 10 (Figura 9).

Los ratones administrados con DTLLO-E7 conjugados demostraron un aumento atenuado del tamaño tumoral en comparación con los controles sin tratar. Los ratones administrados con DTLLO en solitario o DTLLO+E7 mezclados también demostraron un aumento atenuado en el tamaño tumoral (Figura 9). Aunque todos los animales sin tratar 15 tenían tumores hacia el día 75, 5/8 ratones tratados con DTLLO+E7 y 7/8 ratones tratados con DTLLOE7 estaban libres de tumor en el día 75 (Figura 9).

EJEMPLO 8: REGRESIÓN DE TUMOR TC-1 DESPUÉS DE LA INMUNIZACIÓN CON ACTA, E7, O ACTA + E7 MEZCLADA O ACTA-E7 FUSIONADA GENÉTICAMENTE

20 **Preparación de vacunas.**

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

25 **Regresión tumoral**

Se establecieron 1×10^5 células TC-1 en el costado de cada ratón, y en los días 6 y 13, los ratones se inmunizaron por vía subcutánea a lo largo del lomo con 250 µl de PBS que contenía E7 (50 µg), ActA (200 µg) mezclada con E7 30 (50 µg), ActA-E7 fusionados genéticamente (250 µg), o PBS solamente (sin tratar).

RESULTADOS

Los ratones inmunizados con ActA en solitario, E7 en solitario, ActA-E7, o ActA+E7 demostraron un aumento de la 35 latencia hasta la aparición de los tumores en comparación con los controles (Figuras 10-12). Los ratones inmunizados con ActA-E7 (fusionados genéticamente) demostraron una fuerte regresión tumoral, con 7/8 ratones libres de tumor en el día 55 después de la inmunización (Figura 10, Tabla 1). Los ratones inmunizados con ActA+E7 demostraron una regresión tumoral superior en comparación con E7 y los controles vírgenes, con 7/8 ratones libres de tumor en el día 55 después de la inoculación del tumor (Figura 11, Tabla 1). Los ratones inmunizados con ActA 40 en solitario demostraron una regresión tumoral superior en comparación con los ratones inmunizados con E7 o los controles inyectados con PBS (3/8 ratones libres de tumor después de la inmunización en comparación con ninguno de los ratones en los grupos de E7 o sin tratar; Figura 12, Tabla 1).

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

<u>Vacuna</u>	<u>Figura</u>	<u>N.º de ratones libres de tumor</u>	<u>Comentarios</u>
LLO-E7	6	4/8	Conjugados químicamente
LLO + E7	6	2/8	Mezclados
E7	7	1/8	
LLO	7	0/8	
LLO-E7	8	5/8	Fusionados genéticamente
Quimera LLO-E7	8	7/8	Reemplazados genéticamente
E7	9	0/8	
LLO	9	0/8	
LLO-E7	9	6/8	Fusionados genéticamente
LLO + E7	9	2/8	Mezclados
Quimera LLO-E7	10	8/8	Reemplazados genéticamente
E7	11	0/8	Día 33
LLO	11	0/8	Día 33

LLO-E7	11	8/8	Día 33
LLO + E7	11	6/8	Día 33
Quimera LLO-E7	11	8/8	Día 33
ActA-E7	n/a	7/8	Sistema de expresión anterior
ActA + E7	n/a	4/8	
E7	n/a	0/8	
ActA	n/a	3/8	

EJEMPLO 9: DETOX LLO INDUCE LA EXPRESIÓN DE ARNm DE CITOCINAS Y LA SECRECIÓN DE CITOCINAS POR LOS MACRÓFAGOS DE LA MÉDULA ÓSEA (BM)

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

RESULTADOS

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

EJEMPLO 10: DETOX LLO REGULA POSITIVAMENTE LOS MARCADORES DE MADURACIÓN DE LAS CÉLULAS DENDRÍTICAS

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

- Estas células dendríticas originadas en la médula ósea (día 7) se sembraron a 2 x 10⁶/ml y después se sometieron a un pulso con E7 (10 mcg/ml), LLO (40 mcg/ml), o LLOE7 (50 mcg/ml) más LLO (40 mcg/ml) durante 16 h a 37°C, y 5% de CO₂. El fenotipo de las DC obtenidas mediante el uso de este protocolo se analizó por análisis de FACS. Las DC se recolectaron después de 16 h como se describió anteriormente. Las células se tiñeron con mAb marcados con APC específicos para CD11c de ratón, o mAb marcados con FITC específicos para CD86 de ratón, MHC clase II, CD40. La IgG de ratón de igual isotipo se usó como un control negativo y se restó del fondo. Las células se incubaron con los mAb durante 30 min a 4°C en la oscuridad. Después de dos lavados con PBS, se añadieron 10 μ l de 7AAD (Beckman Coulter, Marseille, Francia) 10 min antes de analizar las células en un citómetro de flujo FACS.

RESULTADOS

- La médula ósea se recogió de los fémures de ratones C57BL/6 a las 6-8 semanas de edad. Después de 7 días de cultivo, las células no adherentes se recogieron, se lavaron y colocaron en placas a 2 x 10⁶/ml y después se sometieron a un pulso con E7 (10 mcg/ml), LLO (40 mcg/ml), o LLOE7 (50 mcg/ml) más LLO (40 mcg/ml) durante 16 h a 37°C, y 5% de CO₂. Las células se tiñeron con mAb marcados con APC específicos para CD11c de ratón, o mAb marcados con FITC específicos para CD86 de ratón, MHC clase II, CD40. La IgG de ratón de igual isotipo se usó como un control negativo y se restó del fondo. Las células se incubaron con los mAb durante 30 min a 4°C en la oscuridad. Después de dos lavados con PBS, se añadieron 10 μ l de 7AAD (Beckman Coulter, Marseille, Francia) 10 min antes de analizar las células en un citómetro de flujo FACS. La población de células vivas se muestra como porcentaje de células positivas a CD11c. La administración de detoxLLO (en los grupos LLO, LLO+E7 y LLOE7)

reguló positivamente (Figuras 15A-C) en comparación con los controles.

EJEMPLO 11: TRANSLOCACIÓN NUCLEAR DE NF-KAPPA-B DESPUÉS DE LA ESTIMULACIÓN CON DT-LLO

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

10

RESULTADOS

- NF-kappaB se ubica en el citoplasma después del tratamiento de las células con los medios en solitario (sin activación) (Figura 16A). Las células tratadas con los medios demuestran una débil tinción para Cd11b (Figura 16B).
- 15 Después de la estimulación durante una noche (24 h) con Dt-LLO (30 mcg), NF-kappaB se movió del citoplasma hacia el núcleo (Figura 16C) y existía un aumento en la tinción de CD11b (Figura 16D). De manera similar, después de la estimulación durante una noche (24 h) con LPS (10 mcg/ml, control positivo), NF-kappaB se translocó al núcleo (Figura 16E), lo que se enfatiza por el aumento de la tinción de CD11b+ de la membrana plasmática (Figura 16F).
- 20 Por lo tanto, en una forma de realización, los datos demuestran la capacidad de detox LLO para estimular la inmunidad innata a través de macrófagos y DC.

LISTA DE SECUENCIAS

- 25 <110> The Trustees of the University of Pennsylvania
- <120> PROTEÍNAS DE FUSIÓN LLO NO HEMOLÍTICAS Y USOS DE LAS MISMAS
- <130> P-7771-EP3
- 30 <150> EP 09798450.4
- <151> 22-06-2009
- <150> PCT/US09/048085
- 35 <151> 22-06-2009
- <150> US 12/213.696
- <151> 23-06-2008
- 40 <160> 63
- <170> PatentIn versión 3.5
- <210> 1
- 45 <211> 180
- <212> PRT
- <213> Homo sapiens
- <400> 1

Met Gln Ala Glu Gly Arg Gly Thr Gly Gly Ser Thr Gly Asp Ala Asp
 1 5 10 15

Gly Pro Gly Gly Pro Gly Ile Pro Asp Gly Pro Gly Gly Asn Ala Gly
 20 25 30

Gly Pro Gly Glu Ala Gly Ala Thr Gly Gly Arg Gly Pro Arg Gly Ala
 35 40 45

Gly Ala Ala Arg Ala Ser Gly Pro Gly Gly Gly Ala Pro Arg Gly Pro
 50 55 60

His Gly Gly Ala Ala Ser Gly Leu Asn Gly Cys Cys Arg Cys Gly Ala
 65 70 75 80

Arg Gly Pro Glu Ser Arg Leu Leu Glu Phe Tyr Leu Ala Met Pro Phe
 85 90 95

Ala Thr Pro Met Glu Ala Glu Leu Ala Arg Arg Ser Leu Ala Gln Asp
 100 105 110

Ala Pro Pro Leu Pro Val Pro Gly Val Leu Leu Lys Glu Phe Thr Val
 115 120 125

Ser Gly Asn Ile Leu Thr Ile Arg Leu Thr Ala Ala Asp His Arg Gln
 130 135 140

Leu Gln Leu Ser Ile Ser Ser Cys Leu Gln Gln Leu Ser Leu Leu Met
 145 150 155 160

Trp Ile Thr Gln Cys Phe Leu Pro Val Phe Leu Ala Gln Pro Pro Ser
 165 170 175

Gly Gln Arg Arg
 180

5 <210> 2
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10 <400> 2
 Ser Leu Leu Met Trp Ile Thr Gln Cys
 1 5

15 <210> 3
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 3
 Ser Leu Leu Met Trp Ile Thr Gln Cys Phe Leu
 1 5 10

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

 <400> 4
 Ser Leu Leu Met Trp Ile Thr Gln Cys Phe Leu Pro
 1 5 10

 10 <210> 5
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 15 <400> 5
 Ser Leu Leu Met Trp Ile Thr Gln Cys Phe Leu Pro Val
 1 5 10

 20 <210> 6
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 <400> 6
 Ser Leu Leu Met Trp Ile Thr Gln Cys Phe Leu Pro Val Phe
 1 5 10

 25 <210> 7
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 30 <400> 7
 Ser Leu Leu Met Trp Ile Thr Gln Cys Phe Leu Pro Val Phe Leu
 1 5 10 15

 35 <210> 8
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 <400> 8
 Trp Ile Thr Gln Cys Phe Leu Pro Val Phe Leu Ala Gln Pro Pro Ser
 1 5 10 15

 40 Gly Gln Arg Arg
 20

 45 <210> 9
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 <400> 9

Tyr Leu Ala Met Pro Phe Ala Thr Pro Met Glu Ala Glu Leu Ala Arg
 1 5 10 15

Arg Ser Leu Ala
 20

5 <210> 10
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10 <400> 10
 Ala Ser Gly Pro Gly Gly Gly Ala Pro Arg
 1 5 10

15 <210> 11
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

15 <400> 11
 Met Pro Phe Ala Thr Pro Met Glu Ala
 1 5

20 <210> 12
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

25 <400> 12
 Leu Ala Met Pro Phe Ala Thr Pro Met
 1 5

30 <210> 13
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

35 <400> 13
 Ala Arg Gly Pro Glu Ser Arg Leu Leu
 1 5

35 <210> 14
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

40 <400> 14
 Leu Leu Met Trp Ile Thr Gln Cys Phe
 1 5

45 <210> 15
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

45 <400> 15
 Ser Leu Leu Met Trp Ile Thr Gln Val
 1 5

<210> 16
 <211> 9
 <212> PRT
 5 <213> Homo sapiens

 <400> 16
 Ser Leu Leu Met Trp Ile Thr Gln Val
 1 5

 10 <210> 17
 <211> 98
 <212> PRT
 <213> Virus del papiloma humano

 15 <400> 17
 Met His Gly Asp Thr Pro Thr Leu His Glu Tyr Met Leu Asp Leu Gln
 1 5 10 15

 Pro Glu Thr Thr Asp Leu Tyr Cys Tyr Glu Gln Leu Asn Asp Ser Ser
 20 25 30

 Glu Glu Glu Asp Glu Ile Asp Gly Pro Ala Gly Gln Ala Glu Pro Asp
 35 40 45

 Arg Ala His Tyr Asn Ile Val Thr Phe Cys Cys Lys Cys Asp Ser Thr
 50 55 60

 Leu Arg Leu Cys Val Gln Ser Thr His Val Asp Ile Arg Thr Leu Glu
 65 70 75 80

 Asp Leu Leu Met Gly Thr Leu Gly Ile Val Cys Pro Ile Cys Ser Gln
 85 90 95

 Lys Pro

 20 <210> 18
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Listeria monocytogenes

 <400> 18
 Glu Cys Thr Gly Leu Ala Trp Glu Trp Trp Arg
 1 5 10

 25 <210> 19
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Virus del papiloma humano

 30 <400> 19
 Arg Ala His Tyr Asn Ile Val Thr Phe
 1 5

 <210> 20

<211> 105
 <212> PRT
 <213> Virus del papiloma humano

5 <400> 20
 Met His Gly Pro Lys Ala Thr Leu Gln Asp Ile Val Leu His Leu Glu
 1 5 10 15
 Pro Gln Asn Glu Ile Pro Val Asp Leu Leu Cys His Glu Gln Leu Ser
 20 25 30
 Asp Ser Glu Glu Glu Asn Asp Glu Ile Asp Gly Val Asn His Gln His
 35 40 45
 Leu Pro Ala Arg Arg Ala Glu Pro Gln Arg His Thr Met Leu Cys Met
 50 55 60
 Cys Cys Lys Cys Glu Ala Arg Ile Glu Leu Val Val Glu Ser Ser Ala
 65 70 75 80
 Asp Asp Leu Arg Ala Phe Gln Gln Leu Phe Leu Asn Thr Leu Ser Phe
 85 90 95
 Val Cys Pro Trp Cys Ala Ser Gln Gln
 100 105

10 <210> 21
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Virus del papiloma humano

15 <400> 21
 Thr Leu Gly Ile Val Cys Pro Ile
 1 5

20 <210> 22
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Virus del papiloma humano

25 <400> 22
 Leu Leu Met Gly Thr Leu Gly Ile Val
 1 5

30 <210> 23
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Virus del papiloma humano

35 <400> 23
 Tyr Met Leu Asp Leu Gln Pro Glu Thr Thr
 1 5 10

<210> 24
 <211> 158
 <212> PRT

<213> Virus del papiloma humano

<400> 24

Met His Gln Lys Arg Thr Ala Met Phe Gln Asp Pro Gln Glu Arg Pro
1 5 10 15

Arg Lys Leu Pro Gln Leu Cys Thr Glu Leu Gln Thr Thr Ile His Asp
20 25 30

Ile Ile Leu Glu Cys Val Tyr Cys Lys Gln Gln Leu Leu Arg Arg Glu
35 40 45

Val Tyr Asp Phe Ala Phe Arg Asp Leu Cys Ile Val Tyr Arg Asp Gly
50 55 60

Asn Pro Tyr Ala Val Cys Asp Lys Cys Leu Lys Phe Tyr Ser Lys Ile
65 70 75 80

Ser Glu Tyr Arg His Tyr Cys Tyr Ser Leu Tyr Gly Thr Thr Leu Glu
85 90 95

Gln Gln Tyr Asn Lys Pro Leu Cys Asp Leu Leu Ile Arg Cys Ile Asn
100 105 110

Cys Gln Lys Pro Leu Cys Pro Glu Glu Lys Gln Arg His Leu Asp Lys
115 120 125

Lys Gln Arg Phe His Asn Ile Arg Gly Arg Trp Thr Gly Arg Cys Met
130 135 140

Ser Cys Cys Arg Ser Ser Arg Thr Arg Arg Glu Thr Gln Leu
145 150 155

5

<210> 25

<211> 158

<212> PRT

<213> Virus del papiloma humano

10

<400> 25

Met Ala Arg Phe Glu Asp Pro Thr Arg Arg Pro Tyr Lys Leu Pro Asp
1 5 10 15

Leu Cys Thr Glu Leu Asn Thr Ser Leu Gln Asp Ile Glu Ile Thr Cys
20 25 30

Val Tyr Cys Lys Thr Val Leu Glu Leu Thr Glu Val Phe Glu Phe Ala
35 40 45

Phe Lys Asp Leu Phe Val Val Tyr Arg Asp Ser Ile Pro His Ala Ala

50 55 60

Cys His Lys Cys Ile Asp Phe Tyr Ser Arg Ile Arg Glu Leu Arg His
65 70 75 80

Tyr Ser Asp Ser Val Tyr Gly Asp Thr Leu Glu Lys Leu Thr Asn Thr
85 90 95

Gly Leu Tyr Asn Leu Leu Ile Arg Cys Leu Arg Cys Gln Lys Pro Leu
100 105 110

Asn Pro Ala Glu Lys Leu Arg His Leu Asn Glu Lys Arg Arg Phe His
115 120 125

Asn Ile Ala Gly His Tyr Arg Gly Gln Cys His Ser Cys Cys Asn Arg
130 135 140

Ala Arg Gln Glu Arg Leu Gln Arg Arg Arg Glu Thr Gln Val
145 150 155

<210> 26
<211> 145
<212> PRT
<213> Mus musculus

5

<400> 26
Met Lys Leu Trp Leu Asn Trp Ile Phe Leu Val Thr Leu Leu Asn Gly
1 5 10 15

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

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

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

Glu Trp Leu Ala Leu Ile Arg Asn Lys Ala Asn Gly Tyr Thr Thr Glu
65 70 75 80

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

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

Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Pro Asn Tyr Tyr Asp Gly Ser Tyr

10

		115						120							125	
	Glu	Gly	Tyr	Phe	Asp	Tyr	Trp	Ala	Gln	Gly	Thr	Thr	Leu	Thr	Val	Ser
		130					135					140				
	Ser															
	145															
	<210> 27															
	<211> 124															
5	<212> PRT															
	<213> Mus musculus															
	<400> 27															
	Leu	Leu	Leu	Ile	Ser	Val	Thr	Val	Ile	Val	Ser	Asn	Gly	Glu	Ile	Val
	1				5					10					15	
	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Thr	Thr	Met	Ala	Ala	Ser	Pro	Gly	Glu	Lys	Ile
				20					25					30		
	Thr	Ile	Thr	Cys	Ser	Ala	Ser	Ser	Ser	Ile	Ser	Ser	Asn	Tyr	Leu	His
			35					40					45			
	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Phe	Ser	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Arg
		50					55					60				
	Thr	Ser	Asn	Leu	Ala	Ser	Gly	Val	Pro	Ala	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly
	65					70					75					80
	Ser	Gly	Thr	Ser	Tyr	Ser	Leu	Thr	Ile	Gly	Thr	Met	Glu	Ala	Glu	Asp
					85					90					95	
	Val	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Gly	Ser	Ser	Ile	Pro	Arg	Gly	Val
				100					105					110		
	Thr	Phe	Gly	Ser	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	Arg				
			115					120								
10	<210> 28															
	<211> 132															
	<212> PRT															
	<213> Mus musculus															
15	<400> 28															
	Gly	Phe	Leu	Leu	Ile	Ser	Val	Thr	Val	Ile	Leu	Thr	Asn	Gly	Glu	Ile
	1				5					10					15	
	Phe	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Ala	Ile	Ile	Ala	Ala	Ser	Pro	Gly	Glu	Lys
				20					25					30		

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

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

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

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

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

Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val
 115 120 125

Ser His Leu Pro
 130

<210> 29
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

5

<400> 29
 Leu Leu Leu Ile Ser Val Thr Val Ile Val Ser Asn Gly Glu Ile Val
 1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala
 115 120

<210> 30

10

<211> 157
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

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

<210> 31
 <211> 157
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10

<400> 31
 Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Ile Leu Lys Gly
 1 5 10 15

15

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

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

Ser Gly Ser Thr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Ser Gly Arg Gly Leu
 50 55 60

Glu Trp Val Gly Arg Ser Arg Ser Lys Ala Asp Asn Phe Met Thr Ser
 65 70 75 80

Tyr Ala Pro Ser Ile Lys Gly Lys Phe Ile Ile Ser Arg Asp Asp Ser
 85 90 95

Ser Asn Met Met Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys Asn Glu Asp Thr
 100 105 110

Ala Val Tyr Phe Cys Thr Arg Asn Phe Thr Ser Leu Asp Ser Thr Gly
 115 120 125

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

Gly Ser Ala Ser Ala Pro Thr Leu Phe Pro Leu Val Ser
 145 150 155

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

5

<400> 32
 Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Ile Leu Lys Gly
 1 5 10 15

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

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

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

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

10

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

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

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

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

Arg Ser
145

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

5

<400> 33
Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Ile Leu Lys Gly
1 5 10 15

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

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

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

Glu Trp Val Gly His Ile Arg Asp Lys Ala Asn Ser Tyr Ala Thr Thr
65 70 75 80

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

Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Ile Glu Asp Thr
100 105 110

Ala Val Tyr Phe Cys Thr Arg Asn Phe Thr Ser Leu Asp Ser Thr Gly
115 120 125

Asn Ser Phe Gly Pro Trp
130

<210> 34
<211> 108
<212> PRT

10

<213> Homo sapiens

<400> 34

Ser Glu Leu Thr Gln Asp Pro Val Val Ser Val Ala Leu Gly Gln Thr
1 5 10 15

Val Arg Ile Thr Cys Gln Gly Asp Ser Leu Arg Ser Tyr Tyr Ala Ser
20 25 30

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr Gly
35 40 45

Lys Asn Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ser
50 55 60

Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Thr Gly Ala Gln Ala Glu Asp
65 70 75 80

Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Asn Ser Arg Asp Ser Ser Gly Asn Leu Pro
85 90 95

Leu Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
100 105

5

<210> 35

<211> 114

<212> PRT

<213> Homo sapiens

10

<400> 35

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Thr Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Ile Leu Tyr Ser
20 25 30

Ser Asn Asp Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Ala Gly Gln
35 40 45

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Ala Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Ile Tyr Tyr Cys Gln Gln
 85 90 95

Tyr Tyr Ser Thr Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile
 100 105 110

Lys Arg

<210> 36

<211> 108

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 36

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Thr Trp
 20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Glu Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Asp Asp Phe Val Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Thr Phe Ser Ser
 85 90 95

Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 37

<211> 529

<212> PRT

<213> Listeria monocytogenes

<400> 37

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

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

Glu Asn Ser Ile Ser Ser Met Ala Pro Pro Ala Ser Pro Pro Ala Ser

5

10

15

ES 2 719 832 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Glu

<210> 38

<211> 22

<212> ADN

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador
 5
 <400> 38
 ggctcgagca tggagataca cc 22
 <210> 39
 10 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 15 <223> Cebador
 <400> 39
 ggggactagt ttatggttc tgagaaca 28
 20 <210> 40
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 25 <220>
 <223> Cebador
 <400> 40
 30 gggggctagc cctccttga ttagtatatt c 31
 <210> 41
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <223> Cebador
 <400> 41
 40 ctccctcgag atcataatt acttcatc 28
 <210> 42
 <211> 55
 <212> ADN
 45 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador
 50 <400> 42
 gactacaagg acgatgaccg acaagtgata acccgggatc taataaatc cgttt 55
 <210> 43
 <211> 27
 55 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador

<400> 43
cccgtcgacc agctcttctt ggtgaag 27

5 <210> 44
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Cebador

<400> 44
gcggatccca tggagataca cctac 25

15 <210> 45
<211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Cebador

<400> 45
gctctagatt atggttctg ag 22

25 <210> 46
<211> 529
<212> PRT
<213> Listeria monocytogenes

30 <400> 46
Met Lys Lys Ile Met Leu Val Phe Ile Thr Leu Ile Leu Val Ser Leu
1 5 10 15

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

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

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

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

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

ES 2 719 832 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ile Ile Lys Asn Ser Ser Phe Lys Ala Val Ile Tyr Gly Gly Ser Ala

ES 2 719 832 T3

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

ES 2 719 832 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Glu His His His His His His
 530 535

<210> 48
 <211> 1551
 <212> ADN
 <213> Listeria monocytogenes

5

```

<400> 48
catatgaagg atgcatctgc attcaataaa gaaaattcaa tttcatccgt ggcaccacca      60
gcatctccgc ctgcaagtcc taagacgcca atcgaaaaga aacacgcgga tgaaatcgat      120
aagtataac aaggattgga ttacaataaa aacaatgtat tagtatacca cggagatgca      180
gtgacaaatg tgccgccaag aaaaggttac aaagatggaa atgaatatat tgttgtggag      240
aaaaagaaga aatccatcaa tcaaaataat gcagacattc aagttgtgaa tgcaatttcg      300
agcctaacct atccagggtgc tctcgtaaaa gcgaattcgg aattagtaga aatcaacca      360
gatgttctcc ctgtaaaacg tgattcatta aactcagca ttgatttgcc aggtatgact      420
aatcaagaca ataaaatagt tgtaaaaaat gccactaaat caaacgttaa caacgcagta      480
aatacattag tggaaagatg gaatgaaaaa tatgctcaag cttattcaaa tgtaagtgca      540
aaaattgatt atgatgacga aatggcttac agtgaatcac aattaattgc gaaatttggg      600
acagatttta aagctgtaaa taatagcttg aatgtaaact tcggcgcaat cagtgaaggg      660
aaaatgcaag aagaagtcac tagttttaa caaatttact ataacgtgaa tgtaaatgaa      720
cctacaagac cttccagatt tttcgcaaaa gctgttacta aagagcagtt gcaagcgtt      780
ggagtgaatg cagaaaatcc tcttgcatac atctcaagtg tggcgtatgg ccgtcaagtt      840
tatttgaat tatcaactaa ttcccatagt actaaagtaa aagctgcttt tgatgctgcc      900
gtaagcggaa aatctgtctc aggtgatgta gaactaaca atatcatcaa aaattcttcc      960
ttcaaagccg taatttacgg aggttccgca aaagatgaag ttcaaatcat cgacggcaac     1020
ctcggagact tacgcgatat tttgaaaaaa ggcgctactt ttaatcgaga aacaccagga     1080
gttcccattg cttatacaac aaacttccta aaagacaatg aattagctgt tattaanaac     1140
aactcagaat atattgaaac aacttcaaaa gcttatacag atggaaaaat taacatcgat     1200
cactctggag gatacggttc tcaattcaac atttcttggg atgaagtaaa ttatgatcct     1260
gaagtaacg aaattgttca acataaaaac tggagcgaaa acaataaaaag caagctagct     1320
catttcacat cgtccatcta tttgcctggg aacgcgagaa atattaatgt ttacgctaaa     1380
gaatgactg gtttagcttg ggaatggtgg agaacggtaa ttgatgaccg gaacttacca     1440
cttgtgaaaa atagaaatat ctccatctgg ggcaccacgc tttatccgaa atatagtaat     1500
aaagtagata atccaatcga acaccaccac caccaccact aataaggatc c              1551
    
```

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

10

<220>
 <223> Cebador

 <400> 49
 5 gctagctcat ttacatcgt 20

 <210> 50
 <211> 54
 <212> ADN
 10 <213> Artificial

 <220>
 <223> Cebador

 <400> 50
 15 tcttgacgt tccaagcta aaccagtcgc tctttagcg taaacattaa tatt 54

 <210> 51
 <211> 54
 20 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Cebador
 25
 <400> 51
 gaagcgactg gtttagctg ggaagctgca agaacggtaa ttgatgaccg gaac 54

 <210> 52
 30 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Cebador
 35
 <400> 52
 ggatcctat tagtgggtg gtggtgggtg ttcgattg 39

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

 <400> 53
 45 Glu Ala Thr Gly Leu Ala Trp Glu Ala Ala Arg
 1 5 10

 <210> 54
 <211> 238
 50 <212> PRT
 <213> Listeria monocytogenes

 <400> 54

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Cys Ala Cys Cys
 210 215 220

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

<210> 55
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Listeria monocytogenes

<400> 55
 Glu Ser Leu Leu Met Trp Ile Thr Gln Cys Arg
 1 5 10

5
 <210> 56
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Artificial

10
 <220>
 <223> Cebador

<400> 56
 Gly Cys Thr Ala Gly Cys Thr Cys Ala Thr Thr Thr Cys Ala Cys Ala
 1 5 10 15

Thr Cys Gly Thr
 20

15
 <210> 57
 <211> 54
 <212> PRT
 <213> Artificial

20
 <220>
 <223> Cebador

<400> 57
 Thr Cys Thr Gly Cys Ala Cys Thr Gly Gly Gly Thr Gly Ala Thr Cys
 1 5 10 15

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

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

25
 Ala Ala Thr Ala Thr Thr
 50

30
 <210> 58
 <211> 54
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Cebador

<400> 58

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

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

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

Cys Gly Gly Ala Ala Cys
 50

<210> 59
 <211> 39
 <212> PRT
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> Cebador

10

<400> 59
 Gly Gly Ala Thr Cys Cys Thr Thr Ala Thr Thr Ala Gly Thr Gly Gly
 1 5 10 15

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

Cys Gly Ala Thr Thr Gly Gly
 35

<210> 60
 <211> 238
 <212> PRT
 <213> Listeria monocytogenes

15

<400> 60
 Gly Cys Thr Ala Gly Cys Thr Cys Ala Thr Thr Thr Cys Ala Cys Ala
 1 5 10 15

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

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

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

20

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Cys Ala Cys Cys
210 215 220

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

<210> 61
<211> 810
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 61
Gly Cys Cys Cys Ala Gly Cys Cys Gly Cys Cys Ala Thr Gly Cys Cys
1 5 10 15

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

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

5

10

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

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

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

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

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

Cys Cys Ala Gly Cys Cys Thr Cys Cys Ala Gly Gly Gly Ala Ala Gly
 130 135 140

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

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

Ala Gly Cys Thr Ala Ala Thr Gly Gly Thr Thr Ala Cys Ala Cys Ala
 180 185 190

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

Thr Gly Ala Ala Gly Gly Gly Thr Cys Gly Gly Thr Thr Cys Ala Cys
 210 215 220

Cys Ala Thr Cys Thr Cys Cys Ala Gly Ala Gly Ala Thr Ala Ala Thr
 225 230 235 240

Thr Cys Cys Cys Ala Ala Ala Gly Cys Ala Thr Cys Cys Thr Cys Thr
 245 250 255

Ala Thr Cys Thr Thr Cys Ala Ala Ala Thr Gly Ala Ala Thr Gly Cys
 260 265 270

Cys Cys Thr Gly Ala Gly Ala Gly Cys Thr Gly Ala Gly Gly Ala Cys
 275 280 285

Ala Gly Thr Gly Cys Cys Ala Cys Thr Thr Ala Thr Thr Ala Cys Thr
 290 295 300

ES 2 719 832 T3

Gly Thr Gly Cys Ala Ala Gly Ala Gly Ala Thr Cys Cys Cys Ala Ala
 305 310 315 320

Thr Thr Ala Cys Thr Ala Cys Gly Ala Thr Gly Gly Thr Ala Gly Cys
 325 330 335

Thr Ala Cys Gly Ala Ala Gly Gly Gly Thr Ala Cys Thr Thr Thr Gly
 340 345 350

Ala Cys Thr Ala Cys Thr Gly Gly Gly Gly Cys Cys Ala Ala Gly Gly
 355 360 365

Gly Ala Cys Cys Ala Cys Gly Gly Thr Cys Ala Cys Cys Gly Thr Cys
 370 375 380

Thr Cys Cys Thr Cys Ala Gly Gly Cys Gly Gly Ala Gly Gly Cys Gly
 385 390 395 400

Gly Thr Thr Cys Ala Gly Gly Cys Gly Gly Ala Gly Gly Thr Gly Gly
 405 410 415

Cys Thr Cys Thr Gly Gly Cys Gly Gly Thr Gly Gly Cys Gly Gly Ala
 420 425 430

Thr Cys Gly Gly Ala Cys Ala Thr Thr Gly Ala Gly Cys Thr Cys Ala
 435 440 445

Cys Cys Cys Ala Gly Thr Cys Thr Cys Cys Ala Thr Cys Cys Thr Cys
 450 455 460

Ala Cys Thr Gly Thr Cys Thr Gly Cys Ala Thr Cys Thr Cys Thr Gly
 465 470 475 480

Gly Gly Ala Gly Gly Cys Ala Ala Ala Gly Thr Cys Ala Cys Cys Ala
 485 490 495

Thr Cys Ala Cys Thr Thr Gly Cys Ala Ala Gly Gly Cys Ala Ala Gly
 500 505 510

Cys Cys Ala Ala Gly Ala Cys Ala Thr Thr Ala Ala Cys Ala Ala Gly
 515 520 525

Thr Ala Thr Ala Thr Ala Gly Cys Thr Thr Gly Gly Thr Ala Cys Cys
 530 535 540

Ala Ala Cys Ala Cys Ala Ala Gly Cys Cys Thr Gly Gly Ala Ala Ala

<210> 62
 <211> 285
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

<400> 62
 Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Ala Gly Leu Leu Leu Leu Ala
 1 5 10 15

 Ala Gln Pro Ala Gln Pro Pro Cys Gln Val Lys Leu Gln Glu Ser Gly
 20 25 30

 Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Ser Leu Ser Cys Ala Ala
 35 40 45

 Ser Gly Phe Thr Phe Thr Asp Tyr Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Pro
 50 55 60

 Pro Gly Lys Ala Leu Glu Trp Leu Ala Leu Ile Arg Asn Lys Ala Asn
 65 70 75 80

 Gly Tyr Thr Glu Tyr Ser Ala Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser
 85 90 95

 Arg Asp Asn Ser Gln Ser Ile Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ala Leu Arg
 100 105 110

 Ala Glu Asp Ser Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Pro Asn Tyr Tyr
 115 120 125

 Asp Gly Ser Tyr Glu Gly Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr
 130 135 140

 Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 145 150 155 160

 Gly Gly Gly Ser Asp Ile Glu Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser
 165 170 175

 Ala Ser Leu Gly Gly Lys Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp
 180 185 190

 Ile Asn Lys Tyr Ile Ala Trp Tyr Gln His Lys Pro Gly Lys Gly Pro
 195 200 205

Arg Leu Leu Ile His Tyr Thr Ser Thr Leu Gln Pro Gly Ile Pro Ser
210 215 220

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Arg Asp Tyr Ser Phe Ser Ile Ser
225 230 235 240

Asn Leu Glu Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp
245 250 255

Asn Leu Tyr Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala
260 265 270

Ala Ala Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn
275 280 285

<210> 63

<211> 32

<212> PRT

<213> *Listeria monocytogenes*

5

<400> 63

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

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

10

REIVINDICACIONES

1. Una proteína recombinante que comprende una proteína listeriolisina O (LLO), en la que la proteína LLO comprende una mutación dentro del dominio de unión al colesterol (CBD) de la misma (SEQ ID NO: 18), en la que dicha mutación consiste en la sustitución de todos los residuos de aminoácidos en las posiciones 2, 9 y 10 de la SEQ ID NO: 18, y en la que la proteína recombinante presenta una reducción de más de 100 veces en la actividad hemolítica con respecto a una proteína LLO de tipo silvestre; y
 5 opcionalmente, en la que la proteína recombinante comprende además un péptido heterólogo que comprende un péptido antigénico.
- 10 2. La proteína recombinante de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la secuencia de proteína LLO de tipo silvestre se expone en la SEQ ID NO: 37.
- 15 3. La proteína recombinante de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en la que el péptido antigénico es:
 un antígeno E7 del virus del papiloma humano (HPV)-16 o un antígeno E7 de HPV-18, o
 un antígeno E6 de HPV-16 o un antígeno E6 de HPV-18, o
 un péptido NY-ESO-1, o
 un receptor de linfocitos B (BCR), o
 20 un antígeno específico de próstata (PSA), un antígeno de células madre de próstata (PSCA), un antígeno de la enzima quimotriptica de estrato córneo (SCCE), un antígeno 1 de tumor de Wilms (WT-1), transcriptasa inversa de telomerasa humana (hTERT), proteinasa 3, proteína 2 relacionada con tirosinasa (TRP2), antígeno asociado a melanoma de alto peso molecular (HMW-MAA), sarcoma sinovial, X (SSX)-2, antígeno carcinoembrionario (CEA), MAGE-A, receptor alfa de interleucina-13 (IL13-R alfa), anhidrasa
 25 carbónica IX (CAIX), survivina, GP100 o testisina.
- 30 4. La proteína recombinante de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en la que la proteína LLO comprende además una delección de la secuencia del péptido señal de la misma, o en la que la proteína LLO comprende la secuencia señal de la misma.
- 35 5. La proteína recombinante de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en la que el péptido heterólogo está condensada genéticamente a la proteína LLO.
6. La proteína recombinante de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en la que el péptido heterólogo está conjugado químicamente a la proteína LLO.
7. Una molécula nucleotídica que codifica la proteína recombinante de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-5.
- 40 8. Un vector de vacuna recombinante que codifica la proteína recombinante de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-5.
9. Una cepa de *Listeria* recombinante que comprende la proteína recombinante de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-5.
- 45 10. Una composición de vacuna que comprende la proteína recombinante de cualquiera de las reivindicaciones 1-6, o la molécula nucleotídica de la reivindicación 7, en la que la proteína recombinante comprende además dicho péptido heterólogo que comprende dicho péptido antigénico, y un adyuvante, en la que el adyuvante comprende una proteína del factor estimulante de colonias de granulocitos/macrófagos (GM-CSF), una molécula
 50 nucleotídica que codifica una proteína GM-CSF, saponina QS21, monofosforil lípido A, o un oligonucleótido que contiene CpG no metilado.
11. La proteína recombinante de cualquiera de las reivindicaciones 1-6, o la molécula nucleotídica de la reivindicación 7, o el vector de vacuna recombinante de la reivindicación 8, o la cepa de *Listeria* recombinante de la
 55 reivindicación 9, en la que la proteína recombinante comprende además dicho péptido heterólogo que comprende dicho péptido antigénico, para su uso como un medicamento.
12. La proteína recombinante de cualquiera de las reivindicaciones 1-6, o la molécula nucleotídica de la reivindicación 7, o el vector de vacuna recombinante de la reivindicación 8, o la cepa de *Listeria* recombinante de la

reivindicación 9, en la que la proteína recombinante comprende además dicho péptido heterólogo que comprende dicho péptido antigénico, comprendiendo dicho péptido antigénico un antígeno E6 de HPV o un antígeno E7 de HPV, para su uso en la prevención o tratamiento de la infección de HPV en un sujeto.

5 13. La proteína recombinante de cualquiera de las reivindicaciones 1-6, o la molécula nucleotídica de la reivindicación 7, o el vector de vacuna recombinante de la reivindicación 8, o la cepa de *Listeria* recombinante de la reivindicación 9, en la que la proteína recombinante comprende además dicho péptido heterólogo que comprende dicho péptido antigénico, en la que dicho péptido antigénico comprende un antígeno E7 de HPV, para su uso en el tratamiento, inhibición, supresión, inducción de la regresión de, reducción de la incidencia de, o protección contra un
10 tumor que expresa HPV-E7 en un sujeto.

14. La proteína recombinante, molécula nucleotídica, vector recombinante, o cepa de *Listeria* para su uso de acuerdo con la reivindicación 13, en la que el tumor que expresa HPV E7 es un tumor de cuello del útero o un tumor de cabeza y cuello.

15

15. La proteína recombinante de cualquiera de las reivindicaciones 1-6, o la molécula nucleotídica de la reivindicación 7, o el vector de vacuna recombinante de la reivindicación 8, o la cepa de *Listeria* recombinante de la reivindicación 9, en la que la proteína recombinante comprende además dicho péptido heterólogo que comprende dicho péptido antigénico, en la que dicho péptido antigénico comprende un antígeno NY-ESO-1, para su uso en el
20 tratamiento, inhibición, supresión, inducción de la regresión de, reducción de la incidencia de, o protección contra un tumor que expresa NY-ESO-1 en un sujeto, en la que el tumor que expresa NY-ESO-1 es un melanoma de ovario o un cáncer de pulmón.

16. La proteína recombinante de cualquiera de las reivindicaciones 1-6, o la molécula nucleotídica de la reivindicación 7, o el vector de vacuna recombinante de la reivindicación 8, o la cepa de *Listeria* recombinante de la
25 reivindicación 9, en la que la proteína recombinante comprende además dicho péptido heterólogo que comprende dicho péptido antigénico, en la que dicho péptido antigénico comprende un receptor de linfocitos B (BCR), para su uso en el tratamiento, inhibición, supresión, inducción de la regresión de, reducción de la incidencia de, o protección contra un linfoma que expresa BCR en un sujeto.

30

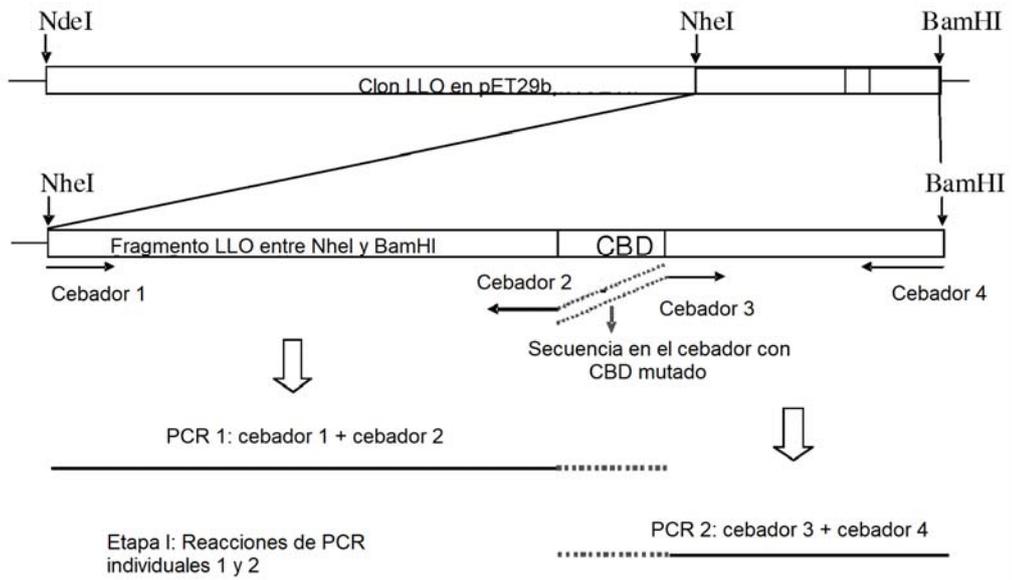
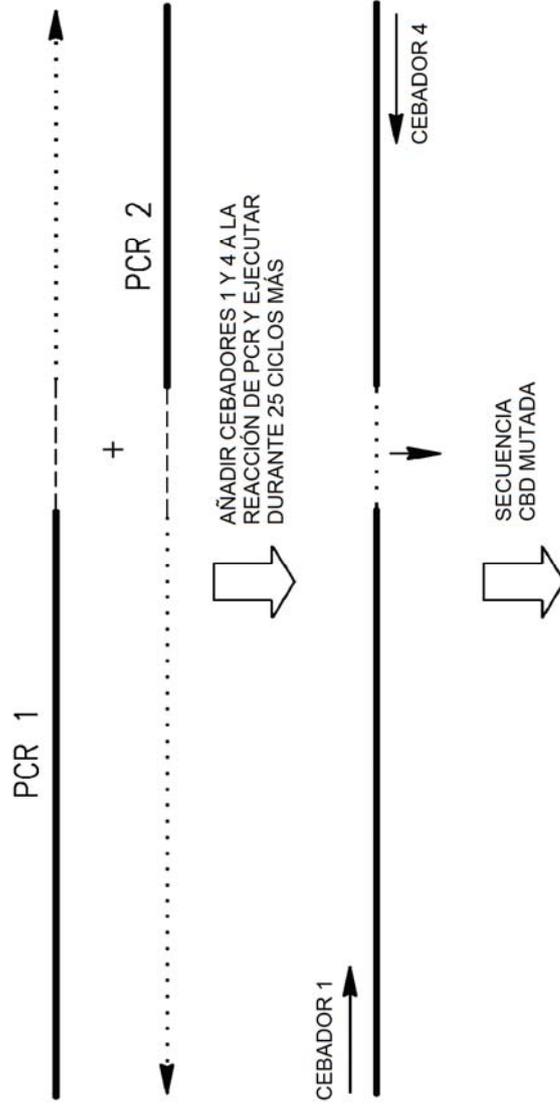


FIG. 1A

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



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

FIG. 1B

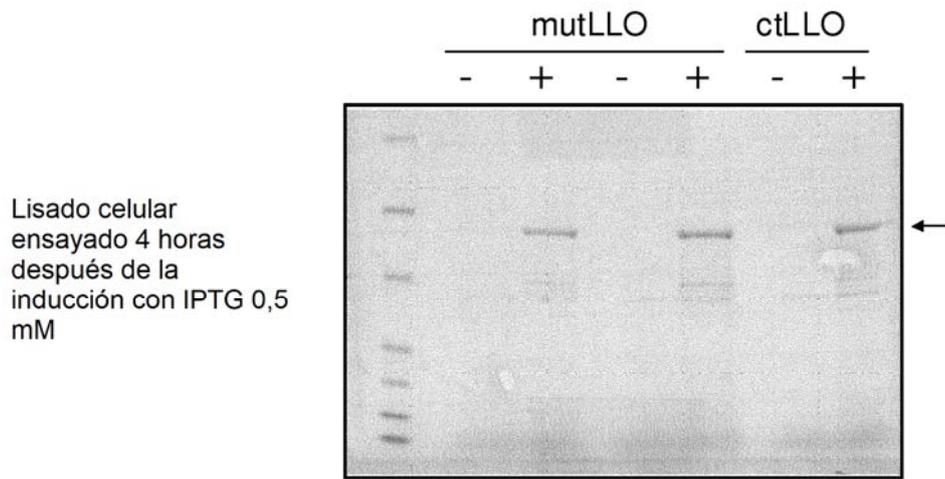


FIG. 2A

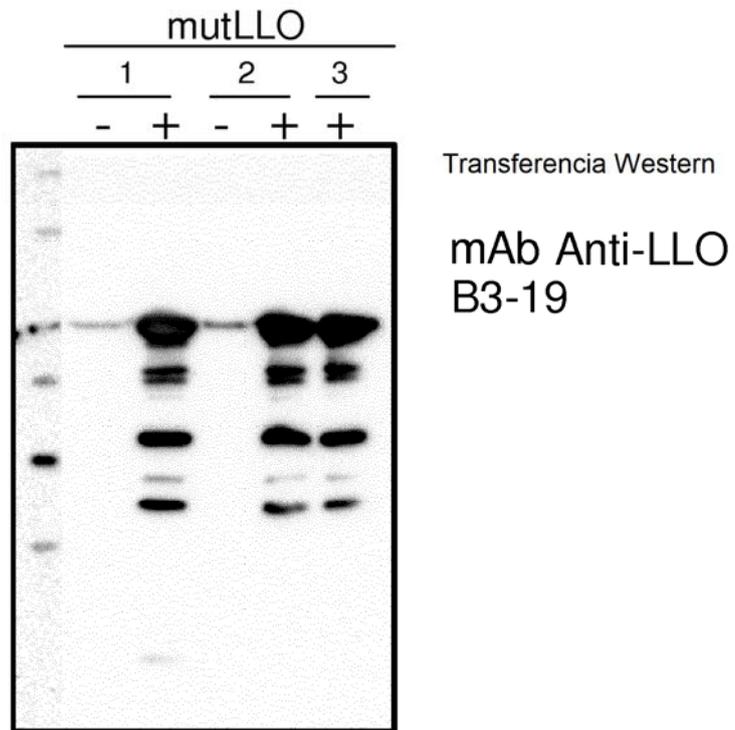


FIG. 2B

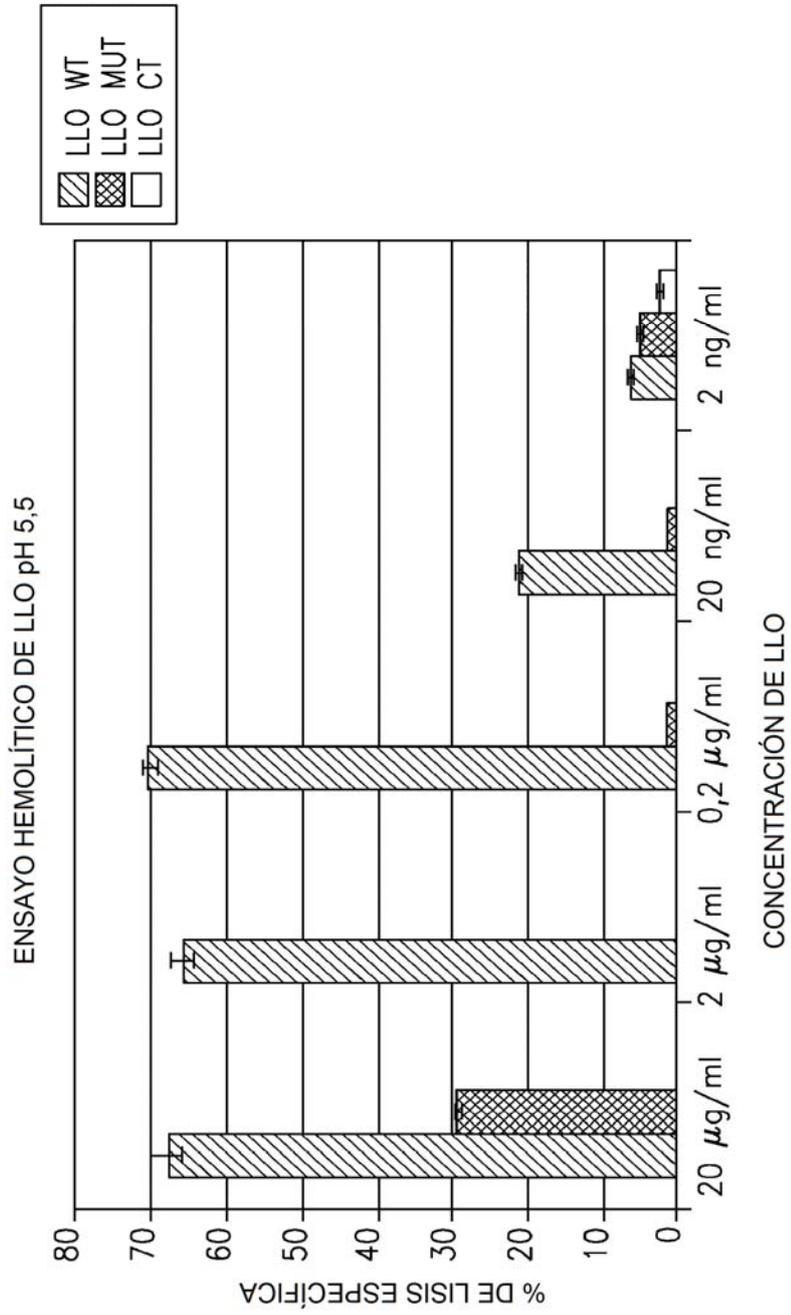


FIG. 3A

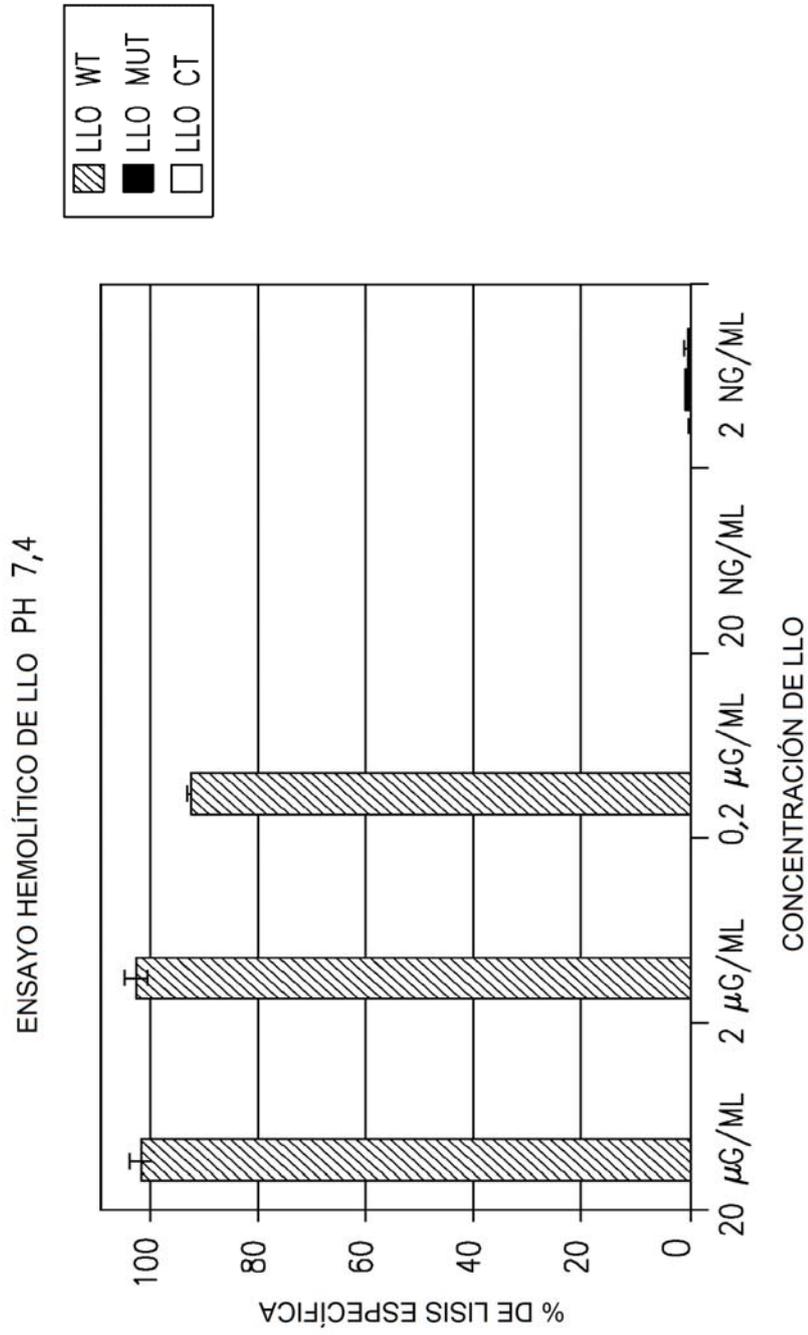


FIG. 3B

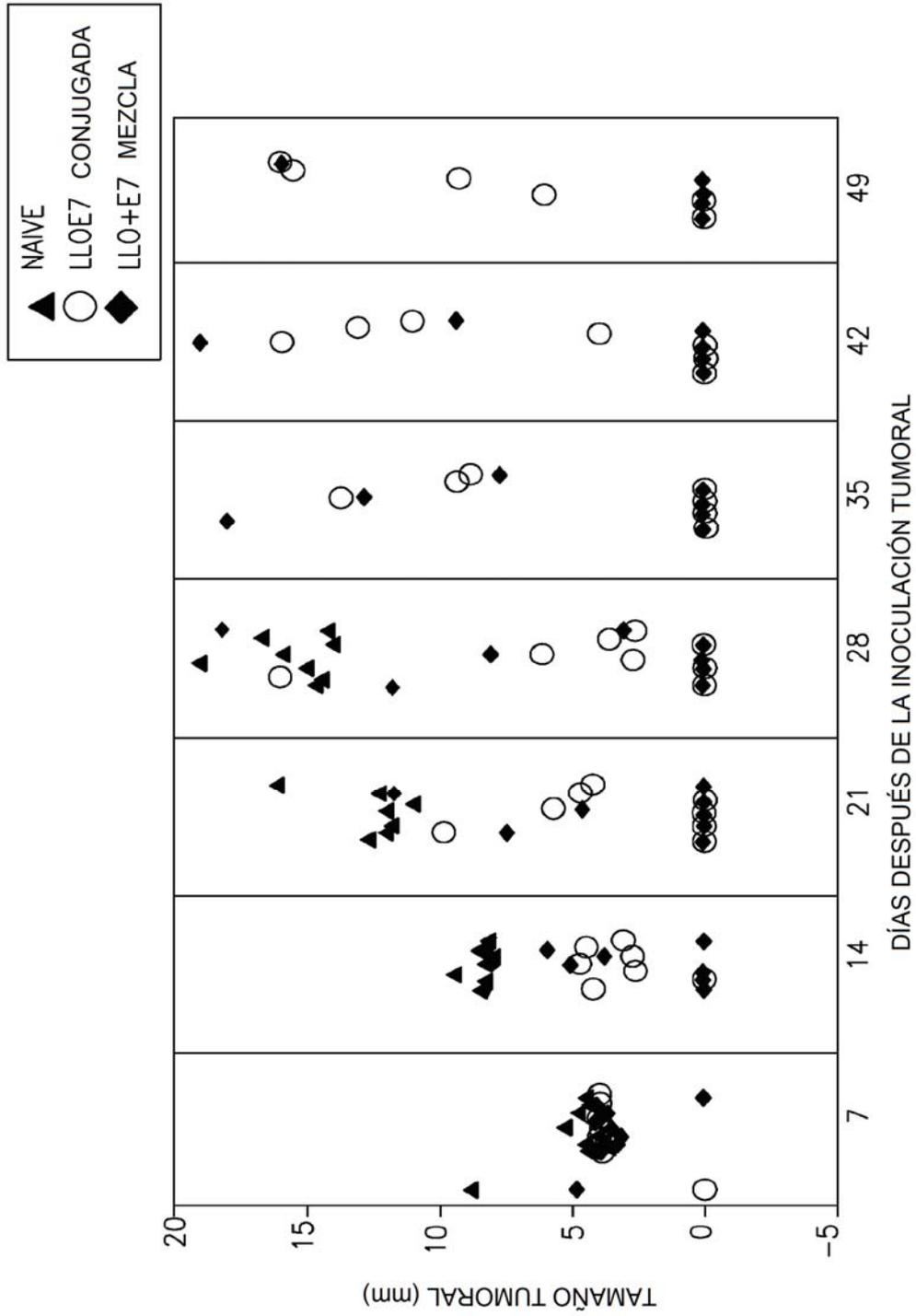


FIG. 4

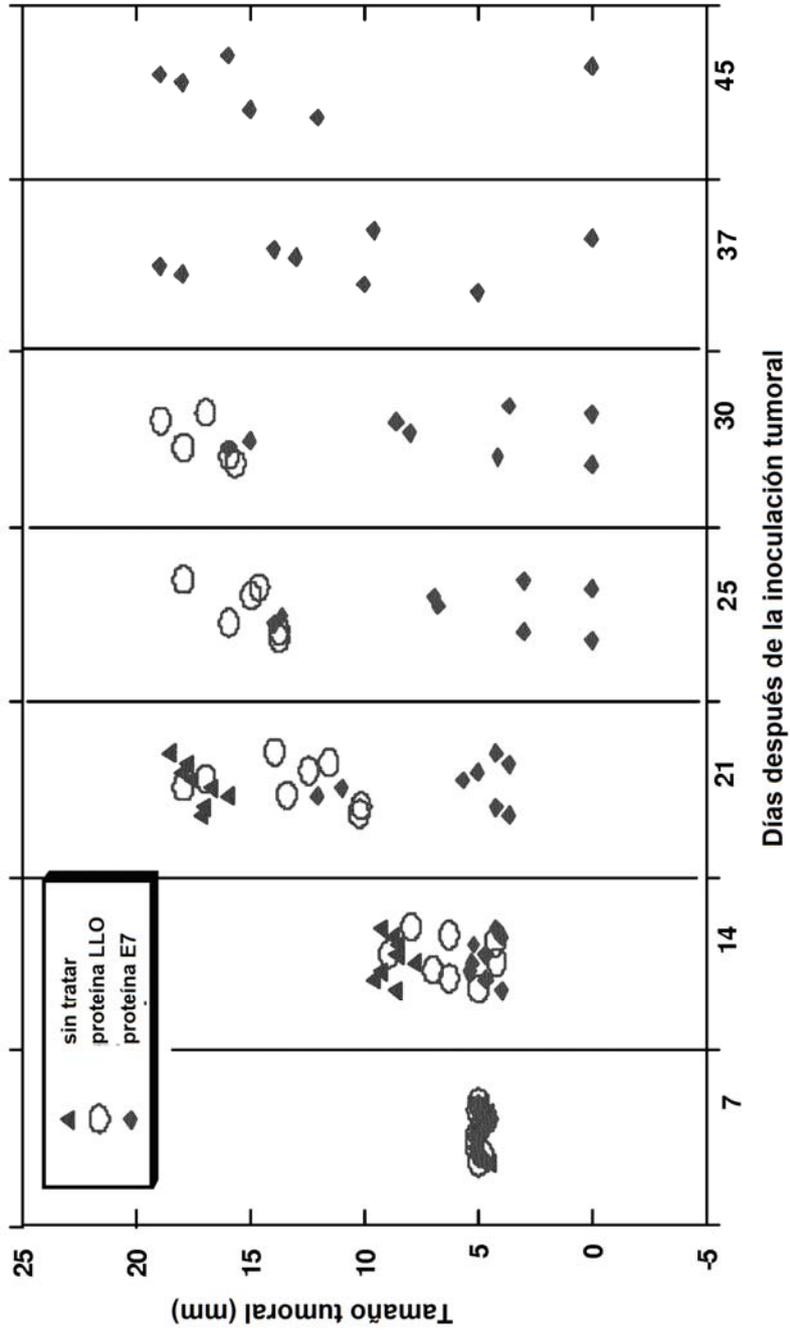


FIG. 5

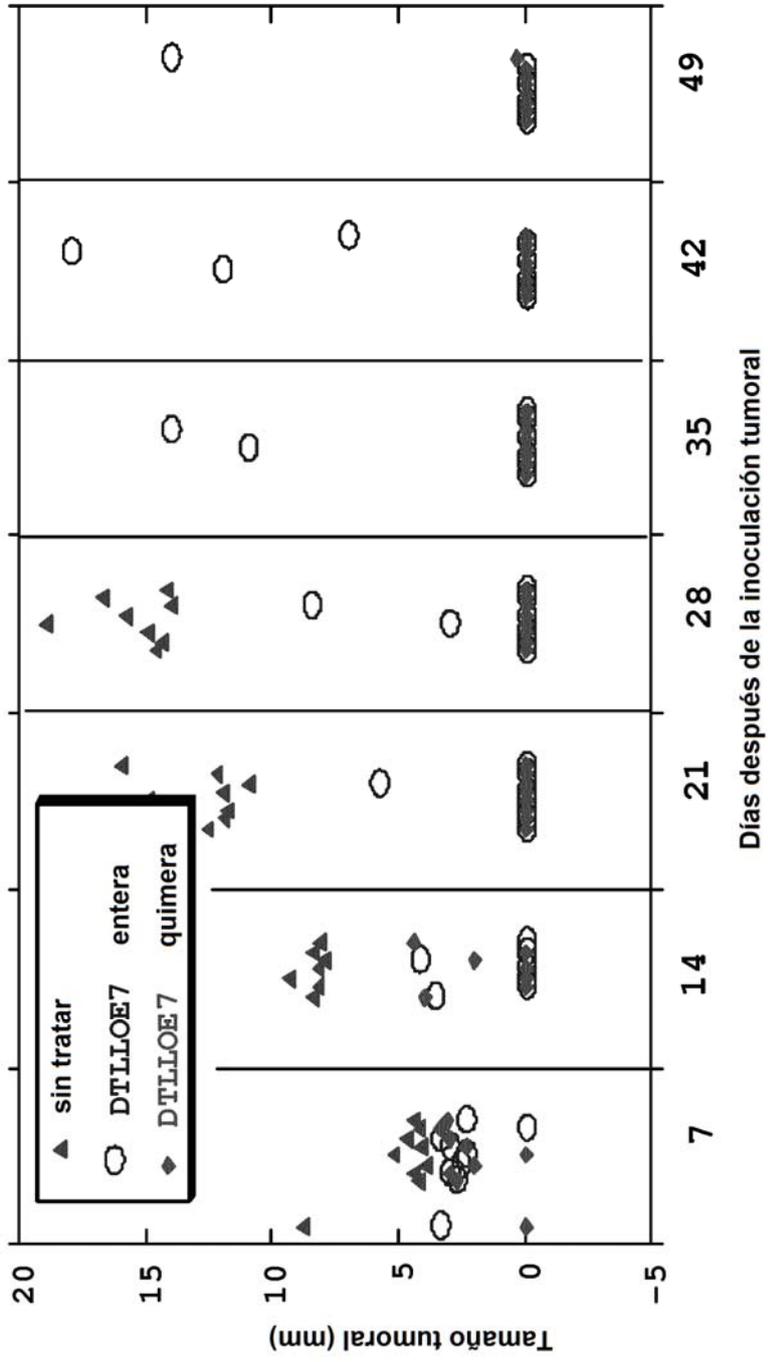


FIG. 6

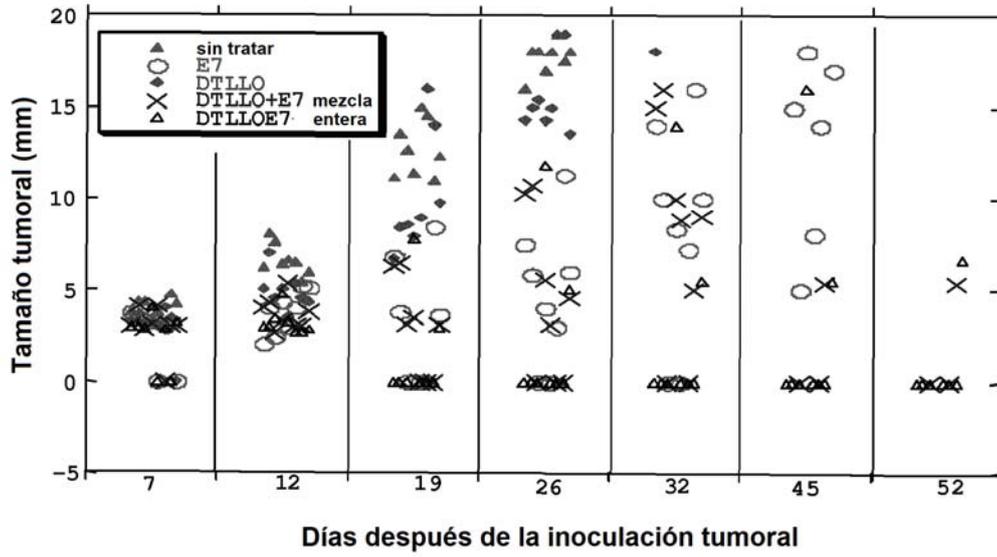


FIG. 7

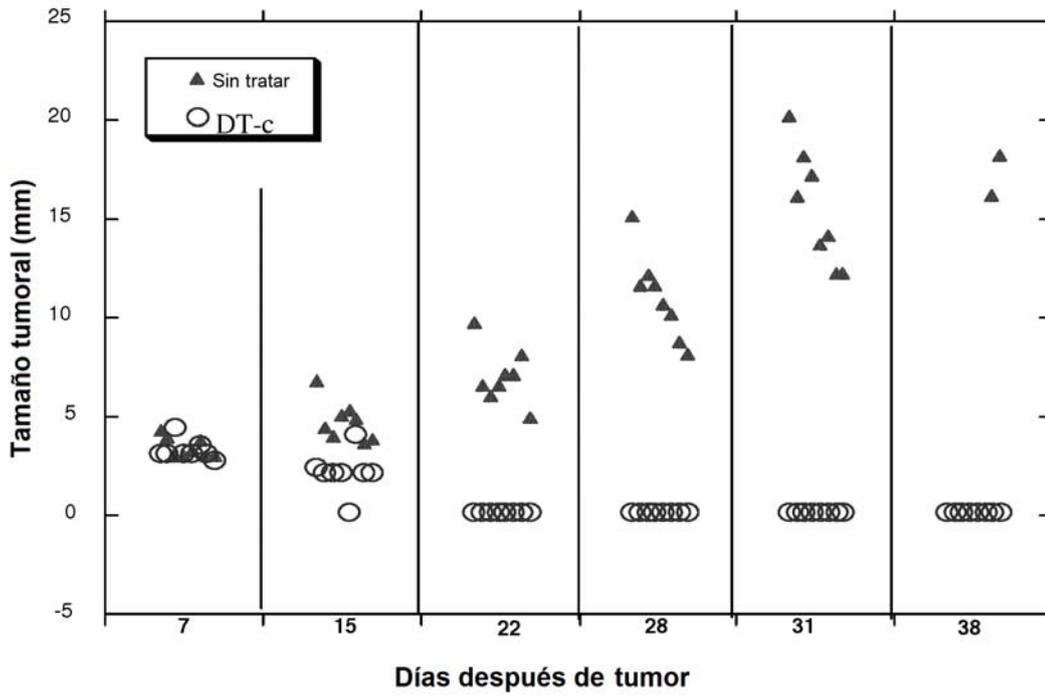


FIG. 8

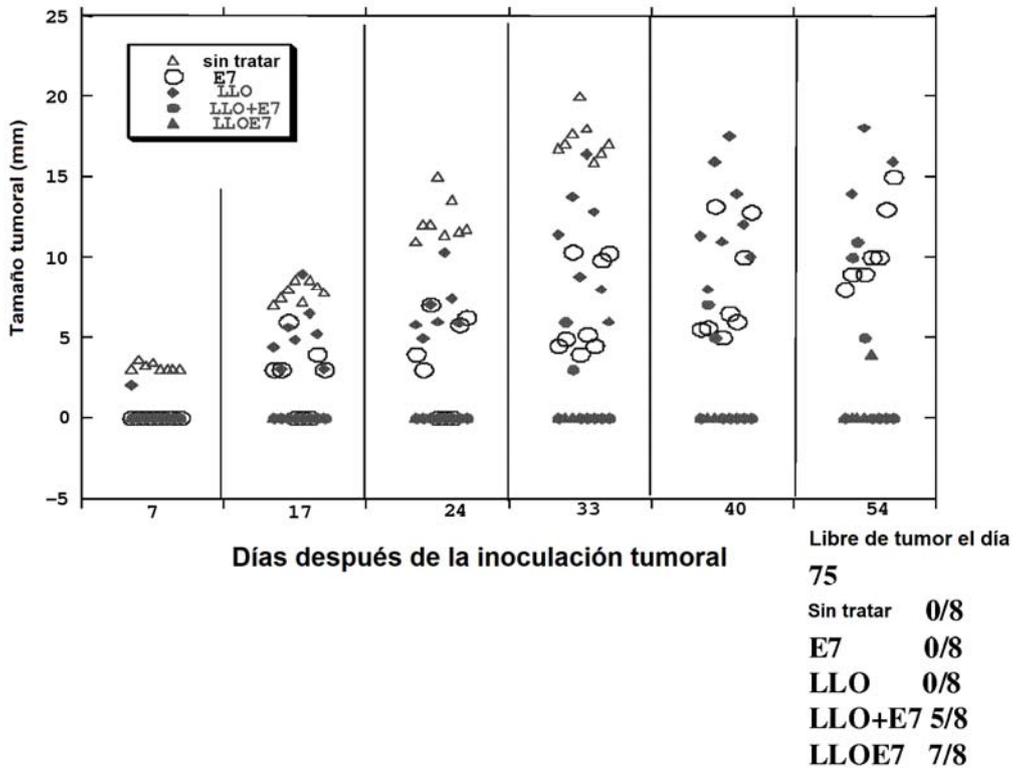


FIG. 9

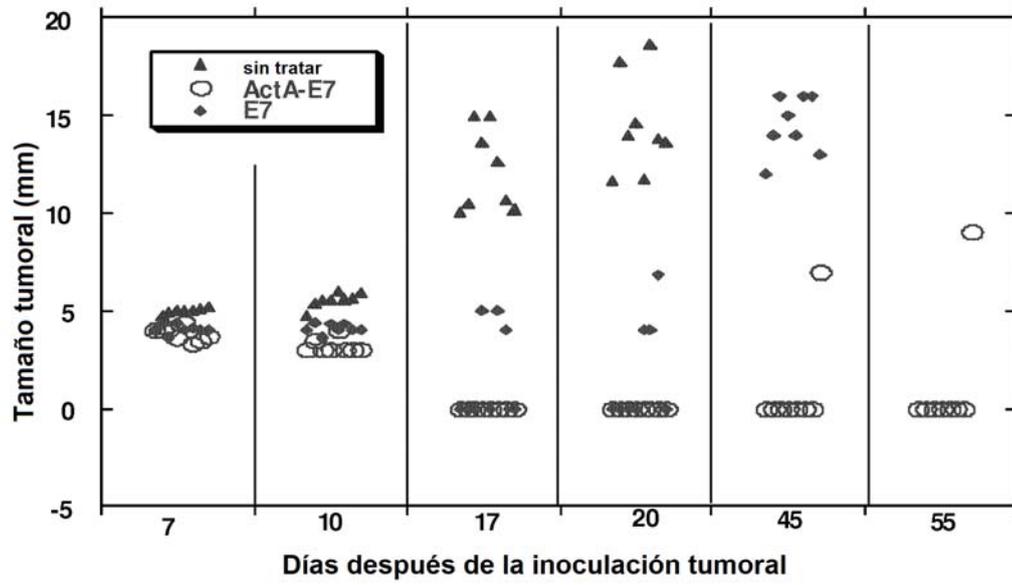


FIG. 10

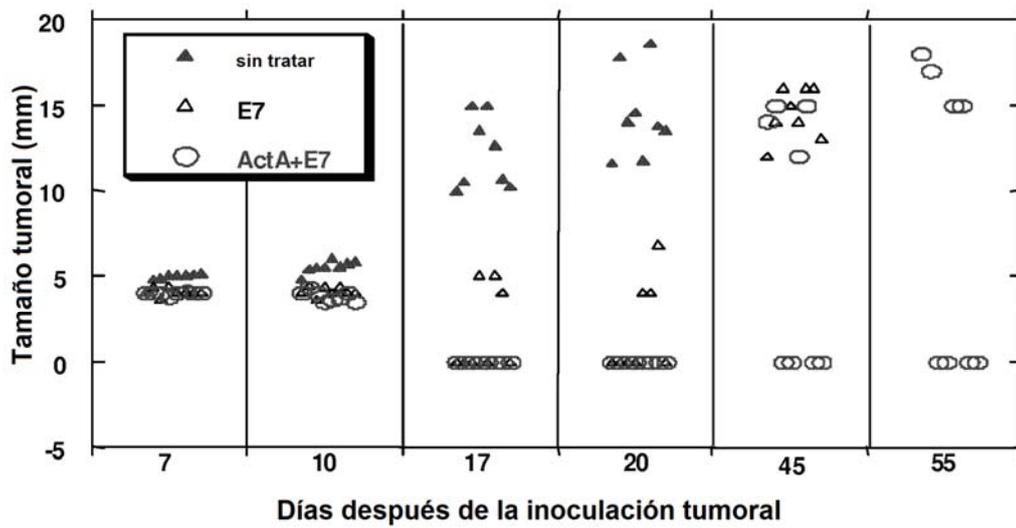


FIG. 11

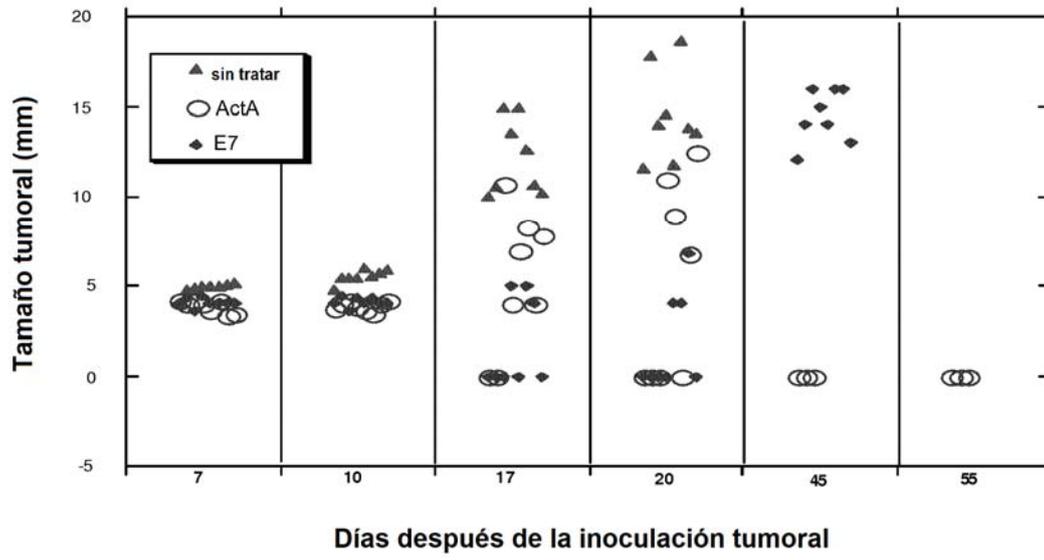


FIG. 12

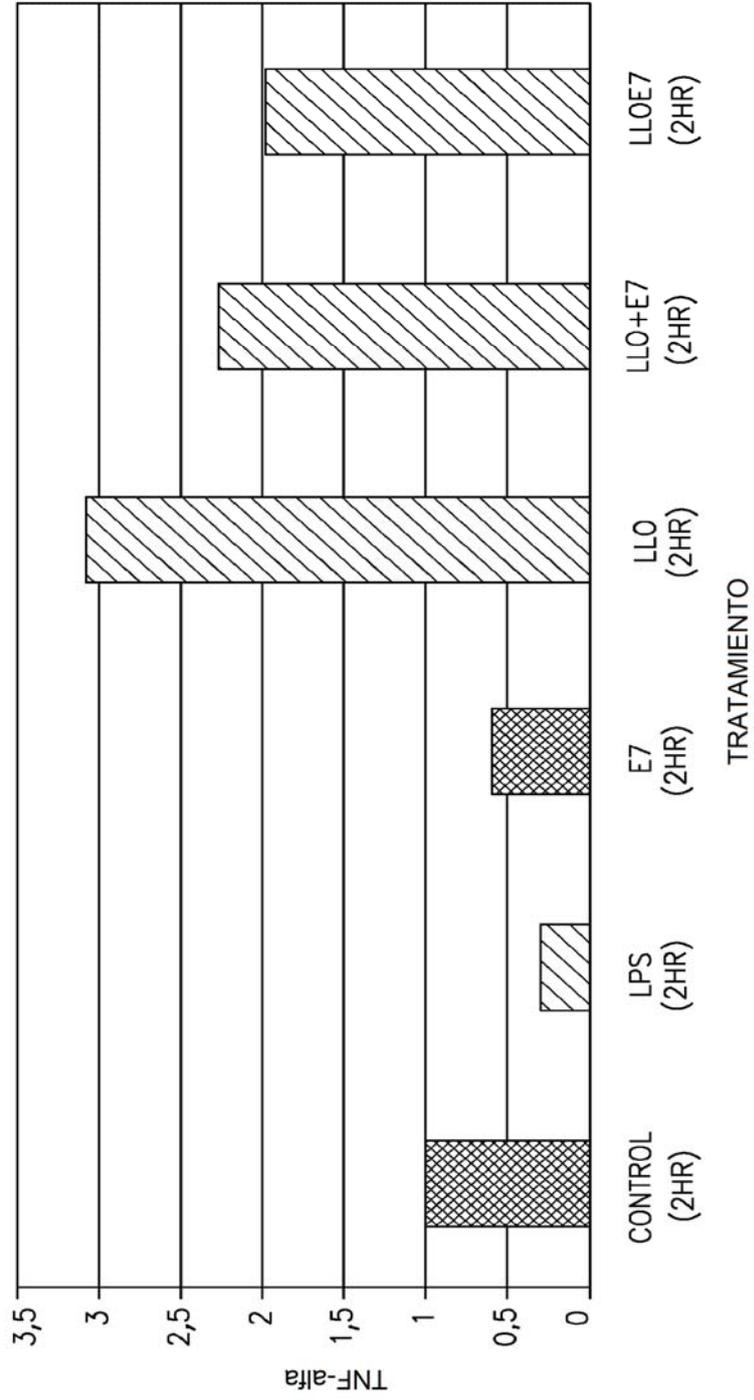


FIG. 13A

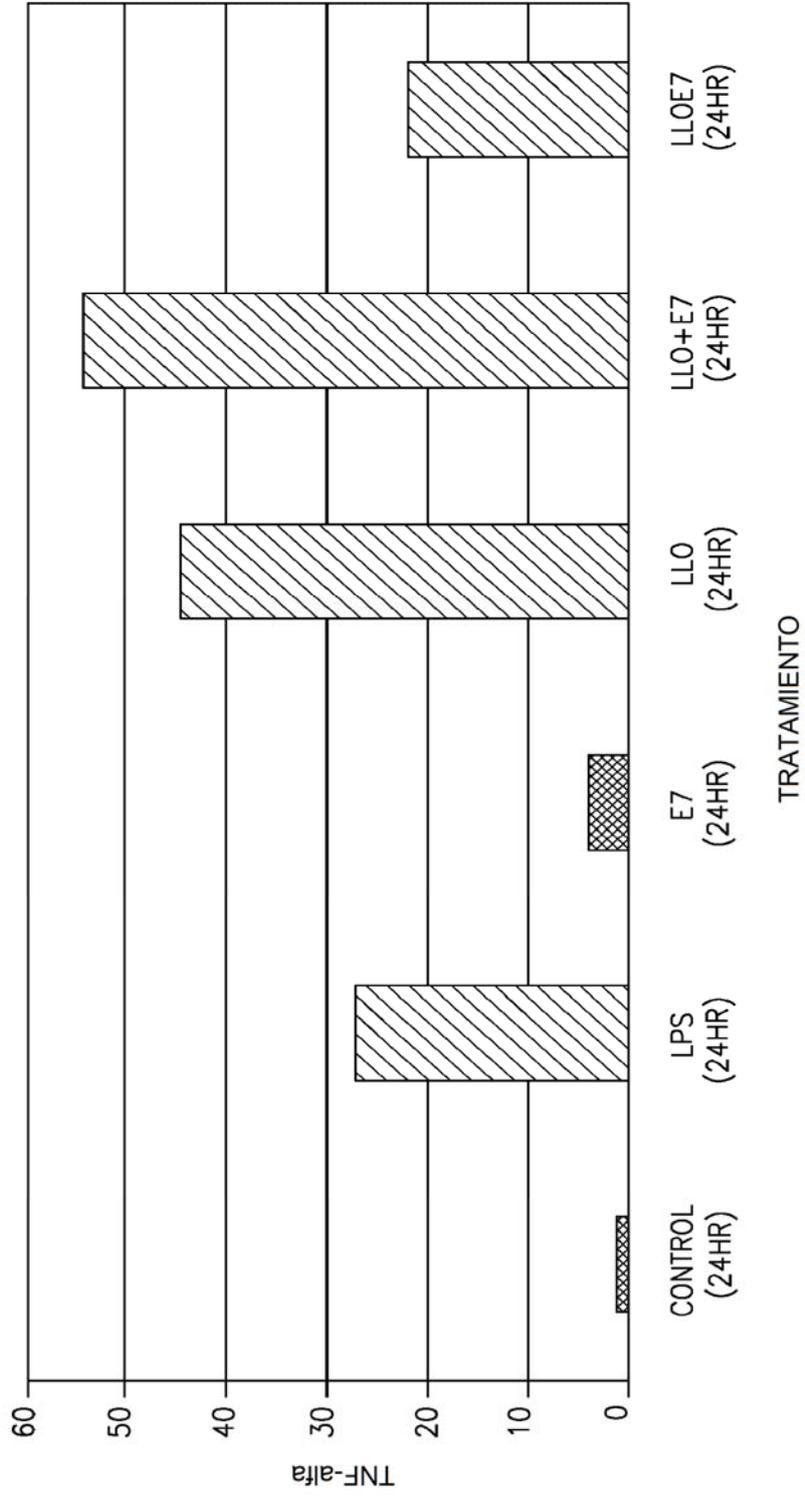


FIG. 13B

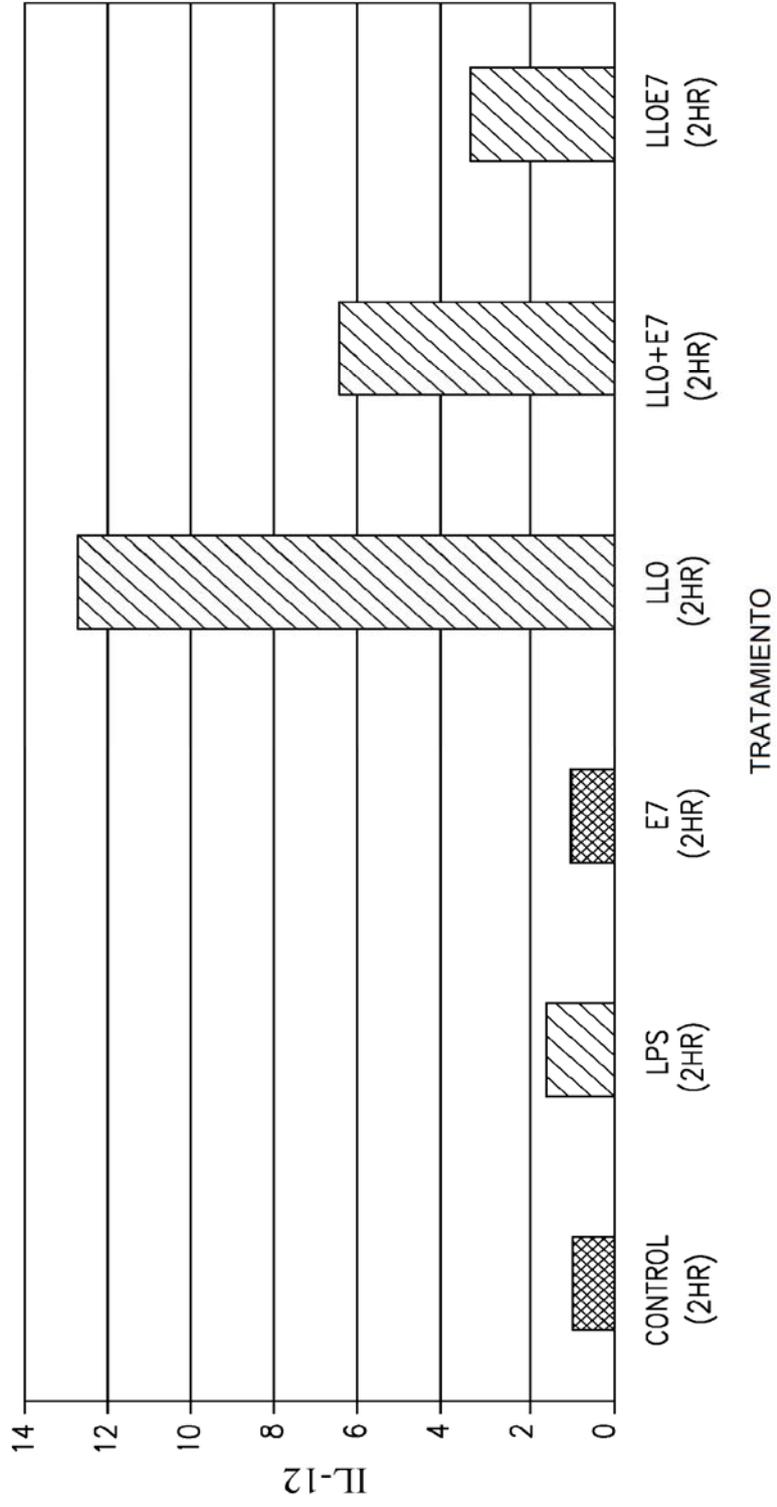
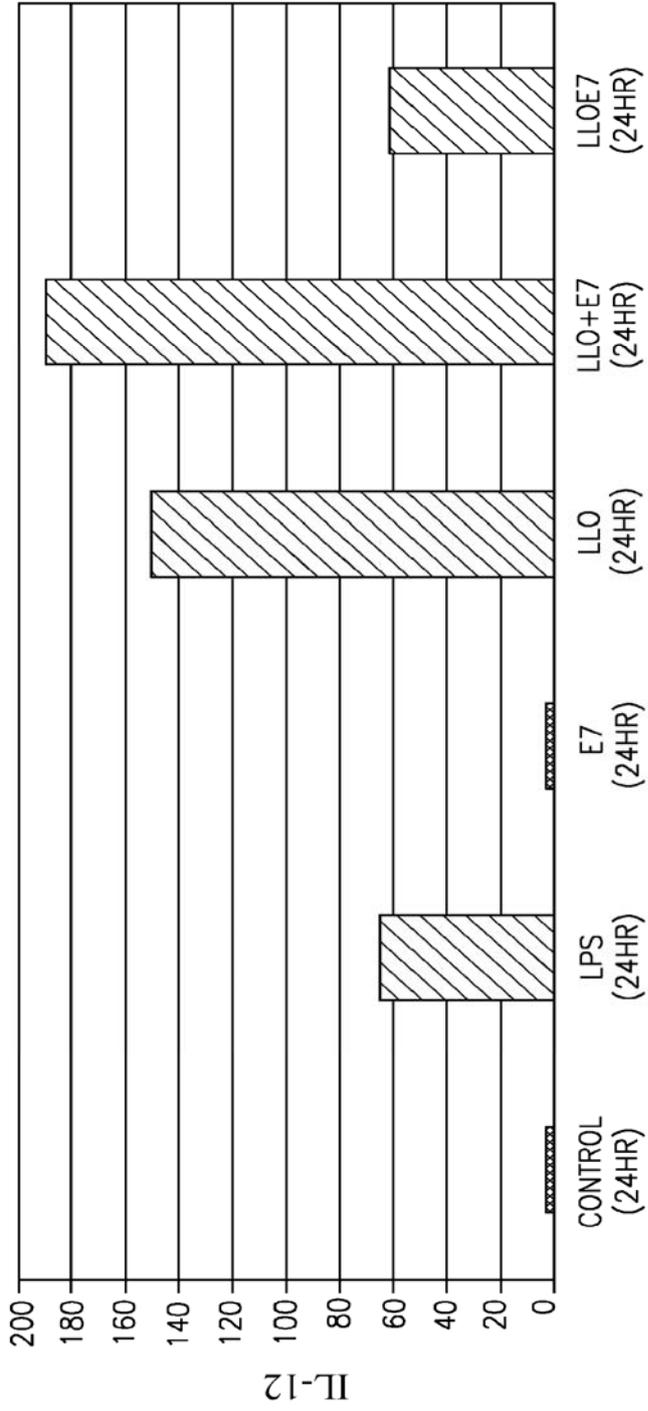


FIG. 13C



TRATAMIENTO

FIG. 13D

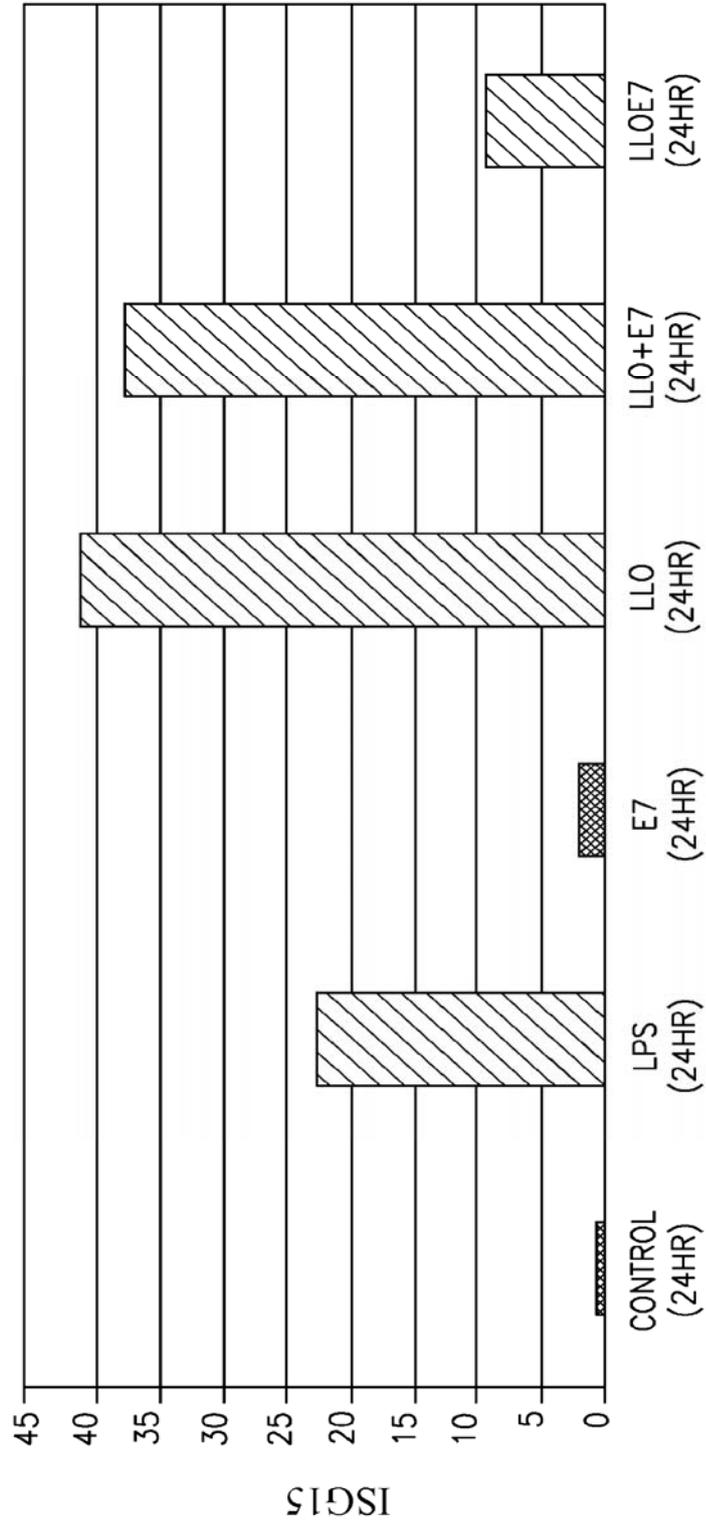
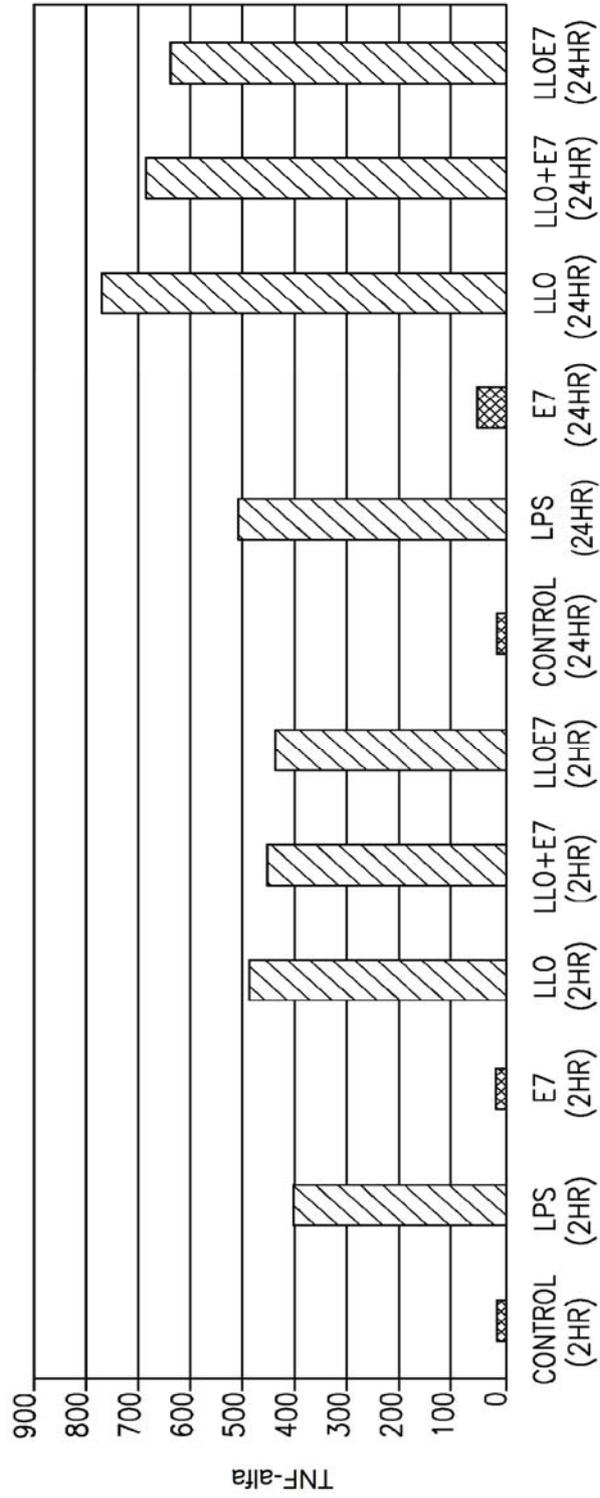


FIG. 13E



TRATAMIENTO

FIG. 14A

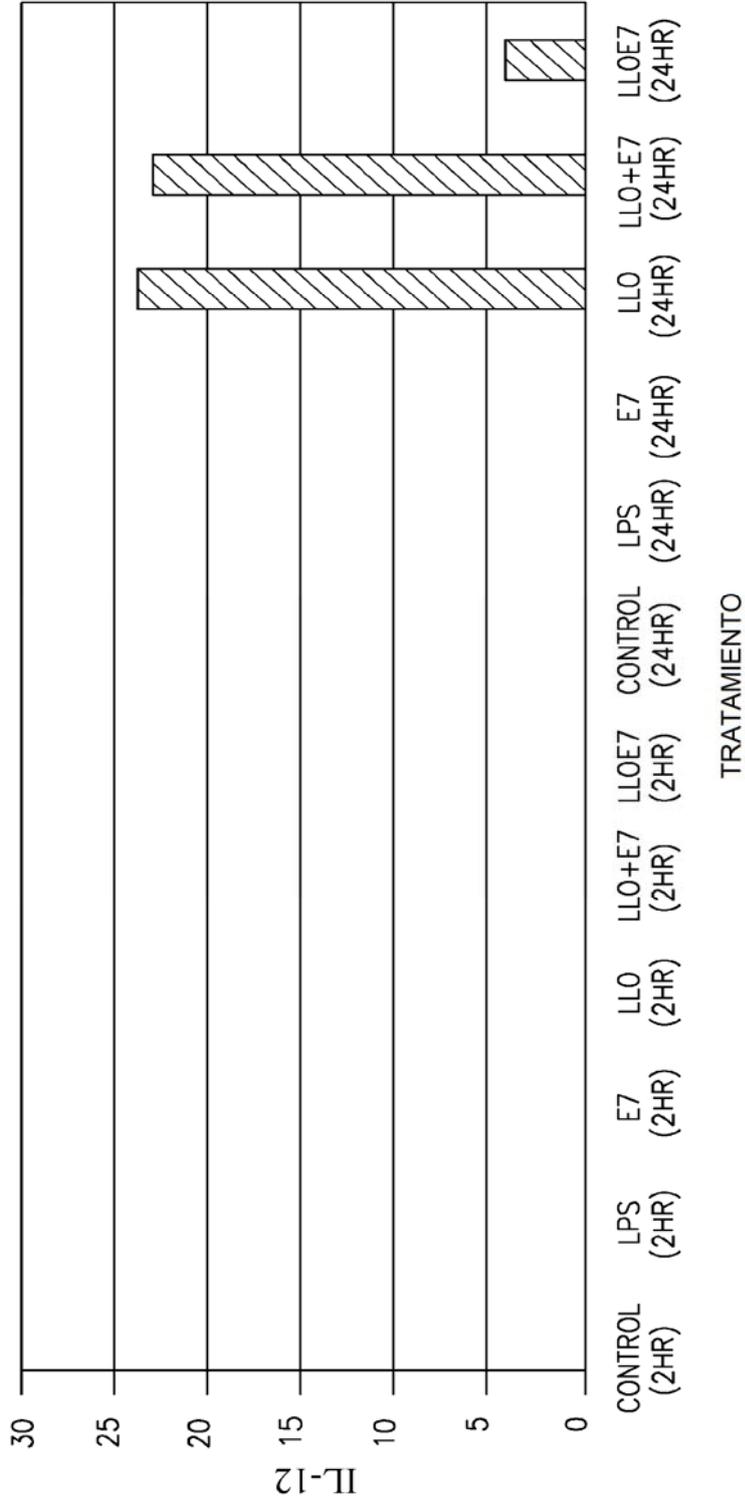


FIG. 14B

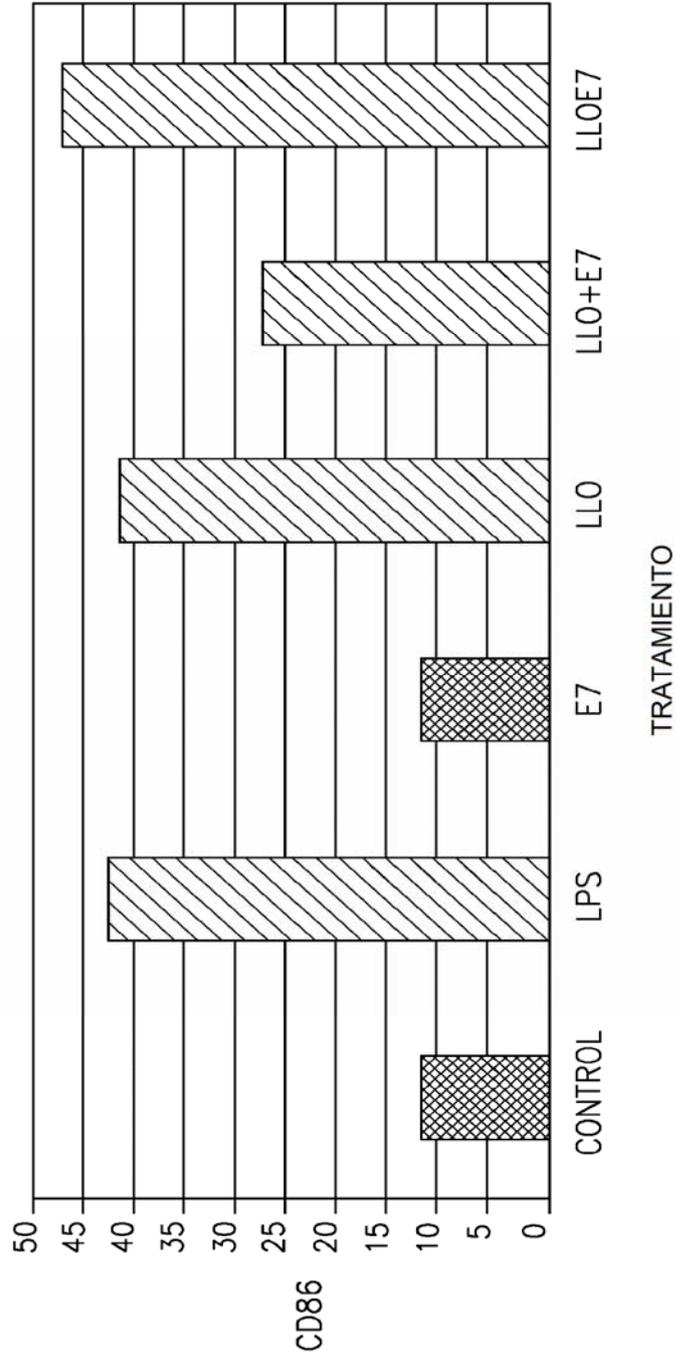


FIG. 15A

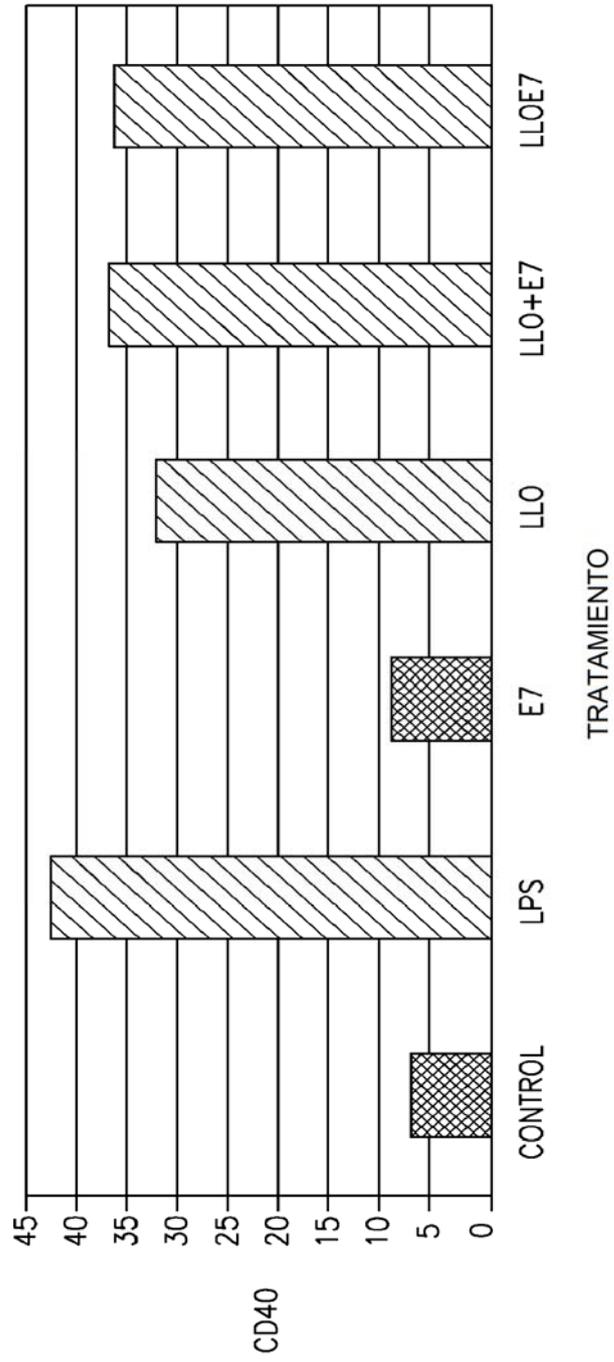


FIG. 15B

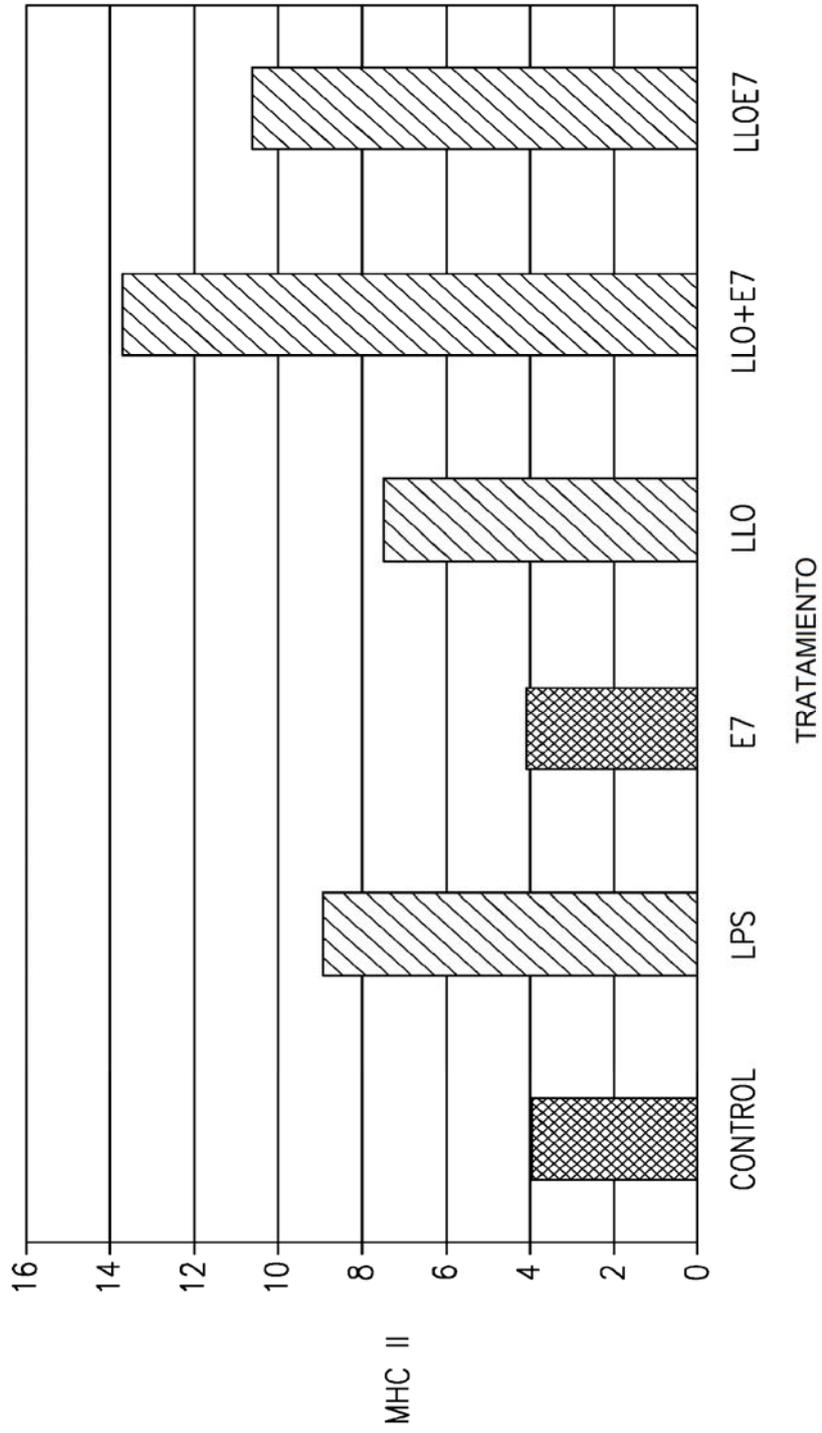


FIG. 15C

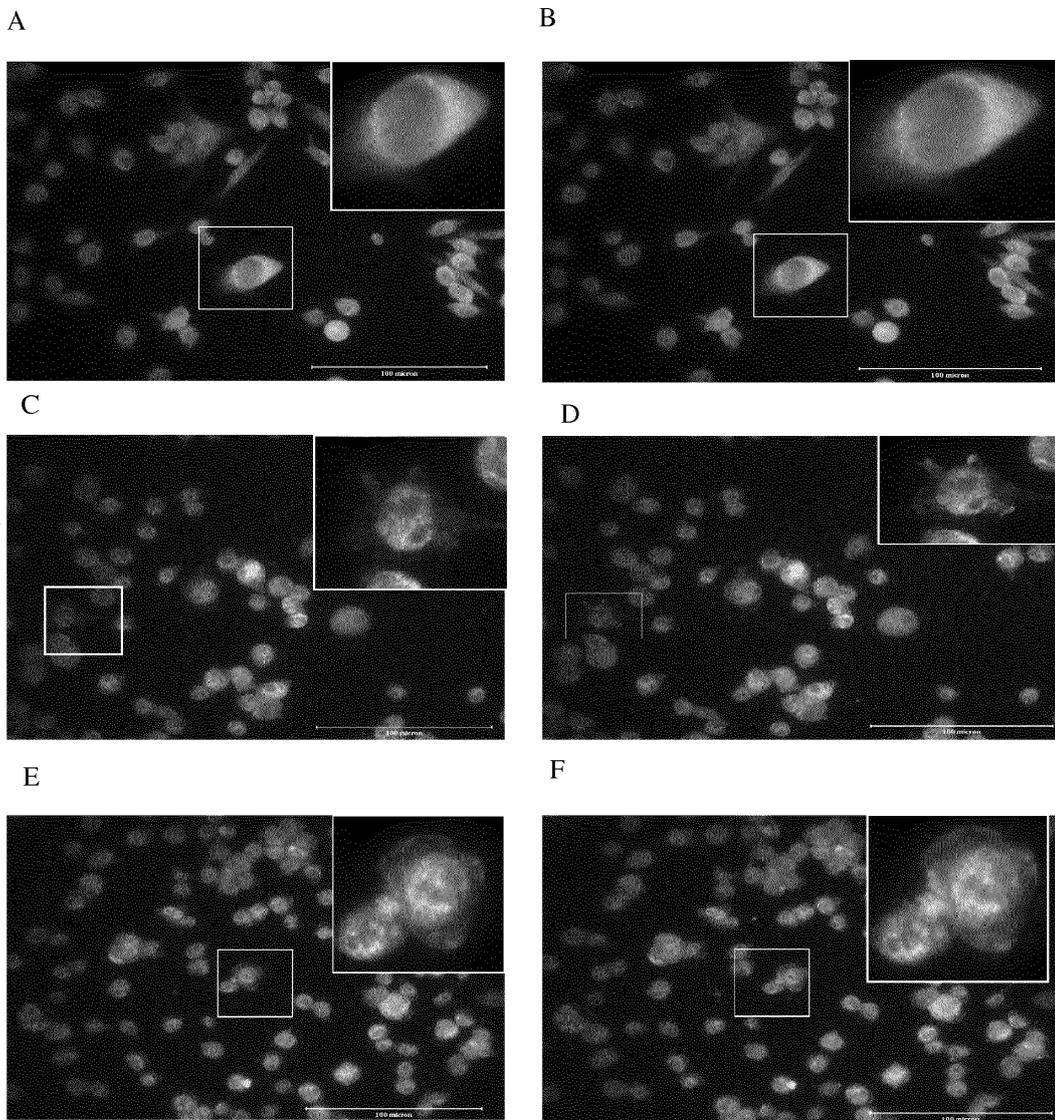


FIG. 16