

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 741 730**

51 Int. Cl.:

A61K 39/02 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.05.2009** **E 14190388 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.05.2019** **EP 2853269**

54 Título: **Sistema de administración doble para antígenos heterólogos que comprende una cepa de Listeria recombinante atenuada por la mutación de dal/dat y la delección de ActA que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína de fusión de listeriolisina O - antígeno prostático específico**

30 Prioridad:

19.05.2008 US 71792 P

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

12.02.2020

73 Titular/es:

**ADVAXIS, INC. (100.0%)
305 College Road East
Princeton, NJ 08540, US**

72 Inventor/es:

**MACIAG, PAULO;
WALLECHA, ANU y
SHAHABI, VAFA**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 741 730 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

Sistema de administración doble para antígenos heterólogos que comprende una cepa de *Listeria* recombinante atenuada por la mutación de *dal/dat* y la delección de *ActA* que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína de fusión de listeriolisina O - antígeno prostático específico

5 **Campo de la invención**

En la presente memoria se proporcionan cepas de *Listeria* recombinantes que expresan un polipéptido antigénico específico de tumor y, opcionalmente, un polipéptido angiogénico en el que una molécula de ácido nucleico que codifica al menos uno de los polipéptidos se integra de forma operable en el genoma de *Listeria* en un marco de lectura abierto con una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido que contiene PEST, métodos para preparar el mismo y métodos para inducir una respuesta inmune, y para tratar, inhibir o suprimir el cáncer o los tumores, que comprenden administrar el mismo.

15 **Antecedentes de la invención**

Una gran cantidad de evidencia preclínica y datos de ensayos clínicos preliminares sugieren que las capacidades antitumorales del sistema inmunitario pueden aprovecharse para tratar a pacientes con cánceres establecidos. La estrategia de vacunas aprovecha los antígenos tumorales asociados con varios tipos de cánceres. La inmunización con vacunas vivas, como los vectores virales o bacterianos que expresan un antígeno asociado a un tumor, es una estrategia para provocar respuestas de CTL fuertes contra tumores.

Listeria monocytogenes (*Lm*) es una bacteria intracelular facultativa grampositiva que tiene acceso directo al citoplasma de las células presentadoras de antígenos, como macrófagos y células dendríticas, en gran parte debido a la actividad de formación de poros de la listeriolisina-O (LLO). La LLO es secretada por *Lm* después de que las células la fagociten, y perfora la membrana fagolisosómica, lo que permite que la bacteria escape de la vacuola y entre en el citoplasma. La LLO se presenta de manera muy eficiente al sistema inmunitario a través de moléculas MHC de clase I. Además, los péptidos derivados de *Lm* también tienen acceso a la presentación de MHC de clase II a través del fagolisosoma. El documento WO 2006/017856 describe cepas de vacuna de *Listeria* que expresan un antígeno heterólogo y una enzima metabólica, y métodos para su generación.

El cáncer es una enfermedad compleja, y es más probable que los enfoques terapéuticos combinados tengan éxito. No solo las células tumorales, sino también el microambiente que soporta el crecimiento tumoral, deben ser seleccionados como objetivo para maximizar la eficacia terapéutica. La mayoría de las inmunoterapias se centran en antígenos individuales para atacar a las células tumorales y, por lo tanto, han demostrado un éxito limitado contra los cánceres humanos. Un único agente terapéutico capaz de dirigirse a las células tumorales y al microentorno del tumor simultáneamente tendría una ventaja sobre otros enfoques inmunoterapéuticos, especialmente si produce un efecto antitumoral sinérgico.

30 **Compendio de la invención**

La invención se define en las reivindicaciones adjuntas, y cualquier otro aspecto o realización expuesta en la presente memoria que no esté dentro del alcance de las reivindicaciones es solo a título informativo.

En un aspecto, en la presente memoria se proporciona una cepa de *Listeria* recombinante que comprende una primera y una segunda molécula de ácido nucleico, y cada una de dichas moléculas de ácido nucleico codifica un polipéptido antigénico heterólogo o un fragmento del mismo, en donde dicha primera molécula de ácido nucleico se integra de forma operable en el genoma de *Listeria* en un marco de lectura abierto con un gen que contiene PEST endógeno. En otro aspecto, la presente descripción proporciona una vacuna que comprende tal cepa de *Listeria* recombinante.

En otro aspecto, en la presente memoria se proporciona un método para inducir una respuesta inmune a un antígeno en un sujeto, que comprende administrar una cepa de *Listeria* recombinante a dicho sujeto, en donde dicha cepa de *Listeria* recombinante comprende una primera y una segunda molécula de ácido nucleico, y cada una de dichas moléculas de ácido nucleico codifican un polipéptido antigénico heterólogo o fragmento del mismo, en el que dicha primera molécula de ácido nucleico se integra de forma operable en el genoma de *Listeria* en un marco de lectura abierto con un gen que contiene PEST endógeno.

En otro aspecto, en la presente memoria se proporciona un método para tratar, suprimir o inhibir un cáncer en un sujeto que comprende administrar una cepa de *Listeria* recombinante que comprende una primera y una segunda molécula de ácido nucleico, y cada una de dichas moléculas de ácido nucleico codifican un polipéptido antigénico heterólogo o un fragmento del mismo, en donde dicha primera molécula de ácido nucleico se integra de forma operable en el genoma de *Listeria* en un marco de lectura abierto con un gen que contiene PEST endógeno.

En otro aspecto, en la presente memoria se proporciona un método para tratar, suprimir o inhibir al menos un tumor en un sujeto que comprende administrar una cepa de *Listeria* recombinante que comprende una primera y una segunda molécula de ácido nucleico, y cada una de dichas moléculas de ácido nucleico codifican un polipéptido o fragmento antigénico heterólogo del mismo, en donde dicha primera molécula de ácido nucleico se integra de forma

operable en el genoma de *Listeria* en un marco de lectura abierto con un gen que contiene PEST endógeno.

En otro aspecto, en la presente memoria se proporciona una cepa de *Listeria* recombinante que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido antigénico heterólogo o un fragmento del mismo, en donde dicha molécula de ácido nucleico se integra de forma operable en el genoma de *Listeria* en un marco de lectura abierto con un gen que contiene PEST endógeno.

En otro aspecto, en la presente memoria se proporciona un método para producir una cepa de *Listeria* recombinante que expresa dos antígenos, y el método comprende fusionar genéticamente un primer ácido nucleico que codifica un primer antígeno y un segundo ácido nucleico que codifica un segundo antígeno en el genoma de *Listeria* en un marco de lectura abierto con un gen que contiene PEST endógeno; y expresar dichos primer y segundo antígenos en condiciones conducentes a la expresión antigénica en dicha cepa de *Listeria* recombinante.

En otro aspecto, en la presente memoria se proporciona un método para producir una cepa de *Listeria* recombinante que expresa dos antígenos. En un aspecto, el método comprende fusionar genéticamente un primer ácido nucleico que codifica un primer antígeno en el genoma de *Listeria* en un marco de lectura abierto con un gen que contiene PEST endógeno; transformar dicha *Listeria* recombinante con un vector de expresión episomal que comprende un segundo ácido nucleico que codifica un segundo antígeno; y expresar dichos primer y segundo antígenos en condiciones conducentes a la expresión antigénica en dicha cepa de *Listeria* recombinante.

La presente invención proporciona una cepa de *Listeria* recombinante que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido de fusión antigénico de listeriolisina O (LLO) - antígeno prostático específico (PSA), en el que dicha *Listeria* recombinante es un mutante *dal/dat* auxotrófico atenuado, que comprende un vector de expresión episomal que comprende una enzima metabólica que complementa la auxotrofia de dicho mutante auxotrófico, y en el que dicha *Listeria* recombinante comprende además una delección del gen *ActA* endógeno. La presente invención proporciona además:

- una composición inmunogénica que comprende la cepa de *Listeria* recombinante de la invención, y un adyuvante;
- una cepa de *Listeria* recombinante de la invención, para uso como un medicamento;
- una cepa de *Listeria* recombinante de la invención, para uso en la inducción de una respuesta inmune al PSA en un sujeto;
- una cepa de *Listeria* recombinante de la invención, para uso en un método para prevenir o retrasar la aparición de un cáncer en un sujeto; y
- una cepa de *Listeria* recombinante de la invención, para uso en el tratamiento, supresión o inhibición de un cáncer o tumor en un sujeto.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1. (A) Representación esquemática de la región cromosómica de *Lmdd-143* y *LmddA-143* después de la integración de *klk3* y la delección de *actA*; (B) El gen *klk3* está integrado en los cromosomas *Lmdd* y *LmddA*. La PCR de la preparación de ADN cromosómico de cada construcción utilizando cebadores específicos de *klk3* amplifica una banda de 714 pb correspondiente al gen *klk3*, que carece de la secuencia señal de secreción de la proteína de tipo natural.

Figura 2. (A) Mapa del plásmido pADV134. (B) Las proteínas del sobrenadante de cultivo de *LmddA-134* se precipitaron, se separaron en una SDS-PAGE y la proteína LLO-E7 se detectó mediante transferencia de Western utilizando un anticuerpo monoclonal anti-E7. El casete de expresión del antígeno consiste en un promotor *hly*, un ORF para LLO truncado y un gen de PSA humano (*klk3*). (C) Mapa del plásmido pADV142. (D) La transferencia de Western mostró la expresión de la proteína de fusión LLO-PSA utilizando anticuerpos anti-PSA y anti-LLO.

FIGURA 3. (A) Estabilidad del plásmido *in vitro* de *LmddA-LLO-PSA* si se cultiva con y sin presión selectiva (D-alanina). Las condiciones de la cepa y del cultivo se enumeran primero, y las placas utilizadas para la determinación de UFC se enumeran después. (B) Eliminación de *LmddA-LLO-PSA in vivo* y evaluación de la pérdida potencial de plásmidos durante este tiempo. Las bacterias se inyectaron i.v. y se aislaron del bazo en el momento indicado. Las UFCs se determinaron en placas de BHI y BHI + D-alanina.

FIGURA 4. (A) Aclaramiento *in vivo* de la cepa *LmddA-LLO-PSA* después de la administración de 10^8 UFC en ratones C57BL/6. El número de UFC se determinó colocando en placas BHI/str. El límite de detección de este método fue de 100 UFC. (B) Ensayo de infección celular de células J774 con 10403S, *LmddA-LLO-PSA* y cepas XFL7.

FIGURA 5. (A) Células específicas de tetrámero de PSA en los esplenocitos de ratones sin tratamiento e inmunizados con *LmddA-LLO-PSA* en el día 6 después de la dosis de refuerzo. (B) La tinción intracelular de citoquinas para IFN- γ en los esplenocitos de ratones sin tratamiento e inmunizados con *LmddA-LLO-PSA* estimulados con péptido de PSA

durante 5 h. Lisis específica de células EL4 pulsadas con péptido de PSA con células T efectoras estimuladas in vitro de ratones inmunizados con *LmddA*-LLO-PSA y ratones sin tratamiento con una proporción efector/objetivo diferente utilizando un ensayo basado en caspasa (C) y un ensayo basado en europio (D). Número de puntos de IFN γ en esplenocitos sin tratamiento e inmunizados obtenidos después de la estimulación durante 24 h en presencia de péptido de PSA o sin péptido (E).

FIGURA 6. La inmunización con *LmddA*-142 induce la regresión de los tumores Tramp-C1-PSA (TPSA). Los ratones se dejaron sin tratar (n = 8) (A) o se inmunizaron i.p. con *LmddA*-142 (1×10^8 UFC/ratón) (n = 8) (B) o *Lm*-LLO-PSA (n = 8) (C) en días 7, 14 y 21. Los tamaños de los tumores se midieron para cada tumor individual y los valores se expresaron como el diámetro medio en milímetros. Cada línea representa un ratón individual.

FIGURA 7. (A) Análisis de las células T tetrámero de PSA $^+$ CD8 $^+$ en los bazo y la infiltración de tumores T-PSA-23 de los ratones sin tratar y los ratones inmunizados con una cepa de *Lm* de control o *Lm-ddA*-LLO-PSA (*LmddA*-142). (B) Análisis de las células reguladoras T CD4 $^+$, que se definieron como CD25 $^+$ FoxP3 $^+$, en los bazo e infiltradas en tumores T-PSA-23 de los ratones sin tratar y los ratones inmunizados con una cepa de *Lm* de control o *Lm-ddA*-LLO-PSA.

FIGURA 8. (A) Representación esquemática de la región cromosómica de *Lmdd*-143 y *LmddA*-143 después de la integración de *klk3* y la delección de *actA*; (B) El gen *klk3* está integrado en los cromosomas de *Lmdd* y *LmddA*. La PCR de la preparación de ADN cromosómico de cada construcción utilizando cebadores específicos de *klk3* amplifica una banda de 760 pb correspondiente al gen *klk3*.

Figura 9. (A) *Lmdd*-143 y *LmddA*-143 secretan la proteína LLO-PSA. Las proteínas de los sobrenadantes de cultivo bacteriano se precipitaron, se separaron en una SDS-PAGE y las proteínas LLO y LLO-PSA se detectaron mediante transferencia de Western utilizando anticuerpos anti-LLO y anti-PSA; (B) La LLO producida por *Lmdd*-143 y *LmddA*-143 retiene la actividad hemolítica. Se incubaron glóbulos rojos de ovejas con diluciones en serie de sobrenadantes de cultivos bacterianos, y se midió la actividad hemolítica mediante absorbancia a 590 nm; (C) *Lmdd*-143 y *LmddA*-143 crecen dentro de las células J774 de tipo macrófago. Las células J774 se incubaron con bacterias durante 1 hora, seguido de un tratamiento con gentamicina para destruir las bacterias extracelulares. El crecimiento intracelular se midió colocando en placas diluciones en serie de lisados de J774 obtenidos en los momentos indicados. Se utilizó *Lm* 10403S como control en estos experimentos.

Figura 10. La inmunización de ratones con *Lmdd*-143 y *LmddA*-143 induce una respuesta inmune específica de PSA. Se inmunizaron ratones C57BL/6 dos veces a intervalos de 1 semana con 1×10^8 UFC de *Lmdd*-143, *LmddA*-143 o *LmddA*-142, y 7 días más tarde se recogieron los bazo. Los esplenocitos se estimularon durante 5 horas en presencia de monensina con 1 μ M del péptido PSA₆₅₋₇₄. Las células se tiñeron para detectar CD8, CD3, CD62L e IFN- γ intracelular, y se analizaron en un citómetro FACS Calibur.

Figura 11. Se diseñaron tres vacunas basadas en *Lm* que expresaban distintos fragmentos de HMW-MAA según la posición de los epítomos de HLA-A2 previamente cartografiados y predichos (A). La cepa *Lm*-tLLO-HMW-MMA₂₁₆₀₋₂₂₅₈ (también denominada *Lm*-LLO-HMW-MAA-C) secreta una banda de ~ 62 kDa correspondiente a la proteína de fusión tLLO-HMW-MAA₂₁₆₀₋₂₂₅₈ (B). A ratones C57BL/6 (n = 15) se les inocularon s.c. células B16F10 y se inmunizaron i.p. en los días 3, 10 y 17 con *Lm*-tLLO-HMW-MAA₂₁₆₀₋₂₂₅₈ (n = 8) o se dejaron sin tratamiento (n = 7). Se inocularon ratones BALB/c (n = 16) s.c. con células RENCA y se inmunizaron i.p. los días 3, 10 y 17 con *Lm*-HMW-MAA-C (n = 8) o una dosis equivalente de una vacuna de *Lm* de control. Los ratones inmunizados con *Lm*-LLO-HMW-MAA-C impidieron el crecimiento de tumores establecidos (C). Se inocularon a ratones FVB/N (n = 13) s.c. células tumorales NT-2 y se inmunizaron i.p. los días 7, 14 y 21 con *Lm*-HMW-MAA-C (n = 5) o una dosis equivalente de una vacuna de *Lm* de control (n = 8). La inmunización de los ratones con *Lm*-LLO-HMW-MAA-C perjudicó significativamente el crecimiento de los tumores sin modificar para expresar HMW-MAA, como B16F10, RENCA y NT-2 (D). Los tamaños de los tumores se midieron para cada tumor individual, y los valores se expresaron como el diámetro medio en milímetros \pm EEM. *, $P \leq 0,05$, prueba de Mann-Whitney.

Figura 12. La inmunización con *Lm*-HMW-MAA-C estimula la infiltración del tumor con las células T CD8 $^+$ y disminuye el número de pericitos en los vasos sanguíneos. (A) Se extrajeron los tumores NT-2 y se cortaron para determinar la inmunofluorescencia. Los grupos de tinción están numerados (1-3), y cada tinción se indica a la derecha. Los tejidos secuenciales se tiñeron con el marcador general de vasos anti-CD31 o el anticuerpo anti-NG2 para el homólogo de ratón de HMW-MAA, AN2, junto con anti-CD8 α para los posibles TILs. El grupo 3 muestra controles de isotipo para los anticuerpos anteriores y la tinción DAPI utilizada como marcador nuclear. Se analizaron un total de 5 tumores, y se muestra una única imagen representativa de cada grupo. Las células CD8 $^+$ alrededor de los vasos sanguíneos están indicadas por flechas. (B) Los cortes secuenciales se tiñeron para detectar pericitos utilizando los anticuerpos anti-NG2 y anti-actina de células musculares lisas alfa (α -SMA). La doble tinción/colocalización de estos dos anticuerpos (amarillo en la imagen mixta) es indicativa de la tinción de pericitos (parte superior). La colocalización de pericitos se cuantificó utilizando el programa informático Image Pro y el número de objetos colocalizados se muestra en el gráfico (parte inferior). Se analizaron un total de 3 tumores, y se muestra una única imagen representativa de cada grupo. *, $P \leq 0,05$, prueba de Mann-Whitney. El gráfico muestra la media \pm EEM.

Descripción detallada de la invención

La invención se define en las reivindicaciones adjuntas, y cualquier otro aspecto o realización expuesta en la presente memoria que no esté dentro del alcance de las reivindicaciones es solo a título informativo.

5 Un aspecto descrito en la presente memoria se refiere a una cepa de *Listeria* recombinante que expresa un polipéptido antigénico en el que el ácido nucleico que codifica el polipéptido se integra de forma operable en el genoma de *Listeria* en un marco de lectura abierto con un gen que contiene PEST endógeno, que, en un aspecto, es LLO. En un aspecto, la *Listeria* expresa dos polipéptidos, uno de los cuales es un antígeno asociado a un tumor, y uno de los cuales es un polipéptido angiogénico.

10 Un aspecto descrito en la presente memoria proporciona una cepa de *Listeria* recombinante que comprende una primera y una segunda molécula de ácido nucleico, y cada una de dichas moléculas de ácido nucleico codifican un polipéptido antigénico heterólogo o un fragmento del mismo, en donde la primera molécula de ácido nucleico se integra en el genoma de *Listeria* en un marco de lectura abierto con un gen LLO endógeno, y en donde la segunda molécula de ácido nucleico está presente en un vector de expresión episomal dentro de la cepa de *Listeria* recombinante. En un aspecto, la primera molécula de ácido nucleico codifica una proteína KLK3 y la segunda molécula de ácido nucleico codifica un péptido HMW-MAA, y, en un aspecto, está en un marco de lectura abierto con un ácido nucleico que codifica una LLO no hemolítica, ActA truncado, o secuencia PEST.

Un aspecto descrito en la presente memoria proporciona una cepa de *Listeria* recombinante que comprende una primera y una segunda molécula de ácido nucleico, y cada una de dichas moléculas de ácido nucleico codifican un polipéptido antigénico heterólogo.

20 En un aspecto, la primera molécula de ácido nucleico se integra de forma operable en el genoma de *Listeria* como un marco de lectura abierto con una secuencia de ácido nucleico endógena que codifica un polipéptido que comprende una secuencia PEST. En un aspecto, la primera molécula de ácido nucleico se integra de forma operable en el genoma de *Listeria* como un marco de lectura abierto con una secuencia de ácido nucleico que codifica LLO. En otro aspecto, la primera molécula de ácido nucleico se integra de forma operable en el genoma de *Listeria* como un marco de lectura abierto con una secuencia de ácido nucleico que codifica ActA.

30 En un aspecto, la primera molécula de ácido nucleico se integra de forma operable en el genoma de *Listeria* en un marco de lectura abierto con una secuencia de ácido nucleico endógena que codifica LLO. En un aspecto, la integración no elimina la funcionalidad de LLO. En otro aspecto, la integración no elimina la funcionalidad de ActA. En un aspecto, la funcionalidad de LLO o ActA es su funcionalidad nativa. En un aspecto, la funcionalidad de LLO es permitir que el organismo escape del fagolisosoma, mientras que en otro aspecto, la funcionalidad de LLO es mejorar la inmunogenicidad de un polipéptido con el que está fusionada. En un aspecto, una *Listeria* recombinante descrita en la presente memoria retiene la función de LLO, que en un aspecto es una función hemolítica y en otro aspecto es una función antigénica. En la técnica se conocen otras funciones de LLO, como los métodos y ensayos para evaluar la funcionalidad de LLO. En un aspecto, una *Listeria* recombinante descrita en la presente memoria tiene una virulencia de tipo natural, mientras que en otro aspecto, una *Listeria* recombinante descrita en la presente memoria tiene una virulencia atenuada. En otro aspecto, una *Listeria* recombinante de la presente invención es avirulenta. En un aspecto, una *Listeria* recombinante de la presente invención es suficientemente virulenta para escapar del fagolisosoma y entrar en el citosol. La *Listeria* recombinante de la presente invención expresa una proteína antígeno-LLO fusionada. Así, en un aspecto, la integración de la primera molécula de ácido nucleico en el genoma de *Listeria* no altera la estructura del gen que contiene PEST endógeno, mientras que en otro aspecto, no altera la función del gen que contiene PEST endógeno. En un aspecto, la integración de la primera molécula de ácido nucleico en el genoma de *Listeria* no altera la capacidad de dicha *Listeria* de escapar del fagolisosoma.

45 En otro aspecto, la segunda molécula de ácido nucleico se integra de forma operable en el genoma de *Listeria* con dicha primera molécula de ácido nucleico en un marco de lectura abierto con un polipéptido endógeno que comprende una secuencia PEST. Por lo tanto, en un aspecto, la primera y segunda moléculas de ácido nucleico se integran en el marco de lectura con una secuencia de ácido nucleico que codifica LLO, mientras que en otro aspecto, se integran en el marco de lectura con una secuencia de ácido nucleico que codifica ActA. En otro aspecto, la segunda molécula de ácido nucleico se integra de forma operable en el genoma de *Listeria* en un marco de lectura abierto con una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido que comprende una secuencia PEST en un sitio que es distinto del sitio de integración de la primera molécula de ácido nucleico. En un aspecto, la primera molécula de ácido nucleico se integra en el marco de lectura con una secuencia de ácido nucleico que codifica LLO, mientras que la segunda molécula de ácido nucleico se integra en el marco de lectura con una secuencia de ácido nucleico que codifica ActA, mientras que en otro aspecto, la primera molécula de ácido nucleico se integra en el marco de lectura con una secuencia de ácido nucleico que codifica ActA, mientras que la segunda molécula de ácido nucleico se integra en el marco de lectura con una secuencia de ácido nucleico que codifica LLO.

Otro aspecto descrito en la presente memoria proporciona una cepa de *Listeria* recombinante que comprende una primera molécula de ácido nucleico que codifica un primer polipéptido antigénico heterólogo o un fragmento del mismo y una segunda molécula de ácido nucleico que codifica un segundo polipéptido antigénico heterólogo o un fragmento del mismo, en donde dicha primera molécula de ácido nucleico se integra en el genoma de *Listeria* de forma que el

primer polipéptido antigénico heterólogo y un polipéptido que contiene PEST endógeno se expresan como una proteína de fusión. En un aspecto, el primer polipéptido antigénico heterólogo y el polipéptido que contiene PEST endógeno se traducen en un único marco de lectura abierto, mientras que en otro aspecto, el primer polipéptido antigénico heterólogo y el polipéptido que contiene PEST endógeno se fusionan después de traducirse por separado.

5 En un aspecto, el genoma de *Listeria* comprende una delección del gen ActA endógeno, que en un aspecto es un factor de virulencia. En un aspecto, dicha delección proporciona una cepa de *Listeria* más atenuada y, por lo tanto, más segura para uso humano. De acuerdo con este aspecto, el polipéptido antigénico está integrado en el marco de lectura con LLO en el cromosoma de *Listeria*. En otro aspecto, la molécula de ácido nucleico integrada se integra en el locus ActA. En otro aspecto, el ácido nucleico cromosómico que codifica ActA se reemplaza por una molécula de ácido nucleico que codifica un antígeno.

En otro aspecto, la molécula de ácido nucleico integrada se integra en el cromosoma de *Listeria*.

En un aspecto, dicha primera molécula de ácido nucleico es un vector diseñado para la recombinación homóloga específica de sitio en el genoma de *Listeria*. En otro aspecto, la construcción o gen heterólogo se integra en el cromosoma de *Listeria* utilizando la recombinación homóloga.

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

En otro aspecto, la construcción o gen heterólogo se integra en el cromosoma de *Listeria* mediante la inserción de transposones. Las técnicas para la inserción de transposones son muy conocidas en la técnica y se describen, entre otros, por Sun et al. (*Infection and Immunity* 1990, 58: 3770-3778) en la construcción de DP-L967. La mutagénesis por transposones tiene la ventaja, en un aspecto, de que se puede formar un mutante de inserción genómica estable. En otro aspecto, se desconoce la posición en el genoma donde el gen exógeno se ha insertado por la mutagénesis por transposones.

En otro aspecto, la construcción o gen heterólogo se integra en el cromosoma de *Listeria* utilizando sitios de integración de fagos (Lauer P, Chow MY et al, Construction, characterization, and use of two LM site-specific phage integration vectors. *J Bacteriol* 2002; 184 (15): 4177-86). En otro aspecto, se utiliza un gen de integrasa y un sitio de unión de un bacteriófago (por ejemplo, listeriófago U153 o PSA) para insertar el gen heterólogo en el sitio de unión correspondiente, que puede ser cualquier sitio apropiado en el genoma (por ejemplo, comK o el extremo 3' del gen arg tRNA). En otro aspecto, los profagos endógenos se eliminan del sitio de unión utilizado antes de la integración de la construcción o gen heterólogo. En otro aspecto, este método da como resultado integrantes de copia única. Cada posibilidad representa un aspecto distinto como se proporciona en la presente memoria.

40 En otro aspecto, la primera secuencia de ácido nucleico de los métodos y las composiciones que se proporcionan en la presente memoria está unida de forma operable a una secuencia promotora/reguladora. En otro aspecto, la segunda secuencia de ácido nucleico está unida de forma operable a una secuencia promotora/reguladora. En otro aspecto, cada una de las secuencias de ácido nucleico está unida de forma operable a una secuencia promotora/reguladora. En un aspecto, la secuencia promotora/reguladora está presente en un plásmido episomal que comprende dicha secuencia de ácido nucleico. En un aspecto, la secuencia promotora/reguladora de *Listeria* endógena controla la expresión de una secuencia de ácido nucleico de los métodos y composiciones descritos en la presente memoria. Cada posibilidad representa un aspecto distinto de los métodos y las composiciones que se proporcionan en la presente memoria.

En otro aspecto, una secuencia de ácido nucleico como se proporciona en la presente memoria está unida de forma operable a un promotor, secuencia reguladora o combinación de los mismos que controla la expresión del péptido codificado en la cepa de *Listeria*. El promotor, las secuencias reguladoras y sus combinaciones útiles para controlar la expresión constitutiva de un gen son muy conocidos en la técnica e incluyen, entre otros, los promotores de *Listeria* P_{hlyA}, P_{ActA}, hly, ActA y p60, el promotor bac de *Streptococcus*, el promotor de *Streptomyces griseus* sgiA y el promotor phaZ de *B. thuringiensis*. En otro aspecto, la expresión inducible y específica de tejido del ácido nucleico que codifica un péptido como se proporciona en la presente memoria se logra colocando el ácido nucleico que codifica el péptido bajo control de una secuencia reguladora/promotora inducible o específica de tejido. Los ejemplos de secuencias reguladoras, promotoras y combinaciones de las mismas específicas de tejido que son útiles para este propósito incluyen, pero sin limitación, el promotor inducible por LTR de MMTV y el potenciador/promotor tardío de SV40. En otro aspecto, se utiliza un promotor que se induce en respuesta a agentes inductores tales como metales,

5 glucocorticoides y similares. Por lo tanto, se apreciará que la invención incluye el uso de cualquier promotor o secuencia reguladora, que sea conocida o desconocida, y que sea capaz de controlar la expresión de la proteína deseada unida de forma operable a la misma. En un aspecto, una secuencia reguladora es un promotor, mientras que en otro aspecto, una secuencia reguladora es un potenciador, mientras que en otro aspecto, una secuencia reguladora es un supresor, mientras que en otro aspecto, una secuencia reguladora es un represor, mientras que en otro aspecto, una secuencia reguladora es un silenciador.

10 En un aspecto, la construcción de ácido nucleico utilizada para la integración en el genoma de *Listeria* contiene un sitio de integración. En un aspecto, el sitio es un sitio de integración attPP' de PhSA (fago de Scott A). PhSA es, en otro aspecto, el profago de la cepa ScottA de *L. monocytogenes* (Loessner, MJ, IB Krause, T. Henle y S. Scherer). 1994. Structural proteins and DNA characteristics of 14 Listeria typing bacteriophages. J. Gen. Virol. 75: 701-710), una cepa de serotipo 4b que se aisló durante una epidemia de listeriosis humana. En otro aspecto, el sitio es cualquier otro sitio de integración conocido en la técnica. Cada posibilidad representa un aspecto distinto de los métodos y las composiciones que se proporcionan en la presente memoria.

15 En otro aspecto, la construcción de ácido nucleico contiene un gen de integrasa. En otro aspecto, el gen de la integrasa es un gen de la integrasa PhSA. En otro aspecto, el gen de la integrasa es cualquier otro gen de la integrasa conocido en la técnica. Cada posibilidad representa un aspecto distinto de los métodos y las composiciones que se proporcionan en la presente memoria.

20 En un aspecto, la construcción de ácido nucleico es un plásmido. En otro aspecto, la construcción de ácido nucleico es un plásmido lanzadera. En otro aspecto, la construcción de ácido nucleico es un vector de integración. En otro aspecto, la construcción de ácido nucleico es un vector de integración específico de sitio. En otro aspecto, la construcción de ácido nucleico es cualquier otro tipo de construcción de ácido nucleico conocido en la técnica. Cada posibilidad representa un aspecto distinto de los métodos y las composiciones que se proporcionan en la presente memoria.

25 El vector de integración de los métodos y las composiciones que se proporciona en la presente memoria es, en otro aspecto, un vector de fago. En otro aspecto, el vector de integración es un vector de integración específico de sitio. En otro aspecto, el vector comprende además un sitio attPP'. Cada posibilidad representa un aspecto distinto de los métodos y las composiciones que se proporcionan en la presente memoria.

En otro aspecto, el vector de integración es un vector U153. En otro aspecto, el vector de integración es un vector A118. En otro aspecto, el vector de integración es un vector PhSA.

30 En otro aspecto, el vector es un vector A511 (por ejemplo, nº de acceso de GenBank: X91069). En otro aspecto, el vector es un vector A006. En otro aspecto, el vector es un vector B545. En otro aspecto, el vector es un vector B053. En otro aspecto, el vector es un vector A020. En otro aspecto, el vector es un vector A500 (por ejemplo, nº de acceso de GenBank: X85009). En otro aspecto, el vector es un vector B051. En otro aspecto, el vector es un vector B052. En otro aspecto, el vector es un vector B054. En otro aspecto, el vector es un vector B055. En otro aspecto, el vector es un vector B056. En otro aspecto, el vector es un vector B101. En otro aspecto, el vector es un vector B110. En otro aspecto, el vector es un vector Bill. En otro aspecto, el vector es un vector A153. En otro aspecto, el vector es un vector D441. En otro aspecto, el vector es un vector A538. En otro aspecto, el vector es un vector B653. En otro aspecto, el vector es un vector A513. En otro aspecto, el vector es un vector A507. En otro aspecto, el vector es un vector A502. En otro aspecto, el vector es un vector A505. En otro aspecto, el vector es un vector A519. En otro aspecto, el vector es un vector B604. En otro aspecto, el vector es un vector C703. En otro aspecto, el vector es un vector B025. En otro aspecto, el vector es un vector A528. En otro aspecto, el vector es un vector B024. En otro aspecto, el vector es un vector B012. En otro aspecto, el vector es un vector B035. En otro aspecto, el vector es un vector C707.

45 En otro aspecto, el vector es un vector A005. En otro aspecto, el vector es un vector A620. En otro aspecto, el vector es un vector A640. En otro aspecto, el vector es un vector B021. En otro aspecto, el vector es un vector HSO47. En otro aspecto, el vector es un vector H10G. En otro aspecto, el vector es un vector H8/73. En otro aspecto, el vector es un vector H19. En otro aspecto, el vector es un vector H21. En otro aspecto, el vector es un vector H43. En otro aspecto, el vector es un vector H46. En otro aspecto, el vector es un vector H107. En otro aspecto, el vector es un vector H108. En otro aspecto, el vector es un vector H110. En otro aspecto, el vector es un vector H163/84. En otro aspecto, el vector es un vector H312. En otro aspecto, el vector es un vector H340. En otro aspecto, el vector es un vector H387. En otro aspecto, el vector es un vector H391/73. En otro aspecto, el vector es un vector H684/74. En otro aspecto, el vector es un vector H924A. En otro aspecto, el vector es un vector fMLUP5. En otro aspecto, el vector es un vector syn (= P35). En otro aspecto, el vector es un vector 00241. En otro aspecto, el vector es un vector 00611. En otro aspecto, el vector es un vector 02971A. En otro aspecto, el vector es un vector 02971C. En otro aspecto, el vector es un vector 5/476. En otro aspecto, el vector es un vector 5/911. En otro aspecto, el vector es un vector 5/939. En otro aspecto, el vector es un vector 5/11302. En otro aspecto, el vector es un vector 5/11605. En otro aspecto, el vector es un vector 5/11704. En otro aspecto, el vector es un vector 184. En otro aspecto, el vector es un vector 575. En otro aspecto, el vector es un vector 633. En otro aspecto, el vector es un vector 699/694. En otro aspecto, el vector es un vector 744. En otro aspecto, el vector es un vector 900. En otro aspecto, el vector es un vector 1090. En otro aspecto, el vector es un vector 1317. En otro aspecto, el vector es un vector 1444. En otro aspecto, el vector es un

vector 1652. En otro aspecto, el vector es un vector 1806. En otro aspecto, el vector es un vector 1807. En otro aspecto, el vector es un vector 1921/959. En otro aspecto, el vector es un vector 1921/11367. En otro aspecto, el vector es un vector 1921/11500. En otro aspecto, el vector es un vector 1921/11566. En otro aspecto, el vector es un vector 1921/12460. En otro aspecto, el vector es un vector 1921/12582. En otro aspecto, el vector es un vector 1967. En otro aspecto, el vector es un vector 2389. En otro aspecto, el vector es un vector 2425. En otro aspecto, el vector es un vector 2671. En otro aspecto, el vector es un vector 2685. En otro aspecto, el vector es un vector 3274. En otro aspecto, el vector es un vector 3550. En otro aspecto, el vector es un vector 3551. En otro aspecto, el vector es un vector 3552. En otro aspecto, el vector es un vector 4276. En otro aspecto, el vector es un vector 4277. En otro aspecto, el vector es un vector 4292. En otro aspecto, el vector es un vector 4477. En otro aspecto, el vector es un vector 5337. En otro aspecto, el vector es un vector 5348/11363. En otro aspecto, el vector es un vector 5348/11646. En otro aspecto, el vector es un vector 5348/12430. En otro aspecto, el vector es un vector 5348/12434. En otro aspecto, el vector es un vector 10072. En otro aspecto, el vector es un vector 11355C. En otro aspecto, el vector es un vector 11711A. En otro aspecto, el vector es un vector 12029. En otro aspecto, el vector es un vector 12981. En otro aspecto, el vector es un vector 13441. En otro aspecto, el vector es un vector 90666. En otro aspecto, el vector es un vector 90816. En otro aspecto, el vector es un vector 93253. En otro aspecto, el vector es un vector 907515. En otro aspecto, el vector es un vector 910716. En otro aspecto, el vector es un vector NN-*Listeria*. En otro aspecto, el vector es un vector O1761. En otro aspecto, el vector es un vector 4211. En otro aspecto, el vector es un vector 4286.

En otro aspecto, el vector de integración es cualquier otro vector de integración específico de sitio conocido en la técnica que sea capaz de infectar *Listeria*. Cada posibilidad representa un aspecto distinto de los métodos y las composiciones que se proporcionan en la presente memoria. En otro aspecto, el vector de integración o plásmido de los métodos y las composiciones que se proporcionan en la presente memoria no confiere resistencia a antibióticos a la cepa de vacuna de *Listeria*. En otro aspecto, el vector de integración o plásmido no contiene un gen de resistencia a antibióticos. Cada posibilidad representa un aspecto distinto de los métodos y las composiciones que se proporcionan en la presente memoria.

Otro aspecto descrito en la presente memoria proporciona un ácido nucleico aislado que codifica un polipéptido recombinante. En un aspecto, el ácido nucleico aislado comprende una secuencia que comparte al menos un 85% de homología con un ácido nucleico que codifica un polipéptido recombinante como se proporciona en la presente memoria. En otro aspecto, el ácido nucleico aislado comprende una secuencia que comparte al menos un 90% de homología con un ácido nucleico que codifica un polipéptido recombinante como se proporciona en la presente memoria. En otro aspecto, el ácido nucleico aislado comprende una secuencia que comparte al menos un 95% de homología con un ácido nucleico que codifica un polipéptido recombinante como se proporciona en la presente memoria. En otro aspecto, el ácido nucleico aislado comprende una secuencia que comparte al menos un 97% de homología con un ácido nucleico que codifica un polipéptido recombinante como se proporciona en la presente memoria. En otro aspecto, el ácido nucleico aislado comprende una secuencia que comparte al menos un 99% de homología con un ácido nucleico que codifica un polipéptido recombinante como se proporciona en la presente memoria.

En un aspecto, en la presente memoria se proporciona un método para producir una cepa de *Listeria* recombinante que expresa dos antígenos heterólogos distintos. En otro aspecto, la *Listeria* recombinante expresa al menos 3 o más antígenos heterólogos distintos. En otro aspecto, la *Listeria* recombinante expresa 4 o más antígenos heterólogos distintos. En otro aspecto, la *Listeria* recombinante expresa 5 o más antígenos heterólogos distintos.

En otro aspecto, el método comprende fusionar genéticamente un primer ácido nucleico que codifica un primer antígeno en el genoma de *Listeria* en un marco de lectura abierto con un polipéptido endógeno que comprende una secuencia PEST. En otro aspecto, el método comprende fusionar genéticamente al menos 2 ácidos nucleicos que codifican dos antígenos heterólogos distintos en el genoma de *Listeria* en un marco de lectura abierto con un polipéptido endógeno que comprende una secuencia PEST. En otro aspecto, el método comprende fusionar genéticamente al menos 3 ácidos nucleicos que codifican dos antígenos heterólogos distintos en el genoma de *Listeria* en un marco de lectura abierto con un polipéptido endógeno que comprende una secuencia PEST. En otro aspecto, el método comprende fusionar genéticamente al menos 4 ácidos nucleicos que codifican dos antígenos heterólogos distintos en el genoma de *Listeria* en un marco de lectura abierto con un polipéptido endógeno que comprende una secuencia PEST. En otro aspecto, el método comprende fusionar genéticamente al menos 5 ácidos nucleicos que codifican dos antígenos heterólogos distintos en el genoma de *Listeria* en un marco de lectura abierto con un polipéptido endógeno que comprende una secuencia PEST.

En otro aspecto, el método comprende transformar dicha *Listeria* recombinante con un vector de expresión episomal que comprende un segundo ácido nucleico que codifica un segundo antígeno. En otro aspecto, el método comprende transformar dicha *Listeria* recombinante con un vector de expresión episomal que comprende al menos 2 ácidos nucleicos que codifican al menos dos antígenos heterólogos distintos. En otro aspecto, el método comprende transformar dicha *Listeria* recombinante con un vector de expresión episomal que comprende al menos 3 ácidos nucleicos que codifican al menos tres antígenos heterólogos distintos. En otro aspecto, el método comprende transformar dicha *Listeria* recombinante con un vector de expresión episomal que comprende al menos 4 ácidos nucleicos que codifican al menos cuatro antígenos heterólogos distintos. En otro aspecto, el método comprende transformar dicha *Listeria* recombinante con un vector de expresión episomal que comprende al menos 5 ácidos nucleicos que codifican al menos cinco antígenos heterólogos distintos.

En otro aspecto más, el método comprende expresar dichos primer y segundo antígenos en condiciones conducentes a la expresión antigénica, que se conocen en la técnica, en dicha cepa de *Listeria* recombinante.

En otro aspecto, el método comprende transformar dicha *Listeria* recombinante con al menos 1 vector de expresión episomal que comprende los antígenos heterólogos como se describieron anteriormente en la presente memoria. En otro aspecto, el método comprende transformar dicha *Listeria* recombinante con al menos 2 vectores de expresión episomal que comprenden los antígenos heterólogos como se describieron anteriormente en la presente memoria. En otro aspecto, el método comprende transformar dicha *Listeria* recombinante con al menos 3 vectores de expresión episomal que comprenden los antígenos heterólogos como se describieron anteriormente en la presente memoria. En otro aspecto, el método comprende transformar dicha *Listeria* recombinante con al menos 4 vectores de expresión episomal que comprenden los antígenos heterólogos como se describieron anteriormente en la presente memoria.

En otro aspecto, la cepa de *Listeria* recombinante puede expresar más de dos antígenos, algunos de los cuales se expresan a partir de una o más moléculas de ácido nucleico integradas en el cromosoma de *Listeria*, y algunos de los cuales se expresan a través de uno o más vectores de expresión episomal presentes en la cepa de *Listeria* recombinante. Por lo tanto, como se describió anteriormente en la presente memoria, en un aspecto, una cepa de *Listeria* recombinante como se proporciona en la presente memoria comprende dos o más vectores de expresión episomal, cada uno de los cuales expresa un polipéptido antigénico distinto, en un aspecto. En un aspecto, uno o más de los antígenos se expresan como una proteína de fusión con LLO, que, en un aspecto, es LLO no hemolítica y, en otro aspecto, LLO truncada. En un aspecto, una cepa de *Listeria* recombinante como se proporciona en la presente memoria selecciona como objetivo los tumores provocando respuestas inmunes a dos antígenos distintos, que se expresan mediante dos tipos de células diferentes, que en un aspecto son un antígeno de superficie celular y un polipéptido anti-angiogénico, mientras que, en otro aspecto, una cepa de *Listeria* recombinante como se proporciona en la presente memoria selecciona como objetivo los tumores provocando una respuesta inmune a dos antígenos diferentes expresados por el mismo tipo de célula, que en un aspecto son el antígeno prostático específico (PSA) y el antígeno prostático específico de membrana (PSMA), que en un aspecto es FOLH1. En otro aspecto, una cepa de *Listeria* recombinante, como se proporciona en la presente memoria, se dirige a los tumores provocando una respuesta inmune a dos antígenos diferentes como se describe a continuación o como se conoce en la técnica.

En un aspecto, un primer antígeno de las composiciones y métodos descritos en la presente memoria se dirige contra un antígeno de superficie celular específico o un objetivo tumoral, y un segundo antígeno se dirige contra un antígeno angiogénico o un microentorno tumoral. En otro aspecto, el primer y segundo antígenos de las composiciones y métodos del presente documento son polipéptidos expresados por células tumorales, o, en otro aspecto, polipéptidos expresados en un microentorno tumoral. En otro aspecto, el primer antígeno de las composiciones y métodos descritos en la presente memoria es un polipéptido expresado por un tumor y el segundo antígeno de las composiciones y métodos descritos en la presente memoria es un receptor objetivo, la NO sintetasa, Arg-1 u otra enzima conocida en la técnica.

En un aspecto, en la presente memoria se proporciona un método para producir una cepa de *Listeria* recombinante que expresa dos antígenos, y el método comprende, en un aspecto, fusionar genéticamente un primer ácido nucleico que codifica un primer antígeno y un segundo ácido nucleico que codifica un segundo antígeno en el genoma de *Listeria* en un marco de lectura abierto con un polipéptido nativo que comprende una secuencia PEST. En otro aspecto, la expresión de dichos primer y segundo antígenos se produce en condiciones conducentes a la expresión antigénica en dicha cepa de *Listeria* recombinante.

En un aspecto, la cepa de *Listeria* recombinante de la composición y los métodos que se proporcionan en la presente memoria comprende un vector de expresión episomal que comprende la segunda molécula de ácido nucleico que codifica un antígeno heterólogo. En otro aspecto, la segunda molécula de ácido nucleico que codifica un antígeno heterólogo está presente en dicho vector de expresión episomal en un marco de lectura abierto con un polipéptido que comprende una secuencia PEST.

En otro aspecto, un vector de expresión episomal de los métodos y las composiciones que se proporcionan en la presente memoria comprende un antígeno fusionado en el marco de lectura a una secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia AA de tipo PEST. En un aspecto, el antígeno es HMW-MAA, y en otro aspecto, un fragmento de HMW-MAA. En otro aspecto, la secuencia AA de tipo PEST es KENSISS-MAPPASPAPKPTPIEKKHADDEIDK (SEQ ID N°: 1). En otro aspecto, la secuencia de tipo PEST es KENSISSMAP-PASPAPK (SEQ ID N°: 2). En otro aspecto, la fusión de un antígeno a cualquier secuencia de LLO que incluya una de las secuencias AA de tipo PEST enumeradas en la presente memoria puede mejorar la inmunidad mediada por células contra HMW-MAA.

En otro aspecto, la secuencia AA de tipo PEST es una secuencia de tipo PEST de una proteína ActA de *Listeria*. En otro aspecto, la secuencia de tipo PEST es KTEEQPSEVNTGPR (SEQ ID N°: 3), KASVTDTSEGDL DSSMQSADESTPQPLK (SEQ ID N°: 4), KNEEVNASDFPPPTDEELR (SEQ ID N°: 5), o RGGIPTSEEFSSLNSG DFTDDENSETTEEEIDR (SEQ ID N°: 6). En otro aspecto, la secuencia de tipo PEST es de la citolisina de *Listeria seeligeri*, codificada por el gen Iso. En otro aspecto, la secuencia de tipo PEST es RSEVTISPAETPESPPATP (SEQ ID N°: 7). En otro aspecto, la secuencia de tipo PEST es de la proteína estreptolisina O de *Streptococcus sp.* En otro aspecto, la secuencia de tipo PEST es de estreptolisina O de *Streptococcus pyogenes*, por ejemplo, KQNTASTETTTTNEQPK (SEQ ID N°: 8) en AA 35-51. En otro aspecto, la secuencia de tipo PEST es de estreptolisina

O de *Streptococcus equisimilis*, por ejemplo, KQNTANTETTTTNEQPK (SEQ ID N°: 9) en AA 38-54. En otro aspecto, la secuencia de tipo PEST tiene una secuencia seleccionada de las SEQ ID N°s: 3-9. En otro aspecto, la secuencia de tipo PEST tiene una secuencia seleccionada de las SEQ ID N°s: 1-9. En otro aspecto, la secuencia de tipo PEST es otra secuencia AA de tipo PEST derivada de un organismo procariontico.

5 La identificación de secuencias de tipo PEST es muy conocida 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 otro aspecto, a una región rica en prolina (P), ácido glutámico (E), serina (S) y treonina (T). En otro aspecto, la secuencia de tipo PEST está flanqueada por una o más agrupaciones que
10 contienen varios aminoácidos cargados positivamente. En otro aspecto, la secuencia de tipo PEST media en la degradación intracelular rápida de las proteínas que la contienen. En otro aspecto, la secuencia de tipo PEST se ajusta a un algoritmo descrito en Rogers et al. En otro aspecto, la secuencia de tipo PEST se ajusta a un algoritmo descrito en Rechsteiner et al. En otro aspecto, la secuencia de tipo PEST contiene uno o más sitios de fosforilación interna, y la fosforilación en estos sitios precede a la degradación de proteínas. En un aspecto, una secuencia a la que se hace
15 referencia en la presente memoria como una secuencia de tipo PEST es una secuencia PEST.

En un aspecto, las secuencias de tipo PEST de organismos procarionticos se identifican de acuerdo con métodos como los descritos, por ejemplo, por Rechsteiner y Rogers (1996, Trends Biochem. Sci. 21: 267-271) para LM y en Rogers S et al. (Science 1986; 234 (4774): 364-8). Alternativamente, las secuencias AA de tipo PEST de otros organismos procarionticos también se pueden identificar en base a este método. Otros organismos procarionticos en los que se
20 esperarían las secuencias AA de tipo PEST incluyen, pero sin limitación, otras especies de *Listeria*. En un aspecto, la secuencia de tipo PEST se ajusta a un algoritmo descrito en Rogers et al. En otro aspecto, la secuencia de tipo PEST se ajusta a un algoritmo descrito en Rechsteiner et al. En otro aspecto, la secuencia de tipo PEST se identifica mediante el programa PEST-find.

En otro aspecto, la identificación de los motivos PEST se logra mediante un escaneo inicial en busca de aminoácidos R, H y K cargados positivamente dentro de la secuencia de la proteína especificada. Se cuentan todos los aminoácidos entre los flancos cargados positivamente, y solo se consideran adicionalmente los motivos que contienen una cantidad de aminoácidos igual o superior al parámetro del tamaño de la ventana. En otro aspecto, una secuencia de tipo PEST
25 debe contener al menos 1 P, 1 D o E, y al menos 1 S o T.

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

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

En otro aspecto, la hidrofobicidad de un motivo PEST potencial se calcula como la suma sobre los productos del porcentaje molar y el índice de hidrofobicidad para cada especie de aminoácido. La puntuación PEST deseada se obtiene como una combinación del término de enriquecimiento local y el término de hidrofobicidad expresados por la
40 siguiente ecuación:

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

En otro aspecto, "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, utilizando el algoritmo anterior. En otro aspecto, el término se refiere a un péptido que tiene una puntuación de al menos 6. En otro aspecto, el péptido tiene una puntuación de al menos
45 7. En otro aspecto, la puntuación es de al menos 8. En otro aspecto, la puntuación es de al menos 9. En otro aspecto, la puntuación es de al menos 10. En otro aspecto, la puntuación es de al menos 11. En otro aspecto, la puntuación es de al menos 12. En otro aspecto, la puntuación es de al menos 13. En otro aspecto, la puntuación es de al menos 14. En otro aspecto, la puntuación es de al menos 15. En otro aspecto, la puntuación es de al menos 16. En otro aspecto, la puntuación es de al menos 17. En otro aspecto, la puntuación es de al menos 18. En otro aspecto, la puntuación es de al menos 19. En otro aspecto, la puntuación es de al menos 20. En otro aspecto, la puntuación es de al menos 21. En otro aspecto, la puntuación es de al menos 22. En otro aspecto, la puntuación es de al menos 22. En otro aspecto, la puntuación es de al menos 24. En otro aspecto, la puntuación es de al menos 24. En otro aspecto, la puntuación es de al menos 25. En otro aspecto, la puntuación es de al menos 26. En otro aspecto, la puntuación es de al menos 27. En otro aspecto, la puntuación es de al menos 28. En otro aspecto, la puntuación es de al menos 29. En otro aspecto,
55 la puntuación es de al menos 30. En otro aspecto, la puntuación es de al menos 32. En otro aspecto, la puntuación es de al menos 35. En otro aspecto, la puntuación es de al menos 38. En otro aspecto, la puntuación es de al menos 40. En otro aspecto, la puntuación es de al menos 45. Cada posibilidad representa un aspecto distinto de los métodos y las composiciones que se proporcionan en la presente memoria.

En otro aspecto, 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. junio de 2005; 21 Supl. 1: i169-76). En otro aspecto, se utiliza el siguiente método:

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

Cada método para identificar una secuencia de tipo PEST representa un aspecto distinto como se proporciona en la presente memoria.

10 En otro aspecto, la secuencia de tipo PEST es cualquier otra secuencia de tipo PEST conocida en la técnica. Cada secuencia de tipo PEST y su tipo representan un aspecto distinto como se proporciona en la presente memoria.

15 Un aspecto descrito en la presente memoria proporciona proteínas de fusión, que en un aspecto se expresan mediante *Listeria*. En un aspecto, tales proteínas de fusión se fusionan con una secuencia de tipo PEST que, en un aspecto, se refiere a la fusión con un fragmento de proteína que comprende una secuencia de tipo PEST. En otro aspecto, el término incluye casos en los que el fragmento de proteína comprende una secuencia circundante distinta de la secuencia de tipo PEST. En otro aspecto, el fragmento de proteína consiste en la secuencia de tipo PEST. Por lo tanto, en otro aspecto, "fusión" se refiere a dos péptidos o fragmentos de proteínas, ya sea unidos entre sí en sus respectivos extremos o incrustados uno dentro del otro. Cada posibilidad representa un aspecto distinto de los métodos y las composiciones que se proporcionan en la presente memoria.

20 En otro aspecto, una cepa de *Listeria* recombinante de las composiciones y los métodos que se proporcionan en la presente memoria comprende un polipéptido LLO de longitud completa, que en un aspecto, es hemolítico.

En otro aspecto, la cepa de *Listeria* recombinante comprende un polipéptido LLO no hemolítico. En otro aspecto, el polipéptido es un fragmento de LLO. En otro aspecto, el oligopéptido es una proteína LLO completa. En otro aspecto, el polipéptido es cualquier proteína LLO o fragmento de la misma conocido en la técnica. Cada posibilidad representa un aspecto distinto de los métodos y las composiciones que se proporcionan en la presente memoria.

25 En otro aspecto, se utiliza un fragmento de proteína LLO en las composiciones y métodos como se proporciona en la presente memoria. En un aspecto, una proteína LLO truncada está codificada por el vector de expresión episomal como se proporciona en la presente memoria que expresa un polipéptido, es decir, en un aspecto, un antígeno, en otro aspecto, un factor angiogénico o, en otro aspecto, ambos antígenos y factor angiogénico. En otro aspecto, el fragmento LLO es un fragmento N-terminal.

30 En otro aspecto, el fragmento de LLO N-terminal tiene la secuencia: MKKIMLVFITLILVSLPIAQQTEAKDASAF NKENSISVAPPASPAPKPTPIEKKHADEIDKYIQGLDYNKNNVLVYHGDAVTNVPPrKGYKDGNEYIVVEKkkksIN QNNADIQVVNAISSLTYPGALVKANSELVENQPdVLPVKRDSLTLSDLPGMTNQDNKIVVKNATKSNVNAVNTLVER WNEKYAQAYSNSVSAKIDYDDEMAYSESQLIAKFGTAFKAVNNSLNVNFGAISEGKMqEEVISFKQIYYNVNVNEPTRP SRFFGKAVTKEQLQALGVNAENPPAYISSVAYGRQVYLKSTNSHSTKVKAADFDAVSGKSVSGDVELTNIKNSSFKAVIYGGSAKDEVQIIDGNLGDRLDILKKGATFNRETGPVPIAYTTNFKDNELAVIKNNSEYIETTskAYTDGKINIDHSGG YVAQFNISWDEVNYD (SEQ ID N°: 10). En otro aspecto, una secuencia de AA de LLO de los métodos y las composiciones que se proporcionan en la presente memoria comprende la secuencia expuesta en la SEQ ID N°: 10. En otro aspecto, la secuencia de AA de LLO es un homólogo de la SEQ ID N°: 10. En otro aspecto, la secuencia de AA de LLO es una variante de la SEQ ID N°: 10. En otro aspecto, la secuencia de AA de LLO es un fragmento de la SEQ ID N°: 10. En otro aspecto, la secuencia de AA de LLO es una isoforma de la SEQ ID N°: 10. Cada posibilidad representa un aspecto distinto de los métodos y las composiciones que se proporcionan en la presente memoria.

35 En otro aspecto, el fragmento de LLO tiene la secuencia: mkkimlvfitlilvslpiaqqteakdasafnkensissvappasppaspkptpiek khadeidkyiqgldynknnvlvyhgdavtnvpprkykdgneyivvekkksinqqnadiqvvnaiissltypgalvkanselenqpdvlpvkrdslltsidlpgmtn qdnkivvknatksnvnnavntlverwnekyaqaysnvsakidyddemaysesqliakfgtafkaavnnslnvnfgaisegkmqeevisfkqiyynvvneptrpsrff gkavtkeqlqalgvnaenppayissvaygrqvylkstnshstkvkaafdaavsgksvsgdveltniiknssfkaviygg sakdevqiidgnlgdrlidilkkgatfnretgypiayttnfkdelaviknnseyietskaytd (SEQ ID N°: 11). En otro aspecto, una secuencia de AA de LLO de los métodos y las composiciones que se proporcionan en la presente memoria comprende la secuencia expuesta en la SEQ ID N°: 11. En otro aspecto, la secuencia de AA de LLO es un homólogo de la SEQ ID N°: 11. En otro aspecto, la secuencia de AA de LLO es una variante de la SEQ ID N°: 11. En otro aspecto, la secuencia de AA de LLO es un fragmento de la SEQ ID N°: 11. En otro aspecto, la secuencia de AA de LLO es una isoforma de la SEQ ID N°: 11. Cada posibilidad representa un aspecto distinto de los métodos y las composiciones que se proporcionan en la presente memoria.

45 La proteína LLO utilizada en las composiciones y métodos que se proporcionan en la presente memoria tiene, en otro aspecto, la secuencia: MKKIMLVFITLILVSLPIAQQTEAKDASAFNKENSISVAPPASPAPKPTPIE KKHAEID KYIQGLDYNKNNVLVYHGDAVTNVPPrKGYKDGNEYIVVEKkkksINQNNADIQVVNAISSLTYPGALVKANSELVEN QPDVLPVKRDSLTLSDLPGMTNQDNKIVVKNATKSNVNAVNTLVERWNEKYAQAYPNVSAKIDYDDEMAYSESQLI AKFGTAFKAVNNSLNVNFGAISEGKMqEEVISFKQIYYNVNVNEPTRPsrffgkavtkeqlqalgvnaenppayissv AYGRQVYLKSTNSHSTKVKAADFDAVSGKSVSGDVELTNIKNSSFKAVIYGGSAKDEVQIIDGNLGDRLDILKKGATFNRETGPVPIAYTTNFKDNELAVIKNNSEYIETTskAYTDGKINIDHSGGYVAQFNISWDEVNYDPEGNEIVQHKNWSE

NNKSKLAHFTSSIYLPGNARNINVYAKECTGLAWEWVRTVIDDRNLPLVKNRNIWGTTLYPKYSNKVDNPIE (nº de acceso de GenBank P13128; SEQ ID Nº: 12; la secuencia de ácido nucleico se expone en el nº de acceso de GenBank X15127). Los primeros 25 AA de la proproteína correspondientes a esta secuencia son la secuencia señal y se escinden de LLO cuando es secretada por la bacteria. Por lo tanto, en este aspecto, la proteína LLO activa de longitud completa tiene una longitud de 504 residuos. En otro aspecto, el fragmento de LLO anterior se usa como fuente del fragmento de LLO incorporado en una vacuna como se proporciona en la presente memoria. En otro aspecto, una secuencia de AA de LLO de los métodos y las composiciones que se proporcionan en la presente memoria comprende la secuencia expuesta en la SEQ ID Nº: 12. En otro aspecto, la secuencia de AA de LLO es un homólogo de la SEQ ID Nº: 12. En otro aspecto, la secuencia de AA de LLO es una variante de la SEQ ID Nº: 12. En otro aspecto, la secuencia de AA de LLO es un fragmento de la SEQ ID Nº: 12. En otro aspecto, la secuencia de AA de LLO es una isoforma de la SEQ ID Nº: 12. Cada posibilidad representa un aspecto distinto como se proporciona en la presente memoria.

La proteína LLO utilizada en las composiciones y los métodos que se proporcionan en la presente memoria tiene, en otro aspecto, la secuencia: MKKIMLVFITLILVSLPIAQTEAKDASAFNKENSIVAPPASPPASPKTPIE KKHAEIDK YIQGLDYNNKNNVLVYHGDAVTNVPVRKGYKDGNEYIVVEKKKKSINQNNADIQVVNAISSLTYPGALVKANSELVENQ PDVLPVKRDSLTLSDLPGMTNQDNKIVVKNATKSNVNNVNTLVERWNEKYAQAYSNVSAKIDYDDEMAYESQLIA KFGTAFKAVNNSLNVNFGAISEGKMQUEEVISFKQIYVNVNVEPTRPSRFFGKAVTKEQLQALGVNAENPPAYISSVA YGRQVYLKSTNSHSTKVKAADFVAASVSGKSVSGDVELTNIKNSSFKAVIYGGSAKDEVQIIDGNLGLDRDILKKGATFN RETPGVPIAYTTNFKLDNELAVIKNNSEYIETTSKAYTD (SEQ ID Nº: 13). En otro aspecto, una secuencia de AA de LLO de los métodos y las composiciones que se proporcionan en la presente memoria comprende la secuencia expuesta en la SEQ ID Nº: 13. En otro aspecto, la secuencia de AA de LLO es un homólogo de la SEQ ID Nº: 13. En otro aspecto, la secuencia de AA de LLO es una variante de la SEQ ID Nº: 13. En otro aspecto, la secuencia de AA de LLO es un fragmento de la SEQ ID Nº: 13. En otro aspecto, la secuencia de AA de LLO es una isoforma de la SEQ ID Nº: 13. Cada posibilidad representa un aspecto distinto como se proporciona en la presente memoria.

En un aspecto, la secuencia de aminoácidos del polipéptido LLO de las composiciones y los métodos que se proporcionan en la presente memoria proviene de la cepa 10403S de *Listeria monocytogenes*, como se establece en el número de acceso de Genbank: ZP_01942330, EBA21833, o está codificada por la secuencia de ácido nucleico establecida en el número de acceso de Genbank: NZ_AARZ01000015 o AARZ01000015.1. En otro aspecto, la secuencia de LLO para uso en las composiciones y los métodos que se proporcionan en la presente memoria es de *Listeria monocytogenes*, que en un aspecto es la cepa 4b F2365 (en un aspecto, el número de acceso de Genbank: YP_012823), la cepa EGD-e (en un aspecto, el número de acceso de Genbank: NP_463733), o cualquier otra cepa de *Listeria monocytogenes* conocida en la técnica.

En otro aspecto, la secuencia de LLO para uso en las composiciones y los métodos que se proporcionan en la presente memoria es de la bacteria HTCC2170 de Flavobacteriales (en un aspecto, el número de acceso de Genbank: ZP_01106747 o EAR01433; en un aspecto, codificado por el número de acceso de Genbank: NZ_AAOC01000003). En un aspecto, las proteínas que son homólogas a LLO en otras especies, como la alveolisina, que, en un aspecto, se encuentra en *Paenibacillus alvei* (en un aspecto, el número de acceso de Genbank: P23564 o AAA22224; en un aspecto, codificado por el número de acceso de Genbank : M62709) se pueden usar en las composiciones y los métodos que se proporcionan en la presente memoria. Otras proteínas homólogas de este tipo son conocidas en la técnica.

Cada proteína LLO y el fragmento de LLO representan un aspecto distinto de los métodos y las composiciones que se proporcionan en la presente memoria.

En otro aspecto, se pueden usar homólogos de LLO de otras especies, incluidas lisinas conocidas, o fragmentos de las mismas, para crear una proteína de fusión de LLO con un antígeno de las composiciones y los métodos que se proporcionan en la presente memoria, que, en un aspecto, es HMW-MAA, y en otro aspecto es un fragmento de HMW-MAA.

En otro aspecto, el fragmento de LLO de los métodos y las composiciones que se proporcionan en la presente memoria es un dominio de tipo PEST. En otro aspecto, un fragmento de LLO que comprende una secuencia PEST se utiliza como parte de una composición o en los métodos que se proporcionan en la presente memoria.

En otro aspecto, el fragmento de LLO no contiene el dominio de activación en el extremo carboxiterminal. En otro aspecto, el fragmento de LLO no incluye la cisteína 484. En otro aspecto, el fragmento de LLO es un fragmento no hemolítico. En otro aspecto, el fragmento de LLO se vuelve no hemolítico por delección o mutación del dominio de activación. En otro aspecto, el fragmento de LLO se vuelve no hemolítico por delección o mutación de la cisteína 484. En otro aspecto, una secuencia de LLO se convierte en no hemolítica por delección o mutación en otra ubicación.

En otro aspecto, el fragmento de LLO consiste en aproximadamente los primeros 441 AA de la proteína LLO. En otro aspecto, el fragmento de LLO comprende aproximadamente los primeros 400-441 AA de la proteína LLO de longitud completa de 529 AA. En otro aspecto, el fragmento de LLO corresponde a los AA 1-441 de una proteína LLO descrita en la presente memoria. En otro aspecto, el fragmento de LLO consiste en aproximadamente los primeros 420 AA de LLO. En otro aspecto, el fragmento de LLO corresponde a los AA 1-420 de una proteína LLO descrita en la presente

memoria. En otro aspecto, el fragmento de LLO consta de aproximadamente los AA 20-442 de LLO. En otro aspecto, el fragmento de LLO corresponde a los AA 20-442 de una proteína LLO descrita en la presente memoria. En otro aspecto, cualquier LLO sin el dominio de activación que comprende cisteína 484, y en particular sin cisteína 484, es adecuada para los métodos y las composiciones que se proporcionan en la presente memoria.

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

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

15 En otro aspecto, una cepa de *Listeria* recombinante de los métodos y las composiciones que se proporcionan en la presente memoria comprende una molécula de ácido nucleico integrada de forma operable en el genoma de *Listeria* como un marco de lectura abierto con una secuencia de ActA endógena. En otro aspecto, un vector de expresión episomal como se proporciona en la presente memoria comprende una proteína de fusión que comprende un antígeno fusionado a un ActA o un ActA truncado. En un aspecto, el antígeno es HMW-MAA, mientras que en otro aspecto, es un fragmento inmunogénico de HMW-MAA.

20 En un aspecto, un antígeno de los métodos y las composiciones que se proporcionan en la presente memoria se fusiona con una proteína ActA, que, en un aspecto, es un fragmento N-terminal de una proteína ActA, que, en un aspecto, comprende o consiste en los primeros 390 AA de ActA, en otro aspecto, los primeros 418 AA de ActA, en otro aspecto, los primeros 50 AA de ActA, en otro aspecto, los primeros 100 AA de ActA, que, en un aspecto, comprenden una secuencia de tipo PEST tal como se proporciona en la SEQ ID N°: 2. En otro aspecto, un fragmento

25 N-terminal de una proteína ActA utilizada en los métodos y las composiciones que se proporcionan en la presente memoria comprende o consiste en los primeros 150 AA de ActA, en otro aspecto, aproximadamente los primeros 200 AA de ActA, que en un aspecto comprenden 2 secuencias de tipo PEST como se describe en la presente memoria. En otro aspecto, un fragmento N-terminal de una proteína ActA utilizada en los métodos y las composiciones que se proporcionan en la presente memoria comprende o consiste en los primeros 250 AA de ActA, en otro aspecto, los primeros 300 AA de ActA. En otro aspecto, el fragmento de ActA contiene los residuos de una proteína ActA homóloga que corresponde a uno de los rangos de AA anteriores. Los números de los residuos no necesitan, en otro aspecto, corresponder exactamente a los números de los residuos enumerados anteriormente; por ejemplo, si la proteína ActA homóloga tiene una inserción o deleción, en relación con una proteína ActA utilizada en la presente memoria, entonces los números de los residuos pueden ajustarse en consecuencia, como sería rutinario para un técnico experto utilizando herramientas de alineación de secuencias como NCBI BLAST, que son muy conocidas en la técnica.

35 En otro aspecto, la porción N-terminal de la proteína ActA comprende 1, 2, 3 o 4 secuencias de tipo PEST, que en un aspecto son las secuencias de tipo PEST mencionadas específicamente en la presente memoria, o sus homólogos, como se describe en la presente memoria, u otras secuencias de tipo PEST como pueden determinarse usando los métodos y algoritmos descritos en la presente memoria o usando métodos alternativos conocidos en la técnica.

40 Un fragmento N-terminal de una proteína ActA utilizada en los métodos y las composiciones que se proporcionan en la presente memoria tiene, en otro aspecto, la secuencia expuesta en la SEQ ID N°: 14:

MRAMMVVFITANCITINPDIIFAATDSEDSSLNTDEWEEKTEEQPSEVNTGPRYETAREVSSRDIKELEKSNKVRNTN
KADLIAMLKEKAEKGPNNNNSEQTENAINEEASGADRPQIVERRHPGLPSDSAAEIKRRRKAASSDSELES
45 PDKPTKVNKKKVAKESVADASESDLSSMQSADESSPQPLKANQQPFPPKVFKKIKDAGKWVRDKIDENPEVKKAI
DKSAGLIDQLLTKKSEEVNASDFPPPTDEELRLALPETPMLLGFNAPATSEPSSFEFPPPTDEELRLALPETPMLL
GFNAPATSEPSSFEFPPPTDELEIIRETASSLDSSFTRGDLASLRNAINRHSQNFSDFPPIIPEEELNGRGGRP

(SEQ ID N°: 14). En otro aspecto, el fragmento de ActA comprende la secuencia expuesta en la SEQ ID N°: 14. En otro aspecto, el fragmento de ActA es cualquier otro fragmento de ActA conocido en la técnica. En otro aspecto, la proteína ActA es un homólogo de la SEQ ID N°: 14. En otro aspecto, la proteína ActA es una variante de la SEQ ID N°: 14. En otro aspecto, la proteína ActA es una isoforma de la SEQ ID N°: 14. En otro aspecto, la proteína ActA es un fragmento de la SEQ ID N°: 14. En otro aspecto, la proteína ActA es un fragmento de un homólogo de la SEQ ID N°: 14. En otro aspecto, la proteína ActA es un fragmento de una variante de la SEQ ID N°: 14. En otro aspecto, la proteína ActA es un fragmento de una isoforma de la SEQ ID N°: 14. Cada posibilidad representa un aspecto distinto como se proporciona en la presente memoria. Cada posibilidad representa un aspecto distinto como se proporciona

55 En otro aspecto, el nucleótido recombinante que codifica un fragmento de una proteína ActA comprende la secuencia expuesta en la SEQ ID N°: 15: atgctgctgatgatggtggttttcattactgccaattgcattacgattaaccccgacataatattgcagcg
acagatagcgaagattctagtctaacaacagatgaatgggaagaagaaaaacagaagagcaaccaagcgaggtaaatacgggaccaagatacgaactgc
acgtgaagtaagttcacgtgataaagaactagaaaaatcgaataaagtgagaaatacgaacaagcagacctaataagcaatgttgaagaaaaagcagaa

aaaggtccaaatatcaataataacaacagtgaaacaaactgagaatgcggctataaatgaagaggcttcaggagccgaccgaccagctatacaagtgaggcgtcg
 tcatccaggattgccatcgatagcgcagcggaaatataaaaaagaaggaaagccatagcatcatcggatagtgagcttgaagccttactatccggataaacca
 acaaaagtaataagaaaaaagtgccgaaagagtcagttgctgctgaaagtgacttagattctagatgcagtcagcagatgagcttaccacaacaccttt
 5 gattgtgataaaagtcagggttaattgaccaattattaacccaaaaagaaagtgaaagaggttaaatgcttcggactcccgccaccacctacggatgaagagtaa
 gactgctttgccagagacaccaatgcttctggttttaagtctcctgctacatcagaaccgagctcattogaattccaccaccacctacggatgaagagtaaagactgc
 ttgcccagagacgccaatgcttctggttttaagtctcctgctacatcagaaccgagctcattogaattccaccaccacctacggatgaagagtaaagactgc
 10 aaacagcatcctcgtagattctggttttaagtctcctgctacatcagaaccgagctcattogaattccaccaccacctacggatgaagagtaaagactgc
 agaagagtgtaacgggagaggcggttagacca (SEQ ID N°: 15). En otro aspecto, el nucleótido recombinante tiene la secuencia
 expuesta en la SEQ ID N°: 15. En otro aspecto, el nucleótido recombinante comprende cualquier otra secuencia que
 codifica un fragmento de una proteína ActA. Cada posibilidad representa un aspecto distinto de los métodos y las
 composiciones que se proporcionan en la presente memoria.

Un fragmento N-terminal de una proteína ActA utilizado en los métodos y las composiciones que se proporcionan en
 la presente memoria tiene, en otro aspecto, la secuencia expuesta en la SEQ ID N°: 16:
 15 MRAMMVVITANCITINPDIIFAATDSEDSSLNTDEWEEEEKTEEQPSEVNTGPRYETAREVSSRDIEELEKSNKVKNTN
 KADLIAMLKAKAEKGPNNNNNGEQTGNVAINEEASGVDRPTLQVERRHPGLSSDSAAEIKRKRKAIASSDSELESLT
 YPDKPTKANKRKVKAKESVVDASESDLSSMQSADESTPQPLKANQKPFPPKVFVKIKDAGKWVRDKIDENPEVKKAI
 DKSAGLIDQLLTKKKSEEVNASDFPPPPPTDEELRLALPETPMLLGFNAPTPSEPSSEFFPPPPPTDEELRLALPETPMLL
 20 GFNAPATSEPSSEFFPPPPPTDELEIMRETAPSLDSSFTSGDLASLRSAINRHSNFSDFLIPTTEELNGRGGRP
 (SEQ ID N°: 16), que en un aspecto es los primeros 390 AA para ActA de *Listeria monocytogenes*, cepa 10403S. En
 otro aspecto, el fragmento ActA comprende la secuencia expuesta en la SEQ ID N°: 16. En otro aspecto, el fragmento
 de ActA es cualquier otro fragmento de ActA conocido en la técnica. En otro aspecto, la proteína ActA es un homólogo
 de la SEQ ID N°: 16. En otro aspecto, la proteína ActA es una variante de la SEQ ID N°: 16. En otro aspecto, la proteína
 ActA es una isoforma de la SEQ ID N°: 16. En otro aspecto, la proteína ActA es un fragmento de la SEQ ID N°: 16. En
 25 otro aspecto, la proteína ActA es un fragmento de un homólogo de la SEQ ID N°: 16. En otro aspecto, la proteína ActA
 es un fragmento de una variante de la SEQ ID N°: 16. En otro aspecto, la proteína ActA es un fragmento de una
 isoforma de la SEQ ID N°: 16. Cada posibilidad representa un aspecto distinto de los métodos y las composiciones
 que se proporcionan en la presente memoria.

En otro aspecto, el nucleótido recombinante que codifica un fragmento de una proteína ActA comprende la secuencia
 30 expuesta en la SEQ ID N°: 17: atgctgctgcatgagtgtagtttctactctgccaactgcattacgattaaccccgacataatattgcagc
 gacagatagcgaagattccagctctaaacacagatgaatgggaagaagaaaaacagaagagcagccaagcagagtaataacgggaccaagatacgaact
 gacgtgaagtaagttcacgtgatattggaactagaaaaatcgataaaagtgaaaaatcgaacaaagcagactaatgcaatgttgaagcaaaaagcag
 agaaaggtccgaaataacaataataacaacgggtgagcaaacaggaatgtggctataaatgaagaggcttcaggagtcgaccgaccaactctgcaagtgagcg
 35 tgcgcatccaggctgctcagatagcgcagcggaaatataaaaaagaagaaagccatagcgtcgtcgatagtgagcttgaagccttactatccagataaac
 caaaaaagcaataagagaaaaagtgccgaaagagtcagttgtggatgcttctgaaagtgacttagattctagatgcagtcagcagagctctacaccacaac
 cttaaaagcaaatcaaaaaccattttccctaaagtattataaaaaataaaagatcggggaaatgggtacgtgataaaatcgacgaaaatcctgaaagtaaagaa
 agcgattgtgataaaagtcagggttaattgaccaattattaacccaaaaagaaagtgaaagaggttaaatgcttcggactcccgccaccacctacggatgaagagt
 taagactgctttgccagagacccgatgcttctggttttaagtctcctactcctacatcggaaccgagctcattcgaattcccgccgaccacctacggatgaagagtaagac
 40 ttgctttgccagagcgaatgcttctggttttaagtctcctactcctacatcggaaccgagctcattcgaattcccgccgaccacctacggatgaagagtaagac
 ggaaacagcacctcgtagattctggttttaagtctcctactcctacatcggaaccgagctcattcgaattcccgccgaccacctacggatgaagagtaagac
 gaagaagagtgtaacgggagaggcggttagacca (SEQ ID N°: 17), que, en un aspecto, son los primeros 1170 nucleótidos que
 codifican ActA en la cepa 10403S de *Listeria monocytogenes*. En otro aspecto, el nucleótido recombinante tiene la
 secuencia expuesta en la SEQ ID N°: 17. En otro aspecto, el nucleótido recombinante comprende cualquier otra
 secuencia que codifica un fragmento de una proteína ActA. Cada posibilidad representa un aspecto distinto de los
 45 métodos y las composiciones que se proporcionan en la presente memoria.

En otro aspecto, el fragmento de ActA es otro fragmento de ActA conocido en la técnica, que, en un aspecto, es
 cualquier fragmento que comprende una secuencia PEST. Por lo tanto, en un aspecto, el fragmento de ActA son los
 aminoácidos 1-100 de la secuencia de ActA. En otro aspecto, el fragmento de ActA son los aminoácidos 1-200 de la
 secuencia de ActA. En otro aspecto, el fragmento de ActA son los aminoácidos 200-300 de la secuencia de ActA. En
 50 otro aspecto, el fragmento de ActA son los aminoácidos 300-400 de la secuencia de ActA. En otro aspecto, el
 fragmento de ActA son los aminoácidos 1-300 de la secuencia de ActA. En otro aspecto, un nucleótido recombinante
 como se proporciona en la presente memoria comprende cualquier otra secuencia que codifique un fragmento de una
 proteína ActA. En otro aspecto, el nucleótido recombinante comprende cualquier otra secuencia que codifique una
 proteína ActA completa. Cada posibilidad representa un aspecto distinto de los métodos y las composiciones que se
 55 proporcionan en la presente memoria.

En un aspecto, la secuencia de ActA para uso en las composiciones y los métodos que se proporcionan en la presente
 memoria es de *Listeria monocytogenes*, que en un aspecto es la cepa EGD, la cepa 10403S (número de acceso de
 Genbank: DQ054585) la cepa NICPBP 54002 (número de acceso de Genbank : EU394959), la cepa S3 (número de
 acceso de Genbank: EU394960), la cepa NCTC 5348 (número de acceso de Genbank: EU394961), la cepa NICPBP
 60 54006 (número de acceso de Genbank: EU394962), la cepa M7 (número de acceso de Genbank: EU394963), la cepa
 S19 (número de acceso de Genbank: EU394964), o cualquier otra cepa de *Listeria monocytogenes* que se conoce en
 la técnica.

En un aspecto, la secuencia de la región *actA* deletada en la cepa, LmddΔ*actA* es como sigue:
 gcgccaatcattggtgattggtgaggatgtctgtgctggtgctgagatggcggaataagaagcattaagatcctgacaaatataatcaagcggctcatatg
 aaagattacgaatcgtccactcacagaggaaggcactggggcggagtccattataatagtggtatcccgataaagcagcctataatactactactaaacttga
 5 ataggtgaagatgcttcaaaaagtgtgctgaagctgggaagcagttgggtaactgattaacaaatgttagagaaaaataattctccaagtgtatcttaaaata
 atcatgaatatttttcttattagctaattaagaagataactgactaatccaatttaacggaacaaatagtgaaaatgaaggcgaattttcctgttctaaaaag
 gttgtattagcgtatcagaggagggtataagtggtataaacagattatgctgctgagatggtggtttcattactgccaattgcaattaccccgacgctc
gacccatacgcgtaattctgcaatgttagctattggcgtgtctctttaggggcggttaacaaatattcaattaagaaaaataaataaaaaacacagaacgaaaga
 10 **aaaagtgggtgaatgatgaaattcaaaaagggtgtctaggtatgtgcttgcgaagtgttagtcttccggaacgataaaagcaaatgctgttgtgatgaa**
 tacttacaacaccccgagctccgatgatattgacagcaaataccacataaacttagttgctcgggataacccgacaaatactgacgtaatacgcactattgg
 cttttaaacagcggaaaaaatactagtaaagatgtaaatcatatgagcgaatattgaatgaactaaaaaattcgataacaaatagctcaaggaatattg
 atgcgatcataaaatccatattgatactagctattttatctctttataatcctgatagagataatactattgcccgggtttgtaatgcaaaataacaggagc
 a aagatttcaatcaatcggtagctgattaccgagaaggaa (SEQ ID N°: 18). En un aspecto, la región subrayada contiene el
 15 elemento de secuencia de *actA* que está presente en la cepa LmddΔ*actA*. En un aspecto, la secuencia en negrita
 gtcgac representa el sitio de unión de la secuencia NT y CT.

En un aspecto, la cepa de *Listeria* recombinante de las composiciones y los métodos que se proporcionan en la presente memoria comprende una primera o segunda molécula de ácido nucleico que codifica un antígeno asociado a melanoma de alto peso molecular (HMW-MAA) o, en otro aspecto, un fragmento de HMW-MAA.

En un aspecto, HMW-MAA también se conoce como condroitina sulfato proteoglicano de melanoma (MCSP), y en otro aspecto, es una proteína unida a la membrana de 2322 residuos. En un aspecto, el HMW-MAA se expresa en más del 90% de las lesiones de nevos benignos y melanomas extirpados quirúrgicamente, y también se expresa en el carcinoma de células basales, tumores de origen de la cresta neural (por ejemplo, astrocitomas, gliomas, neuroblastomas y sarcomas), leucemias infantiles y lesiones de carcinomas de mama lobulillares. En otro aspecto, HMW-MAA se expresa a nivel elevado tanto en pericitos activados como en pericitos de la vasculatura angiogénica tumoral que, en otro aspecto, está asociada con la neovascularización *in vivo*. En otro aspecto, la inmunización de ratones con *Listeria* recombinante, como se proporciona en la presente memoria, que expresa un fragmento de HMW-MAA (residuos 2160 a 2258), perjudica el crecimiento de tumores no modificados para expresar HMW-MAA (Figura 9D). En otro aspecto, la inmunización de ratones con *Listeria* recombinante que expresa un fragmento de HMW-MAA (residuos 2160 a 2258) disminuye el número de pericitos en la vasculatura del tumor. En otro aspecto, la inmunización de ratones con *Listeria* recombinante que expresa un fragmento de HMW-MAA (residuos 2160 a 2258) causa la infiltración de células T CD8⁺ alrededor de los vasos sanguíneos y en el tumor.

En un aspecto, un homólogo murino de HMW-MAA, conocido como NG2 o AN2, tiene un 80% de homología con HMW-MAA, así como un patrón y función de expresión similares. En otro aspecto, HMW-MAA se expresa a nivel elevado tanto en pericitos activados como en pericitos en la vasculatura angiogénica del tumor. En un aspecto, los pericitos activados están asociados con la neovascularización *in vivo*. En un aspecto, los pericitos activados están implicados en la angiogénesis. En otro aspecto, la angiogénesis es importante para la supervivencia de los tumores. En otro aspecto, los pericitos de la vasculatura angiogénica tumoral están asociados con la neovascularización *in vivo*. En otro aspecto, los pericitos activados son células importantes en el desarrollo vascular, la estabilización, la maduración y la remodelación. Por lo tanto, en un aspecto, además de su papel como antígeno asociado a tumor, HMW-MAA también es un objetivo universal potencial para la anti-angiogénesis que utiliza un enfoque inmunoterapéutico. Como se describe en la presente memoria (Ejemplo 8), los resultados obtenidos utilizando una vacuna basada en *Lm* contra este antígeno han respaldado esta posibilidad.

En otro aspecto, uno de los antígenos de los métodos y las composiciones que se proporcionan en la presente memoria se expresa en pericitos activados. En otro aspecto, al menos uno de los antígenos se expresa en pericitos activados.

La proteína HMW-MAA de la que derivan los fragmentos de HMW-MAA que se proporcionan en la presente memoria es, en otro aspecto, una proteína HMW-MAA humana. En otro aspecto, la proteína HMW-MAA es una proteína de ratón. En otro aspecto, la proteína HMW-MAA es una proteína de rata. En otro aspecto, la proteína HMW-MAA es una proteína de primate. En otro aspecto, la proteína HMW-MAA es de cualquier otra especie conocida en la técnica. En otro aspecto, la proteína HMW-MAA es proteoglicano de condroitina sulfato de melanoma (MCSP). En otro aspecto, una proteína AN2 se usa en los métodos y las composiciones que se proporcionan en la presente memoria. En otro aspecto, una proteína NG2 se usa en los métodos y las composiciones que se proporcionan en la presente memoria.

En otro aspecto, la proteína HMW-MAA de los métodos y las composiciones como se proporcionan en la presente memoria tiene la secuencia: MQSGRGPPLPAPGLALALTLMLARLASAASFFGENHLEVPVATALTDIDLQLQFS
 55 TSQPEALLLLAAGPADHLLQLYSGRLQVRLVLGQEELRLQTPAETLLSDSIPHTVVLTVEGWATLSVDGFLNASSAV
 PGAPLEVPYGLFVGGTGLGLPYLRGTSRPLRGCLHAATLNRSLLRPLTPDVHEGCAEEFSASDDVALGFSGPHSL
 AAFPWGTQDEGTLEFTLTTQSRQAPLAFQAGGRRGDFIYVDIFEGHLRAVVEKGQGTVLLHNSVPVADGQPHEVSV
 HINahrLEISVDQYPTHTSNRGVLSYLEPRGSLLLGGLDAEASRHLQEHRLGLTPEATNASLLGCMEDLSVNGQRRGL
 REALLTRNMAAGCRLEEEYEDDAYGHYEAFTLAPAEAWPAMELPEPCVPEPGLPPVFANFTQLLITISPLVVAEGGT
 60 AWLEWRHVQPTLDLMEALRKSQVLFVTRGARHGELELDIPGAQARKMFTLLDVVNRKARFIHDGSEDTSQQLVLE
 VSVTARVPMPSCLRGQTYLLPIQVNPVNDPPHIFPHGSLMVILEHTQKPLGPEVVFQAYDPDSACEGLTFQVLGTSS

gaccattgcccctagaggcccactggccccactgaagctggtccggcacaagaagatctacgtcttccaggagaggcagctgagatcagaaggaccagctgg
 aggcagcccaggaggcagtgccacctgcagacatcgtattctcagtggaagaccaccagagtgccggctacctggtaggtgctcgtggccttggcagatga
 gccaccagcctggaccctgtgcagagcttcccaggaggcagtgacacaggcagggtcctgtacctgactcccggcctgaggcctggagcagatgcttctcg
 ctggatgtggcctcaggcctgggtgctcccctcagggcgtccttctggagctggaggtgctgcccgtgctatcccactagagggcgaacactcagcgtcccctgag
 5 ggtgagcagcctcaccctggcccctcactgctccgtgctcggggccctacttcccactctcctgggctcagcctgacaggtgctgagccaccccagcagtgaggcc
 ctgcagaaggaggacggacctcaagccaggaccctcagcgtcttctctggagaatggtggaagagcagctgatccgtactcgtgatgacgggagcagacac
 tgacagacagtttctctgatggctaatgctccgagatggatgccaagagccatcctgtggcctcactgctactgctcgtcaatgaccaacccccatcctca
 ctacaacacagggcctgcatggtgggagggggccactgcctcaccctcgggaggtctgagggagcagcgacggcagctcgggtctgagggatctgggtctaca
 10 ccatcgagcagcccagcaacgggcggtgtagtctgctggggggcgccgggactgaggtgctgagcttccagcaggcccagctggacggcggtctgctgtt
 ctcacacagaggaaccctggatggaggctcggctcctcagcggcagcacttccccggacacttctcggagtacggcccagaagcaagtctcc
 tctcgtgaaggcagccagacactgactgctgcccagggtcctgacccactcagcagctcagaccctcaggggcagctccagcagcaggcactgacccccag
 ctctcgtctaccgtgtggtgctggggccccagctagggcgtgttccacgcccagcagcagcagcaggggagggcctggtaacttactcaggcagaggtct
 acgtgggaatattctgatgagcatgagatgcccccgagccctttggaggcccatgataccctagagctccagctgctcctcggcctgcccgggacgtggcgg
 ccacctgtgtggtgctgtttgaggctcctgtcccagcggcccagccacttggagaagaacaaaggctctgggtccccgaggggcagcggggcaggatc
 15 ccagtggctgctcctcctcaatcttggccagcggcctcctcctcagctcagctccagctggctgagggcagctagtgctcttccaggctcacaagttcccagcgggacg
 tgttgtgctcggaggagcccctcctgctgggagcccacttctcagctccagctggctgagggcagctagtgatgcccacggcggtgggggaccccagca
 ggatggtctccacttctgctcccactccaggggcagcaggggctcctggtgagcccaacctcagaggccttggcatcacggtgagggatgaaatgag
 cggcccctcagccacaggcctctgctcccactccggctcaccgaggctcctgctgccccatctcccgggcccagctgagtggtggaccagactcagctcctgg
 ggagatgagtagcagggtccagcgggacccccacaacggcttctcagcctggtggtggtggtgctggggcccgtgacccgctcagcgaacccgatgtgattca
 20 gggcggtggtcctctggtggcaacgggagcagcgtggcaggtcctccagctgagcagctgctgatggggccagcccaccctgcccctgctcctggtgacat
 cctaccatccgcatcgaggtgacgtcgggaccccctggaggtgcccgaagcttggggcgtcctcactgagccagcagcagctcgggtggtttcagatcgg
 gaggagccagagcagcatacccgctcaccagggaccctcagctatggcactcctggtggcgggcggcccactcggcctcagcgaactccagatagacca
 gggcgagggtgcttggcctcaccacacttctcctcctcctatgaccactcagagctcctgagctggtgtaggggtgcaatgcatcagccgtagtgaactcactgtgag
 25 ggtcctgctgcatgtgtggcaggtggccatggccccagggtgccaccctgcgctggaccaccctcctagatgctggcgagctggccaaccgcacaggcag
 tgtcggcgtcctcggcctcctggaggaccaccggatggcggctgttccgctgcccagcagcaggagcggggggcagccagctggtggagcagttca
 ctacagcaggacctgagcagggaggctgggctgagggtggcaggccaggggagggcccccgcccagcaggtgacagctcactctgagcgtgtggg
 cacaggcgtcccgcctgctgtggcctcctggacttggcactgagccttacaatgctgcccggccctacagcgtggccctgctcagtgccccgagggcggcccgg
 acggaagcagggaaagccagagagcagcacccccacaggcagcaggcccatggcatccagccctgagcccgtggtggcaaggggaggttctcctgagctt
 30 ctgagggccaacatggtcagcgtcactcctcccagtgctggtgacttctgctcctggcgtcactcctgcccctgcttctcactccgaaacgcaacaagacgggcaa
 gcatgacgtccaggtctgactgccaagccccgacggcctggtggtgacaccgagaccttctgcaagggtgagccaggccaggccatcccgtcacagctgt
 gcctggccagggggccccctcagggaggccagcctgaccagagctgctgacgttctcgggacaccaacctgccccttaagaatggccagctactgggtgtagg
 cctggcctggggcccagatgctgacgggcccagggaca ggc (SEQ ID N°: 20). En otro aspecto, el nucleótido recombinante tiene la
 secuencia expuesta en la SEQ ID N°: 20. En otro aspecto, un nucleótido que codifica HMW-MAA de los métodos y las
 composiciones que se proporcionan en la presente memoria comprende la secuencia expuesta en la SEQ ID N°: 20.
 35 En otro aspecto, el nucleótido que codifica HMW-MAA es un homólogo de la SEQ ID N°: 20. En otro aspecto, el
 nucleótido que codifica HMW-MAA es una variante de la SEQ ID N°: 20. En otro aspecto, el nucleótido que codifica
 HMW-MAA es un fragmento de la SEQ ID N°: 20. En otro aspecto, el nucleótido que codifica HMW-MAA es una
 isoforma de la SEQ ID N°: 20. Cada posibilidad representa un aspecto distinto de los métodos y las composiciones
 que se proporcionan en la presente memoria.
 40 En otro aspecto, la proteína HMW-MAA de los métodos y las composiciones que se proporcionan en la presente
 memoria tiene una secuencia de AA establecida en una entrada de GenBank que tiene un número de acceso
 seleccionado de NM_001897 y X96753. En otro aspecto, la proteína HMW-MAA está codificada por una secuencia de
 nucleótidos establecida en una de las entradas de GenBank anteriores. En otro aspecto, la proteína HMW-MAA
 45 comprende una secuencia establecida en una de las entradas de GenBank anteriores. En otro aspecto, la proteína
 HMW-MAA es un homólogo de una secuencia establecida en una de las entradas de GenBank anteriores. En otro
 aspecto, la proteína HMW-MAA es una variante de una secuencia establecida en una de las entradas de GenBank
 anteriores. En otro aspecto, la proteína HMW-MAA es un fragmento de una secuencia expuesta en una de las entradas
 de GenBank anteriores. En otro aspecto, la proteína HMW-MAA es una isoforma de una secuencia establecida en una
 de las entradas de GenBank anteriores. Cada posibilidad representa un aspecto distinto de los métodos y las
 50 composiciones que se proporcionan en la presente memoria.
 El fragmento de HMW-MAA utilizado en la presente descripción comprende, en otro aspecto, los AA 360-554. En otro
 aspecto, el fragmento consiste esencialmente en los AA 360-554. En otro aspecto, el fragmento consiste en los AA
 360-554. En otro aspecto, el fragmento comprende los AA 701-1130. En otro aspecto, el fragmento consiste
 esencialmente en los AA 701-1130. En otro aspecto, el fragmento consiste en los AA 701-1130. En otro aspecto, el
 55 fragmento comprende los AA 2160-2258. En otro aspecto, el fragmento consiste esencialmente en 2160-2258. En otro
 aspecto, el fragmento consta de 2160-2258. Cada posibilidad representa un aspecto distinto de los métodos y las
 composiciones que se proporcionan en la presente memoria.
 En otro aspecto, la *Listeria* recombinante de las composiciones y los métodos que se proporcionan en la presente
 memoria comprende un plásmido que codifica un polipéptido recombinante que es, en un aspecto, angiogénico, y en
 60 otro aspecto, antigénico. En un aspecto, el polipéptido es HMW-MAA, y en otro aspecto, el polipéptido es un fragmento
 de HMW-MAA. En otro aspecto, el plásmido codifica además un péptido distinto de HMW-MAA. En un aspecto, el
 péptido distinto de HMW-MAA potencia la inmunogenicidad del polipéptido. En un aspecto, el fragmento de HMW-
 MAA de los métodos y las composiciones que se proporcionan en la presente memoria se fusiona con la secuencia

de AA distinta de HMW-MAA. En otro aspecto, el fragmento de HMW-MAA está incorporado dentro de la secuencia de AA distinta de HMW-MAA. En otro aspecto, un péptido derivado de HMW-MAA se incorpora en un fragmento de LLO, proteína o fragmento de ActA, o secuencia de tipo PEST. Cada posibilidad representa un aspecto distinto de los métodos y las composiciones que se proporcionan en la presente memoria.

5 El péptido distinto de HMW-MAA es, en un aspecto, un oligopéptido de listeriolisina (LLO). En otro aspecto, el péptido distinto de HMW-MAA es un oligopéptido de ActA. En otro aspecto, el péptido distinto de HMW-MAA es un oligopéptido de tipo PEST. En un aspecto, la fusión a LLO, ActA, las secuencias de tipo PEST y sus fragmentos potencia la inmunogenicidad de antígenos mediada por células. En un aspecto, la fusión a LLO, ActA, secuencias de tipo PEST y sus fragmentos potencia la inmunogenicidad de antígenos mediada por células en una variedad de sistemas de expresión. En otro aspecto, el péptido distinto de HMW-MAA es cualquier otro péptido inmunogénico distinto de HMW-MAA conocido en la técnica. Cada posibilidad representa un aspecto distinto de los métodos y las composiciones que se proporcionan en la presente memoria.

15 En un aspecto, la cepa de *Listeria* recombinante de las composiciones y los métodos que se proporcionan en la presente memoria expresa un polipéptido antigénico heterólogo que se expresa en una célula tumoral. En un aspecto, la cepa de *Listeria* recombinante de las composiciones y los métodos que se proporcionan en la presente memoria comprende una primera o segunda molécula de ácido nucleico que codifica un antígeno prostático específico (PSA), que en un aspecto, es un marcador del cáncer de próstata que se expresa a nivel elevado en los tumores de próstata, que en un aspecto es el tipo de cáncer más frecuente en los hombres estadounidenses y, en otro aspecto, es la segunda causa de muerte relacionada con el cáncer en los hombres estadounidenses. En un aspecto, el PSA es una calicreína con actividad de serín proteasa (KLK3) secretada por las células epiteliales prostáticas, que, en un aspecto, se usa ampliamente como marcador del cáncer de próstata.

20 En un aspecto, la cepa de *Listeria* recombinante que se proporciona en la presente memoria comprende una molécula de ácido nucleico que codifica la proteína KLK3.

25 En otro aspecto, la proteína KLK3 tiene la secuencia: MWVPVFLTSLVWIGAAPLILSRIVGGWECEKH SQPWQVLVASRGRAVCGGVLVHPQWVLTAAHCIRNKSVILLGRHSLFHPEDTGQVFQVSHSFPHPPLYDMSLLKNRFL RPDGDDSSHDLMMLRLSEPAELTDAVKVMDLPTQEPALGTTTCYASGWGSIPEEFLLTPKKLQCVDLHVISNDVCAQVH PQKVTKFMLCAGRWTGGKSTCSGDSGGPLVCNGVITSWGSEPCALPERPSLYTKVVHYRKWIKDTIVANP (SEQ ID N°: 21; n° de acceso de GenBank CAA32915). En otro aspecto, la proteína KLK3 es un homólogo de la SEQ ID N°: 21. En otro aspecto, la proteína KLK3 es una variante de la SEQ ID N°: 21. En otro aspecto, la proteína KLK3 es un isómero de la SEQ ID N°: 21. En otro aspecto, la proteína KLK3 es un fragmento de la SEQ ID N°: 21. Cada posibilidad representa un aspecto distinto de los métodos y las composiciones que se proporcionan en la presente memoria.

35 En otro aspecto, la proteína KLK3 tiene la secuencia: IVGGWECEKHSQPWQVLVASRGRAVCGGVLVHPQWV LTAHCIRNKSVILLGRHSLFHPEDTGQVFQVSHSFPHPPLYDMSLLKNRFLRPDGDSSHDLMMLRLSEPAELTDAVKV MDLPTQEPALGTTTCYASGWGSIPEEFLLTPKKLQCVDLHVISNDVCAQVHPQKVTKFMLCAGRWTGGKSTCSGDSG GPLVCYGVLQGITSWGSEPCALP-ERPSLYTKVVHYRKWIKDTIVANP (SEQ ID N°: 22). En otro aspecto, la proteína KLK3 es un homólogo de la SEQ ID N°: 22. En otro aspecto, la proteína KLK3 es una variante de la SEQ ID N°: 22. En otro aspecto, la proteína KLK3 es un isómero de la SEQ ID N°: 22. En otro aspecto, la proteína KLK3 es un fragmento de la SEQ ID N°: 22. Cada posibilidad representa un aspecto distinto de los métodos y las composiciones que se proporcionan en la presente memoria.

45 En otro aspecto, la proteína KLK3 tiene la secuencia: IVGGWECEKHSQPWQVLVASRGRAVCGGVLVHPQWV LTAHCIRNKSVILLGRHSLFHPEDTGQVFQVSHSFPHPPLYDMSLLKNRFLRPDGDSSHDLMMLRLSEPAELTDAVKVMDLP TQEPALGTTTCYASGWGSIPEEFLLTPKKLQCVDLHVISNDVCAQVHPQKVTKFMLCAGRWTGGKSTCSGDSGGPLV CNGVITSWGSEPCALP-ERPSLYTKVVHYRKWIKDTIVANP (SEQ ID N°: 23; n° de acceso de GenBank AAA59995.1). En otro aspecto, la proteína KLK3 es un homólogo de la SEQ ID N°: 23. En otro aspecto, la proteína KLK3 es una variante de la SEQ ID N°: 23. En otro aspecto, la proteína KLK3 es un isómero de la SEQ ID N°: 23. En otro aspecto, la proteína KLK3 es un fragmento de la SEQ ID N°: 23. Cada posibilidad representa un aspecto distinto de los métodos y las composiciones que se proporcionan en la presente memoria.

50 En otro aspecto, la proteína KLK3 está codificada por una molécula de nucleótidos que tiene la secuencia: ggtgtcttaggcacactggtctgagtgcaagatctagcagctgaggctttagtaagaatcgggatcgaccaccctggttctgttcatcctggcatgtc tcctctgcttctgcccctagatgaagtctccatgagctacaagggcctggtgatccagggtgatctagtaattgcagaacagcaagtctgactctccctcccctcca cagctctgggtgaggagggggtgtccagcctccagcagctggggaggccttggcagcctctgggtgccagcaggcaggggcggagctctggggaatga aggtttatagggtcctgaggaggctcccagcccagcttaccacctgaccggagagctgtgaccatgtgggtccgggtgtcttctcaccctgtccgtga cgtgattggtgagaggggccatggtgggggatgaggagaggagccagccctgactgtcaagctgaggctcttccccccaaccagcaccagcccagccc gacaggagactgggctcttctgtctcccagcccactcaagcccataccccagctcccctcatattgcaacagctcctcactcccacaccagggtcccgcctcct cccacttaccagaaacttctcccattgcccagccagctccctgctcccagctgcttactaaagggaagtctcctgggatctcctggttcttcttggggctcaaa acctcaaggacctctcaatgcatggttctggaccgtatcactggtccatctcctgaccctcaatcctatcacagtactgactttccattcagctgtgagtg tccaacctatcccagagacctgatgctggcctcccaatctgcccagtagataccagatgccaaccagacacctcttcttctgaccaggctatctggcctgaga caacaaatgggtcctcagctgtgcaatgggactctgagaactcctcattcctgactcttagccccagactcttattcagtgccacatttcttaggaaaaacatg agcatccccagccacaactgcccagctctgagctcccaaatctgcatcttctcaaacctaaaacaaaagaaaacaaaataaaaacaaaactcagac

cagggggcaaaagcacctgctctgggtcattctgatcaccgaactgacatgccagccctgccgatggctcctcatggctccttagtgcctggagaggaggtgct
tagtcagagagtagtctggaaggtggcctctgtaggagaccacggggacagcatcctgcagatggctcctggccctgtcccaccgacctgtacaaggactgctc
cgtggaccctcccctctgcacaggagctggaccctgaagtcctcccaccggccaggactggaccctaccctctgttgaatccctgccaccctctcttgaa
gtcggctctggagacatttctcttccaagctgggaactgctatctgtatctgcctgaccagctgaaagataggattgccaggcagaaactgggactgacct
5 atctcactctcctcctgctttacccttaggggtgattctggggcccaactgtctgtaatgggtgctcaaggatcacgtcatggggcagtgaaacctgtgccctgcccga
aaggcctcctgtacaccaaggtggtgactaccggaagtgatcaaggacaccatctggccaaccctgagcaccctatcaacccctattgtagaaactg
gaacctggaaatgaccaggccaagactcaagcctcccagttctactgacctgtcttaggtgtgaggccagggtgtaggaaaagaatcagcagacacag
gtgtagaccagaggtttctaaatgggtgtaatttgcctctctgctgctggggaatactggccatgctggagacatatactcaatttctgaggacacagataggat
10 ggggtgctgtgtatttgggggtacagagatgaaagaggggtggatccacactgagagagtgagagtgacatgtctggacactgtccatgaagcactgagc
agaagctggaggcacaacgcaccagacactcacagaaggatggagctgaaaacataaccactgtcctggaggcactgggaagcctagagaaggctgtg
agccaaggaggagggtctcctttgcatggatggggatgaagtaaggagaggactggaccctggaagctgattcactatggggggagggtgattgaagct
ctccagacaaccctcagattgatgattcctagtagaactcacagaaataaagagctgttatactgtg (SEQ ID N°: 26; número de acceso de
GenBank NM_001030047). En otro aspecto, la proteína KLK3 está codificada por los residuos 42-758 de la SEQ ID
N°: 26. En otro aspecto, la proteína KLK3 está codificada por un homólogo de la SEQ ID N°: 26. En otro aspecto,
15 la proteína KLK3 está codificada por una variante de la SEQ ID N°: 26. En otro aspecto, la proteína KLK3 está codificada
por un isómero de la SEQ ID N°: 26. En otro aspecto, la proteína KLK3 está codificada por un fragmento de la SEQ ID
N°: 26. Cada posibilidad representa un aspecto distinto de los métodos y las composiciones que se proporcionan en
la presente memoria.

En otro aspecto, la proteína KLK3 tiene la secuencia: MWVPPVFLTLSTWIGAAPLILSRIVG-
GWECEKHSQPWQVLVASRGRAVCGGLVHPQWVLTAAHCIRK (SEQ ID N°: 27; número de acceso de GenBank
NP_001025221). En otro aspecto, la proteína KLK3 es un homólogo de la SEQ ID N°: 27. En otro aspecto, la proteína
KLK3 es una variante de la SEQ ID N°: 27. En otro aspecto, la secuencia de la proteína KLK3 comprende la SEQ ID
N°: 27. En otro aspecto, la proteína KLK3 es un isómero de la SEQ ID N°: 27. En otro aspecto, la proteína KLK3 es un
20 fragmento de la SEQ ID N°: 27. Cada posibilidad representa un aspecto distinto de los métodos y las composiciones
que se proporcionan en la presente memoria.

En otro aspecto, la proteína KLK3 está codificada por una molécula de nucleótidos que tiene la secuencia:
agccccagcttaccacctgaccccgagagctgtgacaccatggtgctcccggtgtcttctcaccctcctgacgtggattggtgctgacccctcatcctgtctog
gattgtggaggctggagtgcgagaagcattcccaaccctggcaggtgctgtggcctctctgagcaggcagctgctggcggtgttctgtgacccccagtggt
30 cctcacagctgcccactgcatcaggaagtgagtagggcctgggtctggggagcaggtgctgtgctccagaggaataacagctggcatttccccaggataac
cttaaggccagcctgggactggggagagagggaaagtctggttcaggctcacatggggaggcaggggtggggctggaccaccctcccctggtgctctgggtc
tccatctgtctctatgtctcttctgtcgtcttctcattatgtctctgtaactggctcctgggtgtgctctcctgctgactatttctctctcctctctctctctcagt
(SEQ ID N°: 28; n° de acceso de GenBank NM_001030050). En otro aspecto, la proteína KLK3 está codificada por los
residuos 42-758 de la SEQ ID N°: 28. En otro aspecto, la proteína KLK3 está codificada por un homólogo de la SEQ
ID N°: 28. En otro aspecto, la proteína KLK3 está codificada por una variante de la SEQ ID N°: 28. En otro aspecto,
35 la proteína KLK3 está codificada por un isómero de la SEQ ID N°: 28. En otro aspecto, la proteína KLK3 está codificada
por un fragmento de la SEQ ID N°: 28. Cada posibilidad representa un aspecto distinto de los métodos y las
composiciones que se proporcionan en la presente memoria.

En otro aspecto, la proteína KLK3 que es la fuente del péptido KLK3 tiene la secuencia: MWVPPVFLTLSTWIG
AAPLILSRIVGGWECEKHSQPWQVLVASRGRAVCGGLVHPQWVLTAAHCIRNKSIVLLGRHSLFHPEDTGQVQVVS
40 HSFPHPLYDMSLLKNRFLRPGDDSSIEPEEFLTPKQLQCVDLHVISNDVCAQVHPQKVTKFMCLCAGRWTGGKSTCSG
DSGGPLVCNGLQGITSWGSEPCALPERPSLYTKVVHYRKWIKDITIVANP (SEQ ID N°: 29; n° de acceso de GenBank
NP_001025220). En otro aspecto, la proteína KLK3 es un homólogo de la SEQ ID N°: 29. En otro aspecto, la proteína
KLK3 es una variante de la SEQ ID N°: 29. En otro aspecto, la proteína KLK3 es un isómero de la SEQ ID N°: 29. En
otro aspecto, la proteína KLK3 es un fragmento de la SEQ ID N°: 29. Cada posibilidad representa un aspecto distinto
45 de los métodos y las composiciones que se proporcionan en la presente memoria.

En otro aspecto, la proteína KLK3 está codificada por una molécula de nucleótidos que tiene la secuencia:
agccccagcttaccacctgaccccgagagctgtgacaccatggtgctcccggtgtcttctcaccctgctcctgacgtggattggtgctgacccctcatcctgtctc
ggattgtggaggctggagtgcgagaagcattcccaaccctggcaggtgctgtggcctctctgagcaggcagctgctggcggtgttctgtgacccccagtg
50 gtcctcacagctgcccactgcatcaggaacaaagctgctgtctgctggctggcagcagcctgttctcctgaagacacagggcaggtatttcagctgagccacag
ctccacacccgctctacgatagcctcctgaagaatcattctcctcaggccaggtgatgactccagcattgaaccagaggagttctgaccccaagaaactca
gtgtgtggacctcatttattccaatgacgtgtgtgcaagttcacccctcagaaggtgaccaagttcatgctgtgtgctggacgctggacagggggcaaaagcacc
tgcctgggtgattctggggcccaactgtctgtaatgggtgctcaaggatcacgctatggggcagtgaaacctgtccctgcccgaaggcctcctgtacaccaa
ggtggtgcaattaccggaagtgatcaaggacaccatcgtggccaaccctgagcaccctatcaacccctattgtagtaaaactggaacctggaaatgaccaggc
caagactcaagcctcccagttctactgaccttctcttaggtgtgagggtcaggggtgctagaaaagaatcagcagacacaggtgtagaccagaggtttctaa
55 atggtgtaatttctctctgctgctgggaatactggccatgctggagacatactcaatttctgaggacacagataggatgggggtgctgtgtatttgggggt
acagagatgaaagaggggtggatccacactgagagagtgagagtgatgctgagacactgctcctgaagcactgagcagaagctggaggcacaacgca
ccagacactcacagaaggatggagctgaaaacataaccactctgctggagcactgggaagcctagagaaggctgtgagccaaggagggtctctct
ttggcatgggatggggatgaagtaaggagagggactggaccctggaagctgattcactatggggggagggtattgaagctccagacaaccctcagattgat
gatttctagtagaactcacagaaataaagagctgttatactgtg (SEQ ID N°: 30; número de acceso de GenBank NM_001030049). En
otro aspecto, la proteína KLK3 está codificada por los residuos 42-758 de la SEQ ID N°: 30. En otro aspecto, la proteína
KLK3 está codificada por un homólogo de la SEQ ID N°: 30. En otro aspecto, la proteína KLK3 está codificada por una
60 variante de la SEQ ID N°: 30. En otro aspecto, la proteína KLK3 está codificada por un isómero de la SEQ ID N°: 30.
En otro aspecto, la proteína KLK3 está codificada por un fragmento de la SEQ ID N°: 30. Cada posibilidad representa

un aspecto distinto de los métodos y las composiciones que se proporcionan en la presente memoria.

En otro aspecto, la proteína KLK3 tiene la secuencia: MWVPVFLTSLVWIGAAPLILSRIVG-GWECEKHSQPWQV
 LVASRGRAVCGGVLVHPQWVLTAAHCIRKPGDDSSHDMLLRLSEPAELTDAVKVMDLPTQEPALGTTTCYASGWGSI
 EPEEFLTPKKLQCVDLHVISNDVCAQVHPQKVKFMLCAGRWTGGKSTCSGDSGGPLVCNGVLQGITSWGSEPCAL
 5 PERPSLYTKVVHYRKWIKDTIVANP (SEQ ID N°: 31; n° de acceso de GenBank NP_001025219). En otro aspecto, la
 proteína KLK3 es un homólogo de la SEQ ID N°: 31. En otro aspecto, la proteína KLK3 es una variante de la SEQ ID
 N°: 31. En otro aspecto, la proteína KLK3 es un isómero de la SEQ ID N°: 31. En otro aspecto, la proteína KLK3 es un
 fragmento de la SEQ ID N°: 31. Cada posibilidad representa un aspecto distinto de los métodos y las composiciones
 que se proporcionan en la presente memoria.

10 En otro aspecto, la proteína KLK3 está codificada por una molécula de nucleótidos que tiene la secuencia:
 agccccagcttaccaccctgaccccgagagctgtgtcaccatgtgggtcccgggtgtcttctcaccctgtccgtgacgtggatgtgtgctgacccccatctgtctc
 ggattgtgggagctgggagtgcgagaagcattccaaccctggcagggtgctgtggcctctgtggcagggcagctctcggcggtgttctgtgacccccagtg
 gtctcacagctgcccactgcatcaggaagccaggtgatgactccagccacgacctatgctgtcctccgtgacagcctgcccagctcacggatgctgtgaagg
 15 catggacctgcccaccagagccagcactggggaccacctgctacgctcaggctggggcagcattgaaccagaggagtcttaccacaaagaactcagt
 gtgtggacctcatgtatttccaatgacgtgtgtgcaagttcacccctcagaaggtgaccaagttatgctgtgtgtgagcgtggacagggggcaaaagcactg
 ctgggtgattctggggcccactgtctgaatggtgtgctcaaggtatcagctatggggcagtgaaacctgtgcccgaaggccttccctgtacaccaag
 tggcattaccacaaagcaccatgctggccaaccctgagcaccctatcaaccctattgtagtaaacttgaacctggaatgaccagcgaagcactcaagc
 ctcccagttactgactgcttcttaggtgtgaggtccaggtgtaggaaaagaatcagacagcaggtgtagaccaggttcttaaatggtgtaatttgt
 cctctctgtctctgggaatactggccatgctggagacatatcactcaatttctgaggacacagataggatgggtgtctgtgtatttgggggtacagagatgaa
 20 agaggggtgggatccacactgagagagtgagagtgacatgtgtgacactgtccatgaagcactgagcagaagctggaggcacaacgcaccagacactca
 cagcaaggatggagctgaaaaataaccactctgtctggaggcactgggaagcctagagaaggctgtgagccaaggagggagggcttcttggcatggat
 ggggatgaagtaaggagagggactggacccctggaagctgattcactatggggggaggtgtattgaagctccagacaaccctcagattgatattctagta
 gaactcacagaataaagagctgttatactgtg (SEQ ID N°: 32; n° de acceso de GenBank NM_001030048). En otro aspecto, la
 proteína KLK3 está codificada por los residuos 42-758 de la SEQ ID N°: 32. En otro aspecto, la proteína KLK3 está
 25 codificada por un homólogo de la SEQ ID N°: 32. En otro aspecto, la proteína KLK3 está codificada por una variante
 de la SEQ ID N°: 32. En otro aspecto, la proteína KLK3 está codificada por un isómero de la SEQ ID N°: 32. En otro
 aspecto, la proteína KLK3 está codificada por un fragmento de la SEQ ID N°: 32. Cada posibilidad representa un
 aspecto distinto de los métodos y las composiciones que se proporcionan en la presente memoria.

En otro aspecto, la proteína KLK3 tiene la secuencia: MWVPVFLTSLVWIGAAPLILSRIVG-
 GWECEKHSQPWQV LVASRGRAVCGGVLVHPQWVLTAAHCIRNKS VILLGRHSLFHPEDTGQVFQVSHSFPHPPLYD
 30 MSLLKNRFLRPGDDSSHDMLLRLSEPAELTDAVKVMDLPTQEPALGTTTCYASGWGSI EPEEFLTPKKLQCVDLHVIS
 NDVCAQVHPQKVKFMLCAGRWTGGKSTCSGDSGGPLVCNGVLQGITSWGSEPCALPERPSLYTKVVHYRKWIKD
 TIVANP (SEQ ID N°: 33; n° de acceso de GenBank NP_001639). En otro aspecto, la proteína KLK3 es un homólogo
 de la SEQ ID N°: 33. En otro aspecto, la proteína KLK3 es una variante de la SEQ ID N°: 33. En otro aspecto, la
 35 proteína KLK3 es un isómero de la SEQ ID N°: 33. En otro aspecto, la proteína KLK3 es un fragmento de la SEQ ID
 N°: 33. Cada posibilidad representa un aspecto distinto de los métodos y las composiciones que se proporcionan en
 la presente memoria.

En otro aspecto, la proteína KLK3 está codificada por una molécula de nucleótidos que tiene la secuencia:
 agccccagcttaccaccctgaccccgagagctgtgtcaccatgtgggtcccgggtgtcttctcaccctgtccgtgacgtggatgtgtgctgacccccatctgtctc
 40 ggattgtgggagctgggagtgcgagaagcattccaaccctggcagggtgctgtggcctctgtggcagggcagctctcggcggtgttctgtgacccccagtg
 gtctcacagctgcccactgcatcaggaacaaaagcgtgatctgtggcctcgtggcagacctgttctatcctgaagacacagggcaggtatttcaggtcagccacag
 ctcccacaccctctacagctcctgaagaatcagctcctgacccagcagctgacccagcctcagcagcctcagcagcctcagcagcctgacagcctgca
 gctcacggatgctgtgaaggtcagctgcccaccagagccagcactggggaccacctgctacgcctcaggtggtgggagcattgaaccagaggagtctt
 45 gacccccaaagaactcagtggtgacctcatttccaatgacgtgtgtgccaagttcacccctcagaaggtgaccaagttcagctgtgtgtgctggacgtgga
 cagggggcaaaagcactgctcgggtgattctggggcccactgtctgaatggtgtgctcaaggtatcagctatggggcagtgaaacctgtgccctgcccga
 ggcttccctgtacaccaaggtggtgattaccggaagtgatcaaggacacatcgtggccaaccctgagcaccctatcaaccctattgtagtaaacttga
 acctggaaatgaccaggccaagactcaagcctcccagtttactgaccttctttaggtgtgaggtccaggggtgtaggaaaagaatcagcagacacaggt
 50 gtgaccagagtggttcttaaatggtgtaatttgtcctctgtgtcctgggaatactggccatgctggagacatatcactcaatttctgaggacacagataggatg
 ggtgtctgtgtattgtgggtacagagatgaaagaggggtggatccacactgagagagtgagagtgacatgtgtagcactgctcatgaagcactgagcag
 aagctggaggcacaacgcaccagacactcacagcaaggatggagctgaaaacataaccactctgctcggaggcactgggaagcctagagaaggctgtgag
 ccaaggagggaggttcttcttggcatgggatgggatgaagtaaggagagggactggacccctggaagctgattcactatggggggaggtgtattgaagctc
 ccagacaaccctcagattgatattcttagtagaactcacagaataaagagctgttatactgtg (SEQ ID N°: 34; n° de acceso de GenBank
 55 NM_001648). En otro aspecto, la proteína KLK3 está codificada por los residuos 42-827 de la SEQ ID N°: 34. En otro
 aspecto, la proteína KLK3 está codificada por un homólogo de la SEQ ID N°: 34. En otro aspecto, la proteína KLK3
 está codificada por una variante de la SEQ ID N°: 34. En otro aspecto, la proteína KLK3 está codificada por un isómero
 de la SEQ ID N°: 34. En otro aspecto, la proteína KLK3 está codificada por un fragmento de la SEQ ID N°: 34. Cada
 posibilidad representa un aspecto distinto de los métodos y las composiciones que se proporcionan en la presente
 memoria.

En otro aspecto, la proteína KLK3 tiene la secuencia: MWVPVFLTSLVWIGAAPLILSRIVGGWECEKHSQ
 60 PWQV LVASRGRAVCGGVLVHPQWVLTAAHCIRNKS VILLGRHSLFHPEDTGQVFQVSHSFPHPPLYDMSLLKNRFLR
 P GDDSSHDMLLRLSEPAELTDAVKVMDLPTQEPALGTTTCYASGWGSI EPEEFLTPKKLQCVDLHVISNDVCAQVHPQ
 KVKFMLCAGRWTGGKSTCSGDSGGPLVCNGVLQGITSWGSEPCALPERPSLYTKVVHYRKWIKDTIVANP (SEQ ID

Nº: 35; nº de acceso de GenBank AAX29407.1). En otro aspecto, la proteína KLK3 es un homólogo de la SEQ ID Nº: 35. En otro aspecto, la proteína KLK3 es una variante de la SEQ ID Nº: 35. En otro aspecto, la proteína KLK3 es un isómero de la SEQ ID Nº: 35. En otro aspecto, la secuencia de la proteína KLK3 comprende la SEQ ID Nº: 35. En otro aspecto, la proteína KLK3 es un fragmento de la SEQ ID Nº: 35. Cada posibilidad representa un aspecto distinto de los métodos y las composiciones que se proporcionan en la presente memoria.

En otro aspecto, la proteína KLK3 está codificada por una molécula de nucleótidos que tiene la secuencia: gggggagccccaagcttaccacctgcaccggagagctgtgtcaccatggtgtcccggtgtcttctcaccctgtcctgacgtggattgtgtgacccctcatc
ctgtctcggattgtggaggctgggagtgcgagaagcattccaaccctggcagggtgtgtgacctctcgtggcaggcagctgtcggcggtgtctgtgacccccc
agtggtctcctcagctgcccactgcatcaggaacaaagcgtgatctgtcgtggctggcagcctgttcatcctgaagacacaggccaggtattcaggtcagcc
acagcttccacacccgctctacgatatgagcctcctgaagaatcattcctcagggcaggtgatgactccagccacgacctcatgctcctcggctgtcagagcctg
ccgagctcacggatgctgtgaaggtcattgacctgcccaccaggagccagcactggggaccacctgctacgcctcaggtggggcagcattgaaccagagga
gtcttgaccccaagaactcagtggtgacctcatttattccaatgacgtgtgtgctgcaagttcaccctcagaaggtgaccaagttcagctgtgtgctggagc
ctggacagggggcaaaagcaccctgctcgggtgattctggggcaccactgtctgtaagttgtgtctcaaggtatcagctatggggcagtgaaacctgtgcccctg
cgaaaggccttccctgtacaccaaggtggtgattaccgggaagtgatcaaggacacatcgtggccaaccctgagcaccctatcaactcctattgtagtaaac
ttggaacctggaatgaccagccaagactcaggcctcccagttctactgaccttctctagggtgtaggtccagggtgctaggaaaagaatcagcagacac
aggtgtagaccagagtgcttcttaaatggtgtaatttctcctctgtgctcctggggaatactggcctgagacatcactcaatttctctgaggacacagatagg
atgggtgtctgttattgtgggtacagagatgaaagaggggtgggatccacactgagagagtgagagtgacatgtgctggacactgtcattgaagcactgag
cagaagctggaggcacaacgcaccagacactcacagcaaggatggagctgaaaacataaccactctgtcctggaggcactgggaagcctagagaaggtgt
gagccaaggagggagggtctccttggcatgggatgggatgaagtagggagagggactggacccctggaagctgattcactatgggggaggtgtattgaa
tctccagacaaccctcagatttgatgattcctagtagaactcacagaataaagagctgttatactgcgaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa (SEQ ID
Nº: 36; nº de acceso de GenBank BC056665). En otro aspecto, la proteína KLK3 está codificada por los residuos 47-
832 de la SEQ ID Nº: 36. En otro aspecto, la proteína KLK3 está codificada por un homólogo de la SEQ ID Nº: 36. En
otro aspecto, la proteína KLK3 está codificada por una variante de la SEQ ID Nº: 36. En otro aspecto, la proteína KLK3
está codificada por un isómero de la SEQ ID Nº: 36. En otro aspecto, la proteína KLK3 está codificada por un fragmento
de la SEQ ID Nº: 36. Cada posibilidad representa un aspecto distinto de los métodos y las composiciones que se
proporcionan en la presente memoria.

En otro aspecto, la proteína KLK3 tiene la secuencia: MWVPVFLTLSVTWIGAAPLILSRIVG-GWECEKHSQPWQ
VLVASRGRAVCGGVLVHPQWVLTAAHCIRNKSIVLLGRHSLFHPEDTGQVFQVSHSFPHPLYDMSLLKNRFLRPGDD
SSIEPEEFLTPKLLQCVDLHVISNDVCAQVHPQKVTKFMLCAGRWTGGKSTCSGDSGGPLVCNGVLQGITSWGSEP
CALPERPSLYTKVVHYRKWIKDTIVA (SEQ ID Nº: 37; nº de acceso de GenBank AJ459782). En otro aspecto, la
proteína KLK3 es un homólogo de la SEQ ID Nº: 37. En otro aspecto, la proteína KLK3 es una variante de la SEQ ID
Nº: 37. En otro aspecto, la proteína KLK3 es un isómero de la SEQ ID Nº: 37. En otro aspecto, la proteína KLK3 es un
fragmento de la SEQ ID Nº: 37. Cada posibilidad representa un aspecto distinto de los métodos y las composiciones
que se proporcionan en la presente memoria.

En otro aspecto, la proteína KLK3 tiene la secuencia: MWVPVFLTLSVTWIGAAPLILSRIVG-GWECEKHSQPW
QVLVASRGRAVCGGVLVHPQWVLTAAHCIRNKSIVLLGRHSLFHPEDTGQVFQVSHSFPHPLYDMSLLKNRFLRPGD
DSSHDLMLLRLSEPAELTDAVKVMDLPTQEPALGTTTCYASGWGSIPEEFLTPKLLQCVDLHVISNDVCAQVHPQKVT
KFMLCAGRWTGGKSTCSVSHYPYSQDLEGGKGEWGP (SEQ ID Nº: 38; nº de acceso GenBank AJ512346). En otro
aspecto, la proteína KLK3 es un homólogo de la SEQ ID Nº: 38. En otro aspecto, la proteína KLK3 es una variante de
la SEQ ID Nº: 38. En otro aspecto, la proteína KLK3 es un isómero de la SEQ ID Nº: 38. En otro aspecto, la secuencia
de la proteína KLK3 comprende la SEQ ID Nº: 38. En otro aspecto, la proteína KLK3 es un fragmento de la SEQ ID
Nº: 38. Cada posibilidad representa un aspecto distinto de los métodos y las composiciones que se proporcionan en
la presente memoria.

En otro aspecto, la proteína KLK3 tiene la siguiente secuencia: MWVPVFLTLSVTWIGERGHGWGDAGEGASPDC-
QAEALSPPTQHPSPDRELGSFSLPAPLQAHTPSPSILQSSLPHQVPAPSHLPQNFLPIAQAPPCSQLLY (SEQ ID
Nº: 39; nº de acceso de GenBank AJ459784). En otro aspecto, la proteína KLK3 es un homólogo de la SEQ ID Nº: 39.
En otro aspecto, la proteína KLK3 es una variante de la SEQ ID Nº: 39. En otro aspecto, la secuencia de la proteína
KLK3 comprende la SEQ ID Nº: 39. En otro aspecto, la proteína KLK3 es un isómero de la SEQ ID Nº: 39. En otro
aspecto, la proteína KLK3 es un fragmento de la SEQ ID Nº: 39. Cada posibilidad representa un aspecto distinto de
los métodos y las composiciones que se proporcionan en la presente memoria.

En otro aspecto, la proteína KLK3 tiene la secuencia: MWVPVFLTLSVTWIGAAPLILSRIVG-GWECEKHSQPWQVL
VASRGRAVCGGVLVHPQWVLTAAHCIRNKSIVLLGRHSLFHPEDTGQVFQVSHSFPHPLYDMSLLKNRFLRPGDDSS
HDLMLLRLSEPAELTDAVKVMDLPTQEPALGTTTCYASGWGSIPEEFLTPKLLQCVDLHVISNDVCAQVHPQKVTKFM
LCAGRWTGGKSTCSGDSGGPLVCNGVLQGITSWGSEP
CALPERPSLYTKVVHYRKWIKDTIVANP (SEQ ID Nº: 40;
nº de acceso de GenBank AJ459783). En otro aspecto, la proteína KLK3 es un homólogo de la SEQ ID Nº: 40. En otro
aspecto, la proteína KLK3 es una variante de la SEQ ID Nº: 40. En otro aspecto, la proteína KLK3 es un isómero de la
SEQ ID Nº: 40. En otro aspecto, la proteína KLK3 es un fragmento de la SEQ ID Nº: 40. Cada posibilidad representa
un aspecto distinto de los métodos y las composiciones que se proporcionan en la presente memoria.

En otro aspecto, la proteína KLK3 está codificada por una molécula de nucleótidos que tiene la secuencia:
aagtttcccttctcccagtcacaagaccccaaatcaccacaaaggaccaatccccagactcaagatatggtctggcgctgtctgtctcctaccctgatccctgggt
tcaactctgctcccagagcatgaagcctctccaccagcaccagccaccaacctgcaaacctagggaagattgacagaattccagccttcccagctccccctgccc

atgtcccaggactcccagccttggttctctgccccgtgtctttcaaacccacatcctaaatccatctcctatccgagtcccccagttcctctgtcaaccctgattcccctg
 atctagcaccctctgcaggtgctgccccctcatcctgctcggattggtggaggctgggagtgcgagaagcattcccaaccctggcagggtgctgtgacctctctg
 gcagggcagctcgcggcggtgctggtgacccccagtggtcctcacagctaccactgcatcaggaacaaaagcgtgatctgctgggtcggcacagcctgttc
 atcctgaagacacagggcaggtattcaggtcagccacagctcccacaccgctctacgatagcctcctgaagaatcgattcctcaggccaggtgatgactcca
 5 gccacgacctatgctgctcgcctgctcagagcctgccagctcacggatgctatgaaggtcatggacctgcccaccaggagccagcactggggaccacctgct
 acgcctcaggctggggcagcattgaaccagaggagttctgaccccaaaagaaactcagtgctggacctccatgttattccaatgacgtgtgtgcaagttcacc
 tcagaaggtgaccaagttcagctgtgtgctgctggagcctggacagggggcaaaagcacctgctcgggtgattctggggcccactgtctgtaattggtgtctcaaggt
 atcacgtcatggggcagtgaaacctgtgcccctgcccgaaggccttccctgtacaccaaggtggtgcattaccggaagtgatcaaggacacatcgctggcaacc
 10 cctgagcaccctatcaactccctattgtagtaaaactggaacctggaatgaccaggccaagactcaggcctccccagttctactgacctttgctctagggtgtaggt
 ccaggggtgctagggaaaagaaatcagcagacacaggtgtagaccagagtgcttctaaatggtgtaattttgctcctctgctgctgggaatactggccatgctgga
 gacatatcactcaatttctgaggacacagataggtggtgctgtgttattggtgggtacagagatgaaagaggggtggatccactgagagagtgaggaga
 gtgacatgtgctggacactgctcatgaagcactgagcagaagctggaggcacaacgaccagacactcacagcaaggtgagctgaaaacataaccactct
 gtctggaggcactgggaagcctagagaaggctggaaccaaggagggggtcttcttggcattgggatgggatgaaagtaaggagagggactgacccctg
 gaagctgattcactatgggggaggtgattgaagtcctcagacaaccctcagattgatgattcctagtagaactcacagaaataaagagctgttatactgtgaa
 15 (SEQ ID N°: 41; n° de acceso de GenBank X07730). En otro aspecto, la proteína KLK3 está codificada por los residuos
 67-1088 de la SEQ ID N°: 41. En otro aspecto, la proteína KLK3 está codificada por un homólogo de la SEQ ID N°: 41.
 En otro aspecto, la proteína KLK3 está codificada por una variante de la SEQ ID N°: 41. En otro aspecto, la proteína
 KLK3 está codificada por un isómero de la SEQ ID N°: 41. En otro aspecto, la proteína KLK3 está codificada por un
 20 fragmento de la SEQ ID N°: 41. Cada posibilidad representa un aspecto distinto de los métodos y las composiciones
 que se proporcionan en la presente memoria.

En otro aspecto, la proteína KLK3 está codificada por una secuencia establecida en uno de los siguientes números de
 acceso de GenBank: BC005307, AJ310938, AJ310937, AF335478, AF335477, M27274 y M26663. En otro aspecto,
 la proteína KLK3 está codificada por una secuencia establecida en uno de los números de acceso de GenBank
 anteriores. Cada posibilidad representa un aspecto distinto de los métodos y las composiciones que se proporcionan
 25 en la presente memoria.

En otro aspecto, la proteína KLK3 está codificada por una secuencia establecida en uno de los siguientes números de
 acceso de GenBank: NM_001030050, NM_001030049, NM_001030048, NM_001030047, NM_001648, AJ459782,
 AJ512346 o AJ459784. Cada posibilidad representa un aspecto distinto de los métodos y las composiciones que se
 proporcionan en la presente memoria. En un aspecto, la proteína KLK3 está codificada por una variación de cualquiera
 30 de las secuencias descritas en la presente memoria, en la que la secuencia carece de
 MWVPPVFLFLVLSWTWIGAAPLILSR (SEQ ID N°: 55).

En otro aspecto, la proteína KLK3 tiene la secuencia que comprende una secuencia establecida en uno de los
 siguientes números de acceso de GenBank: X13943, X13942, X13940, X13941 y X13944. Cada posibilidad representa
 un aspecto distinto de los métodos y las composiciones que se proporcionan en la presente memoria.

35 En otro aspecto, la proteína KLK3 es cualquier otra proteína KLK3 conocida en la técnica. Cada proteína KLK3
 representa un aspecto distinto de los métodos y las composiciones que se proporcionan en la presente memoria.

En otro aspecto, el péptido KLK3 es cualquier otro péptido KLK3 conocido en la técnica. En otro aspecto, el péptido
 KLK3 es un fragmento de cualquier otro péptido KLK3 conocido en la técnica. Cada tipo de péptido KLK3 representa
 un aspecto distinto de los métodos y las composiciones que se proporcionan en la presente memoria.

40 "Péptido KLK3" se refiere, en otro aspecto, a una proteína KLK3 de longitud completa. En otro aspecto, el término se
 refiere a un fragmento de una proteína KLK3. En otro aspecto, el término se refiere a un fragmento de una proteína
 KLK3 que carece del péptido señal de KLK3. En otro aspecto, el término se refiere a una proteína KLK3 que contiene
 la secuencia de KLK3 completa, excepto el péptido señal de KLK3. "Secuencia señal de KLK3" se refiere, en otro
 45 aspecto, a cualquier secuencia señal encontrada en la naturaleza en una proteína KLK3. En otro aspecto, una proteína
 KLK3 de los métodos y las composiciones que se proporcionan en la presente memoria no contiene ninguna secuencia
 señal. Cada posibilidad representa un aspecto distinto de los métodos y las composiciones que se proporcionan en la
 presente memoria.

En otro aspecto, la peptidasa relacionada con la calicreína 3 (proteína KLK3), que es la fuente de un péptido KLK3
 para el uso en los métodos y las composiciones que se proporcionan en la presente memoria, es una proteína PSA.
 50 En otro aspecto, la proteína KLK3 es una proteína antigénica P-30. En otro aspecto, la proteína KLK3 es una proteína
 gamma-seminoproteína. En otro aspecto, la proteína KLK3 es una proteína calicreína 3. En otro aspecto, la proteína
 KLK3 es una proteína semenogelasa. En otro aspecto, la proteína KLK3 es una proteína seminina. En otro aspecto,
 la proteína KLK3 es cualquier otro tipo de proteína KLK3 que se conoce en la técnica. Cada posibilidad representa un
 aspecto distinto de los métodos y las composiciones que se proporcionan en la presente memoria.

55 En otro aspecto, la proteína KLK3 es una proteína KLK3 variante de corte y empalme 1. En otro aspecto, la proteína
 KLK3 es una proteína KLK3 variante de corte y empalme 2. En otro aspecto, la proteína KLK3 es una proteína KLK3
 variante de corte y empalme 3. En otro aspecto, la proteína KLK3 es una proteína KLK3 variante de transcripción 1.
 En otro aspecto, la proteína KLK3 es una proteína KLK3 variante de transcripción 2. En otro aspecto, la proteína KLK3
 es una proteína KLK3 variante de transcripción 3. En otro aspecto, la proteína KLK3 es una proteína KLK3 variante de

transcripción 4. En otro aspecto, la proteína KLK3 es una proteína KLK3 variante de transcripción 5. En otro aspecto, la proteína KLK3 es una proteína KLK3 variante de transcripción 6. En otro aspecto, la proteína KLK3 es una proteína RP5 KLK3 variante de corte y empalme. En otro aspecto, la proteína KLK3 es cualquier otra proteína KLK3 variante de corte y empalme conocida en la técnica. En otro aspecto, la proteína KLK3 es cualquier otra proteína KLK3 variante de transcripción conocida en la técnica. Cada posibilidad representa un aspecto distinto de los métodos y las composiciones que se proporcionan en la presente memoria.

En otro aspecto, la proteína KLK3 es una proteína KLK3 madura. En otro aspecto, la proteína KLK3 es una pro-proteína KLK3. En otro aspecto, la secuencia líder se ha eliminado de una proteína KLK3 madura de los métodos y las composiciones que se proporcionan en la presente memoria. Cada posibilidad representa un aspecto distinto de los métodos y las composiciones que se proporcionan en la presente memoria.

En otro aspecto, la proteína KLK3 que es la fuente de un péptido KLK3 de los métodos y las composiciones que se proporcionan en la presente memoria es una proteína KLK3 humana. En otro aspecto, la proteína KLK3 es una proteína KLK3 de primate. En otro aspecto, la proteína KLK3 es una proteína KLK3 de cualquier otra especie conocida en la técnica. En otro aspecto, una de las proteínas KLK3 anteriores se denomina en la técnica "proteína KLK3". Cada posibilidad representa un aspecto distinto de los métodos y las composiciones que se proporcionan en la presente memoria.

En otro aspecto, el antígeno de interés es un polipéptido KLK9.

En otro aspecto, el antígeno de interés es HPV-E7. En otro aspecto, el antígeno es HPV-E6. En otro aspecto, el antígeno es Her-2/neu. En otro aspecto, el antígeno es NY-ESO-1. En otro aspecto, el antígeno es telomerasa (TERT). En otro aspecto, el antígeno es SCCE. En otro aspecto, el antígeno es CEA. En otro aspecto, el antígeno es LMP-1. En otro aspecto, el antígeno es p53. En otro aspecto, el antígeno es la anhidrasa carbónica IX (CAIX). En otro aspecto, el antígeno es PSMA. En otro aspecto, el antígeno es el antígeno de células madre de próstata (PSCA). En otro aspecto, el antígeno es HMW-MAA. En otro aspecto, el antígeno es WT-1. En otro aspecto, el antígeno es HIV-1 Gag. En otro aspecto, el antígeno es proteinasa 3. En otro aspecto, el antígeno es proteína 2 relacionada con tirosinasa. En otro aspecto, el antígeno es PSA (antígeno prostático específico). En otro aspecto, el antígeno se selecciona de HPV-E7, HPV-E6, Her-2, NY-ESO-1, telomerasa (TERT), SCCE, HMW-MAA, WT-1, Gag del VIH-1, CEA, LMP-1, p53, PSMA, PSCA, proteinasa 3, proteína 2 relacionada con tirosinasa, Mucl, PSA (antígeno prostático específico), o una combinación de los mismos.

En otro aspecto, el antígeno es un antígeno asociado a un tumor, que en un aspecto es uno de los siguientes antígenos tumorales: una proteína MAGE (antígeno E asociado a melanoma), por ejemplo, MAGE 1, MAGE 2, MAGE 3, MAGE 4, una tirosinasa; una proteína ras mutante; una proteína p53 mutante; antígeno de melanoma p97, un péptido ras o péptido p53 asociado con cánceres avanzados; los antígenos HPV 16/18 asociados con cánceres de cuello uterino, antígeno KLH asociado con carcinoma de mama, CEA (antígeno carcinoembrionario) asociado con cáncer colorrectal, gp100, un antígeno MART1 asociado con melanoma o el antígeno PSA asociado con cáncer de próstata. En otro aspecto, el antígeno para las composiciones y los métodos que se proporcionan en la presente memoria son antígenos asociados a melanoma, que en un aspecto son TRP-2, MAGE-1, MAGE-3, gp-100, tirosinasa, HSP-70, beta-HCG, o una combinación de los mismos.

En un aspecto, el primer y segundo ácido nucleico pueden codificar dos antígenos distintos que sirven como objetivos tumorales, que en un aspecto son el antígeno prostático específico (PSA) y el antígeno de células madre del cáncer de próstata (PSCA). En un aspecto, el polipéptido codificado por el segundo ácido nucleico puede complementar o sinergizar la respuesta inmune al primer ácido nucleico que codifica un polipéptido antigénico. En otro aspecto, el polipéptido codificado por el segundo ácido nucleico afecta al crecimiento vascular. En un aspecto, el primer y segundo ácido nucleico pueden codificar dos polipéptidos que afectan al crecimiento vascular, que, en un aspecto, funcionan a través de distintos mecanismos para afectar al crecimiento vascular. En un aspecto, tales polipéptidos son EGFR-III, HMW-MAA, o una combinación de los mismos. En un aspecto, un polipéptido puede servir como antígeno tumoral y como factor angiogénico. En un aspecto, el primer ácido nucleico puede codificar un antígeno tumoral, y el segundo ácido nucleico puede codificar un polipéptido que es un inhibidor de la función o expresión de ARG-1 o NOS o una combinación. En un aspecto, un inhibidor de NOS es N^G-mono-metil-L-arginina (L-NMMA), éster metílico de N^G-nitro-L-arginina (L-NAME), 7-NI, L-NIL, o L-NIO. En un aspecto, el ácido nucleico puede codificar la N-omega-nitro-L-arginina, un inhibidor de la óxido nítrico sintasa, y el inhibidor competitivo de la L-arginina. En un aspecto, el segundo ácido nucleico puede codificar un ARNm que inhibe la función o expresión de ARG-1 o NOS.

En un aspecto, un polipéptido expresado por la Listeria descrita en la presente memoria puede ser un antagonista del factor de crecimiento neuropeptídico, que en un aspecto es [D-Arg1, D-Phe5, D-Trp7,9, Leu11] sustancia P, [Arg6, D-Trp7,9, NmePhe8] sustancia P (6-11). Estos aspectos y los aspectos relacionados los entiende un experto en la técnica.

En otro aspecto, el antígeno es un antígeno de una enfermedad infecciosa. En un aspecto, el antígeno es un auto-antígeno o un antígeno propio.

En otros aspectos, el antígeno deriva de un patógeno fúngico, bacterias, parásitos, helmintos o virus. En otros

- aspectos, el antígeno se selecciona de toxoide tetánico, moléculas de hemaglutinina del virus de la gripe, toxoide de la difteria, gp120 del VIH, proteína gag del VIH, proteasa de IgA, péptido de insulina B, antígenos de *Spongopora* subterránea, antígenos de vibrios, antígenos de salmonela, antígenos de neumococos, antígenos del virus sincitial respiratorio, proteínas de la membrana externa de *Haemophilus influenzae*, ureasa de *Helicobacter pylori*, pilinas de *Neisseria meningitidis*, pilinas de *N. gonorrhoeae*, antígenos E1 y E2 del virus del papiloma humano de tipo HPV-16, -18, -31, -33, -35 o -45 humanos, o una combinación de los mismos.
- En otros aspectos, el antígeno está asociado con una de las siguientes enfermedades; cólera, difteria, *Haemophilus*, hepatitis A, hepatitis B, gripe, sarampión, meningitis, paperas, tos ferina, viruela, neumonía neumocócica, poliomielitis, rabia, rubéola, tétanos, tuberculosis, fiebre tifoidea, Varicella-zóster, tos ferina, fiebre amarilla, los inmunógenos y antígenos de la enfermedad de Addison, alergias, anafilaxia, síndrome de Bruton, cáncer, que incluye los tumores sólidos y los sanguíneos, eccema, tiroiditis de Hashimoto, polimiositis, dermatomiositis, diabetes mellitus tipo 1, síndrome de inmunodeficiencia adquirida, rechazo de trasplantes, como de riñón, corazón, páncreas, pulmón, hueso e hígado, enfermedad de Graves, enfermedad autoinmune poliendocrina, hepatitis, poliarteritis microscópica, poliarteritis nodosa, pénfigo, cirrosis biliar primaria, anemia perniciosa, enfermedad celíaca, nefritis mediada por anticuerpos, glomerulonefritis, enfermedades reumáticas, lupus eritematoso sistémico, artritis reumatoide, espondiloartritis seronegativa, rinitis, síndrome de Sjögren, esclerosis sistémica, colangitis esclerosante, granulomatosis de Wegener, dermatitis herpetiforme, psoriasis, vitíligo, esclerosis múltiple, encefalomielitis, síndrome de Guillain-Barré, miastenia grave, síndrome de Lambert-Eaton, esclerótica, epiesclerótica, uveítis, candidiasis mucocutánea crónica, urticaria, hipogamaglobulinemia transitoria infantil, mieloma, síndrome de hiper IgM asociado al cromosoma X, síndrome de Wiskott-Aldrich, ataxia telangiectasia, anemia hemolítica autoinmune, trombocitopenia autoinmune, neutropenia autoinmune, macroglobulinemia de Waldenström, amiloidosis, leucemia linfocítica crónica, linfoma no Hodgkin, proteína del circumsporozoito de la malaria, antígenos microbianos, antígenos virales, autoantígenos, y listeriosis. Cada antígeno representa un aspecto distinto de los métodos y las composiciones que se proporcionan en la presente memoria.
- La respuesta inmune inducida por los métodos y las composiciones que se proporcionan en la presente memoria es, en otro aspecto, una respuesta de células T. En otro aspecto, la respuesta inmune comprende una respuesta de células T. En otro aspecto, la respuesta es una respuesta de células T CD8⁺. En otro aspecto, la respuesta comprende una respuesta de células T CD8⁺. Cada posibilidad representa un aspecto distinto como se proporciona en la presente memoria.
- En un aspecto, una *Listeria* recombinante de las composiciones y los métodos que se proporcionan en la presente memoria comprende un polipéptido angiogénico. En otro aspecto, los enfoques antiangiogénicos para la terapia del cáncer son muy prometedores, y, en un aspecto, un tipo de terapia antiangiogénica de este tipo selecciona como objetivo los pericitos. En otro aspecto, los objetivos moleculares en las células endoteliales vasculares y los pericitos son objetivos importantes para las terapias antitumorales. En otro aspecto, la señalización del receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF-B/PDGFR-β) es importante para reclutar pericitos en los vasos sanguíneos recién formados. Por lo tanto, en un aspecto, los polipéptidos angiogénicos que se proporcionan en la presente memoria inhiben las moléculas involucradas en la señalización de pericitos, que, en un aspecto, es PDGFR-β.
- En un aspecto, las composiciones de la presente invención comprenden un factor angiogénico, o un fragmento inmunogénico del mismo, en donde, en un aspecto, el fragmento inmunogénico comprende uno o más epítopos reconocidos por el sistema inmune del huésped. En un aspecto, un factor angiogénico es una molécula involucrada en la formación de nuevos vasos sanguíneos. En un aspecto, el factor angiogénico es VEGFR2. En otro aspecto, un factor angiogénico descrito en la presente memoria es angiogenina; Angiopoyetina-1; Del-1; Factores de crecimiento de fibroblastos: ácido (aFGF) y básico (bFGF); Folistatina; Factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF); Factor de crecimiento de hepatocitos (HGF)/factor de dispersión (SF); Interleucina-8 (IL-8); Leptina; Midkina; Factor de crecimiento placentario; Factor de crecimiento de células endoteliales derivado de plaquetas (PD-ECGF); Factor de crecimiento derivado de plaquetas-BB (PDGF-BB); Pleiotrofina (PTN); Progranulina; Prolifina; Factor de crecimiento transformante alfa (TGF-alfa); Factor de crecimiento transformante beta (TGF-beta); Factor de necrosis tumoral alfa (TNF-alfa); Factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF)/factor de permeabilidad vascular (VPF). En otro aspecto, un factor angiogénico es una proteína angiogénica. En un aspecto, un factor de crecimiento es una proteína angiogénica. En un aspecto, una proteína angiogénica para uso en las composiciones y métodos descritos en la presente memoria son los factores de crecimiento de fibroblastos (FGF); VEGF; VEGFR y neuropilina 1 (NRP-1); Angiopoyetina 1 (Ang1) y Tie2; Factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF; homodímero BB) y PDGFR; Factor de crecimiento transformante beta (TGF-β), endoglina y receptores de TGF-β; proteína-1 quimiotáctica de monocitos (MCP-1); Integrinas αVβ3, αVβ5 y α5β1; VE-cadherina y CD31; efrina; activadores de plasminógeno; inhibidor del activador de plasminógeno-1; óxido nítrico sintasa (NOS) y COX-2; AC133; o Id1/Id3. En un aspecto, una proteína angiogénica para uso en las composiciones y métodos descritos en la presente memoria es una angiopoyetina, que en un aspecto es la angiopoyetina 1, la angiopoyetina 3, la angiopoyetina 4 o la angiopoyetina 6. En un aspecto, la endoglina también se conoce como CD105; EDG; HHT1; ORW; u ORW1. En un aspecto, la endoglina es un co-receptor de TGFbeta.
- En un aspecto, las vacunas contra el cáncer que se proporcionan en la presente memoria generan células T efectoras que pueden infiltrarse en el tumor, destruir las células tumorales y erradicar la enfermedad. En un aspecto, los linfocitos infiltrantes de tumores que se dan de manera natural (TILs) están asociados a un mejor pronóstico en varios tumores,

como los de colon, ovario y melanoma. En el cáncer de colon, los tumores sin signos de micrometástasis tienen una mayor infiltración de células inmunitarias y un perfil de expresión Th1, que se correlaciona con una mejor supervivencia de los pacientes. Además, la infiltración del tumor por las células T se ha asociado con el éxito de los enfoques inmunoterapéuticos tanto en ensayos preclínicos como en humanos. En un aspecto, la infiltración de linfocitos en el sitio del tumor depende de la regulación al alza de las moléculas de adhesión en las células endoteliales de la vasculatura del tumor, generalmente por citoquinas proinflamatorias, tales como IFN- γ , TNF- α e IL-1. Se han implicado varias moléculas de adhesión en el proceso de infiltración de linfocitos en tumores, incluida la molécula de adhesión intercelular 1 (ICAM-1), la molécula de adhesión de células endoteliales vasculares 1 (V-CAM-1), la proteína de adhesión vascular 1 (VAP-1) y E-selectina. Sin embargo, estas moléculas de adhesión celular suelen estar reguladas a la baja en la vasculatura del tumor. Por lo tanto, en un aspecto, las vacunas contra el cáncer que se proporcionan en la presente memoria aumentan los TILs, regulan al alza las moléculas de adhesión (en un aspecto, ICAM-1, V-CAM-1, VAP-1, E-selectina, o una combinación de las mismas), regulan las citocinas proinflamatorias (en un aspecto, IFN- γ , TNF- α , IL-1, o una combinación de las mismas), o una combinación de las mismas.

En un aspecto, las composiciones y los métodos que se proporcionan en la presente memoria proporcionan una terapia antiangiogénica, que, en un aspecto, puede mejorar las estrategias de inmunoterapia. En un aspecto, las composiciones y los métodos que se proporcionan en la presente memoria evitan la anergia de las células endoteliales *in vivo* mediante el aumento de las moléculas de adhesión en los vasos tumorales y la mejora de las interacciones de los leucocitos y los vasos, lo que aumenta el número de leucocitos infiltrantes de tumores, como las células T CD8⁺. Curiosamente, la protección antitumoral mejorada se correlaciona con un número aumentado de células T infiltrantes en tumores CD4⁺ y CD8⁺ activadas y una disminución pronunciada del número de células T reguladoras en el tumor tras el bloqueo de VEGF.

En un aspecto, la administración de un antígeno antiangiogénico simultáneamente con un antígeno asociado a un tumor a un huésped afectado por un tumor, como se describe en la presente memoria, tendrá un efecto sinérgico en el impacto del crecimiento tumoral y una eficacia terapéutica más potente.

En otro aspecto, la selección como objetivo de los pericitos mediante la vacunación conducirá a la infiltración de linfocitos T citotóxicos (CTL), la destrucción de pericitos, la desestabilización de los vasos sanguíneos y la inflamación vascular, que en otro aspecto está asociada con la regulación positiva de las moléculas de adhesión en las células endoteliales que son importantes para la adherencia y la trans migración de los linfocitos, mejorando en última instancia la capacidad de los linfocitos de infiltrarse en el tejido tumoral. En otro aspecto, la administración concomitante de un antígeno específico del tumor genera linfocitos capaces de invadir el sitio tumoral y destruir las células tumorales.

En un aspecto, la señalización del receptor de factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF-B/PDGFR- β) es importante para incorporar pericitos en los vasos sanguíneos recién formados. En otro aspecto, la inhibición de VEGFR-2 y PDGFR- β induce de manera concomitante la apoptosis de las células endoteliales y la regresión de los vasos sanguíneos tumorales, en una realización, aproximadamente del 40% de los vasos sanguíneos tumorales.

La cepa de *Listeria* recombinante de la invención es una cepa de *Listeria* auxotrófica que es un mutante dal/dat. En otro aspecto, la molécula de ácido nucleico se mantiene estable en la cepa bacteriana recombinante en ausencia de selección con antibióticos.

Los mutantes auxótrofos útiles como vectores de vacunas se pueden generar de varias maneras. Los mutantes auxotróficos de D-alanina se pueden generar, en un aspecto, a través de la ruptura del gen dal y del gen dat para generar una cepa auxotrófica atenuada de *Listeria* que requiere D-alanina añadida exógenamente para el crecimiento.

La generación de cepas AA de *Listeria* deficientes en D-alanina, por ejemplo, puede llevarse a cabo de varias maneras que son muy conocidas para los expertos en la técnica, incluyendo mutagénesis por delección, mutagénesis por inserción y mutagénesis que resulta en la generación de mutaciones de desplazamiento del marco de lectura, mutaciones que causan la terminación prematura de una proteína, o la mutación de secuencias reguladoras que afectan a la expresión génica. En otro aspecto, la mutagénesis se puede lograr usando técnicas de ADN recombinante o utilizando la tecnología de mutagénesis tradicional usando productos químicos mutagénicos o radiación, y la posterior selección de mutantes. En otro aspecto, se prefieren los mutantes por delección debido a la baja probabilidad asociada de reversión del fenotipo auxotrófico. En otro aspecto, los mutantes de D-alanina que se generan de acuerdo con los protocolos presentados en la presente memoria pueden ensayarse para determinar su capacidad de crecer en ausencia de D-alanina en un ensayo de cultivo de laboratorio simple. En otro aspecto, los mutantes que no pueden crecer en ausencia de este compuesto se seleccionan para un estudio adicional.

En otro aspecto, además de los genes asociados a D-alanina mencionados anteriormente, se pueden usar otros genes implicados en la síntesis de una enzima metabólica, como se proporciona en la presente memoria, como objetivos para la mutagénesis de *Listeria*.

La cepa de *Listeria* auxotrófica de la invención comprende un vector de expresión episomal que comprende una enzima metabólica que complementa la auxotrofia de dicha cepa de *Listeria* auxotrófica. En otro aspecto, la construcción está contenida en la cepa de *Listeria* de una manera episomal. En otro aspecto, el antígeno exógeno se expresa a partir de un vector albergado por la cepa de *Listeria* recombinante. En otro aspecto, dicho vector de

- expresión episomal carece de un marcador de resistencia a antibióticos. En un aspecto, un antígeno de los métodos y las composiciones que se proporcionan en la presente memoria se fusiona genéticamente con un oligopéptido que comprende una secuencia PEST. En otro aspecto, dicho polipéptido endógeno que comprende una secuencia PEST es LLO. En otro aspecto, dicho polipéptido endógeno que comprende una secuencia PEST es ActA. Cada posibilidad representa un aspecto distinto de los métodos y las composiciones que se proporcionan en la presente memoria.
- En otro aspecto, la enzima metabólica complementa un gen metabólico endógeno que falta en el resto del cromosoma de la cepa bacteriana recombinante. En un aspecto, el gen metabólico endógeno está mutado en el cromosoma. En otro aspecto, el gen metabólico endógeno está delecionado del cromosoma. En otro aspecto, dicha enzima metabólica es una enzima del metabolismo de aminoácidos. En otro aspecto, dicha enzima metabólica cataliza la formación de un aminoácido utilizado para la síntesis de la pared celular en dicha cepa de *Listeria* recombinante. En otra realización, dicha enzima metabólica es una enzima alanina racemasa. En otra realización, dicha enzima metabólica es una enzima D-aminoácido transferasa. Cada posibilidad representa un aspecto distinto de los métodos y las composiciones que se proporcionan en la presente memoria.
- En otro aspecto, la enzima metabólica cataliza la formación de un aminoácido (AA) utilizado en la síntesis de la pared celular. En otro aspecto, la enzima metabólica cataliza la síntesis de un AA utilizado en la síntesis de la pared celular. En otro aspecto, la enzima metabólica está involucrada en la síntesis de un AA usado en la síntesis de la pared celular. En otro aspecto, el AA se utiliza en la biogénesis de la pared celular. Cada posibilidad representa un aspecto distinto de los métodos y las composiciones que se proporcionan en la presente memoria.
- En otro aspecto, la enzima metabólica es una enzima sintética para el ácido D-glutámico, un componente de la pared celular.
- En otro aspecto, la enzima metabólica está codificada por un gen de alanina racemasa (dal). En otro aspecto, el gen dal codifica alanina racemasa, que cataliza la reacción L-alanina ↔ D-alanina.
- El gen dal de los métodos y las composiciones que se proporcionan en la presente memoria está codificado, en otro aspecto, por la secuencia: atggtgacaggctggcatcgtccaacatggattgaaatagaccgcgcaaatcgcgaaaaataaaaaatgaacaaaa
 25 taaactcccgaaagtgtcgactatggcagtagtcaaagctaatgcatatggtcacggaattatcgaagttgctaggacggcgaaagaagctggagcaaaaggt
 ttctcgtagccatttagatgaggcaactggctcttagagaagctggattcaagatgactttattctgtgctggcgaaccagaaaagaagatgctaactcggcagcca
 aaaaccacatttcaactactgttttagagaagattggctagagaatctaacgctagaagcaacactcgaaltcatttaaagtagatagcgggtatggggcgtctcggg
 atcgtacgactgaagaagcagcggaattgaagcaaccagactaatgatccaattacaactggaaggatttaccacgcttttgaacagccgaccagctaga
 aactgatttttgaacaacaattagctaagttccaacgatttaacgagtttaaaaaaacgaccaactatgttcatacagccaattcagctgctcattgttacagcca
 30 caaatcgggtttgatgagcattcgtttgtatttcgatgatggtaactcctccacagaaatcaaaactagcttgcggttgagcttaaacctgcaactgcaactctatacc
 gagatggctcatgtgaaagaactgcaccagcgatagcgttagctacggagcaactatacagcaacagagcggagaatgggtgacattaccaattggctatgc
 ggatggattgattcgtcattacagtggtttccatgttttagtagcgggtaaccagctccaatcattggtcaggtttgatggatcaaacatcataaaactaccagtgat
 tcaaaactgggtcaaaagtaacgataattggcaagatcaggttaacacggtaaacagcagatgatgccgctcaatattagatacaataaattagaggaactgtttgt
 35 aaatgagcgcataccta-gaaaatacatccattag (SEQ ID N°: 42; n° de acceso de GenBank: AF038438). En otro aspecto, el nucleótido que codifica dal es homólogo a la SEQ ID N°: 42. En otro aspecto, el nucleótido que codifica dal es una variante de la SEQ ID N°: 42. En otro aspecto, el nucleótido que codifica dal es un fragmento de la SEQ ID N°: 42. En otro aspecto, la proteína dal está codificada por cualquier otro gen dal conocido en la técnica. Cada posibilidad representa un aspecto distinto de los métodos y las composiciones que se proporcionan en la presente memoria.
- En otro aspecto, la proteína dal tiene la secuencia: MVTGWHRPTWIEIDRAAIARENINIKNEQNKLPEVDLWAVVKANAY
 40 GHGIIEVARTAKEAGAKGFCVAILDEALALREAGFQDDFILVLGATRKEDANLAAKNHISLTVFREDWLENLTLEATLRIH
 LKVDSGMGRLGIRTTEEARRIEATSTNDHQLQLEGIYTHFATADQLETSYFEQQLAKFQITILSLKKRPTYVHTANSAA
 SLLQPQIGFDAIRFGISMYGLTPSTEIKTSLPFELKPALALYTEMVHVKELAPGDSVSYGATYTATEREWVATLPIGYAD
 GLIRHYSGFHVLVDGEPAPIIGRVCMDQTIILKLPREFQTGSKVTIIGKDHGNTVTADDAAYLDTINYEVTCLLNERIPRK
 45 YIH (SEQ ID N°: 43; n° de acceso de GenBank: AF038428). En otro aspecto, la proteína dal es homóloga a la SEQ ID
 N°: 43. En otro aspecto, la proteína dal es una variante de la SEQ ID N°: 43. En otro aspecto, la proteína dal es un
 isómero de la SEQ ID N°: 43. En otro aspecto, la proteína dal es un fragmento de la SEQ ID N°: 43. En otro aspecto,
 la proteína dal es un fragmento de un homólogo de la SEQ ID N°: 43. En otro aspecto, la proteína dal es un fragmento
 de una variante de la SEQ ID N°: 43. En otro aspecto, la proteína dal es un fragmento de un isómero de la SEQ ID N°:
 43.
- En otro aspecto, la proteína dal es cualquier otra proteína dal de *Listeria* conocida en la técnica. En otro aspecto, la
 50 proteína dal es cualquier otra proteína dal grampositiva conocida en la técnica. En otro aspecto, la proteína dal es
 cualquier otra proteína dal conocida en la técnica. Cada posibilidad representa un aspecto distinto de los métodos y
 las composiciones que se proporcionan en la presente memoria.
- En otro aspecto, la proteína dal de los métodos y las composiciones que se proporcionan en la presente memoria
 55 conserva su actividad enzimática. En otro aspecto, la proteína dal retiene el 90% de la actividad de tipo natural. En
 otro aspecto, la proteína dal retiene el 80% de la actividad de tipo natural. En otro aspecto, la proteína dal retiene el
 70% de la actividad de tipo natural. En otro aspecto, la proteína dal retiene el 60% de la actividad de tipo natural. En
 otro aspecto, la proteína dal retiene el 50% de la actividad de tipo natural. En otro aspecto, la proteína dal retiene el
 40% de la actividad de tipo natural. En otro aspecto, la proteína dal retiene el 30% de la actividad de tipo natural. En

enzima metabólica es cualquier otra enzima conocida en la técnica que participa en la síntesis de L-alanina. En otro aspecto, la enzima metabólica es cualquier otra enzima conocida en la técnica que participa en la síntesis de D-alanina. En otro aspecto, la *Listeria* recombinante es auxotrófica para la D-alanina. Las bacterias auxotróficas para la síntesis de alanina son muy conocidas en la técnica y se describen, por ejemplo, en *E. coli* (Strych et al, 2002, J. Bacteriol. 184: 4321-4325), *Corynebacterium glutamicum* (Tauch et al., 2002, J. Biotechnol 99: 79-91), y *Listeria monocytogenes* (Frankel et al., Patente de EE. UU. 6.099.848), género *Lactococcus* y género *Lactobacillus* (Bron et al, 2002, Appl Environ Microbiol, 68: 5663-70). En otro aspecto, cualquier gen de síntesis de D-alanina conocido en la técnica está inactivado. Cada posibilidad representa un aspecto distinto de los métodos y las composiciones que se proporcionan en la presente memoria.

10 En otro aspecto, la enzima metabólica es una aminoácido aminotransferasa.

En otro aspecto, la enzima metabólica está codificada por serC, una fosfoserina aminotransferasa. En otro aspecto, la enzima metabólica está codificada por la asd (aspartato beta-semialdehído deshidrogenasa), que participa en la síntesis del ácido diaminopimélico de la pared celular. En otro aspecto, la enzima metabólica está codificada por gsaB-glutamato-1-semialdehído aminotransferasa, que cataliza la formación de 5-aminolevulinato a partir de (S)-4-amino-5-oxopentanoato. En otro aspecto, la enzima metabólica está codificada por HemL, que cataliza la formación de 5-aminolevulinato a partir de (S)-4-amino-5-oxopentanoato. En otro aspecto, la enzima metabólica está codificada por aspB, una aspartato aminotransferasa que cataliza la formación de oxaloacetato y L-glutamato a partir de L-aspartato y 2-oxoglutarato. En otro aspecto, la enzima metabólica está codificada por argF-1, involucrada en la biosíntesis de arginina. En otro aspecto, la enzima metabólica está codificada por aroE, involucrada en la biosíntesis de aminoácidos. En otro aspecto, la enzima metabólica está codificada por aroB, involucrada en la biosíntesis de 3-deshidroquinato. En otro aspecto, la enzima metabólica está codificada por aroD, involucrada en la biosíntesis de aminoácidos. En otro aspecto, la enzima metabólica está codificada por aroC, involucrada en la biosíntesis de aminoácidos. En otro aspecto, la enzima metabólica está codificada por hisB, involucrada en la biosíntesis de histidina. En otro aspecto, la enzima metabólica está codificada por hisD, involucrada en la biosíntesis de histidina. En otro aspecto, la enzima metabólica está codificada por hisG, involucrada en la biosíntesis de histidina. En otro aspecto, la enzima metabólica está codificada por metX, involucrada en la biosíntesis de metionina. En otro aspecto, la enzima metabólica está codificada por proB, involucrada en la biosíntesis de prolina. En otro aspecto, la enzima metabólica está codificada por argR, involucrada en la biosíntesis de arginina. En otro aspecto, la enzima metabólica está codificada por argJ, involucrada en la biosíntesis de arginina. En otro aspecto, la enzima metabólica está codificada por thil, involucrada en la biosíntesis de tiamina. En otro aspecto, la enzima metabólica está codificada por LMOF2365_1652, involucrada en la biosíntesis de triptófano. En otro aspecto, la enzima metabólica está codificada por aroA, involucrada en la biosíntesis de triptófano. En otro aspecto, la enzima metabólica está codificada por ilvD, involucrada en la biosíntesis de valina e isoleucina. En otro aspecto, la enzima metabólica está codificada por ilvC, involucrada en la biosíntesis de valina e isoleucina. En otro aspecto, la enzima metabólica está codificada por leuA, involucrada en la biosíntesis de leucina. En otro aspecto, la enzima metabólica está codificada por dapF, involucrada en la biosíntesis de lisina. En otro aspecto, la enzima metabólica está codificada por thrB, involucrada en la biosíntesis de treonina (todas con el nº de acceso de GenBank NC_002973).

40 En otro aspecto, la enzima metabólica es una ARNt sintetasa. En otro aspecto, la enzima metabólica está codificada por el gen trpS, que codifica la triptofanilo ARNt sintetasa. En otro aspecto, la enzima metabólica es cualquier otra ARNt sintetasa conocida en la técnica. Cada posibilidad representa un aspecto distinto de los métodos y las composiciones que se proporcionan en la presente memoria.

En otro aspecto, una cepa de *Listeria* recombinante como se proporciona en la presente memoria se ha pasado a través de un huésped animal. En otro aspecto, el paso maximiza la eficacia de la cepa como vector de vacuna. En otro aspecto, el paso estabiliza la inmunogenicidad de la cepa de *Listeria*. En otro aspecto, el paso estabiliza la virulencia de la cepa de *Listeria*. En otro aspecto, el paso aumenta la inmunogenicidad de la cepa de *Listeria*. En otro aspecto, el paso aumenta la virulencia de la cepa de *Listeria*. En otro aspecto, el paso elimina las subcepas inestables de la cepa de *Listeria*. En otro aspecto, el paso reduce la prevalencia de las subcepas inestables de la cepa de *Listeria*. En otro aspecto, el paso atenúa la cepa, o, en otro aspecto, hace que la cepa sea menos virulenta. Los métodos para hacer pasar una cepa de *Listeria* recombinante a través de un huésped animal son muy conocidos en la técnica, y se describen, por ejemplo, en la solicitud de patente de Estados Unidos de nº de serie 10/541.614. Cada posibilidad representa un aspecto distinto de los métodos y las composiciones que se proporcionan en la presente memoria.

55 La cepa de *Listeria* recombinante de la invención es, en otra realización, una cepa de *Listeria monocytogenes* recombinante. En otro aspecto, la cepa de *Listeria* es una cepa de *Listeria seeligeri* recombinante. En otro aspecto, la cepa de *Listeria* es una cepa de *Listeria grayi* recombinante. En otro aspecto, la cepa de *Listeria* es una cepa de *Listeria ivanovii* recombinante. En otro aspecto, la cepa de *Listeria* es una cepa de *Listeria murrayi* recombinante. En otro aspecto, la cepa de *Listeria* es una cepa de *Listeria welshimeri* recombinante. En otro aspecto, la cepa de *Listeria* es una cepa recombinante de cualquier otra especie de *Listeria* conocida en la técnica. Cada posibilidad representa un aspecto distinto como se proporciona en la presente memoria. En otro aspecto, las secuencias de proteínas de *Listeria* para el uso en los métodos y las composiciones que se proporcionan en la presente memoria son de cualquiera de las cepas descritas anteriormente.

60 En un aspecto, una cepa de *Listeria monocytogenes*, como se proporciona en la presente memoria, es la cepa EGD,

la cepa 10403S, la cepa NICPBP 54002, la cepa S3, la cepa NCTC 5348, la cepa NICPBP 54006, la cepa M7, la cepa S19 u otra cepa de *Listeria monocytogenes* que se conoce en la técnica.

En otro aspecto, la cepa de *Listeria* recombinante es una cepa de vacuna, que, en un aspecto, es una cepa de vacuna bacteriana.

5 En un aspecto, una vacuna es una composición que provoca una respuesta inmune a un antígeno o polipéptido de la composición como resultado de la exposición a la composición. En otro aspecto, la vacuna comprende adicionalmente un adyuvante, citocina, quimiocina o una combinación de los mismos. En otro aspecto, la vacuna o composición comprende adicionalmente células presentadoras de antígenos (APC), que en un aspecto son autólogas, mientras que, en otro aspecto, son alogénicas para el sujeto.

10 En un aspecto, una "vacuna" es una composición que provoca una respuesta inmune en un huésped a un antígeno o polipéptido de la composición como resultado de la exposición a la composición. En un aspecto, la respuesta inmune es a un antígeno particular o a un epítipo particular del antígeno. En un aspecto, la vacuna puede ser una vacuna peptídica, en otro aspecto, una vacuna de ADN. En otro aspecto, la vacuna puede estar contenida dentro y, en otro aspecto, se puede administrar mediante, una célula, que en un aspecto es una célula bacteriana, que en un aspecto es una *Listeria*. En un aspecto, una vacuna puede evitar que un sujeto contraiga o desarrolle una enfermedad o afección, en el que, en otro aspecto, una vacuna puede ser terapéutica para un sujeto que tiene una enfermedad o afección. En un aspecto, una vacuna descrita en la presente memoria comprende una composición descrita en la presente memoria y un adyuvante, citocina, quimiocina o una combinación de los mismos.

20 La presente invención proporciona una composición inmunogénica que comprende una *Listeria* recombinante de la presente invención. En otro aspecto, la composición inmunogénica de los métodos y las composiciones de la presente invención comprende un vector de vacuna recombinante descrito en la presente memoria. En otro aspecto, la composición inmunogénica comprende un plásmido descrito en la presente memoria. La composición inmunogénica de la presente invención comprende un adyuvante. En un aspecto, un vector descrito en la presente memoria puede administrarse como parte de una composición de vacuna. Cada posibilidad representa un aspecto distinto de la presente descripción.

25 En otro aspecto, una vacuna descrita en la presente memoria se administra con un adyuvante. En un aspecto, el adyuvante favorece una respuesta inmune predominantemente mediada por Th1. En otro aspecto, el adyuvante favorece una respuesta inmune de tipo Th1. En otro aspecto, el adyuvante favorece una respuesta inmune mediada por Th1. En otro aspecto, el adyuvante favorece una respuesta inmune mediada por células sobre una respuesta mediada por anticuerpos. En otro aspecto, el adyuvante es cualquier otro tipo de adyuvante conocido en la técnica. En otro aspecto, la composición inmunogénica induce la formación de una respuesta inmune de células T contra la proteína objetivo.

30 En otro aspecto, el adyuvante es MPL. En otra realización, el adyuvante es QS21. En otro aspecto, el adyuvante es un agonista de TLR. En otro aspecto, el adyuvante es un agonista de TLR4. En otro aspecto, el adyuvante es un agonista de TLR9. En otro aspecto, el adyuvante es Resiquimod®. En otro aspecto, el adyuvante es imiquimod. En otro aspecto, el adyuvante es un oligonucleótido CpG. En otro aspecto, el adyuvante es una citocina o un ácido nucleico que codifica la misma. En otro aspecto, el adyuvante es una quimiocina o un ácido nucleico que codifica la misma. En otro aspecto, el adyuvante es IL-12 o un ácido nucleico que codifica la misma. En otro aspecto, el adyuvante es IL-6 o un ácido nucleico que codifica la misma. En otro aspecto, el adyuvante es un lipopolisacárido. En otro aspecto, el adyuvante es como se describe en *Fundamental Immunology*, 5ª ed. (Agosto de 2003): William E. Paul (Editor); Lippincott Williams & Wilkins Publishers; Capítulo 43: Vacunas, GJV Nossal. En otro aspecto, el adyuvante es cualquier otro adyuvante conocido en la técnica. Cada posibilidad representa un aspecto distinto de los métodos y las composiciones que se proporcionan en la presente memoria.

45 En una realización, en la presente memoria se proporciona una cepa de *Listeria* de la invención para el uso en la inducción de una respuesta inmune al PSA en un sujeto. En un aspecto, en la presente memoria se proporciona un método para inducir una respuesta inmune anti-angiogénica a un antígeno en un sujeto que comprende administrar una cepa de *Listeria* recombinante a dicho sujeto. En otro aspecto, dicha cepa de *Listeria* recombinante comprende una primera y una segunda molécula de ácido nucleico. En otro aspecto, cada una de dichas moléculas de ácido nucleico codifica un antígeno heterólogo. En otro aspecto más, dicha primera molécula de ácido nucleico se integra de forma operable en el genoma de *Listeria* como un marco de lectura abierto con un polipéptido endógeno que comprende una secuencia PEST.

50 En una realización, en la presente memoria se proporciona una cepa de *Listeria* de la invención para el uso en el tratamiento, la supresión o inhibición de un cáncer o un tumor en un sujeto. En otro aspecto, dicha cepa de *Listeria* recombinante comprende una primera y una segunda molécula de ácido nucleico. En otro aspecto, cada una de dichas moléculas de ácido nucleico codifica un antígeno heterólogo. En otro aspecto más, dicha primera molécula de ácido nucleico se integra de forma operable en el genoma de *Listeria* como un marco de lectura abierto con una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido endógeno que comprende una secuencia PEST. En otro aspecto, al menos uno de dichos antígenos se expresa en al menos una célula de dichas células cancerosas.

En una realización, en la presente memoria se proporciona una cepa de *Listeria* de la invención para el uso en la prevención o el retraso de la aparición de un cáncer en un sujeto. En otro aspecto, en la presente memoria se proporciona un método para retrasar la progresión hasta un cáncer en un sujeto, que comprende administrar una cepa de *Listeria* recombinante a dicho sujeto. En otro aspecto, en la presente memoria se proporciona un método para prolongar la remisión de un cáncer en un sujeto, que comprende administrar una cepa de *Listeria* recombinante a dicho sujeto. En otro aspecto, en la presente memoria se proporciona un método para disminuir el tamaño de un tumor existente en un sujeto, que comprende administrar una cepa de *Listeria* recombinante a dicho sujeto. En otro aspecto, en la presente memoria se proporciona un método para prevenir el crecimiento de un tumor existente en un sujeto, que comprende administrar una cepa de *Listeria* recombinante a dicho sujeto. En otro aspecto, en la presente memoria se proporciona un método para prevenir el crecimiento de tumores nuevos o adicionales en un sujeto, que comprende administrar una cepa de *Listeria* recombinante a dicho sujeto.

En un aspecto, el cáncer o los tumores se pueden prevenir en poblaciones específicas que se sabe que son susceptibles a un cáncer o un tumor en particular. En un aspecto, tal susceptibilidad puede deberse a factores ambientales, como el tabaquismo, que, en un aspecto, puede provocar que una población esté sujeta al cáncer de pulmón, mientras que, en otro aspecto, tal susceptibilidad puede deberse a factores genéticos, por ejemplo la población con mutaciones BRCA1/2 puede ser susceptible, en un aspecto, al cáncer de mama, y, en otro aspecto, al cáncer de ovario. En otro aspecto, una o más mutaciones en el cromosoma 8q24, el cromosoma 17q12 y el cromosoma 17q24.3 pueden aumentar la susceptibilidad al cáncer de próstata, como se conoce en la técnica. Otros factores genéticos y ambientales que contribuyen a la susceptibilidad al cáncer son conocidos en la técnica.

En otro aspecto, un método descrito en la presente memoria comprende además la etapa de reforzar al sujeto humano con una cepa de *Listeria* recombinante como se proporciona en la presente memoria. En otro aspecto, la cepa de *Listeria* recombinante usada en la inoculación de refuerzo es la misma que la cepa usada en la inoculación inicial de "sensibilización". En otro aspecto, la cepa de refuerzo es diferente de la cepa de sensibilización. En otro aspecto, se usan las mismas dosis en las inoculaciones de sensibilización y refuerzo. En otro aspecto, se usa una dosis mayor en el refuerzo. En otro aspecto, se usa una dosis menor en el refuerzo. Cada posibilidad representa un aspecto distinto de los métodos y las composiciones que se proporcionan en la presente memoria.

En un aspecto, la primera o la segunda molécula de ácido nucleico codifica un antígeno prostático específico (PSA), y el método es para tratar, inhibir o suprimir el cáncer de próstata. En otro aspecto, la primera o la segunda molécula de ácido nucleico codifica PSA y el método es para tratar, inhibir o suprimir el cáncer de ovario. En otro aspecto, la primera o la segunda molécula de ácido nucleico codifica PSA y el método es para tratar, inhibir o suprimir la metástasis del cáncer de próstata, que en un aspecto comprende la metástasis en el hueso, y en otro aspecto, la metástasis en otros órganos. En otro aspecto, la primera o la segunda molécula de ácido nucleico codifica PSA y el método es para tratar, inhibir o suprimir la metástasis del cáncer de próstata en los huesos. En otro aspecto más, el método es para tratar, inhibir o suprimir la metástasis del cáncer de próstata en otros órganos. En otro aspecto, la primera o la segunda molécula de ácido nucleico codifica PSA y el método es para tratar, inhibir o suprimir el cáncer de mama. En otro aspecto, la primera o la segunda molécula de ácido nucleico codifica PSA y el método es para tratar, inhibir o suprimir el cáncer de ovario y de mama.

En un aspecto, la primera o la segunda molécula de ácido nucleico codifica un antígeno asociado a melanoma de alto peso molecular (HMW-MAA) y el método es para tratar, inhibir o suprimir el melanoma. En otro aspecto, la primera o la segunda molécula de ácido nucleico codifica HMW-MAA y el método es para tratar, inhibir o suprimir el cáncer de mama. En otro aspecto, la primera o la segunda molécula de ácido nucleico codifica HMW-MAA y el método es para tratar, inhibir o suprimir el cáncer de ovario. En otro aspecto, la primera o la segunda molécula de ácido nucleico codifica HMW-MAA y el método es para tratar, inhibir o suprimir las lesiones de nevos benignos. En otro aspecto, la primera o la segunda molécula de ácido nucleico codifica HMW-MAA y el método es para tratar, inhibir o suprimir el carcinoma de células basales. En otro aspecto, la primera o la segunda molécula de ácido nucleico codifica HMW-MAA y el método es para tratar, inhibir o suprimir un tumor de origen de la cresta neural, que, en un aspecto, es un astrocitoma, glioma, neuroblastoma, sarcoma o una combinación de los mismos. En otro aspecto, la primera o la segunda molécula de ácido nucleico codifica HMW-MAA y el método es para tratar, inhibir o suprimir una leucemia infantil, que, en un aspecto, es leucemia linfoblástica aguda infantil, y, en otro aspecto, es leucemia mielóide aguda infantil (que, en un aspecto, es leucemia mielógena aguda, leucemia mielóide aguda, leucemia mielocítica aguda o leucemia no linfocítica aguda) y, en otro aspecto, es leucemia linfocítica aguda (que, en un aspecto, se llama leucemia linfoblástica aguda, y, en otro aspecto, es leucemia mielógena aguda (también llamada leucemia mielóide aguda, leucemia mielocítica aguda o leucemia no linfocítica aguda) y, en otro aspecto, es la leucemia de linaje híbrido o mixto. En otro aspecto, la primera o la segunda molécula de ácido nucleico codifica HMW-MAA y el método es para tratar, inhibir o suprimir la leucemia mielógena crónica o la leucemia mielomonocítica juvenil (JMML). En otro aspecto, la primera o la segunda molécula de ácido nucleico codifica HMW-MAA y el método es para tratar, inhibir o suprimir las lesiones de carcinoma de mama lobulillar.

El cáncer que es el objetivo de los métodos y las composiciones que se proporcionan en la presente memoria es, en otro aspecto, un melanoma. En otro aspecto, el cáncer es un sarcoma. En otro aspecto, el cáncer es un carcinoma. En otro aspecto, el cáncer es un mesotelioma (por ejemplo, mesotelioma maligno). En otro aspecto, el cáncer es un glioma. En otro aspecto, el cáncer es un tumor de células germinales. En otro aspecto, el cáncer es un coriocarcinoma.

En otro aspecto, el cáncer es un cáncer de páncreas. En otro aspecto, el cáncer es un cáncer de ovario. En otro aspecto, el cáncer es un cáncer gástrico. En otro aspecto, el cáncer es una lesión carcinomatosa del páncreas. En otro aspecto, el cáncer es un adenocarcinoma pulmonar. En otro aspecto, el cáncer es un adenocarcinoma colorrectal. En otro aspecto, el cáncer es un adenocarcinoma escamoso pulmonar. En otro aspecto, el cáncer es un adenocarcinoma gástrico. En otro aspecto, el cáncer es una neoplasia epitelial superficial ovárica (por ejemplo, una variedad benigna, proliferativa o maligna de la misma). En otro aspecto, el cáncer es un carcinoma oral de células escamosas. En otro aspecto, el cáncer es un carcinoma pulmonar no microcítico. En otro aspecto, el cáncer es un carcinoma endometrial. En otro aspecto, el cáncer es un cáncer de vejiga. En otro aspecto, el cáncer es un cáncer de cabeza y cuello. En otro aspecto, el cáncer es un carcinoma de próstata.

5
10
15

En otro aspecto, el cáncer es un cáncer de pulmón de células no microcíticas (NSCLC). En otro aspecto, el cáncer es un cáncer de colon. En otro aspecto, el cáncer es un cáncer de pulmón. En otro aspecto, el cáncer es un cáncer de ovario. En otro aspecto, el cáncer es un cáncer uterino. En otro aspecto, el cáncer es un cáncer de tiroides. En otro aspecto, el cáncer es un carcinoma hepatocelular. En otro aspecto, el cáncer es un cáncer de tiroides. En otro aspecto, el cáncer es un cáncer de hígado. En otro aspecto, el cáncer es un cáncer renal. En otro aspecto, el cáncer es un sarcoma de Kaposi. En otro aspecto, el cáncer es un sarcoma. En otro aspecto, el cáncer es otro carcinoma o sarcoma. Cada posibilidad representa un aspecto distinto de los métodos y las composiciones que se proporcionan en la presente memoria.

20

En un aspecto, las composiciones y los métodos que se proporcionan en la presente memoria pueden usarse para tratar tumores sólidos relacionados con o resultantes de cualquiera de los cánceres que se describieron anteriormente en la presente memoria. En otro aspecto, el tumor es un tumor de Wilms. En otro aspecto, el tumor es un tumor desmoplásico de células pequeñas y redondas.

25
30

Otro aspecto descrito en la presente memoria proporciona un método para impedir la angiogénesis de un tumor sólido en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una composición que comprende una *Listeria* recombinante que codifica un antígeno heterólogo. En otro aspecto, el antígeno es HMW-MAA. En otro aspecto, el antígeno es el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF). En otro aspecto, el antígeno es el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF). En otro aspecto, el antígeno es cualquier otro antígeno que se sabe en la técnica que está implicado en la angiogénesis. En otro aspecto, los métodos y las composiciones para impedir la angiogénesis de un tumor sólido en un sujeto, como se proporciona en la presente memoria, comprenden administrar al sujeto una composición que comprende una *Listeria* recombinante que codifica dos antígenos heterólogos. En otro aspecto, uno de los dos antígenos heterólogos es HMW-MAA. En otro aspecto, el antígeno es cualquier otro antígeno que se sabe en la técnica que está implicado en la angiogénesis. Cada posibilidad representa un aspecto distinto de los métodos y las composiciones que se proporcionan en la presente memoria.

35
40

Los métodos para evaluar la eficacia de las vacunas contra el cáncer de próstata son muy conocidos en la técnica, y se describen, por ejemplo, en Dzojic H et al. (Adenovirus-mediated CD40 ligand therapy induces tumor cell apoptosis and systemic immunity in the TRAMP-C2 mouse prostate cancer model. *Prostate*. 1 de junio de 2006; 66 (8): 831-8), Naruishi K et al. (Adenoviral vector-mediated RTVP-1 gene-modified tumor cell-based vaccine suppresses the development of experimental prostate cancer. *Cancer Gene Ther*. julio de 2006; 13 (7): 658-63), Sehgal I et al (Cancer Cell Int. 23 de agosto de 2006; 6: 21), y Heinrich JE et al (Vaccination against prostate cancer using a live tissue factor deficient cell line in Lobund-Wistar rats. *Cancer Immunol Immunother* 2007; 56 (5): 725-30). Cada posibilidad representa un aspecto distinto como se proporciona en la presente memoria.

45

En otro aspecto, el modelo de cáncer de próstata usado para probar los métodos y las composiciones que se proporcionan en la presente memoria es el modelo de ratón TPSA23 (derivado de la línea celular TRAMP-C1 que expresa de manera estable PSA). En otro aspecto, el modelo de cáncer de próstata es un modelo de células 178-2 BMA. En otro aspecto, el modelo de cáncer de próstata es un modelo de células de adenocarcinoma PAIII. En otro aspecto, el modelo de cáncer de próstata es un modelo PC-3M. En otro aspecto, el modelo de cáncer de próstata es cualquier otro modelo de cáncer de próstata conocido en la técnica. Cada posibilidad representa un aspecto distinto de los métodos y las composiciones que se proporcionan en la presente memoria.

50
55

En otro aspecto, la vacuna se prueba en sujetos humanos y la eficacia se controla mediante métodos muy conocidos en la técnica, por ejemplo, midiendo directamente las respuestas de las células T CD4⁺ y CD8⁺, o midiendo la progresión de la enfermedad, por ejemplo, determinando el número o el tamaño de las metástasis del tumor, o monitorizando los síntomas de la enfermedad (tos, dolor torácico, pérdida de peso, etc.). Los métodos para evaluar la eficacia de una vacuna contra el cáncer de próstata en sujetos humanos son muy conocidos en la técnica, y se describen, por ejemplo, en Uenaka A et al (T cell immunomonitoring and tumor responses in patients immunized with a complex of cholesterol-bearing hydrophobized pullulan (CHP) and NY-ESO-1 protein. *Cancer Immunol*. 19 de abril de 2007; 7:9) y Thomas-Kaskel AK et al. (Vaccination of advanced prostate cancer patients with PSCA and PSA peptide-loaded dendritic cells induces DTH responses that correlate with superior overall survival. *Int J Cancer*. 15 de noviembre de 2006; 119(10): 2428-34). Cada método representa un aspecto distinto de los métodos y las composiciones que se proporcionan en la presente memoria.

60

Otro aspecto descrito en la presente memoria proporciona un método para tratar la hiperplasia benigna de próstata (BPH) en un sujeto. Otro aspecto descrito en la presente memoria proporciona un método para tratar la neoplasia

intraepitelial prostática (PIN) en un sujeto.

5 En un aspecto, en la presente memoria se proporciona una cepa de *Listeria* recombinante que comprende una molécula de ácido nucleico integrada de forma operable en el genoma de *Listeria*. En otro aspecto, dicha molécula de ácido nucleico codifica (a) un polipéptido endógeno que comprende una secuencia PEST y (b) un polipéptido que comprende un antígeno en un marco de lectura abierto.

10 En un aspecto, en la presente memoria se proporciona un método para tratar, suprimir o inhibir al menos un tumor en un sujeto, que comprende administrar una cepa de *Listeria* recombinante a dicho sujeto. En otro aspecto, dicha cepa de *Listeria* recombinante comprende una primera y una segunda molécula de ácido nucleico. En otro aspecto, cada una de dichas moléculas de ácido nucleico codifica un antígeno heterólogo. En otro aspecto, dicha primera molécula de ácido nucleico se integra de forma operable en el genoma de *Listeria* como un marco de lectura abierto con un polipéptido nativo que comprende una secuencia PEST y en la que dicho antígeno se expresa en al menos una célula de dicho tumor.

15 En un aspecto, "antígeno" se usa en la presente memoria para referirse a una sustancia que cuando se pone en contacto con un organismo, da como resultado una respuesta inmune detectable del organismo. Un antígeno puede ser un lípido, péptido, proteína, carbohidrato, ácido nucleico, o combinaciones y variaciones de los mismos.

En un aspecto, "variante" se refiere a un aminoácido o secuencia de ácido nucleico (o en otros aspectos, un organismo o tejido) que es diferente de la mayoría de la población, pero aún es lo suficientemente similar a la modalidad común como para ser considerado uno de ellos, por ejemplo, las variantes de corte y empalme.

20 En un aspecto, "isoforma" se refiere a una versión de una molécula, por ejemplo, una proteína, con solo pequeñas diferencias en comparación con otra isoforma, o versión, de la misma proteína. En un aspecto, las isoformas pueden producirse a partir de genes diferentes pero relacionados, o, en otro aspecto, pueden surgir del mismo gen mediante un corte y empalme alternativo. En otro aspecto, las isoformas están provocadas por polimorfismos de un solo nucleótido.

25 En un aspecto, "fragmento" se refiere a una proteína o polipéptido que es más corto o comprende menos aminoácidos que la proteína o polipéptido de longitud completa. En otro aspecto, el fragmento se refiere a un ácido nucleico que es más corto o comprende menos nucleótidos que el ácido nucleico de longitud completa. En otro aspecto, el fragmento es un fragmento N-terminal. En otro aspecto, el fragmento es un fragmento C-terminal. En un aspecto, el fragmento es una sección intrasecuencial de la proteína, péptido o ácido nucleico. En un aspecto, el fragmento es un fragmento funcional. En otro aspecto, el fragmento es un fragmento inmunogénico. En un aspecto, un fragmento tiene 10-20 nucleótidos o aminoácidos, mientras que en otro aspecto un fragmento tiene más de 5 nucleótidos o aminoácidos, mientras que en otro aspecto un fragmento tiene 100-200 nucleótidos o aminoácidos, mientras que en otro aspecto un fragmento tiene 100-500 nucleótidos o aminoácidos, mientras que en otro aspecto un fragmento tiene 50-200 nucleótidos o aminoácidos.

35 En un aspecto, "inmunogenicidad" o "inmunogénico" se usa en la presente memoria para referirse a la capacidad innata de una proteína, péptido, ácido nucleico, antígeno u organismo de provocar una respuesta inmune en un animal cuando la proteína, péptido, ácido nucleico, antígeno u organismo se administra al animal. Por lo tanto, "mejorar la inmunogenicidad", en un aspecto, se refiere a aumentar la capacidad de una proteína, péptido, ácido nucleico, antígeno u organismo de provocar una respuesta inmunitaria en un animal cuando se administra la proteína, péptido, ácido nucleico, antígeno u organismo a un animal. El aumento de la capacidad de una proteína, péptido, ácido nucleico, antígeno u organismo de provocar una respuesta inmunitaria puede medirse, en un aspecto, por un mayor número de anticuerpos contra una proteína, péptido, ácido nucleico, antígeno u organismo, una mayor diversidad de anticuerpos contra un antígeno u organismo, un mayor número de células T específicas de una proteína, péptido, ácido nucleico, antígeno u organismo, una mayor respuesta de células T citotóxicas o auxiliares a una proteína, péptido, ácido nucleico, antígeno u organismo, y similares.

45 En un aspecto, un "homólogo" se refiere a una secuencia de ácido nucleico o aminoácido que comparte un cierto porcentaje de identidad de secuencia con una secuencia particular de ácido nucleico o aminoácidos. En un aspecto, una secuencia útil en la composición y los métodos que se proporcionan en la presente memoria puede ser un homólogo de una secuencia de LLO particular o un fragmento N-terminal de la misma, una secuencia de ActA o un fragmento N-terminal de la misma, o una secuencia de tipo PEST descrita en la presente memoria o conocida en la técnica. En otro aspecto, una secuencia útil en la composición y los métodos que se proporcionan en la presente memoria puede ser un homólogo de un polipéptido antigénico, que, en un aspecto, es KLK3 o HMW-MAA o un fragmento funcional de los mismos. En un aspecto, un homólogo de un polipéptido y, en un aspecto, el ácido nucleico que codifica dicho homólogo, descrito en la presente memoria mantiene las características funcionales del polipéptido original. Por ejemplo, en un aspecto, un homólogo de un polipéptido antigénico descrito en la presente memoria mantiene la característica antigénica del polipéptido original. En otro aspecto, una secuencia útil en la composición y los métodos proporcionados en la presente memoria puede ser un homólogo de cualquier secuencia descrita en la presente memoria. En un aspecto, un homólogo comparte al menos un 70% de identidad con una secuencia particular. En otro aspecto, un homólogo comparte al menos un 72% de identidad con una secuencia particular. En otro aspecto, un homólogo comparte al menos un 75% de identidad con una secuencia particular. En otro aspecto, un homólogo

comparte al menos un 78% de identidad con una secuencia particular. En otro aspecto, un homólogo comparte al menos un 80% de identidad con una secuencia particular. En otro aspecto, un homólogo comparte al menos un 82% de identidad con una secuencia particular. En otro aspecto, un homólogo comparte al menos un 83% de identidad con una secuencia particular. En otro aspecto, un homólogo comparte al menos un 85% de identidad con una secuencia particular. En otro aspecto, un homólogo comparte al menos un 87% de identidad con una secuencia particular. En otro aspecto, un homólogo comparte al menos un 88% de identidad con una secuencia particular. En otro aspecto, un homólogo comparte al menos un 90% de identidad con una secuencia particular. En otro aspecto, un homólogo comparte al menos un 92% de identidad con una secuencia particular. En otro aspecto, un homólogo comparte al menos un 93% de identidad con una secuencia particular. En otro aspecto, un homólogo comparte al menos un 95% de identidad con una secuencia particular. En otro aspecto, un homólogo comparte al menos un 96% de identidad con una secuencia particular. En otro aspecto, un homólogo comparte al menos un 97% de identidad con una secuencia particular. En otro aspecto, un homólogo comparte al menos un 98% de identidad con una secuencia particular. En otro aspecto, un homólogo comparte al menos un 99% de identidad con una secuencia particular. En otro aspecto, un homólogo comparte una identidad del 100% con una secuencia particular. Cada posibilidad representa un aspecto distinto como se proporciona en la presente memoria.

En un aspecto, debe entenderse que un homólogo de cualquiera de las secuencias que se proporcionan en la presente memoria y/o que se describen en la presente memoria se considera parte de la descripción.

En un aspecto, "funcional", dentro del significado de la descripción, se usa en la presente memoria para referirse a la capacidad innata de una proteína, péptido, ácido nucleico, fragmento o una variante de los mismos de exhibir una actividad o función biológica. En un aspecto, tal función biológica es su propiedad de unión a una molécula de interacción, por ejemplo, un receptor asociado a la membrana, y, en otro aspecto, su propiedad de trimerización. En el caso de los fragmentos funcionales y las variantes funcionales descritas en la presente memoria, estas funciones biológicas se pueden cambiar, por ejemplo, con respecto a su especificidad o selectividad, pero con la retención de la función biológica básica.

En un aspecto, "tratar" se refiere tanto al tratamiento terapéutico como a las medidas profilácticas o preventivas, en el que el objetivo es prevenir o disminuir la afección o trastorno patológico objetivo como se describe en la presente memoria. Por lo tanto, en un aspecto, el tratamiento puede incluir afectar o curar directamente, suprimir, inhibir, prevenir, reducir la gravedad, retrasar la aparición, reducir los síntomas asociados con la enfermedad, trastorno o afección, o una combinación de los mismos. Por lo tanto, en un aspecto, "tratar" se refiere, entre otras cosas, a retrasar la progresión, acelerar la remisión, inducir la remisión, aumentar la remisión, acelerar la recuperación, aumentar la eficacia o disminuir la resistencia a terapias alternativas, o una combinación de ellas. En un aspecto, "prevenir" o "impedir" se refiere, entre otras cosas, a retrasar la aparición de los síntomas, prevenir la recaída de una enfermedad, disminuir el número o la frecuencia de los episodios de recaída, aumentar la latencia entre los episodios sintomáticos o una combinación de los mismos. En un aspecto, "suprimir" o "inhibir" se refiere, entre otras cosas, a reducir la gravedad de los síntomas, reducir la gravedad de un episodio agudo, reducir el número de síntomas, reducir la incidencia de síntomas relacionados con la enfermedad, reducir la latencia de los síntomas, mejorar los síntomas, reducir los síntomas secundarios, reducir las infecciones secundarias, prolongar la supervivencia del paciente o una combinación de los mismos.

En un aspecto, los síntomas son primarios, mientras que, en otro aspecto, los síntomas son secundarios. En un aspecto, "primario" se refiere a un síntoma que es un resultado directo de una enfermedad o trastorno particular, mientras que, en un aspecto, "secundario" se refiere a un síntoma que procede o es consecuencia de una causa primaria. En un aspecto, los compuestos para el uso como se describe en la presente memoria tratan síntomas primarios o secundarios o complicaciones secundarias. En otro aspecto, los "síntomas" pueden ser cualquier manifestación de una enfermedad o afección patológica.

En algunos aspectos, el término "que comprende" se refiere a la inclusión de otros polipéptidos recombinantes, secuencias de aminoácidos o secuencias de ácido nucleico, así como a la inclusión de otros polipéptidos, secuencias de aminoácidos o secuencias de ácido nucleico, que se pueden conocer en la técnica, que en un aspecto pueden comprender antígenos o polipéptidos de *Listeria*, secuencias de aminoácidos o secuencias de ácidos nucleicos. En algunos aspectos, el término "que consiste esencialmente en" se refiere a una composición para el uso en los métodos que se proporcionan en la presente memoria, que tiene el polipéptido recombinante específico, la secuencia de aminoácidos o la secuencia de ácido nucleico, o un fragmento del mismo. Sin embargo, se pueden incluir otros polipéptidos, secuencias de aminoácidos o secuencias de ácido nucleico que no están directamente involucrados en la utilidad de el/los polipéptido(s) recombinante(s). En algunos aspectos, el término "que consiste" se refiere a una composición para el uso en los métodos que se proporcionan en la presente memoria que tienen un polipéptido recombinante, secuencia de aminoácidos o secuencia de ácido nucleico particular, o fragmento o combinación de polipéptidos recombinantes, secuencias de aminoácidos o secuencias de ácido nucleico o fragmentos como se proporcionan en la presente memoria, en cualquier forma o aspecto como se describe en la presente memoria.

En un aspecto, las composiciones para el uso en los métodos que se proporcionan en la presente memoria se administran por vía intravenosa. En otro aspecto, la vacuna se administra por vía oral, mientras que, en otro aspecto, la vacuna se administra por vía parenteral (por ejemplo, por vía subcutánea, intramuscular y similares).

Además, en otro aspecto, las composiciones o vacunas se administran como un supositorio, por ejemplo, un supositorio rectal o un supositorio uretral. Además, en otro aspecto, las composiciones farmacéuticas se administran mediante la implantación subcutánea de una esfera. En un aspecto adicional, el sedimento proporciona la liberación controlada de un agente a lo largo de un período de tiempo. En otro aspecto más, las composiciones farmacéuticas se administran en forma de una cápsula.

En un aspecto, la vía de administración puede ser parenteral. En otro aspecto, la vía puede ser intraocular, conjuntival, tópica, transdérmica, intradérmica, subcutánea, intraperitoneal, intravenosa, intraarterial, vaginal, rectal, intratumoral, paraneural, transmucosa, intramuscular, intravascular, intraventricular, intracraneal, por inhalación (aerosol), aspiración nasal (espray), intranasal (gotas), sublingual, oral, en aerosol o supositorio o una combinación de los mismos. Para la administración intranasal o la aplicación por inhalación, son adecuadas las disoluciones o suspensiones de los compuestos mezclados y en aerosol o nebulizados en presencia del vehículo apropiado. Dicho aerosol puede comprender cualquier agente descrito en la presente memoria. En un aspecto, las composiciones que se exponen en la presente memoria pueden estar en una forma adecuada para la administración intracraneal, que, en un aspecto, es administración intratecal e intracerebroventricular. En un aspecto, el régimen de administración lo determinarán médicos expertos, según factores tales como la naturaleza exacta de la afección que se está tratando, la gravedad de la afección, la edad y el estado físico general del paciente, el peso corporal y la respuesta del paciente individual, etc.

En un aspecto, la aplicación parenteral, particularmente adecuada, son soluciones inyectables, estériles, preferiblemente soluciones oleosas o acuosas, así como suspensiones, emulsiones o implantes, que incluyen los supositorios y enemas. Las ampollas son dosis unitarias convenientes. Dicho supositorio puede comprender cualquier agente descrito en la presente memoria.

En un aspecto, pueden formularse composiciones de liberación sostenida o dirigida, por ejemplo, liposomas o aquellos en los que el compuesto activo está protegido con recubrimientos diferencialmente degradables, por ejemplo, mediante microencapsulación, recubrimientos múltiples, etc. Dichas composiciones pueden formularse para la liberación inmediata o lenta. También es posible liofilizar los nuevos compuestos y utilizar los liofilizados obtenidos, por ejemplo, para la preparación de productos para inyección.

En un aspecto, para las formulaciones líquidas, los vehículos farmacéuticamente aceptables pueden ser soluciones acuosas o no acuosas, suspensiones, emulsiones o aceites. Los ejemplos de disolventes no acuosos son propilenglicol, polietilenglicol y ésteres orgánicos inyectables tales como oleato de etilo. Los vehículos acuosos incluyen agua, soluciones alcohólicas/acuosas, emulsiones o suspensiones, que incluyen medios salinos y tamponados. Los ejemplos de aceites son los de petróleo, animales, vegetales o de origen sintético, por ejemplo, aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de oliva, aceite de girasol y aceite de hígado de pescado.

En un aspecto, las composiciones de esta invención son farmacéuticamente aceptables. En un aspecto, el término "farmacéuticamente aceptable" se refiere a cualquier formulación que sea segura y proporcione el suministro apropiado para la vía de administración deseada de una cantidad eficaz de al menos un compuesto para el uso en la presente invención. Este término también se refiere al uso de formulaciones tamponadas, en donde el pH se mantiene en un valor particular deseado, que va desde pH 4,0 a pH 9,0, de acuerdo con la estabilidad de los compuestos y la vía de administración.

En un aspecto, una composición de la invención o usada en los métodos descritos en la presente memoria puede administrarse sola o dentro de una composición. En otro aspecto, las composiciones de esta invención se pueden mezclar con excipientes convencionales, es decir, sustancias portadoras orgánicas o inorgánicas farmacéuticamente aceptables adecuadas para la aplicación parenteral, enteral (por ejemplo, oral) o tópica que no reaccionan de manera perjudicial con los compuestos activos. En un aspecto, los vehículos farmacéuticamente aceptables adecuados incluyen, entre otros, agua, soluciones salinas, alcoholes, goma arábiga, aceites vegetales, alcoholes bencílicos, polietilenglicoles, gelatina, carbohidratos tales como lactosa, amilosa o almidón, estearato de magnesio, talco, ácido silícico, parafina viscosa, parafina blanca, glicerol, alginatos, ácido hialurónico, colágeno, aceite de perfume, monoglicéridos y diglicéridos de ácidos grasos, ésteres de ácidos grasos y pentaeritritol, hidroximetilcelulosa, polivinilpirrolidona, etc. En otro aspecto, las preparaciones farmacéuticas se pueden esterilizar y, si se desea, mezclarlas con agentes auxiliares, por ejemplo, lubricantes, conservantes, estabilizantes, agentes humectantes, emulsionantes, sales para influir en la presión osmótica, tampones, colorantes, aromatizantes y/o sustancias aromáticas y similares que no reaccionan de forma perjudicial con los compuestos activos. En otro aspecto, también pueden combinarse cuando se desee con otros agentes activos, por ejemplo, vitaminas.

En un aspecto, las composiciones para el uso de los métodos y las composiciones que se proporcionan en la presente memoria pueden administrarse con un vehículo/diluyente. Los vehículos/diluyentes sólidos incluyen, pero sin limitación, una goma, un almidón (por ejemplo, almidón de maíz, almidón pregelatinizado), un azúcar (por ejemplo, lactosa, manitol, sacarosa, dextrosa), un material celulósico (por ejemplo, celulosa microcristalina), un acrilato (p. ej., polimetilacrilato), carbonato de calcio, óxido de magnesio, talco o mezclas de los mismos.

En un aspecto, las composiciones de los métodos y las composiciones que se proporcionan en la presente memoria pueden comprender la composición de esta invención y uno o más compuestos adicionales eficaces para prevenir o

tratar el cáncer. En algunos aspectos, el compuesto adicional puede comprender un compuesto útil en quimioterapia, que, en un aspecto, es cisplatino. En otro aspecto, se puede administrar Ifosfamida, Fluorouracilo 5-FU, Irinotecano, Paclitaxel (Taxol), Docetaxel, Gemcitabina, Topotecano o una combinación de los mismos, con una composición que se proporciona en la presente memoria para el uso en los métodos que se proporcionan en la presente memoria. En otro aspecto, puede administrarse Amsacrina, Bleomicina, Busulfán, Capecitabina, Carboplatino, Carmustina, Clorambucilo, Cisplatino, Cladribina, Clofarabina, Crisantaspasa, Ciclofosfamida, Citarabina, Dacarbazina, Dactinomicina, Daunorrubicina, Docetaxel, Doxorubicina, Epirubicina, Etopósido, Fludarabina, Fluorouracilo, Gemcitabina, implantes de Gliadel, Hidroxicarbamida, Idarrubicina, Ifosfamida, Irinotecano, Leucovorina, doxorubicina liposomal, daunorrubicina liposomal, Lomustina, Melfalano, Mercaptopurina, Mesna, Metotrexato, Mitomicina, Mitoxantrona, Oxaliplatino, Paclitaxel, Pemetrexed, Pentostatina, Procarbazina, Raltitrexed, Satraplatino, Streptozocina, Tegafur-uracilo, Temozolomida, Tenipósido, Tiotepa, Tioguanina, Topotecán, Treosulfán, Vinblastina, Vincristina, Vindesina, Vinorelbina, o una combinación de los mismos, con una composición que se proporciona en la presente memoria para su uso en los métodos que se proporcionan en la presente memoria.

En otro aspecto, las proteínas de fusión que se proporcionan en la presente memoria se preparan mediante un proceso que comprende la subclonación de secuencias apropiadas, seguido de la expresión del nucleótido resultante. En otro aspecto, las subsecuencias se clonan y las subsecuencias apropiadas se escinden utilizando enzimas de restricción apropiadas. Los fragmentos se ligan luego, en otro aspecto, para producir la secuencia de ADN deseada. En otro aspecto, 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). Primero, se amplifican los segmentos del ADN nativo a ambos lados del nuevo extremo 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, en agarosa LMP) se pueden usar como un molde solapante en una tercera reacción de PCR. La secuencia amplificada contendrá codones, el segmento en el lado carboxiterminal del sitio de apertura (que ahora forma la secuencia amino), el enlazador y la secuencia del lado amino del sitio de apertura (que ahora forma la secuencia carboxilo). El inserto se liga después en un plásmido. En otro aspecto, se usa una estrategia similar para producir una proteína en la que un fragmento de HMW-MAA está incrustado dentro de un péptido heterólogo.

Un aspecto descrito en la presente memoria proporciona una *Listeria* recombinante que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido antigénico heterólogo o un fragmento del mismo, en el que dicha molécula de ácido nucleico se integra de forma operable en el genoma de *Listeria* como un marco de lectura abierto con un polipéptido endógeno que comprende una secuencia PEST.

En un aspecto, en la presente memoria se proporciona una *Listeria* recombinante capaz de expresar y secretar dos antígenos heterólogos distintos que comprenden un primer antígeno que se integra de forma operable en el genoma como un marco de lectura abierto con un primer polipéptido o un fragmento del mismo que comprende una secuencia PEST y un segundo antígeno que se integra de forma operable en el genoma como un marco de lectura abierto con un segundo polipéptido o fragmento del mismo que comprende una secuencia PEST. En otro aspecto, dicho primer o segundo polipéptido o fragmento del mismo es ActA, o LLO. En otro aspecto, dicho primer o segundo antígeno es un antígeno asociado a un tumor de próstata (PSA), o un antígeno asociado a melanoma con alto peso molecular (HMW-MAA). En otro aspecto, dicho fragmento es un fragmento inmunogénico. En otro aspecto más, dicho vector de expresión episomal carece de un marcador de resistencia a antibióticos.

En otro aspecto, el primer y segundo antígeno son distintos. En otro aspecto, dichos primer y segundo antígenos se expresan de manera concomitante. En otro aspecto, dicho primer o segundo antígeno se expresan al mismo nivel. En otro aspecto, dicho primer o segundo antígeno se expresan de manera diferencial. En otro aspecto, la expresión de genes o proteínas se determina mediante métodos que son muy conocidos en la técnica, que, en otro aspecto, comprenden PCR en tiempo real, transferencia de Northern, inmunotransferencia, etc. En otro aspecto, dicha expresión del primer o segundo antígeno está controlada por un sistema inducible, mientras que, en otro aspecto, dicha expresión del primer o segundo antígeno está controlada por un promotor constitutivo. En otro aspecto, los sistemas de expresión inducibles son muy conocidos en la técnica.

En un aspecto, en la presente memoria se proporciona un método para preparar una *Listeria* recombinante capaz de expresar y secretar dos antígenos heterólogos distintos que seleccionan como objetivo las células tumorales y la angiogénesis de manera concomitante. En otro aspecto, dicho método para preparar dicha *Listeria* recombinante comprende las etapas de fusionar genéticamente un primer antígeno en el genoma que está unido de forma operable a un marco de lectura abierto que codifica un primer polipéptido o fragmento del mismo que comprende una secuencia PEST, y transformar dicha *Listeria* recombinante con un vector de expresión episomal que codifica un segundo antígeno que está unido de forma operable a un marco de lectura abierto que codifica un segundo polipéptido o fragmento del mismo que comprende una secuencia PEST. En otro aspecto, dicho método para preparar dicha *Listeria* recombinante comprende las etapas de fusionar genéticamente un primer antígeno en el genoma que está unido de forma operable a un marco de lectura abierto que codifica un primer polipéptido o fragmento del mismo que comprende una secuencia PEST, y fusionar genéticamente un segundo antígeno que está unido de forma operable a un marco de lectura abierto que codifica un segundo polipéptido o fragmento del mismo que comprende una secuencia PEST.

Los métodos para transformar bacterias son muy conocidos en la técnica, e incluyen métodos basados en células competentes con cloruro de calcio, métodos de electroporación, transducción mediada por bacteriófagos, técnicas de transformación química y física (de Boer et al, 1989, Cell 56: 641-649; Miller et al, 1995, FASEB J., 9: 190-199; Sambrook et al. 1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York; Ausubel et al., 1997, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Nueva York; Gerhardt et al., Eds., 1994, Methods for General and Molecular Bacteriology, American Society for Microbiology, Washington, DC; Miller, 1992, A Short Course in Bacterial Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.). En otro aspecto, la cepa de vacuna de *Listeria* que se proporciona en la presente memoria se transforma mediante electroporación. Cada método representa un aspecto distinto de los métodos y las composiciones que se proporcionan en la presente memoria.

En un aspecto, en la presente memoria se proporciona un método para inducir una respuesta inmunitaria hacia un antígeno en un sujeto, que comprende administrar una cepa de *Listeria* recombinante a dicho sujeto, en donde dicha cepa de *Listeria* recombinante comprende una primera y una segunda molécula de ácido nucleico, cada una de las cuales codifica un polipéptido antigénico heterólogo o fragmento del mismo, en el que dicha primera molécula de ácido nucleico se integra de forma operable en el genoma de *Listeria* como un marco de lectura abierto con un ácido nucleico que codifica un polipéptido endógeno que comprende una secuencia PEST.

En otro aspecto, en la presente memoria se proporciona un método para inhibir la aparición del cáncer, y dicho método comprende la etapa de administrar una composición de *Listeria* recombinante que expresa dos antígenos heterólogos distintos expresados específicamente en dicho cáncer.

En un aspecto, en la presente memoria se proporciona un método para tratar un primer y un segundo tumor en un sujeto, y dicho método comprende la etapa de administrar una composición de *Listeria* recombinante que expresa dos antígenos heterólogos distintos expresados específicamente en dicho primer y segundo tumor.

En otro aspecto, en la presente memoria se proporciona un método para mejorar los síntomas que están asociados con un cáncer en un sujeto, y dicho método comprende la etapa de administrar una composición de *Listeria* recombinante que expresa dos antígenos heterólogos distintos expresados específicamente en dicho cáncer.

En un aspecto, en la presente memoria se proporciona un método para proteger a un sujeto del cáncer, y dicho método comprende la etapa de administrar una composición de *Listeria* recombinante que expresa dos antígenos heterólogos distintos expresados específicamente en dicho cáncer.

En otro aspecto, en la presente memoria se proporciona un método para retrasar la aparición del cáncer, y dicho método comprende la etapa de administrar una composición de *Listeria* recombinante que expresa dos antígenos heterólogos distintos expresados específicamente en dicho cáncer. En otro aspecto, en la presente memoria se proporciona un método para tratar el cáncer metastásico, y dicho método comprende la etapa de administrar una composición de *Listeria* recombinante que expresa dos antígenos heterólogos distintos expresados específicamente en dicho cáncer. En otro aspecto, en la presente memoria se proporciona un método para prevenir el cáncer metastásico o la micrometástasis, y dicho método comprende la etapa de administrar una composición de *Listeria* recombinante que expresa dos antígenos heterólogos distintos expresados específicamente en dicho cáncer. En otro aspecto, la composición de *Listeria* recombinante se administra por vía oral o parenteral.

Un aspecto descrito en la presente memoria proporciona un método para producir una cepa de *Listeria* recombinante que expresa dos antígenos, y el método comprende: (a) fusionar genéticamente un primer ácido nucleico que codifica un primer antígeno en el genoma de *Listeria* en un marco de lectura abierto con un gen que contiene PEST endógeno; (b) transformar dicha *Listeria* recombinante con un vector de expresión episomal que comprende un segundo ácido nucleico que codifica un segundo antígeno; y (c) expresar dichos primer y segundo antígenos en condiciones conducentes a la expresión antigénica en dicha cepa de *Listeria* recombinante. Otro aspecto descrito en la presente memoria proporciona un método para producir una cepa de *Listeria* recombinante que expresa dos antígenos, y el método comprende: (a) fusionar genéticamente un primer ácido nucleico que codifica un primer antígeno y un segundo ácido nucleico que codifica un segundo antígeno en el genoma de *Listeria* en un marco de lectura abierto con un gen que contiene PEST endógeno; y (b) expresar dichos primer y segundo antígenos en condiciones conducentes a la expresión antigénica en dicha cepa de *Listeria* recombinante. En un aspecto, la fusión genética es mediante recombinación homóloga, como se describe en la presente memoria. En un aspecto, las condiciones que conducen a la expresión antigénica se conocen en la técnica.

En otro aspecto de los métodos y las composiciones que se proporcionan en la presente memoria, "ácidos nucleicos" o "nucleótido" se refiere a una cadena de al menos dos combinaciones de base-azúcar-fosfato. El término incluye, en un aspecto, ADN y ARN. "Nucleótidos" se refiere, en un aspecto, a las unidades monoméricas de los polímeros de ácido nucleico. El ARN puede estar, en un aspecto, en forma de un ARNt (ARN de transferencia), ARNs (ARN nuclear pequeño), ARNr (ARN ribosomal), ARNm (ARN mensajero), ARN inverso, ARN inhibitorio pequeño (siARN), micro ARN (miARN) y ribozimas. Se ha descrito el uso de siARN y miARN (Caudy AA et al, Genes & Devel 16: 2491-96 y las referencias citadas en ese documento). El ADN puede estar en forma de ADN plasmídico, ADN viral, ADN lineal o ADN cromosómico o derivados de estos grupos. Además, estas formas de ADN y ARN pueden ser de cadena simple, doble, triple o cuádruple. El término también incluye, en otro aspecto, ácidos nucleicos artificiales que pueden contener

otros tipos de esqueletos pero las mismas bases. En un aspecto, el ácido nucleico artificial es un APN (ácido peptidonucleico). Los APN contienen esqueletos peptídicos y bases de nucleótidos y son capaces de unirse, en un aspecto, tanto a las moléculas de ADN como a las de ARN. En otro aspecto, el nucleótido está modificado con oxetano. En otro aspecto, el nucleótido se modifica mediante la sustitución de uno o más enlaces fosfodiéster con un enlace fosforotioato. En otro aspecto, el ácido nucleico artificial contiene cualquier otra variante del esqueleto de fosfato de los ácidos nucleicos nativos conocida en la técnica. Los expertos en la técnica conocen el uso de ácidos nucleicos de fosforotioato y APN, y se describe, por ejemplo, en Neilsen PE, *Curr Opin Struct Biol* 9: 353-57; y Raz NK et al *Biochem Biophys Res Commun*. 297: 1075-84. Los expertos en la técnica conocen la producción y el uso de ácidos nucleicos, 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. Cada derivado de ácido nucleico representa un aspecto distinto como se proporciona en la presente memoria.

Los términos "polipéptido", "péptido" y "péptido recombinante" se refieren, en otro aspecto, a un péptido o polipéptido de cualquier longitud. En otro aspecto, un péptido o péptido recombinante como se proporciona en la presente memoria tiene una de las longitudes enumeradas anteriormente para un fragmento de HMW-MAA. Cada posibilidad representa un aspecto distinto de los métodos y las composiciones que se proporcionan en la presente memoria. En un aspecto, el término "péptido" se refiere a péptidos nativos (ya sea productos de degradación, péptidos sintetizados sintéticamente o péptidos recombinantes) y/o moléculas peptidomiméticas (péptidos sintetizados sintéticamente, típicamente), tales como peptoides y semipeptoides que son análogos de péptidos, que pueden tener, por ejemplo, modificaciones que hacen que los péptidos sean más estables mientras están en un cuerpo o más capaces de penetrar en las células. Dichas modificaciones incluyen, pero sin limitación, la modificación del extremo N-terminal, la modificación del extremo C-terminal, la modificación del enlace peptídico, incluidos, entre otros, CH₂-NH, CH₂-S, CH₂-S=O, O=C-NH, CH₂-O, CH₂-CH₂, S=C-NH, CH=CH o CF=CH, las modificaciones del esqueleto y la modificación de residuos. Los métodos para preparar compuestos peptidomiméticos son muy conocidos en la técnica y se especifican, por ejemplo, en *Quantitative Drug Design*, CA Ramsden Gd., Capítulo 17.2, F. Choplin Pergamon Press (1992). Se proporcionan más detalles a este respecto a continuación en la presente memoria.

En un aspecto, el "polipéptido antigénico" se usa en la presente memoria para referirse a un polipéptido, péptido o péptido recombinante como se describió anteriormente en la presente memoria que es exógeno para un huésped y conduce a la generación de una respuesta inmune cuando está presente, o, en otro aspecto, lo detecta, el huésped.

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

Estas modificaciones pueden ocurrir en cualquiera de los enlaces a lo largo de la cadena peptídica e incluso en varios (2-3) al mismo tiempo. Los aminoácidos aromáticos naturales, Trp, Tyr y Phe, se pueden sustituir por ácidos artificiales sintéticos tales como TIC, naftilelanina (Nol), derivados metilados en el anillo de Phe, derivados halogenados de Phe u o-metil-Tyr.

Además de lo anterior, los péptidos que se proporcionan en la presente memoria también pueden incluir uno o más aminoácidos modificados o uno o más monómeros que no son aminoácidos (por ejemplo, ácidos grasos, carbohidratos complejos, etc.).

En un aspecto, el término "oligonucleótido" es intercambiable con el término "ácido nucleico", y puede referirse a una molécula, que puede incluir, pero sin limitación, secuencias procarióticas, ARNm eucariótico, ADNc de ARNm eucariótico, secuencias de ADN genómico de ADN eucariótico (por ejemplo, de mamíferos), e incluso secuencias de ADN sintético. El término también se refiere a secuencias que incluyen cualquiera de los análogos de bases conocidas de ADN y ARN.

"Mantenido de forma estable" se refiere, en otro aspecto, al mantenimiento de una molécula de ácido nucleico o plásmido en ausencia de selección (por ejemplo, selección con antibióticos) durante 10 generaciones, sin una pérdida detectable. En otro aspecto, el período es de 15 generaciones. En otro aspecto, el período es de 20 generaciones. En otro aspecto, el período es de 25 generaciones. En otro aspecto, el período es de 30 generaciones. En otro aspecto, el período es de 40 generaciones. En otro aspecto, el período es de 50 generaciones. En otro aspecto, el período es de 60 generaciones. En otro aspecto, el período es de 80 generaciones. En otro aspecto, el período es de 100 generaciones. En otro aspecto, el período es de 150 generaciones. En otro aspecto, el período es de 200 generaciones. En otro aspecto, el período es de 300 generaciones. En otro aspecto, el período es de 500 generaciones. En otro aspecto, el período es de más de 500 generaciones. En otro aspecto, la molécula de ácido nucleico o plásmido se mantiene estable in vitro (por ejemplo, en cultivo). En otro aspecto, la molécula de ácido nucleico o plásmido se mantiene estable in vivo. En otro aspecto, la molécula de ácido nucleico o plásmido se mantiene estable tanto in vitro como in vivo. Cada posibilidad representa un aspecto distinto de los métodos y las composiciones que se proporcionan en la presente memoria.

En un aspecto, el término "aminoácido" o "aminoácidos" se entiende que incluye los 20 aminoácidos naturales; esos aminoácidos a menudo se modifican después de la traducción in vivo, e incluyen, por ejemplo, hidroxiprolina, fosfoserina y fosfotreonina; y otros aminoácidos inusuales que incluyen, entre otros, ácido 2-aminoadípico, hidroxilisina, isodesmosina, nor-valina, nor-leucina y ornitina. Además, el término "aminoácido" puede incluir tanto D- como L-aminoácidos.

El término "ácido nucleico" o "secuencia de ácido nucleico" se refiere a un oligonucleótido desoxirribonucleótido o ribonucleótido en forma mono- o bicatenaria. El término abarca ácidos nucleicos, es decir, oligonucleótidos, que contienen análogos conocidos de nucleótidos naturales que tienen propiedades de unión similares o mejoradas, para los fines deseados, como el ácido nucleico de referencia. El término también incluye ácidos nucleicos que se metabolizan de manera similar a los nucleótidos naturales o a velocidades que se mejoran en los mismos para los fines deseados. El término también abarca estructuras similares a los ácidos nucleicos con esqueletos sintéticos. Los análogos del esqueleto de ADN descritos en la presente memoria incluyen fosfodiéster, fosforotioato, fosforoditioato, metilfosfonato, fosforamidato, alquilfosfotriéster, sulfamato, 3'-tioacetal, metileno (metilimino), 3'-N-carbamato, morfolino carbamato y ácidos peptidonucleicos); véase, por ejemplo, *Oligonucleotides and Analogues, a Practical Approach*, editado por F. Eckstein, IRL Press de Oxford University Press (1991); *Antisense Strategies*, *Annals of the New York Academy of Sciences*, Volumen 600, Eds. Baserga y Denhardt (NYAS 1992); Mulligan (1993) *J. Med. Chem.* 36:1923-1937; *Antisense Research and Applications* (1993, CRC Press). Los APN contienen esqueletos no iónicos, tales como unidades de N-(2-aminoetil) glicina. Los enlaces de fosforotioato se describen, por ejemplo, en los documentos WO 97/03211; WO 96/39154; Mata (1997) *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 144: 189-197. Otros esqueletos sintéticos abarcados por el término incluyen enlaces metilfosfonato o enlaces alternativos de metil-fosfonato y fosfodiéster (Strauss-Soukup (1997) *Biochemistry* 36: 8692-8698), y enlaces de bencilfosfonato (Samstag (1996) *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* 6: 153-156). El término ácido nucleico se usa indistintamente con un gen, ADNc, ARNm, cebador oligonucleotídico, sonda y producto de amplificación.

En un aspecto de los métodos y las composiciones que se proporcionan en la presente memoria, el término "sitio de recombinación" o "sitio de recombinación específico de sitio" se refiere a una secuencia de bases en una molécula de ácido nucleico que es reconocida por una recombinasa (junto con proteínas asociadas, en algunos casos) que media en el intercambio o la escisión de los segmentos de ácido nucleico que flanquean los sitios de recombinación. Las recombinasas y las proteínas asociadas se denominan colectivamente "proteínas de recombinación", véase, por ejemplo, Landy, A., (*Current Opinion in Genetics & Development*) 3: 699-707; 1993).

Un "vector de expresión en fago" o "fagémido" se refiere a cualquier sistema de expresión recombinante basado en fagos con el fin de expresar una secuencia de ácido nucleico de los métodos y las composiciones que se proporcionan en la presente memoria in vitro o in vivo, de forma constitutiva o inducible, en cualquier célula, lo que incluye las células procarióticas, de levadura, fúngicas, vegetales, de insectos o mamíferos. Un vector de expresión en fago típicamente puede reproducirse en una célula bacteriana y, en condiciones adecuadas, producir partículas de fago. El término incluye los sistemas de expresión lineal o circular, y abarca los vectores de expresión basados en fagos que permanecen episomales o se integran en el genoma de la célula huésped.

En un aspecto, el término "unido de forma operable", como se usa en la presente memoria, significa que el ácido nucleico regulador de la transcripción y la traducción se posiciona con relación a cualquier secuencia codificante de tal manera que se inicie la transcripción. En general, esto significará que el promotor y las secuencias de inicio de la transcripción están posicionadas en 5' respecto de la región codificante.

En un aspecto, un "marco de lectura abierto" u "ORF" es una parte del genoma de un organismo que contiene una secuencia de bases que potencialmente podría codificar una proteína. En otro aspecto, los extremos inicial y final del ORF no son equivalentes a los extremos del ARNm, pero generalmente están contenidos dentro del ARNm. En un aspecto, los ORF están ubicados entre la secuencia del codón de inicio (codón de iniciación) y la secuencia de codón de parada (codón de terminación) de un gen. Por lo tanto, en un aspecto, una molécula de ácido nucleico integrada de forma operable en un genoma como un marco de lectura abierto con un polipéptido endógeno es una molécula de ácido nucleico que se ha integrado en un genoma en el mismo marco de lectura abierto que un polipéptido endógeno.

Un aspecto descrito en la presente memoria proporciona un polipéptido de fusión que comprende una secuencia enlazadora. En un aspecto, una "secuencia enlazadora" se refiere a una secuencia de aminoácidos que une dos polipéptidos heterólogos, o fragmentos o dominios de los mismos. En general, como se usa en la presente memoria, un enlazador es una secuencia de aminoácidos que une covalentemente los polipéptidos para formar un polipéptido de fusión. Un enlazador incluye típicamente los aminoácidos traducidos de la señal de recombinación restante después de la eliminación de un gen indicador de un vector de expresión para crear una proteína de fusión que comprende una secuencia de aminoácidos codificada por un marco de lectura abierto y la proteína de expresión. Como apreciará un experto en la técnica, el enlazador puede comprender aminoácidos adicionales, tales como glicina y otros aminoácidos neutros pequeños.

En un aspecto, "endógeno", como se usa en la presente memoria, describe un artículo que se ha desarrollado o se ha originado dentro del organismo de referencia, o que ha surgido dentro del organismo de referencia. En otro aspecto, endógeno se refiere a nativo.

En un aspecto, "heterólogo", como se usa en la presente memoria, describe un ácido nucleico, aminoácido, péptido, polipéptido o proteína derivada de una especie diferente de la especie de referencia. Así, por ejemplo, una cepa de *Listeria* que expresa un polipéptido heterólogo, en un aspecto, expresaría un polipéptido que no es nativo o endógeno respecto de la cepa de *Listeria*, o en otro aspecto, un polipéptido que normalmente no se expresa en la cepa de *Listeria*, o en otro aspecto, un polipéptido de una fuente distinta de la cepa de *Listeria*. En otro aspecto, se puede usar heterólogo para describir algo derivado de un organismo diferente dentro de la misma especie. En otro aspecto, el antígeno heterólogo se expresa mediante una cepa recombinante de *Listeria*, y se procesa y presenta a las células T citotóxicas tras la infección de células de mamífero por la cepa recombinante. En otro aspecto, el antígeno heterólogo expresado por las especies de *Listeria* no necesita coincidir con precisión con el antígeno o la proteína sin modificar correspondiente en la célula tumoral o el agente infeccioso, siempre que dé como resultado una respuesta de células T que reconozca el antígeno o la proteína sin modificar que se expresa naturalmente en el mamífero.

En un aspecto, un "vector de expresión episomal", como se describe en la presente memoria, se refiere a un vector de ácido nucleico que puede ser lineal o circular, y que normalmente tiene una forma bicatenaria. En una realización, un vector de expresión episomal comprende un gen de interés. En otro aspecto, el gen de interés insertado no se interrumpe ni se somete a las restricciones regulatorias que a menudo se producen por la integración en el ADN celular. En otro aspecto, la presencia del gen heterólogo insertado no conduce a la reorganización o la interrupción de las regiones importantes propias de la célula. En otro aspecto, los vectores episómicos persisten en múltiples copias en el citoplasma bacteriano, lo que da como resultado la amplificación del gen de interés y, en otro aspecto, se suministran factores virales que actúan en trans cuando es necesario. En otro aspecto, en procedimientos de transfección estable, el uso de vectores episomales a menudo da como resultado una mayor eficiencia de transfección que el uso de plásmidos de integración cromosómica (Belt, P.B.G.M., et al (1991) Efficient cDNA cloning by direct phenotypic correction of a mutant human cell line (HPRT2) using an Epstein-Barr virus-derived cDNA expression vector. *Nucleic Acids Res.* 19, 4861-4866; Mazda, O., et al. (1997) Extremely efficient gene transfection into lymphohematopoietic cell lines by Epstein-Barr virusbased vectors. *J. Immunol. Methods* 204, 143-151). En un aspecto, los vectores de expresión episomal de los métodos y las composiciones que se proporcionan en la presente memoria pueden administrarse a células in vivo, ex vivo o in vitro mediante cualquiera de una variedad de los métodos empleados para suministrar moléculas de ADN a las células. Los vectores también pueden administrarse solos o en forma de una composición farmacéutica que mejora la administración a las células de un sujeto.

En un aspecto, "fusionado" se refiere a la unión mediante enlaces covalentes.

"Transformación", en un aspecto, se refiere a la modificación de una célula bacteriana para captar un plásmido u otra molécula de ADN heteróloga. En otro aspecto, "transformar" se refiere a la modificación de una célula bacteriana para expresar un gen de un plásmido u otra molécula de ADN heteróloga. Cada posibilidad representa un aspecto distinto de los métodos y las composiciones que se proporcionan en la presente memoria.

En otro aspecto, la conjugación se usa para introducir material genético y/o plásmidos en bacterias. Los métodos para la conjugación son muy conocidos en la técnica, y se describen, por ejemplo, en Nikodinovic J et al. (A second generation snp- derived *Escherichia coli*-*Streptomyces* shuttle expression vector that is generally transferable by conjugation. *Plasmid*. nov. de 2006; 56 (3): 223-7) y Auchtung JM et al (Regulation of a *Bacillus subtilis* mobile genetic element by intercellular signaling and the global DNA damage response. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 30 de agosto de 2005; 102 (35): 12554-9). Cada método representa un aspecto distinto de los métodos y las composiciones que se proporcionan en la presente memoria.

"Enzima metabólica" se refiere, en otro aspecto, a una enzima involucrada en la síntesis de un nutriente requerido por las bacterias huésped. En otro aspecto, el término se refiere a una enzima requerida para la síntesis de un nutriente requerido por las bacterias huésped. En otro aspecto, el término se refiere a una enzima involucrada en la síntesis de un nutriente utilizado por las bacterias huésped. En otro aspecto, el término se refiere a una enzima involucrada en la síntesis de un nutriente requerido para el crecimiento sostenido de las bacterias huésped. En otro aspecto, la enzima es necesaria para la síntesis del nutriente. Cada posibilidad representa un aspecto distinto de los métodos y las composiciones que se proporcionan en la presente memoria.

En un aspecto, el término "atenuación", como se usa en la presente memoria, significa una disminución de la capacidad de la bacteria de causar una enfermedad en un animal. En otras palabras, las características patógenas de la cepa de *Listeria* atenuada se han reducido en comparación con la *Listeria* de tipo natural, aunque la *Listeria* atenuada es capaz de crecer y mantenerse en cultivo. Usando como ejemplo la inoculación intravenosa en ratones Balb/c de *Listeria* atenuada, la dosis letal a la que sobreviven el 50% de los animales inoculados (DL50) se incrementa preferiblemente por encima de la DL50 de *Listeria* de tipo natural en al menos aproximadamente 10 veces, más preferiblemente al menos aproximadamente 100 veces, más preferiblemente al menos aproximadamente 1.000 veces, incluso más preferiblemente al menos aproximadamente 10.000 veces, y lo más preferiblemente al menos aproximadamente 100.000 veces. Una cepa atenuada de *Listeria* es, por lo tanto, una que no mata a un animal al que se administra, o es una que mata al animal solo cuando el número de bacterias administradas es mucho mayor que el número de bacterias no atenuadas de tipo natural que serían necesarias para matar al mismo animal. Una bacteria atenuada también debe interpretarse como una que es incapaz de replicarse en el medio general porque el nutriente necesario para su crecimiento no está presente en el mismo. Por lo tanto, la bacteria se limita a la replicación en un medio controlado en el que se proporciona el nutriente necesario. Las cepas atenuadas de la presente invención son, por lo

tanto, seguras para el medio ambiente en el sentido de que son incapaces de tener una replicación incontrolada.

El término "aproximadamente", como se usa en la presente memoria, significa en términos cuantitativos más o menos un 5%, o, en otro aspecto, más o menos un 10%, o, en otro aspecto, más o menos un 15%, o, en otro aspecto, más o menos un 20%.

5 El término "sujeto" se refiere en un aspecto a un mamífero que incluye un ser humano que necesita terapia o es susceptible a una afección o a sus secuelas. El sujeto puede incluir perros, gatos, cerdos, vacas, ovejas, cabras, caballos, ratas y ratones y humanos. En un aspecto, el término "sujeto" no excluye a un individuo que esté sano en todos los aspectos y que no tenga ni muestre signos de enfermedad o trastorno.

10 En un aspecto, la *Listeria* como se proporciona en la presente memoria expresa un polipéptido heterólogo, como se describe en la presente memoria, en otro aspecto, la *Listeria* como se proporciona en la presente memoria secreta un polipéptido heterólogo, como se describe en la presente memoria, y en otro aspecto, la *Listeria* como se proporciona en la presente memoria expresa y secreta un polipéptido heterólogo, como se describe en la presente memoria. En otro aspecto, la *Listeria* como se proporciona en la presente memoria comprende un polipéptido heterólogo, y, en otro aspecto, comprende un ácido nucleico que codifica un polipéptido heterólogo.

15 En un aspecto, las cepas de *Listeria* como se proporcionan en la presente memoria pueden usarse en la preparación de vacunas. En un aspecto, las cepas de *Listeria* tal como se proporcionan en la presente memoria pueden usarse en la preparación de vacunas peptídicas. Los métodos para preparar vacunas peptídicas son muy conocidos en la técnica y se describen, por ejemplo, en el documento EP1408048, el número de solicitud de patente de Estados Unidos 20070154953, y OGASAWARA et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 89, págs. 8995-8999, octubre de 1992). En un
20 aspecto, se utilizan técnicas de evolución de péptidos para crear un antígeno con mayor inmunogenicidad. Las técnicas de evolución de péptidos son muy conocidas en la técnica y se describen, por ejemplo, en la patente de Estados Unidos 6773900.

En un aspecto, las vacunas de los métodos y las composiciones que se proporcionan en la presente memoria pueden administrarse a un animal vertebrado huésped, preferiblemente un mamífero, y más preferiblemente un ser humano,
25 ya sea solas o en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable. En otro aspecto, la vacuna se administra en una cantidad efectiva para inducir una respuesta inmune hacia la propia cepa de *Listeria* o hacia un antígeno heterólogo que la especie de *Listeria* ha sido modificada para expresar. En otro aspecto, la cantidad de vacuna a administrar la puede determinar rutinariamente un experto en la técnica cuando está en posesión de la presente descripción. En otro aspecto, un vehículo farmacéuticamente aceptable puede incluir, pero sin limitación, agua
30 destilada estéril, solución salina, soluciones tamponadas con fosfato o soluciones tamponadas con bicarbonato. En otro aspecto, el vehículo farmacéuticamente aceptable seleccionado y la cantidad de vehículo a usar dependerán de varios factores que incluyen el modo de administración, la cepa de *Listeria* y la edad y el estado de la enfermedad del vacunado. En otro aspecto, la administración de la vacuna puede ser por vía oral, o puede ser parenteral, intranasal, intramuscular, intravascular, intrarrectal, intraperitoneal, o cualquiera de una variedad de vías de administración muy
35 conocidas. En otro aspecto, la vía de administración puede seleccionarse de acuerdo con el tipo de agente infeccioso o tumor a tratar.

Un aspecto descrito en la presente memoria proporciona una cepa de *Listeria* recombinante que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido antigénico heterólogo o un fragmento del mismo, en el que
40 dicha molécula de ácido nucleico se integra de forma operable en el genoma de *Listeria* en un marco de lectura abierto con un gen que contiene PEST endógeno.

Otro aspecto descrito en la presente memoria proporciona un método para inducir una respuesta inmune a un antígeno en un sujeto que comprende administrar una cepa de *Listeria* recombinante que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido antigénico heterólogo o un fragmento del mismo, en el que dicha molécula de
45 ácido nucleico se integra de forma operable en el genoma de *Listeria* en un marco de lectura abierto con un gen que contiene PEST endógeno.

Otro aspecto descrito en la presente memoria proporciona un método para tratar, suprimir o inhibir un cáncer en un sujeto que comprende administrar una cepa de *Listeria* recombinante que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido antigénico heterólogo o un fragmento del mismo, en el que dicha molécula de ácido nucleico
50 se integra de forma operable en el genoma de *Listeria* en un marco de lectura abierto con un gen que contiene PEST endógeno.

Otro aspecto descrito en la presente memoria proporciona un método para tratar, suprimir o inhibir al menos un tumor en un sujeto que comprende administrar una cepa de *Listeria* recombinante que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido antigénico heterólogo o un fragmento del mismo, en el que dicha molécula de
55 ácido nucleico se integra de forma operable en el genoma de *Listeria* en un marco de lectura abierto con un gen que contiene PEST endógeno.

Otro aspecto descrito en la presente memoria proporciona un método para producir una cepa de *Listeria* recombinante que expresa un antígeno, y el método comprende fusionar genéticamente un primer ácido nucleico que codifica un antígeno en el genoma de *Listeria* en un marco de lectura abierto con un gen que contiene PEST endógeno; y expresar

dicho antígeno en condiciones conducentes a la expresión antigénica en dicha cepa de *Listeria* recombinante.

Otro aspecto descrito en la presente memoria proporciona cualquiera de los métodos descritos anteriormente en la presente memoria utilizando una cepa de *Listeria* recombinante que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido antigénico heterólogo o un fragmento del mismo, en el que dicha molécula de ácido nucleico se integra de forma operable en el genoma de *Listeria* en un marco de lectura abierto con un gen que contiene PEST endógeno.

Otro aspecto descrito en la presente memoria proporciona un kit para poner en práctica convenientemente los métodos que se proporcionan en la presente memoria, que comprende una o más cepas de *Listeria* tal como se proporciona en la presente memoria, un aplicador y material instructivo que describe cómo usar los componentes del kit al poner en práctica los métodos tal como se proporcionan en la presente memoria.

Los siguientes ejemplos se presentan para ilustrar más detalladamente los aspectos descritos en la presente memoria.

Ejemplos

Se desarrolló una *Lm* recombinante que secreta PSA fusionado a tLLO (Lm-LLO-PSA), que provoca una potente respuesta inmune específica de PSA asociada a la regresión de tumores en un modelo de ratón del cáncer de próstata, en donde la expresión de tLLO-PSA procede de un plásmido basado en pGG55 (Tabla 1), que confiere resistencia a antibióticos al vector. Recientemente se desarrolló una nueva cepa para la vacuna de PSA basada en el plásmido pADV142, que no tiene marcadores de resistencia a antibióticos, y se denomina *LmddA-142* (Tabla 1). Esta nueva cepa está 10 veces más atenuada que *Lm*-LLO-PSA. Además, *LmddA-142* fue ligeramente más inmunogénica y significativamente más eficaz en la regresión de tumores que expresan PSA que la *Lm*-LLO-PSA.

Tabla 1. Plásmidos y cepas

Plásmidos	Características
pGG55	Plásmido lanzadera pAM401/pGB354 con resistencia a gram (-) y gram (+) <i>cm</i> , casete de expresión LLO-E7 y una copia del gen <i>prfA</i> de <i>Lm</i>
pTV3	Derivado de pGG55 delecionando los genes <i>cm</i> e insertando el gen <i>dal</i> de <i>Lm</i>
pADV119	Derivado de pTV3 delecionando el gen <i>prfA</i>
pADV134	Derivado de pADV119 reemplazando el gen <i>dal</i> de <i>Lm</i> por el gen <i>dal</i> de <i>Bacillus</i>
pADV142	Derivado de pADV134 reemplazando HPV16 <i>e7</i> con <i>klk3</i>
pADV168	Derivado de pADV134 reemplazando HPV16 <i>e7</i> con <i>hmw-maa</i> ₂₁₆₀₋₂₂₅₈
Cepas	Genotipo
10403S	<i>Listeria monocytogenes</i> de tipo natural:: <i>str</i>
XFL-7	10403S <i>prfA</i> ⁽⁻⁾
<i>Lmdd</i>	10403S <i>dal</i> ⁽⁻⁾ <i>dat</i> ⁽⁻⁾
<i>LmddA</i>	10403S <i>dal</i> ⁽⁻⁾ <i>dat</i> ⁽⁻⁾ <i>actA</i> ⁽⁻⁾
<i>LmddA-134</i>	10403S <i>dal</i> ⁽⁻⁾ <i>dat</i> ⁽⁻⁾ <i>actA</i> ⁽⁻⁾ pADV134
<i>LmddA-142</i>	10403S <i>dal</i> ⁽⁻⁾ <i>dat</i> ⁽⁻⁾ <i>actA</i> ⁽⁻⁾ pADV142
<i>Lmdd-143</i>	10403S <i>dal</i> ⁽⁻⁾ <i>dat</i> ⁽⁻⁾ con <i>klk3</i> fusionado con el gen <i>hly</i> en el cromosoma
<i>LmddA-143</i>	10403S <i>dal</i> ⁽⁻⁾ <i>dat</i> ⁽⁻⁾ <i>actA</i> ⁽⁻⁾ con <i>klk3</i> fusionado con el gen <i>hly</i> en el cromosoma
<i>LmddA-168</i>	10403S <i>dal</i> ⁽⁻⁾ <i>dat</i> ⁽⁻⁾ <i>actA</i> ⁽⁻⁾ pADV168
<i>Lmdd-143/134</i>	<i>Lmdd-143</i> pADV134
<i>LmddA-143/134</i>	<i>LmddA-143</i> pADV134
<i>Lmdd-143/168</i>	<i>Lmdd-143</i> pADV168
<i>LmddA-143/168</i>	<i>LmddA-143</i> pADV168

La secuencia del plásmido pAdv142 (6523 pb) fue la siguiente: cggagtgatactggttactatgttggcactgatgagg
 tgtcagtgaaagtgctcatgtggcaggagaaaaaggctgcaccggctgcagcagaatattgtatagcagatattccgcttccctgctcactgactcgtacgct
 cggctgctgactgagcggcgagcggaaatggcttacgaacggggcggagattcctggaagatgccaggaagataacttaacagggaagtgagagggcggcgca
 aagccgctttccataggctccgccccctgacaagcatcacgaaatctgacgctcaaatcagtggtggcgaacccgacaggactataaagataccaggcgtttcc
 5 ccttggcggctccctgctgctccttctgctccttccggttaccggctgcttccgctgttattgcccggcttctcattccacgctgacactcagttccgggtaggc
 agttcgctccaagctggactgtatgcacgaacccccgctcagtcgacgcttccggttaactatcgttctgagccaacccggaagacatgcaaaagc
 accactggcagcagccactggttaattgatttagaggatgtctgaagtcagcgggtaaggcctaactgaaggacaagtttgggactgctcctccaag
 ccagttacctgtaaaagagtggtgtagcagagaacctcgaaaaacccgctgcaaggcgttttctgctcagagcagagattacggcgagaccaaaccg
 atctcaagaagatccttattaatcagataaaatattctagccctccttgattagatattcctatctaaagttaactttatgtggaggcattaacattgttaatgacgca
 10 aaggatagcaagactagaataaagctataaagcaagcatataattgctgttctttagaagcgaatttcgccaataattataaatacgaagagaggggtggca
 aacggtattggcattattaggtaaaaaatgtagaaggagagtgaaacccatgaaaaaataatgctagttttattacacttattagttagctaccaattgcgcaac
 aaactgaagcaaggatgcatctgcatcaataaagaaaatcaatttcatcattgacccaccagcatctccgctgcaagtcctaagacgccaatgaaaagaa
 acacgggatgaaatcagataagatatacaaggattggattcaataaaaaaatgattagatataccacggagatgagtgacaatgtgcccgaagaaaaggt
 tacaagaatggaatgaatattgttgggagaaaaagaataatccatcaataaaatgtagacattcaagttggaatgcaatttcgagcctaactatcca
 15 ggtgctcgtataaagcgaatgtagtaaaatcaaccagatgttccctgtaaaagcggtaaaactgaatcattaacactgagcagattcagcgaatacga
 gacaataaaatagttgtaaaaaatgccactaatcaacgtaacaacgcagtaaacattagtggaagatggaatgaaaaatgctcaagcttaccaaatg
 aagtgcaaaaatgattatgtagcgaatggcttaccagtgatcacaataatgcaaaatggtaacagcattaaagctgtaataatagcttgaatgaaactcgg
 cgcaatcagtgaaaggaatgcaagaagaagtcattagtttaacaaatfactataacgtaagttatgaacctacaagacctccagattttcggcaagct
 gttactaaagagcagttgcaagcgttggatgaaatccctcgtcatatctcaagtggtgctatggcctcaagttattgaaatatacactaattccc
 20 atagtaactaaagtaaaagctgctttgatgctcggtaagcggaaaatctgctcagtgatgtagaactaacaataatcactaaaatctcctcaagccgtaatta
 cggaggtccgcaaaagatgaagttcaaatcatgcagcgaacccctggagactcagcagatatttgaaaaaaggcgtacttttaacgagaaacaccaggagttc
 ccattgcttatacaacaactcctaaaagacaatgaaatagctgttattaaaaacaactcagaatattgaaacaactcacaagcttatacagatgagaaaaattaa
 catcgtactctgaggatacgttctcaattcaactttctggatgaagtaaatgatctcagatgtgggaggtgggagtgaggaagcattccaacccct
 25 ggcagggtctgtggcctcctgctggcaggcagctcggcggtgtctggtgcacccccagtggtcctcagcagctgccactgcatcaggaacaaaagcgtgatct
tgctgggtcggcacagcctgttcatcctgaagacacaggccaggtatttcagctcagccacagctcccaacccgctctacgatagagcctcctgaagaatcagat
cctcagccaggtgatgactccagccagcctcagctcctcagagcctgcccagctcagcagatgctgtgaaggtcagtgacccctcccacccagag
ccagcactggggaccctgctacgctcaggctggggcagcattgaaccagagaggttctgacccccaaagaaactcagtggtggacccctcatttccaat
gacgtgtgccaagttcacctcagaagtgaccaagttcatgctgtgctggacgctggacagggggcaaaagcactgctcgggtgattcggggcccact
tgctgttattgtgcttcaaggtatcacgctatggggcagtgaccatgtgcccctgcccgaagggcctcctgtaacaaagtgatcaccgaaagtgatgca
 30 aggaacacatcgtggccaaccccTAAccggggccactaactcaacgctagtagtgatttaaccaaatgagccaacagaaaccagaaccagaacagaaca
agtaacattggagttagaatggaagaagaaaaagcaatgatttctgtgtaataatgcacgaaatcattgcttatttttaaaaagcgataactagataacgaa
acaacgaactgaataaagaatacaaaaaagagccacgaccagtaaacgctgagaacatttaactgcgagccttaattgattaccaccaatcaattaagaagt
cagagcccaaaatttggtaaagtatttaattacttttaataatcagatacctaaatctgtaaacccattatcgggttttgggggattcaagctttaaagaataccag
gcaatcaattaagaaaaacttagttgattgctttttgttggattcaactttgatcgttagcttcaactaataattttcgtaagaaaggagaacagctgaaataccctt
 35 ttgtgtagaactgtctcatgacggctgttaaagtacaatttaaaaaatgtaaaatcgtcactactaccaagccaggtaaaagtaaggggctatttttgcgta
tcgctcaaaaaaagcagatgattggcagcgtggcgtgttctgactcgaagaagcagatcagcaaaatcaagatacatttaccagcaccaaacgcttattcgt
fatggctatgacgacgaaacccctacactaaggaacattcgaacaaatitaaagcaaaatcaaatccttatttattgattatcaccgaaacgaaaga
aactattcagcaagcagatatttaacaacagctattgattagggtttatgctcagtaataatcaaatctgataaagggtatcaagcattttgtttgaaacgccagct
atgtgactcaaaatcagaatataatctgcaaaagcagcaaaaataatctgcaaaatccgagaatattttgaaagcttggcagttgatctaacgtgcaatcattt
 40 gggattgctcgtataccaagaacggacaatgtagaattttgatcccaattaccggtatttctcaagaatggcaagattggttcaacaaacagataataagggc
ttactcgttcaagctaacggtttaagcggtaacagaaggcaaaaaaagtagatgaaccctggttaattcttattgacgaaacgaaattttcaggagaaaagg
gtttagtagggcgcaatagcgttattaccctctcttagcctactttagttagcagctattcaatcgaacgctgcaataataatggtttagtttaataatcagtagatcaa
cccttagaagaaaaagatgaaatcaaaatgtagaagtgctattcagaaaactcaagggcctaataaggaatacattaccatttggcaaaagcttgggtatcaa
 45 gtgattaaaccgtaaaagatttttggcgtcaaggggttttaaatcaagaaaaaagaaagcgaacgtaacgctgatttctgagaatggaagaagattaatg
gcttattagcgaaaaaagcagatgatacaagcctatttagcagcagcaaaaaagagattagagaagtgtaggcaattcctgaacggacattagataaattgctg
aaggtagtgaggcgaatcaggaaatttcttaagattaaccagggaagaatggtggcattcaactgctagtgtaaatcattgttctatcagcattaaataaaa
aaagaagaacgagaagctataaagcgtcagacgctgttaatttagaacgtacatttcaagaaacttaaacaaatggcagaacgccccaaaacgg
accacaactcagatttttagctacgatacaggtgaaaataaaacccgactatgccattatattatctatgatacgtgttttttcttctgctgctgcttaattgct
 50 atatttaccgtcaataaaggatttctactcattatactcccattttcaaaaaatacaggggaacacggggaactattgtacaggccaccctatagttaatggttcgag
cctcctgcaatcctcagaaatattcattcccctgcccgtcttaattgacttttggcccggcgatattcctgacccagctccaccataaattggtccatgca
aattcggccgcaatttcaggcgttttccctcacaaggatgctggctccttcaatitccggagcagcctgcatagcctcagggaccctcccgatccatgctt
ttccgctgtgactcggctcctgactgacgctcctccttctgactgattgacatgtgacagtgctgaatgagggttaaatgcccagcagcgtgaaacggatctc
gtccgacatgctcagcagcgggcaaggccatacgtccgatccgaatctgactgattaaaaaagcctttttcagccggagtcagcggcgctgttctcgcgag
 55 ggaccattagattttaaaggcagcggagcaatcagctttaaagcgtcaaacgcttaagaaatagccttctttttatccgctgctgcaaaaatgggtaatac
ccctttgactttaaaggggttggcgtcaagaattgccatcagcttctgaacttctcctgtttttacccaagctgttcatccccgatccagctcagatgaaaatga
agagaacctttttgctggtggcgtgctcctgaaagccattcaacagaataacctgttaagggtcagctacactcagcagcaggtgccacatactccggggaaccg
gcgcaagcacaataataggccttcaatcccttttgcgagtaaatcgttcatccaaaatggccacggccaagcagcagcctgctgcaagcagcagcctt
gctgttctgcatcaccatccgcttcaagcgtttgcttcaactgccaatgagtggaactggttccagcagctgatttttcatatttcttcttccggtgcaacatca
 60 atttccgcccagctatctgttaaaaaggtttgtgctcagtaaaactcctcctttttcagaaaaatcccagctacgtaataatgatttgaataatttattgattaatac
taagtttaccagtttccacataaaaaaacaatgatgagataatagctccaaaggctaaa-gaggactataccaactatttttaattaa (SEQ ID N°: 46). Este
 plásmido se secuenció en la instalación de Genewiz a partir de la cepa de E. coli el 2-20-08.

EJEMPLO 1: Construcción de la cepa de *Listeria* atenuada-LmddΔActA e inserción del gen *klk3* humano en el marco de lectura del gen *hly* en las cepas *Lmdd* y *Lmdda*.

La cepa *Lm dal dat* (Lmdd) se atenuó mediante la delección irreversible del factor de virulencia, ActA. Se construyó una

delección en el marco de lectura de *actA* en el fondo de *Lmddaldat* (Lmdd) para evitar cualquier efecto polar en la expresión de los genes posteriores. El Lm *dal dat ΔactA* contiene los primeros 19 aminoácidos del extremo N-terminal y 28 residuos de aminoácidos del extremo C-terminal con una delección de 591 aminoácidos de ActA.

5 El mutante de delección de *actA* se produjo amplificando la región cromosómica correspondiente a las porciones anteriores (oligo de 657 pb Adv 271/272) y posteriores (oligo de 625 pb Adv 273/274) de *actA* y uniéndolas mediante PCR. La secuencia de los cebadores utilizados para esta amplificación se da en la Tabla 2. Las regiones de ADN anteriores y posteriores de *actA* se clonaron en el pNEB193 en el sitio de restricción EcoRI/PstI y, a partir de este plásmido, el EcoRI/PstI se clonó adicionalmente en el plásmido pKSV7 sensible a la temperatura, dando como resultado $\Delta actA/pKSV7$ (pAdv120).

10 Tabla 2: Secuencias de los cebadores que se usaron para la amplificación de las secuencias de ADN anteriores y posteriores de *actA*

Cebador	Secuencia	SEQ ID N°:
Adv271-actAF1	cgGAATTCGGATCCgcgccaatcattggtgattg	47
Adv272-actAR1	gcgaGTCGACgctcggggtaatcgtaatgcaattg	48
Adv273-actAF2	gcgaGTCGACccatacgcagcttaattcttgc	49
Adv274-actAR2	gataCTGCAGGGATCCctccctctcggtaatcagtcac	50

15 La delección del gen de su ubicación cromosómica se verificó utilizando cebadores que se unen externamente a la región de delección de *actA*, que se muestran en la Figura 1 como cebador 3 (Adv 305-tgggatggccaagaaattc, SEQ ID N°: 51) y cebador 4 (Adv304-ctaccatgcttccctttcttg) SEQ ID N°: 52). El análisis de PCR se realizó en el ADN cromosómico aislado de Lmdd y Lmdd $\Delta actA$. Se esperaba que los tamaños de los fragmentos de ADN después de la amplificación con dos conjuntos diferentes de pares de cebadores 1/2 y 3/4 en el ADN cromosómico de Lmdd fueran de 3,0 Kb y 3,4 Kb. Por otro lado, los tamaños esperados de la PCR utilizando los pares de cebadores 1/2 y 3/4 para el Lmdd $\Delta actA$ fueron de 1,2 Kb y 1,6 Kb. Por lo tanto, el análisis de PCR de la Figura 1 confirma que la región de *actA* de 1,8 kb se delecionó en la cepa Lmdd $\Delta actA$. La secuenciación del ADN también se realizó en productos de PCR para confirmar la delección de la región que contenía *actA* en la cepa Lmdd $\Delta actA$.

EJEMPLO 2: Construcción del sistema de expresión episomal independiente de antibióticos para la administración de antígenos mediante vectores de *Lm*.

25 El sistema de expresión episomal independiente de antibióticos para la administración de antígenos mediante vectores de *Lm* (pAdv142) es la próxima generación del plásmido pTV3 sin antibióticos (Verch et al., Infect Immun, 2004. 72 (11): 6418-25). El gen para el activador de la transcripción del gen de virulencia, *prfA*, se delecionó de pTV3 ya que la cepa Lmdd de *Listeria* contiene una copia del gen *prfA* en el cromosoma. Además, el casete para p60-*dal* de *Listeria* en el sitio de restricción NheI/PacI se reemplazó por p60-*dal* de *Bacillus subtilis* que dio como resultado el plásmido pAdv134 (Figura 2A). La similitud de los genes *dal* de *Listeria* y *Bacillus* es del -30%, eliminando virtualmente la posibilidad de recombinación entre el plásmido y el fragmento restante del gen *dal* en el cromosoma Lmdd. El plásmido pAdv134 contenía el casete de expresión de antígeno tLLO-E7. La cepa LmddA se transformó con el plásmido pADV134 y la expresión de la proteína LLO-E7 a partir de los clones seleccionados se confirmó mediante transferencia de Western (Figura 2B). El sistema Lmdd derivado de la cepa de tipo natural 10403S carece de marcadores de resistencia a antibióticos, a excepción de la resistencia a estreptomycin de Lmdd.

35 Además, pAdv134 se restringió con XhoI/XmaI para clonar PSA humano, *klk3* lo que dio como resultado el plásmido, pAdv142. El nuevo plásmido, pAdv142 (Figura 2C, Tabla 1) contiene *dal* de *Bacillus* (B-Dal) bajo el control del promotor de p60 de *Listeria*. El plásmido lanzadera pAdv142 complementó el crecimiento tanto de *E. coli* *ala drx* MB2159 como de la cepa Lmdd de *Listeria monocytogenes* en ausencia de D-alanina exógena. El casete de expresión de antígeno en el plásmido pAdv142 consiste en un promotor *hly* y una proteína de fusión LLO-PSA (Figura 2C).

40 El plásmido pAdv142 se transformó en las cepas de fondo de *Listeria*, la cepa LmddactA que dio como resultado LmddA-LLO-PSA. La expresión y secreción de la proteína de fusión LLO-PSA por la cepa, Lm-ddA-LLO-PSA se confirmó mediante transferencia de Western utilizando anticuerpos anti-LLO y anti-PSA (Figura 2D). Hubo una expresión y secreción estable de la proteína de fusión LLO-PSA por la cepa, Lm-ddA-LLO-PSA después de dos pases *in vivo*.

EJEMPLO 3: Estabilidad *in vitro* e *in vivo* de la cepa LmddA-LLO-PSA

45 La estabilidad *in vitro* del plásmido se examinó cultivando la cepa de *Listeria* LmddA-LLO-PSA en presencia o ausencia de presión selectiva durante ocho días. La presión selectiva para la cepa LmddA-LLO-PSA es D-alanina. Por lo tanto, la cepa LmddA-LLO-PSA se pasó en infusión de cerebro-corazón (BHI) y BHI + 100 µg/ml de D-alanina. Las UFCs se determinaron para cada día después de la siembra en placas en medio selectivo (BHI) y no selectivo (BHI + D-alanina). Se esperaba que una pérdida de plásmido resultara en una UFC más alta después de la colocación en placas en un

medio no selectivo (BHI + D-alanina). Como se muestra en la Figura 3A, no hubo diferencia entre el número de UFC en el medio selectivo y el no selectivo. Esto sugiere que el plásmido pAdv142 fue estable durante al menos 50 generaciones, cuando terminó el experimento.

5 El mantenimiento del plásmido *in vivo* se determinó mediante inyección intravenosa de 5×10^7 UFC de LmddA-LLO-PSA en ratones C57BL/6. Las bacterias viables se aislaron de bazo homogeneizado en PBS a las 24 h y 48 h. Las UFCs para cada muestra se determinaron en cada punto de tiempo en placas BHI y BHI + 100 μ g/ml de D-alanina. Después de sembrar los esplenocitos en un medio selectivo y no selectivo, las colonias se recuperaron después de 24 h. Dado que esta cepa está muy atenuada, la carga bacteriana se elimina *in vivo* en 24 h. No se detectaron diferencias significativas de UFCs en las placas selectivas y no selectivas, lo que indica la presencia estable del plásmido recombinante en todas las bacterias aisladas (Figura 3B).

EJEMPLO 4: Pases *in vivo*, virulencia y eliminación de la cepa LmddA-142 (LmddA-LLO-PSA)

15 *LmddA-142* es una cepa de *Listeria* recombinante que secreta la proteína de fusión tLLO-PSA expresada episómicamente. Para determinar una dosis segura, los ratones se inmunizaron con LmddA-LLO-PSA a varias dosis y se determinaron los efectos tóxicos. LmddA-LLO-PSA causó efectos tóxicos mínimos (datos no mostrados). Los resultados sugirieron que los ratones toleraron bien una dosis de 10^8 UFC de LmddA-LLO-PSA. Los estudios de virulencia indican que la cepa LmddA-LLO-PSA estuvo altamente atenuada.

20 Se determinó la eliminación *in vivo* de LmddA-LLO-PSA después de la administración de la dosis segura, 10^8 UFC por vía intraperitoneal en ratones C57BL/6. No hubo colonias detectables en el hígado y el bazo de los ratones inmunizados con LmddA-LLO-PSA después del día 2. Dado que esta cepa está muy atenuada, se eliminó completamente *in vivo* a las 48 h (Figura 4A).

25 Para determinar si la atenuación de LmddA-LLO-PSA atenuó la capacidad de la cepa LmddA-LLO-PSA de infectar macrófagos y crecer intracelularmente, se realizó un ensayo de infección celular. La línea celular de tipo macrófago de ratón, tal como J774A.1, se infectó *in vitro* con construcciones de *Listeria* y se cuantificó el crecimiento intracelular. La cepa de control positivo, la cepa de *Listeria* 10403S de tipo natural crece intracelularmente, y el control negativo XFL7, un *prfA* mutante, no puede escapar del fagolisosoma y, por lo tanto, no crece en las células J774. El crecimiento intracitoplasmático de LmddA-LLO-PSA fue más lento que 10403S debido a la pérdida de la capacidad de esta cepa de propagarse desde una célula a otra (Figura 4B). Los resultados indican que LmddA-LLO-PSA tiene la capacidad de infectar macrófagos y crecer intracitoplasmáticamente.

EJEMPLO 5: Inmunogenicidad de la cepa LmddA-LLO-PSA en ratones C57BL/6

30 Las respuestas inmunes específicas hacia PSA provocadas por la construcción LmddA-LLO-PSA en ratones C57BL/6 se determinaron usando una tinción con tetrámero de PSA. Los ratones se inmunizaron dos veces con LmddA-LLO-PSA a intervalos de una semana, y los esplenocitos se tiñeron para el tetrámero de PSA en el día 6 después del refuerzo. La tinción de los esplenocitos con el tetrámero específico de PSA mostró que LmddA-LLO-PSA provocó un 23% de células tetrámero de PSA⁺CD8⁺CD62L^{bajo} (Figura 5A).

35 La capacidad funcional de las células T específicas de PSA de secretar IFN- γ después de la estimulación con el péptido de PSA durante 5 h se examinó utilizando la tinción de citoquinas intracelulares. Hubo un aumento de 200 veces en el porcentaje de células secretoras de CD8⁺CD62L^{bajo}IFN- γ estimuladas con el péptido de PSA en el grupo LmddA-LLO-PSA en comparación con los ratones sin exposición (Figura 5B), lo que indica que la cepa LmddA-LLO-PSA es muy inmunogénica y estimula niveles altos de respuestas de células T CD8⁺ funcionalmente activas contra el PSA en el bazo.

40 Para determinar la actividad funcional de las células T citotóxicas generadas contra el PSA después de inmunizar ratones con LmddA-LLO-PSA, se ensayó la capacidad de los CTL específicos de PSA de lisar células EL4 pulsadas con el péptido H-2D^b en un ensayo *in vitro*. Se utilizó un ensayo de caspasa basado en FACS (Figura 5C) y la liberación de Europio (Figura 5D) para medir la lisis celular. Los esplenocitos de ratones inmunizados con LmddA-LLO-PSA contenían CTL con una alta actividad citolítica hacia las células que expresan el péptido PSA como antígeno objetivo.

Se realizó un Elispot para determinar la capacidad funcional de las células T efectoras de secretar IFN- γ después de 24 h de estimulación con el antígeno. Usando ELISpot, se observó que hubo un aumento de 20 veces en el número de puntos para IFN- γ en los esplenocitos de ratones inmunizados con LmddA-LLO-PSA estimulados con un péptido específico en comparación con los esplenocitos de los ratones sin exponer (Figura 5E).

50 EJEMPLO 6: La inmunización con las cepas *LmddA-142* induce la regresión de un tumor que expresa PSA y la infiltración del tumor con CTL específicos de PSA.

55 La eficacia terapéutica de la construcción *LmddA-142* (LmddA-LLO-PSA) se determinó utilizando una línea celular de adenocarcinoma de próstata diseñada para expresar PSA (Tramp-CI-PSA (TPSA); Shahabi et al., 2008). Se implantaron subcutáneamente 2×10^6 células TPSA a los ratones. Cuando los tumores alcanzaron un tamaño palpable de 4-6 mm, en el día 6 después de la inoculación del tumor, los ratones se inmunizaron tres veces a intervalos de una semana con 10^8 UFC de LmddA-142, 10^7 UFC de Lm-LLO-PSA (control positivo) o se dejaron sin tratar. Los ratones

sin tratamiento desarrollaron tumores gradualmente (Figura 6A). Los ratones inmunizados con *LmddA*-142 estuvieron sin tumores hasta el día 35 y, gradualmente, 3 de los 8 ratones desarrollaron tumores, que crecieron a una velocidad mucho más lenta en comparación con los ratones sin tratamiento (Figura 6B). Cinco de cada ocho ratones permanecieron sin tumores hasta el día 70. Como se esperaba, los ratones vacunados con *Lm*-LLO-PSA tuvieron menos tumores que los controles sin tratamiento, y los tumores se desarrollaron más lentamente que en los controles (Figura 6C). Por lo tanto, la construcción *LmddA*-LLO-PSA pudo hacer retroceder el 60% de los tumores establecidos por la línea celular TPSA y frenar el crecimiento de los tumores en otros ratones. Los ratones curados que permanecieron sin tumores se volvieron a exponer a tumores TPSA en el día 68.

La inmunización de los ratones con *LmddA*-142 puede controlar el crecimiento e inducir la regresión de los tumores Tramp-CI establecidos durante 7 días que se modificaron para expresar el PSA en más del 60% de los animales experimentales (Figura 6B), en comparación con ninguno en el grupo sin tratar (Figura 6A). El *LmddA*-142 se construyó utilizando un vector altamente atenuado (*LmddA*) y el plásmido pADV142 (Tabla 1).

Además, se investigó la capacidad de los linfocitos CD8 específicos de PSA generados mediante la construcción *LmddA*-LLO-PSA de infiltrarse en tumores. Los ratones se implantaron subcutáneamente con una mezcla de tumores y matrigel, seguido de dos inmunizaciones a intervalos de siete días con *Listeria* sin tratar o de control (*Lm*-LLO-E7), o con *LmddA*-LLO-PSA. Los tumores se extirparon en el día 21 y se analizaron para determinar la población de células T reguladoras CD8⁺CD62L^{bajo} PSA^{tetrámero+} y CD4⁺ CD25⁺FoxP3⁺ que infiltraban los tumores.

Se observó un número muy bajo de linfocitos infiltrantes en el tumor (TILs) CD8⁺CD62L^{bajo} PSA^{tetrámero+} específicos de PSA que estaban presentes tanto en ratones sin tratamiento como en ratones inmunizados con el control de *Lm*-LLO-E7. Sin embargo, hubo un aumento de 10-30 veces en el porcentaje de TILs CD8⁺CD62L^{bajo} PSA^{tetrámero+} específicos de PSA en los ratones inmunizados con *LmddA*-LLO-PSA (Figura 7A). Curiosamente, la población de células CD8⁺CD62L^{bajo} PSA^{tetrámero+} en el bazo fue 7,5 veces menor que en el tumor (Figura 7A).

Además, se determinó la presencia de células T reguladoras (regs) CD4⁺/CD25⁺/Foxp3⁺ en los tumores de ratones sin tratar y de ratones inmunizados con *Listeria*. Curiosamente, la inmunización con *Listeria* produjo una disminución considerable del número de T-regs CD4⁺ CD25⁺FoxP3⁺ en el tumor, pero no en el bazo (Figura 7B). Sin embargo, la construcción *LmddA*-LLO-PSA tuvo un mayor impacto en la disminución de la frecuencia de T-regs CD4⁺ CD25⁺FoxP3⁺ en los tumores en comparación con el grupo sin tratamiento e inmunizado con *Lm*-LLO-E7 (Figura 7B).

Por lo tanto, la vacuna *LmddA*-142 puede inducir células T CD8⁺ específicas de PSA que pueden infiltrarse en el sitio tumoral (Figura 7A). Curiosamente, la inmunización con *LmddA*-142 se asoció con un número reducido de células T reguladoras en el tumor (Figura 7B), probablemente creando un entorno más favorable para una actividad eficaz de CTL antitumorales.

EJEMPLO 7: *Lmdd*-143 y *LmddA*-143 secretan una LLO funcional a pesar de la fusión de PSA.

Lmdd-143 y *LmddA*-143 contienen el gen *klk3* humano de longitud completa, que codifica la proteína PSA, insertado mediante recombinación homóloga en una posición posterior y en el marco de lectura del gen *hly* en el cromosoma. Estas construcciones se realizaron mediante recombinación homóloga utilizando el plásmido pKSV7 (Smith y Youngman, Biochimie. 1992; 74 (7-8) p. 705-711), que tiene un replicón sensible a la temperatura, que lleva el casete de recombinación *hly-klk3-mpl*. Debido a la escisión del plásmido después del segundo evento de recombinación, el marcador de resistencia a antibióticos utilizado para la selección por integración se pierde. Además, el gen *actA* se deleta en la cepa *LmddA*-143 (Figura 8A). La inserción de *klk3* en el marco de lectura con *hly* en el cromosoma se verificó mediante PCR (Figura 8B) y secuenciación (datos no mostrados) en ambas construcciones.

Un aspecto importante de estas construcciones cromosómicas es que la producción de LLO-PSA no eliminaría completamente la función de LLO, que es necesaria para el escape de *Listeria* del fagosoma, la invasión del citosol y una inmunidad eficiente generada por *L. monocytogenes*. El análisis de transferencia de Western de las proteínas secretadas en los sobrenadantes de cultivo de *Lmdd*-143 y *LmddA*-143 reveló una banda de ~81 kDa correspondiente a la proteína de fusión LLO-PSA y una banda de ~60 kDa, que es el tamaño esperado de LLO (Figura 9A), lo que indica que la LLO se escinde de la fusión LLO-PSA o aún se produce como una proteína única en *L. monocytogenes*, a pesar del gen de fusión en el cromosoma. La LLO secretada por *Lmdd*-143 y *LmddA*-143 retuvo un 50% de la actividad hemolítica, en comparación con la *L. monocytogenes* 10403S de tipo natural (Figura 9B). De acuerdo con estos resultados, tanto *Lmdd*-143 como *LmddA*-143 fueron capaces de replicarse intracelularmente en la línea celular J774 de tipo macrófago (Figura 9C).

Ejemplo 8: Tanto *Lmdd*-143 como *LmddA*-143 provocan respuestas inmunes mediadas por células contra el antígeno PSA.

Después de demostrar que tanto *Lmdd*-143 como *LmddA*-143 son capaces de secretar PSA fusionado a LLO, se investigó si estas cepas podrían provocar respuestas inmunes específicas de PSA *in vivo*. Los ratones C57B1/6 se dejaron sin tratar o se inmunizaron dos veces con *Lmdd*-143, *LmddA*-143 o *LmddA*-142. Las respuestas de células T CD8⁺ específicas de PSA se midieron mediante la estimulación de esplenocitos con el péptido PSA₆₅₋₇₄ y la tinción intracelular para IFN- γ . Como se muestra en la Figura 10, la respuesta inmune inducida por los vectores cromosómicos y basados en plásmidos es similar.

EJEMPLO 9: Una cepa de *Lm* recombinante que secreta una proteína de fusión LLO-HMW-MAA da como resultado una amplia respuesta antitumoral.

Se diseñaron tres vacunas basadas en *Lm* que expresaban distintos fragmentos de HMW-MAA según la posición de los epítomos HLA-A2 previamente cartografiados y predichos (Figura 11A). La *Lm*-tLLO-HMW-MMA₂₁₆₀₋₂₂₅₈ (también denominada *Lm*-LLO-HMW-MAA-C) se basa en la cepa de *Lm* XFL-7 avirulenta y un plásmido basado en pGG55. Esta cepa secreta una banda de ~62 kDa que corresponde a la proteína de fusión tLLO-HMW-MAA₂₁₆₀₋₂₂₅₈ (Figura 11B). La secreción de tLLO-HMW-MAA₂₁₆₀₋₂₂₅₈ es relativamente débil, probablemente debido a la alta hidrofobicidad de este fragmento, que corresponde al dominio transmembrana de HMW-MAA. Usando células de melanoma B16F10 transfectadas con el gen HMW-MAA de longitud completa, se observó que hasta el 62,5% de los ratones inmunizados con la *Lm*-LLO-HMW-MAA-C pudieron impedir el crecimiento de tumores establecidos (Figura 11C). Este resultado muestra que HMW-MAA puede usarse como un antígeno objetivo en las estrategias de vacunación. Curiosamente, también se observó que la inmunización de ratones con *Lm*-LLO-HMW-MAA-C perjudicó significativamente el crecimiento de tumores no modificados para expresar HMW-MAA, como B16F10, RENCA y NT-2 (Figura 11D), que se obtuvieron de distintas cepas de ratón. En el modelo de tumor NT-2, que es una línea celular de carcinoma mamario que expresa la proteína HER-2/neu de rata y procede de ratones transgénicos FVB/N, la inmunización con *Lm*-LLO-HMW-MAA-C 7 días después de la inoculación del tumor no solo afectó al crecimiento del tumor sino que también indujo la regresión del tumor en 1 de cada 5 ratones (Figura 11D).

EJEMPLO 10: La inmunización de ratones con *Lm*-LLO-HMW-MAA-C induce la infiltración del estroma tumoral con células T CD8⁺ y una reducción significativa de la cobertura de pericitos en la vasculatura tumoral.

Aunque las células NT-2 no expresan el homólogo NG2 de HMW-MAA, la inmunización de ratones FVB/N con *Lm*-LLO-HMW-MAA-C perjudicó significativamente el crecimiento de los tumores NT-2 y finalmente condujo a la regresión tumoral (Figura 11D). Este modelo de tumor se usó para evaluar las células T CD8⁺ y los pericitos en el sitio tumoral mediante inmunofluorescencia. La tinción de cortes del tumor NT-2 para CD8 mostró la infiltración de células T CD8⁺ en los tumores y alrededor de los vasos sanguíneos en los ratones inmunizados con la vacuna *Lm*-LLO-HMW-MAA-C, pero no en los ratones inmunizados con la vacuna de control (Figura 12A). Los pericitos en los tumores NT-2 también se analizaron mediante tinción doble con anticuerpos hacia α SMA y NG2 (homólogo murino de HMW-MAA). El análisis de los datos de tres tumores NT-2 independientes mostró una disminución significativa del número de pericitos en los ratones inmunizados con *Lm*-LLO-HMW-MAA-C, en comparación con el control ($P \leq 0,05$) (Figura 12B). Se obtuvieron resultados similares cuando el análisis se limitó a las células teñidas para α SMA, que la vacuna no selecciona como objetivo (datos no mostrados). Por lo tanto, la vacunación con *Lm*-LLO-HMW-MAA-C afecta a la formación de vasos sanguíneos en el sitio tumoral al atacar a los pericitos.

EJEMPLO 11: Desarrollo de un vector de *L. monocytogenes* recombinante con una actividad antitumoral mejorada mediante la expresión y secreción concomitante de proteínas de fusión LLO-PSA y tLLO-HMW-MAA₂₁₆₀₋₂₂₅₈, que provoca respuestas inmunes hacia ambos antígenos heterólogos.

35 Materiales y métodos:

Construcción del plásmido pADV168. El fragmento HMW-MAA-C se escinde de un plásmido pCR2.1-HMW-MAA₂₁₆₀₋₂₂₅₈ mediante doble digestión con endonucleasas de restricción XhoI y XmaI. Este fragmento se clona en el plásmido pADV134 ya digerido con XhoI y XmaI para extirpar el gen E7. El plásmido pADV168 se somete a electroporación en la cepa de *E. coli* *dal*⁽⁻⁾ *dal*⁽⁻⁾ MB2159 electrocompetente y los clones positivos se criban con respecto a RFLP y el análisis de secuencia.

Construcción de *Lmdd*-143/168, *LmddA*-143/168 y las cepas de control *LmddA*-168, *Lmdd*-143/134 y *LmddA*-143/134. *Lmdd*, *Lmdd*-143 y *LmddA*-143 se transforman con el plásmido pADV168 o pADV134. Los transformantes se seleccionan en placas de agar de infusión de cerebro-corazón suplementadas con estreptomicina (250 μ g/ml) y sin D-alanina (medio BHIs). Los clones individuales se criban en busca de LLO-PSA, tLLO-HMW-MAA₂₁₆₀₋₂₂₅₈ y la secreción de tLLO-E7 en sobrenadantes de cultivos bacterianos mediante transferencia de Western utilizando un anticuerpo anti-LLO, anti-PSA o anti-E7. Se evaluará un clon seleccionado de cada cepa para determinar la virulencia *in vitro* e *in vivo*. Cada cepa se somete a pases dos veces *in vivo* para seleccionar los clones recombinantes más estables. Brevemente, se cultiva un clon seleccionado de cada construcción y se inyecta i.p. a un grupo de 4 ratones a 1×10^8 UFC/ratón. Los bazos se recogen en los días 1 y 3, se homogeneizan y se colocan en placas de agar BHIs. Después del primer pase, se selecciona una colonia de cada cepa y se realiza un pase *in vivo* por segunda vez. Para evitar una mayor atenuación del vector, a un nivel que perjudique su viabilidad, se generan construcciones en dos vectores con distintos niveles de atenuación (*Lmdd*-143/168, *LmddA*-143/168).

Determinación de la virulencia *in vitro* mediante replicación intracelular en células J774. La captación de *Lm* por los macrófagos, seguida de la invasión citosólica y la proliferación intracelular, son necesarias para la administración y presentación eficaz del antígeno por parte de las vacunas basadas en *Lm*. Se utiliza un ensayo de invasión *in vitro*, que utiliza una línea celular J774 de tipo macrófago para ensayar estas propiedades en nuevas cepas de *Lm* recombinantes. Brevemente, las células J774 se infectan durante 1 hora en un medio sin antibióticos a una MOI de 1:1 con la cepa 10403S de *Lm* de tipo natural de control o con las nuevas cepas de *Lm* que se van a ensayar. Las bacterias extracelulares se destruyen mediante incubación de 1 hora en un medio con 10 μ g/ml de gentamicina. Las

muestras se recogen a intervalos regulares y las células se lisan con agua. Se colocan en placas diluciones en serie de diez veces de los lisados por duplicado en placas de BHIs y se cuentan las unidades formadoras de colonias (UFC) en cada muestra.

- 5 Estudios de virulencia *in vivo*. Se inyectan a grupos de cuatro ratones C57BL/6 (7 semanas de edad) i.p. dos dosis diferentes (1×10^8 y 1×10^9 UFC/dosis) de cepas *Lmdd*-143/168, *LmddA*-143/168, *LmddA*-168, *Lmdd*-143/134 o *LmddA*-143/134. Los ratones se siguen durante 2 semanas con respecto a la supervivencia y la estimación de la DL_{50} . Una DL_{50} de $> 1 \times 10^8$ constituye un valor aceptable basado en la experiencia previa con otras vacunas basadas en *Lm*.

RESULTADOS

- 10 Una vez que el plásmido pADV168 se construye con éxito, se secuencia con respecto a la presencia de la secuencia de HMW-MAA correcta. Este plásmido en estas nuevas cepas expresa y secreta las proteínas de fusión de LLO específicas para cada construcción. Estas cepas están muy atenuadas, con una DL_{50} de al menos 1×10^8 UFC, y probablemente más de 1×10^9 UFC para las cepas deficientes de *actA* (*LmddA*), que carecen del gen *actA* y en consecuencia de la capacidad de propagación de célula a célula. La construcción se ensaya y se selecciona la que
15 tiene un mejor equilibrio entre la atenuación y la eficacia terapéutica.

EJEMPLO 12: Detección de respuestas inmunes y efectos antitumorales provocados por la inmunización con *Lmdd*-143/168 y *LmddA*-143/168.

- Las respuestas inmunitarias a PSA y HMW-MAA se estudian en ratones tras la inmunización con cepas *Lmdd*-143/168
20 y *LmddA*-143/168 utilizando métodos habituales, como la detección de IFN- γ y la actividad específica de CTL contra estos antígenos. La eficacia terapéutica de los vectores de expresión doble se analiza en el modelo de tumor TPSA23.

- Tinción intracelular de citoquinas para IFN- γ . Los ratones C57BL/6 (3 ratones por grupo de tratamiento) se inmunizan dos veces a intervalos de 1 semana con las cepas *Lmdd*-143/168 y *LmddA*-143/168. Como controles para este experimento, los ratones se inmunizan con *Lmdd*-143, *LmddA*-143, *LmddA*-142, *LmddA*-168, *Lmdd*-143/134, *LmddA*-143/134 o se dejan sin tratar (grupo sin tratamiento). Los bazo se recogen después de 7 días y se prepara una suspensión de esplenocitos de células individuales. Estos esplenocitos se cultivan en placas a 2×10^6 células/pocillo en una placa de 96 pocillos de fondo redondo, en medio RPMI completo recién preparado con IL-2 (50 U/ml) y se estimulan con el péptido de PSA H-2Db, HCIRNKSVIL, (SEQ ID N°: 53), o el péptido de control de HPV16 E7 H-2Db RAHYNIVTF (SEQ ID N°: 54) a una concentración final de 1 μ M. Como los epítomos de HMW-MAA no se han cartografiado en el ratón C57B1/6, las respuestas inmunes específicas de HMW-MAA se detectan incubando 2×10^6
25 esplenocitos con 2×10^5 células EL4-HMW-MAA. Las células se incuban durante 5 horas en presencia de monensina para retener el IFN- γ intracelular en las células. Después de la incubación, las células se tiñen con anticuerpos anti-ratón CD8-FITC, CD3-PerCP, CD62L-APC. Luego se permeabilizan y se tiñen para detectar IFN- γ -PE y se analizan en un FACS Calibur de cuatro colores (BD Biosciences).

- Ensayo de citotoxicidad. Para investigar la actividad efectora de las células T específicas de PSA y HMW-MAA generadas tras las vacunaciones, se incuban esplenocitos aislados durante 5 días en medio RPMI completo que contiene 20 U/ml de IL-2 de ratón (Sigma), en presencia de células estimuladoras (células MC57G tratadas con mitomicina C infectadas con vacuna de PSA o HMW-MAA). Para el ensayo de citotoxicidad, las células objetivo EL4 se marcan durante 15 minutos con DDAO-SE (0,6 mM) (Molecular Probes) y se lavan dos veces con medio completo. Las células objetivo marcadas se pulsan durante 1 hora con el péptido PSA H-2Db o con el péptido de control HPV16 E7 H-2Db, a una concentración final de 5 mM. Para las respuestas citotóxicas específicas de HMW-MAA, las células EL4-HMW-MAA se utilizan como objetivos. El ensayo de citotoxicidad se realiza durante 2 horas incubando las células diana (T) con células efectoras (E) a diferentes proporciones E:T durante 2-3 horas. Las células se fijan con formalina, se permeabilizan y se tiñen para escindir la caspasa-3 para detectar la inducción de la apoptosis en las células objetivo.

- Eficacia antitumoral. La eficacia antitumoral de las cepas *Lmdd*-143/168 y *LmddA*-143/168 se compara con la de *LmddA*-142 y *LmddA*-168, utilizando el modelo de tumor T-PSA23 (TrampC-1/PSA). Se inocularon grupos de 8 ratones C57BL/6 macho (6-8 semanas de edad) s.c. con 2×10^6 células T-PSA23, y 7 días después se inmunizaron i.p. con dosis 0,1 x DL_{50} de *Lmdd*-143/168, *LmddA*-143/168, *LmddA*-142 y *LmddA*-168. Como controles, los ratones se dejan sin tratar o se inmunizan con una cepa de control de *Lm* (*LmddA*-134). Cada grupo recibe dos dosis adicionales de las vacunas a intervalos de 7 días. Los tumores se monitorizan durante 60 días o hasta que alcanzan un tamaño de 2 cm, momento en el que se sacrifican los ratones.
50

RESULTADOS

- La inmunización de ratones con *LmddA*-168 da como resultado la inducción de respuestas específicas contra HMW-MAA. De manera similar, *Lmdd*-143/168 y *LmddA*-143/168 provocan una respuesta inmune contra PSA y HMW-MAA que es comparable a las respuestas inmunes generadas por los vectores de *L. monocytogenes* que expresan cada antígeno individualmente. La inmunización de ratones portadores de T-PSA-23 con *Lmdd*-143/168 y *LmddA*-143/168 da como resultado una mejor eficacia terapéutica antitumoral que la inmunización con *LmddA*-142 o *LmddA*-168.
55

EJEMPLO 13: La inmunización con *Lmdd*-143/168 o *LmddA*-143/168 da como resultado la destrucción de pericitos,

la estimulación de las moléculas de adhesión en las células endoteliales y una mayor infiltración de TILs específicos de PSA.

5 Caracterización de linfocitos infiltrantes en tumores y moléculas de adhesión en células endoteliales inducidas tras la inmunización con *Lmdd-143/168* o *LmddA-143/168*. Los tumores de ratones inmunizados con *Lmdd-143/168* o *LmddA-143/168* se analizan mediante inmunofluorescencia para estudiar la expresión de moléculas de adhesión en las células endoteliales, la densidad de vasos sanguíneos y la cobertura de pericitos en la vasculatura tumoral, así como la infiltración en el tumor de células inmunes, incluidas las células T CD8 y CD4. Los TILs específicos del antígeno de PSA se caracterizan mediante el análisis de tetrámeros y pruebas funcionales.

10 Análisis de linfocitos infiltrantes en tumores (TILs). Se inoculan células TPSA23 incrustadas en matrigel s.c. en ratones (n = 3 por grupo), que se inmunizan los días 7 y 14 con *Lmdd-143/168* o *LmddA-143/168*, dependiendo de cuál sea el más eficaz según los resultados obtenidos en los estudios antitumorales. Para comparación, los ratones se inmunizan con *LmddA-142*, *LmddA-168*, una vacuna de *Lm de* control o se dejan sin tratar. En el día 21, los tumores se extirpan quirúrgicamente, se lavan en PBS enfriado con hielo y se trocean con un bisturí. Los tumores se tratan con dispasa para solubilizar el Matrigel y liberar las células individuales para su análisis. Las células T CD8⁺ específicas de PSA se tiñen con un tetrámero de PSA65-74 H-2Db-PE y CD8-FITC antiratón, CD3-PerCP-Cy5.5 y CD62L-APC. Para
15 analizar las células T reguladoras en el tumor, los TILs se tiñen con CD4-FITC, CD3-PerCP-Cy5.5 y CD25-APC y posteriormente se permeabilizan para la tinción de FoxP3 (anti-FoxP3-PE, Milteny Biotec). Las células se analizan mediante un citómetro FACS Calibur y el programa informático CellQuestPro (BD Biosciences).

20 Inmunofluorescencia. En el día 21 tras la inoculación del tumor, los tumores TPSA23 incrustados en matrigel se extirpan quirúrgicamente y un fragmento se crioconserva inmediatamente en medio de congelación OCT. Los fragmentos de tumor se cortan en criostato en cortes de 8-10 mm de espesor. Para la inmunofluorescencia, las muestras se descongelan y se fijan con formalina al 4%. Después del bloqueo, los cortes se tiñen con anticuerpos en disolución de bloqueo en una cámara humidificada a 37 °C durante 1 hora. La tinción con DAPI (Invitrogen) se realiza de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Para las tinciones intracelulares (αSMA), la incubación se realiza en
25 PBS/Tween al 0,1%/solución de BSA al 1%. Los portaobjetos se cubren con una solución de montaje (Biomed) con agentes contra el destañido, se fijan durante 24 horas y se mantienen a 4 °C hasta la obtención de imágenes con el programa informático Spot Image (2006) y el microscopio fluorescente Olympus de la serie BX51. CD8, CD4, FoxP3, αSMA, NG2, CD31, ICAM-1, VCAM-1 y VAP-1 se evalúan mediante inmunofluorescencia.

30 Análisis estadístico: se aplican pruebas no paramétricas de Mann-Whitney y Kruskal-Wallis para comparar los tamaños de los tumores entre los diferentes grupos de tratamiento. Los tamaños de los tumores se comparan en el punto temporal más reciente con el mayor número de ratones en cada grupo (8 ratones). Un valor de p inferior a 0,05 se considera estadísticamente significativo en estos análisis.

RESULTADOS

35 La inmunización de ratones que albergan TPSA23 con *Lmdd-143/168* y *LmddA-143/168* da como resultado un mayor número de TILs de efectores específicos para PSA y también disminuye la cobertura de pericitos de la vasculatura tumoral. Además, los marcadores de adhesión celular están significativamente estimulados en los ratones inmunizados.

Listado de secuencias

40 <110> Advaxis, Inc.

<120> SISTEMA DE ADMISITRACIÓN DOBLE PARA ANTÍGENOS HETERÓLOGOS

<130> P-70988-EP1

45 <150> EP 09751395.6

<151> 19-05-2009

<150> US 61/071,792

<151> 19-05-2008

50 <160> 55

<170> PatentIn versión 3.5

55 <210> 1

<211> 32

<212> PRT

<213> Listeria monocytogenes

ES 2 741 730 T3

<400> 1

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

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

<210> 2

<211> 19

<212> PRT

<213> Listeria monocytogenes

5

<400> 2

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

10

Ser Pro Lys

<210> 3

<211> 14

<212> PRT

<213> Listeria monocytogenes

15

<400> 3

Lys Thr Glu Glu Gln Pro Ser Glu Val Asn Thr Gly Pro Arg
1 5 10

20

<210> 4

<211> 28

<212> PRT

<213> Listeria monocytogenes

25

<400> 4

Lys Ala Ser Val Thr Asp Thr Ser Glu Gly Asp Leu Asp Ser Ser Met
1 5 10 15

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

30

<210> 5

<211> 20

<212> PRT

<213> Listeria monocytogenes

<400> 5

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

35

Glu Glu Leu Arg
20

<210> 6

<211> 33

<212> PRT

<213> Listeria monocytogenes

40

<400> 6

ES 2 741 730 T3

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

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

Arg

5
<210> 7
<211> 19
<212> PRT
<213> Listeria seeligeri

10
<400> 7

Arg Ser Glu Val Thr Ile Ser Pro Ala Glu Thr Pro Glu Ser Pro Pro
1 5 10 15

Ala Thr Pro

15
<210> 8
<211> 17
<212> PRT
<213> Streptococcus pyogenes

<400> 8

Lys Gln Asn Thr Ala Ser Thr Glu Thr Thr Thr Thr Asn Glu Gln Pro
1 5 10 15

20
Lys

<210> 9
<211> 17
<212> PRT
25
<213> Streptococcus equisimilis

<400> 9

Lys Gln Asn Thr Ala Asn Thr Glu Thr Thr Thr Thr Asn Glu Gln Pro
1 5 10 15

30
Lys

<210> 10
<211> 441
<212> PRT
35
<213> Listeria monocytogenes

<400> 10

ES 2 741 730 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 741 730 T3

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

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

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

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

Ile Ser Trp Asp Glu Val Asn Tyr Asp
 435 440

<210> 11
 <211> 416
 <212> PRT
 <213> Listeria monocytogenes

5

<400> 11

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

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

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

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

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

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

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

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

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

10

ES 2 741 730 T3

Leu Pro Val Lys Arg Asp Ser Leu Thr Leu Ser Ile Asp Leu Pro Gly
 145 150 155 160
 Met Thr Asn Gln Asp Asn Lys Ile Val Val Lys Asn Ala Thr Lys Ser
 165 170 175
 Asn Val Asn Asn Ala Val Asn Thr Leu Val Glu Arg Trp Asn Glu Lys
 180 185 190
 Tyr Ala Gln Ala Tyr Ser Asn Val Ser Ala Lys Ile Asp Tyr Asp Asp
 195 200 205
 Glu Met Ala Tyr Ser Glu Ser Gln Leu Ile Ala Lys Phe Gly Thr Ala
 210 215 220
 Phe Lys Ala Val Asn Asn Ser Leu Asn Val Asn Phe Gly Ala Ile Ser
 225 230 235 240
 Glu Gly Lys Met Gln Glu Glu Val Ile Ser Phe Lys Gln Ile Tyr Tyr
 245 250 255
 Asn Val Asn Val Asn Glu Pro Thr Arg Pro Ser Arg Phe Phe Gly Lys
 260 265 270
 Ala Val Thr Lys Glu Gln Leu Gln Ala Leu Gly Val Asn Ala Glu Asn
 275 280 285
 Pro Pro Ala Tyr Ile Ser Ser Val Ala Tyr Gly Arg Gln Val Tyr Leu
 290 295 300
 Lys Leu Ser Thr Asn Ser His Ser Thr Lys Val Lys Ala Ala Phe Asp
 305 310 315 320
 Ala Ala Val Ser Gly Lys Ser Val Ser Gly Asp Val Glu Leu Thr Asn
 325 330 335
 Ile Ile Lys Asn Ser Ser Phe Lys Ala Val Ile Tyr Gly Gly Ser Ala
 340 345 350
 Lys Asp Glu Val Gln Ile Ile Asp Gly Asn Leu Gly Asp Leu Arg Asp
 355 360 365
 Ile Leu Lys Lys Gly Ala Thr Phe Asn Arg Glu Thr Pro Gly Val Pro
 370 375 380
 Ile Ala Tyr Thr Thr Asn Phe Leu Lys Asp Asn Glu Leu Ala Val Ile
 385 390 395 400
 Lys Asn Asn Ser Glu Tyr Ile Glu Thr Thr Ser Lys Ala Tyr Thr Asp
 405 410 415

<210> 12

<211> 529

<212> PRT

<213> Listeria monocytogenes

<400> 12

ES 2 741 730 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 741 730 T3

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

ES 2 741 730 T3

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> 13
<211> 416
<212> PRT
<213> Listeria monocytogenes

5

<400> 13

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

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

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

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

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

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

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

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

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

10

ES 2 741 730 T3

Leu Pro Val Lys Arg Asp Ser Leu Thr Leu Ser Ile Asp Leu Pro Gly
 145 150 155 160
 Met Thr Asn Gln Asp Asn Lys Ile Val Val Lys Asn Ala Thr Lys Ser
 165 170 175
 Asn Val Asn Asn Ala Val Asn Thr Leu Val Glu Arg Trp Asn Glu Lys
 180 185 190
 Tyr Ala Gln Ala Tyr Ser Asn Val Ser Ala Lys Ile Asp Tyr Asp Asp
 195 200 205
 Glu Met Ala Tyr Ser Glu Ser Gln Leu Ile Ala Lys Phe Gly Thr Ala
 210 215 220
 Phe Lys Ala Val Asn Asn Ser Leu Asn Val Asn Phe Gly Ala Ile Ser
 225 230 235 240
 Glu Gly Lys Met Gln Glu Glu Val Ile Ser Phe Lys Gln Ile Tyr Tyr
 245 250 255
 Asn Val Asn Val Asn Glu Pro Thr Arg Pro Ser Arg Phe Phe Gly Lys
 260 265 270
 Ala Val Thr Lys Glu Gln Leu Gln Ala Leu Gly Val Asn Ala Glu Asn
 275 280 285
 Pro Pro Ala Tyr Ile Ser Ser Val Ala Tyr Gly Arg Gln Val Tyr Leu
 290 295 300
 Lys Leu Ser Thr Asn Ser His Ser Thr Lys Val Lys Ala Ala Phe Asp
 305 310 315 320
 Ala Ala Val Ser Gly Lys Ser Val Ser Gly Asp Val Glu Leu Thr Asn
 325 330 335
 Ile Ile Lys Asn Ser Ser Phe Lys Ala Val Ile Tyr Gly Gly Ser Ala
 340 345 350
 Lys Asp Glu Val Gln Ile Ile Asp Gly Asn Leu Gly Asp Leu Arg Asp
 355 360 365
 Ile Leu Lys Lys Gly Ala Thr Phe Asn Arg Glu Thr Pro Gly Val Pro
 370 375 380
 Ile Ala Tyr Thr Thr Asn Phe Leu Lys Asp Asn Glu Leu Ala Val Ile
 385 390 395 400
 Lys Asn Asn Ser Glu Tyr Ile Glu Thr Thr Ser Lys Ala Tyr Thr Asp
 405 410 415

<210> 14

<211> 390

<212> PRT

<213> Listeria monocytogenes

ES 2 741 730 T3

<400> 14

Met Arg Ala Met Met Val Val Phe Ile Thr Ala Asn Cys Ile Thr Ile
 1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Ser Pro Gln Pro Leu Lys Ala Asn Gln Gln Pro Phe Phe Pro Lys

ES 2 741 730 T3

gtaagttcac gtgatattaa agaactagaa aaatcgaata aagtgagaaa tacgaacaaa 240
gcagacctaa tagcaatggt gaaagaaaa gcagaaaaag gtccaaatat caataataac 300
aacagtgaac aaactgagaa tgcggctata aatgaagagg cttcaggagc cgaccgacca 360
gctatacaag tggagcgtcg tcatccagga ttgccatcgg atagcgcagc ggaaattaaa 420
aaaagaagga aagccatagc atcatcggat agtgagcttg aaagccttac ttatccggat 480
aaaccaacaa aagtaaataa gaaaaaagtg gcgaaagagt cagttgcgga tgcttctgaa 540
agtgacttag attctagcat gcagtcagca gatgagtctt caccacaacc tttaaaagca 600
aaccaacaac cttttttccc taaagtattt aaaaaataa aagatgcggg gaaatgggta 660
cgtgataaaa tcgacgaaaa tcttgaagta aagaaagcga ttgttgataa aagtgcaggg 720
ttaattgacc aattattaac caaaaagaaa agtgaagagg taaatgcttc ggacttcccg 780
ccaccaccta cggatgaaga gttaagactt gctttgccag agacaccaat gcttcttgg 840
tttaatgctc ctgctacatc agaaccgagc tcattcgaat ttccaccacc acctacggat 900
gaagagttaa gacttgcttt gccagagacg ccaatgcttc ttggttttaa tgctcctgct 960
acatcggaac cgagctcgtt cgaatttcca ccgcctcaa cagaagatga actagaaatc 1020
atccgggaaa cagcatcctc gctagattct agttttacaa gaggggattt agctagtttg 1080
agaaatgcta ttaatcgcca tagtcaaaat ttctctgatt tcccaccaat cccaacagaa 1140
gaagagttga acgggagagg cggtagacca gaagagttga acgggagagg cggtagacca 1200

<210> 16

<211> 390

<212> PRT

<213> Listeria monocytogenes

<400> 16

Met Arg Ala Met Met Val Val Phe Ile Thr Ala Asn Cys Ile Thr Ile
1 5 10 15

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

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

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

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

Ala Asp Leu Ile Ala Met Leu Lys Ala Lys Ala Glu Lys Gly Pro Asn

5

10

ES 2 741 730 T3

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

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

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

Gly Arg Gly Gly Arg Pro
 385 390

<210> 17

<211> 1200

<212> ADN

<213> Listeria monocytogenes

5

<400> 17

atgCGtgCGa tGatGgtagt tttcattact gccaactgca ttacgattaa ccccgacata 60
 atatttgcag cGacagatag cgaagattcc agtctaaca cagatgaatg ggaagaagaa 120
 aaaacagaag agcagccaag cgaggtaaat acgggaccaa gatacgaac tgcacgtgaa 180
 gtaagtccac gtgatattga ggaactagaa aaatcgaata aagtgaaaa tacgaacaaa 240
 gcagacctaa tagcaatggt gaaagcaaaa gcagagaaag gtccgaataa caataataac 300
 aacggtgagc aaacaggaaa tgtggctata aatgaagagg cttcaggagt cgaccgacca 360
 actctgcaag tggagcgtcg tcatccaggt ctgtcatcgg atagcgcgc ggaattaaa 420
 aaaagaagaa aagccatagc gtcgtcggat agtgagcttg aaagccttac ttatccagat 480
 aaaccaacaa aagcaataa gagaaaagtg gcgaaagagt cagttgtgga tgcttctgaa 540
 agtgacttag attctagcat gcagtcagca gacgagtcta caccacaacc tttaaagca 600
 aatcaaaaac catttttccc taaagtattt aaaaaataa aagatgcggg gaaatgggta 660
 cgtgataaaa tcgacgaaaa tcctgaagta aagaaagcga ttgttgataa aagtgcaggg 720
 ttaattgacc aattattaac caaaaagaaa agtgaagagg taaatgcttc ggacttcccg 780
 ccaccaccta cggatgaaga gttaagactt gctttgccag agacaccgat gcttctcgg 840
 tttaatgctc ctactccatc ggaaccgagc tcattcgaat ttccgccc acctacggat 900
 gaagagttaa gacttgcttt gccagagacg ccaatgcttc ttggttttaa tgctcctgct 960
 acatcggaac cgagctcatt cgaatttcca ccgcctcaa cagaagatga actagaaatt 1020
 atgCGggGaaa cagcaacctc gctagattct agttttacaa gcggggattt agctagtttg 1080
 agaagtgcta ttaatcgcca tagcgaaaat ttctctgatt tcccactaat cccaacagaa 1140
 gaagagttga acgggagagg cggtagacca gaagagttga acgggagagg cggtagacca 1200

<210> 18

<211> 1256

<212> ADN

<213> Listeria monocytogenes

<400> 18

10

15

ES 2 741 730 T3

gcgccaaatc attggttgat tgggtgaggat gtctgtgtgc gtgggtcgcg agatgggcga 60
 ataagaagca ttaaagatcc tgacaaatat aatcaagcgg ctcatatgaa agattacgaa 120
 tcgcttccac tcacagagga aggcgactgg ggcggagttc attataatag tggatccccg 180
 aataaagcag cctataatac taccactaaa cttggaaaag aaaaaacaga acagctttat 240
 tttcgcgcct taaagtacta tttaacgaaa aaatcccagt ttaccgatgc gaaaaaagcg 300
 cttcaacaag cagcgaagaa tttatatggt gaagatgctt ctaaaaaagt tgctgaagct 360
 tgggaagcag ttgggggttaa ctgattaaca aatggttagag aaaaattaat tctccaagtg 420
 atattcttaa aataattcat gaatatTTTT tcttatatta gctaattaag aagataacta 480
 actgctaadc caatttttaa cggaacaaat tagtgaaaat gaaggccgaa ttttccttgt 540
 tctaaaaagg ttgtattagc gtatcacgag gagggagtat aagtgggatt aacagattt 600
 atgctgcgca tgatgggtgt tttcattact gccaatgca ttacgattaa ccccgcgctc 660
 gaccatacag acgttaattc ttgcaatggt agctattggc gtgttctctt taggggcggt 720
 tatcaaaatt attcaattaa gaaaaataa ttaaaaacac agaacgaaag aaaaagtgaag 780
 gtgaatgata tgaattcaa aaaggtggtt ctaggtatgt gcttgatcgc aagtgttcta 840
 gtctttccgg taacgataaa agcaaatgcc tgttgtgatg aatacttaca aacacccgca 900
 gctccgcatg atattgacag caaattacca cataaactta gttgggtccgc ggataacccg 960
 acaaatactg acgtaaatac gcactattgg ctttttaaac aagcggaaaa aatactagct 1020
 aaagatgtaa atcatatgag agctaattta atgaatgaac ttaaaaaatt cgataaacaa 1080
 atagctcaag gaatatatga tgggatcat aaaaatccat attatgatac tagtacattt 1140
 ttatctcatt tttataatcc tgatagagat aatacttatt tgccgggttt tgctaagcgg 1200
 aaaataacag gagcaaagta tttcaatcaa tcggtgactg attaccgaga agggaa 1256

5

<210> 19
 <211> 2322
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10

<400> 19

Met Gln Ser Gly Arg Gly Pro Pro Leu Pro Ala Pro Gly Leu Ala Leu
 1 5 10 15

Ala Leu Thr Leu Thr Met Leu Ala Arg Leu Ala Ser Ala Ala Ser Phe
 20 25 30

ES 2 741 730 T3

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

ES 2 741 730 T3

Val His Ile Asn Ala His Arg Leu Glu Ile Ser Val Asp Gln Tyr Pro
 290 295 300

Thr His Thr Ser Asn Arg Gly Val Leu Ser Tyr Leu Glu Pro Arg Gly
 305 310 315 320

Ser Leu Leu Leu Gly Gly Leu Asp Ala Glu Ala Ser Arg His Leu Gln
 325 330 335

Glu His Arg Leu Gly Leu Thr Pro Glu Ala Thr Asn Ala Ser Leu Leu
 340 345 350

Gly Cys Met Glu Asp Leu Ser Val Asn Gly Gln Arg Arg Gly Leu Arg
 355 360 365

Glu Ala Leu Leu Thr Arg Asn Met Ala Ala Gly Cys Arg Leu Glu Glu
 370 375 380

Glu Glu Tyr Glu Asp Asp Ala Tyr Gly His Tyr Glu Ala Phe Ser Thr
 385 390 395 400

Leu Ala Pro Glu Ala Trp Pro Ala Met Glu Leu Pro Glu Pro Cys Val
 405 410 415

Pro Glu Pro Gly Leu Pro Pro Val Phe Ala Asn Phe Thr Gln Leu Leu
 420 425 430

Thr Ile Ser Pro Leu Val Val Ala Glu Gly Gly Thr Ala Trp Leu Glu
 435 440 445

Trp Arg His Val Gln Pro Thr Leu Asp Leu Met Glu Ala Glu Leu Arg
 450 455 460

Lys Ser Gln Val Leu Phe Ser Val Thr Arg Gly Ala Arg His Gly Glu
 465 470 475 480

Leu Glu Leu Asp Ile Pro Gly Ala Gln Ala Arg Lys Met Phe Thr Leu
 485 490 495

Leu Asp Val Val Asn Arg Lys Ala Arg Phe Ile His Asp Gly Ser Glu
 500 505 510

Asp Thr Ser Asp Gln Leu Val Leu Glu Val Ser Val Thr Ala Arg Val
 515 520 525

Pro Met Pro Ser Cys Leu Arg Arg Gly Gln Thr Tyr Leu Leu Pro Ile

ES 2 741 730 T3

Trp Met Leu Arg Leu Glu Pro Leu His Thr Gln Asn Thr Gln Gln Glu
785 790 795 800

Thr Leu Thr Thr Ala His Leu Glu Ala Thr Leu Glu Glu Ala Gly Pro
805 810 815

Ser Pro Pro Thr Phe His Tyr Glu Val Val Gln Ala Pro Arg Lys Gly
820 825 830

Asn Leu Gln Leu Gln Gly Thr Arg Leu Ser Asp Gly Gln Gly Phe Thr
835 840 845

Gln Asp Asp Ile Gln Ala Gly Arg Val Thr Tyr Gly Ala Thr Ala Arg
850 855 860

Ala Ser Glu Ala Val Glu Asp Thr Phe Arg Phe Arg Val Thr Ala Pro
865 870 875 880

Pro Tyr Phe Ser Pro Leu Tyr Thr Phe Pro Ile His Ile Gly Gly Asp
885 890 895

Pro Asp Ala Pro Val Leu Thr Asn Val Leu Leu Val Val Pro Glu Gly
900 905 910

Gly Glu Gly Val Leu Ser Ala Asp His Leu Phe Val Lys Ser Leu Asn
915 920 925

Ser Ala Ser Tyr Leu Tyr Glu Val Met Glu Arg Pro Arg His Gly Arg
930 935 940

Leu Ala Trp Arg Gly Thr Gln Asp Lys Thr Thr Met Val Thr Ser Phe
945 950 955 960

Thr Asn Glu Asp Leu Leu Arg Gly Arg Leu Val Tyr Gln His Asp Asp
965 970 975

Ser Glu Thr Thr Glu Asp Asp Ile Pro Phe Val Ala Thr Arg Gln Gly
980 985 990

Glu Ser Ser Gly Asp Met Ala Trp Glu Glu Val Arg Gly Val Phe Arg
995 1000 1005

Val Ala Ile Gln Pro Val Asn Asp His Ala Pro Val Gln Thr Ile
1010 1015 1020

Ser Arg Ile Phe His Val Ala Arg Gly Gly Arg Arg Leu Leu Thr
1025 1030 1035

ES 2 741 730 T3

Thr Asp Asp Val Ala Phe Ser Asp Ala Asp Ser Gly Phe Ala Asp
 1040 1045 1050
 Ala Gln Leu Val Leu Thr Arg Lys Asp Leu Leu Phe Gly Ser Ile
 1055 1060 1065
 Val Ala Val Asp Glu Pro Thr Arg Pro Ile Tyr Arg Phe Thr Gln
 1070 1075 1080
 Glu Asp Leu Arg Lys Arg Arg Val Leu Phe Val His Ser Gly Ala
 1085 1090 1095
 Asp Arg Gly Trp Ile Gln Leu Gln Val Ser Asp Gly Gln His Gln
 1100 1105 1110
 Ala Thr Ala Leu Leu Glu Val Gln Ala Ser Glu Pro Tyr Leu Arg
 1115 1120 1125
 Val Ala Asn Gly Ser Ser Leu Val Val Pro Gln Gly Gly Gln Gly
 1130 1135 1140
 Thr Ile Asp Thr Ala Val Leu His Leu Asp Thr Asn Leu Asp Ile
 1145 1150 1155
 Arg Ser Gly Asp Glu Val His Tyr His Val Thr Ala Gly Pro Arg
 1160 1165 1170
 Trp Gly Gln Leu Val Arg Ala Gly Gln Pro Ala Thr Ala Phe Ser
 1175 1180 1185
 Gln Gln Asp Leu Leu Asp Gly Ala Val Leu Tyr Ser His Asn Gly
 1190 1195 1200
 Ser Leu Ser Pro Arg Asp Thr Met Ala Phe Ser Val Glu Ala Gly
 1205 1210 1215
 Pro Val His Thr Asp Ala Thr Leu Gln Val Thr Ile Ala Leu Glu
 1220 1225 1230
 Gly Pro Leu Ala Pro Leu Lys Leu Val Arg His Lys Lys Ile Tyr
 1235 1240 1245
 Val Phe Gln Gly Glu Ala Ala Glu Ile Arg Arg Asp Gln Leu Glu
 1250 1255 1260
 Ala Ala Gln Glu Ala Val Pro Pro Ala Asp Ile Val Phe Ser Val
 1265 1270 1275

ES 2 741 730 T3

Lys Ser Pro Pro Ser Ala Gly Tyr Leu Val Met Val Ser Arg Gly
 1280 1285 1290

Ala Leu Ala Asp Glu Pro Pro Ser Leu Asp Pro Val Gln Ser Phe
 1295 1300 1305

Ser Gln Glu Ala Val Asp Thr Gly Arg Val Leu Tyr Leu His Ser
 1310 1315 1320

Arg Pro Glu Ala Trp Ser Asp Ala Phe Ser Leu Asp Val Ala Ser
 1325 1330 1335

Gly Leu Gly Ala Pro Leu Glu Gly Val Leu Val Glu Leu Glu Val
 1340 1345 1350

Leu Pro Ala Ala Ile Pro Leu Glu Ala Gln Asn Phe Ser Val Pro
 1355 1360 1365

Glu Gly Gly Ser Leu Thr Leu Ala Pro Pro Leu Leu Arg Val Ser
 1370 1375 1380

Gly Pro Tyr Phe Pro Thr Leu Leu Gly Leu Ser Leu Gln Val Leu
 1385 1390 1395

Glu Pro Pro Gln His Gly Ala Leu Gln Lys Glu Asp Gly Pro Gln
 1400 1405 1410

Ala Arg Thr Leu Ser Ala Phe Ser Trp Arg Met Val Glu Glu Gln
 1415 1420 1425

Leu Ile Arg Tyr Val His Asp Gly Ser Glu Thr Leu Thr Asp Ser
 1430 1435 1440

Phe Val Leu Met Ala Asn Ala Ser Glu Met Asp Arg Gln Ser His
 1445 1450 1455

Pro Val Ala Phe Thr Val Thr Val Leu Pro Val Asn Asp Gln Pro
 1460 1465 1470

Pro Ile Leu Thr Thr Asn Thr Gly Leu Gln Met Trp Glu Gly Ala
 1475 1480 1485

Thr Ala Pro Ile Pro Ala Glu Ala Leu Arg Ser Thr Asp Gly Asp
 1490 1495 1500

Ser Gly Ser Glu Asp Leu Val Tyr Thr Ile Glu Gln Pro Ser Asn

ES 2 741 730 T3

Glu His Asp Val Leu Phe Gln Val Thr Gln Phe Pro Ser Arg Gly
 1745 1750 1755

 Gln Leu Leu Val Ser Glu Glu Pro Leu His Ala Gly Gln Pro His
 1760 1765 1770

 Phe Leu Gln Ser Gln Leu Ala Ala Gly Gln Leu Val Tyr Ala His
 1775 1780 1785

 Gly Gly Gly Gly Thr Gln Gln Asp Gly Phe His Phe Arg Ala His
 1790 1795 1800

 Leu Gln Gly Pro Ala Gly Ala Ser Val Ala Gly Pro Gln Thr Ser
 1805 1810 1815

 Glu Ala Phe Ala Ile Thr Val Arg Asp Val Asn Glu Arg Pro Pro
 1820 1825 1830

 Gln Pro Gln Ala Ser Val Pro Leu Arg Leu Thr Arg Gly Ser Arg
 1835 1840 1845

 Ala Pro Ile Ser Arg Ala Gln Leu Ser Val Val Asp Pro Asp Ser
 1850 1855 1860

 Ala Pro Gly Glu Ile Glu Tyr Glu Val Gln Arg Ala Pro His Asn
 1865 1870 1875

 Gly Phe Leu Ser Leu Val Gly Gly Gly Leu Gly Pro Val Thr Arg
 1880 1885 1890

 Phe Thr Gln Ala Asp Val Asp Ser Gly Arg Leu Ala Phe Val Ala
 1895 1900 1905

 Asn Gly Ser Ser Val Ala Gly Ile Phe Gln Leu Ser Met Ser Asp
 1910 1915 1920

 Gly Ala Ser Pro Pro Leu Pro Met Ser Leu Ala Val Asp Ile Leu
 1925 1930 1935

 Pro Ser Ala Ile Glu Val Gln Leu Arg Ala Pro Leu Glu Val Pro
 1940 1945 1950

 Gln Ala Leu Gly Arg Ser Ser Leu Ser Gln Gln Gln Leu Arg Val
 1955 1960 1965

 Val Ser Asp Arg Glu Glu Pro Glu Ala Ala Tyr Arg Leu Ile Gln
 1970 1975 1980

ES 2 741 730 T3

Gly Pro Gln Tyr Gly His Leu Leu Val Gly Gly Arg Pro Thr Ser
 1985 1990 1995

Ala Phe Ser Gln Phe Gln Ile Asp Gln Gly Glu Val Val Phe Ala
 2000 2005 2010

Phe Thr Asn Phe Ser Ser Ser His Asp His Phe Arg Val Leu Ala
 2015 2020 2025

Leu Ala Arg Gly Val Asn Ala Ser Ala Val Val Asn Val Thr Val
 2030 2035 2040

Arg Ala Leu Leu His Val Trp Ala Gly Gly Pro Trp Pro Gln Gly
 2045 2050 2055

Ala Thr Leu Arg Leu Asp Pro Thr Val Leu Asp Ala Gly Glu Leu
 2060 2065 2070

Ala Asn Arg Thr Gly Ser Val Pro Arg Phe Arg Leu Leu Glu Gly
 2075 2080 2085

Pro Arg His Gly Arg Val Val Arg Val Pro Arg Ala Arg Thr Glu
 2090 2095 2100

Pro Gly Gly Ser Gln Leu Val Glu Gln Phe Thr Gln Gln Asp Leu
 2105 2110 2115

Glu Asp Gly Arg Leu Gly Leu Glu Val Gly Arg Pro Glu Gly Arg
 2120 2125 2130

Ala Pro Gly Pro Ala Gly Asp Ser Leu Thr Leu Glu Leu Trp Ala
 2135 2140 2145

Gln Gly Val Pro Pro Ala Val Ala Ser Leu Asp Phe Ala Thr Glu
 2150 2155 2160

Pro Tyr Asn Ala Ala Arg Pro Tyr Ser Val Ala Leu Leu Ser Val
 2165 2170 2175

Pro Glu Ala Ala Arg Thr Glu Ala Gly Lys Pro Glu Ser Ser Thr
 2180 2185 2190

Pro Thr Gly Glu Pro Gly Pro Met Ala Ser Ser Pro Glu Pro Ala
 2195 2200 2205

Val Ala Lys Gly Gly Phe Leu Ser Phe Leu Glu Ala Asn Met Phe
 2210 2215 2220

ES 2 741 730 T3

Ser Val Ile Ile Pro Met Cys Leu Val Leu Leu Leu Leu Ala Leu
 2225 2230 2235

Ile Leu Pro Leu Leu Phe Tyr Leu Arg Lys Arg Asn Lys Thr Gly
 2240 2245 2250

Lys His Asp Val Gln Val Leu Thr Ala Lys Pro Arg Asn Gly Leu
 2255 2260 2265

Ala Gly Asp Thr Glu Thr Phe Arg Lys Val Glu Pro Gly Gln Ala
 2270 2275 2280

Ile Pro Leu Thr Ala Val Pro Gly Gln Gly Pro Pro Pro Gly Gly
 2285 2290 2295

Gln Pro Asp Pro Glu Leu Leu Gln Phe Cys Arg Thr Pro Asn Pro
 2300 2305 2310

Ala Leu Lys Asn Gly Gln Tyr Trp Val
 2315 2320

<210> 20
 <211> 7011
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 20

atgcagtc	ccg	gccgcggccc	cccacttcca	gcccccgcc	tggccttggc	tttgaccctg	60
actatgttg	ccagacttgc	atccgcggct	tccttcttcg	gtgagaacca	cctggaggtg	120	
cctgtggcca	cggtctgac	cgacatagac	ctgcagctgc	agttctccac	gtcccagccc	180	
gaagccctcc	ttctcctggc	agcaggccca	gctgaccacc	tcctgctgca	gctctactct	240	
ggacgcctgc	aggtcagact	tgttctgggc	caggaggagc	tgaggctgca	gactccagca	300	
gagacgctgc	tgagtgactc	catccccac	actgtggtgc	tgactgtcgt	agagggctgg	360	
gccacgttgt	cagtcgatgg	gtttctgaac	gcctcctcag	cagtcccagg	agcccccta	420	
gaggtcccct	atgggctcct	tgttgggggc	actgggacc	ttggcctgcc	ctacctgagg	480	
ggaaccagcc	gaccctgag	gggttgctc	catgcagcca	ccctcaatgg	ccgcagcctc	540	
ctccggcctc	tgacccccga	tgtgcatgag	ggctgtgctg	aagagttttc	tgccagtgat	600	
gatgtggccc	tgggcttctc	tgggccccac	tctctggctg	ccttccctgc	ctggggcact	660	
caggacgaag	gaaccctaga	gtttacactc	accacacaga	gccggcaggc	acccttggcc	720	
ttccaggcag	ggggccggcg	tggggacttc	atctatgtgg	acatatttga	gggccacctg	780	
cgggccctgg	tggagaaggg	ccagggtacc	gtattgctcc	acaacagtgt	gcctgtggcc	840	

5

10

ES 2 741 730 T3

gatgggcagc cccatgaggt cagtgtccac atcaatgctc accggctgga aatctccgtg 900
gaccagtacc ctacgcatac ttcgaaccga ggagtcctca gctacctgga gccacggggc 960
agtctccttc tcggggggct ggatgcagag gcctctcgtc acctccagga acaccgctg 1020
ggcctgacac cagaggccac caatgcctcc ctgctgggct gcatggaaga cctcagtgtc 1080
aatggccaga ggcgggggct gcggaagct ttgctgacgc gcaacatggc agccggctgc 1140
aggctggagg aggaggagta tgaggacgat gcctatggac attatgaagc tttctccacc 1200
ctggcccctg aggcttggcc agccatggag ctgcctgagc catgctgtcc tgagccaggg 1260
ctgcctcctg tctttgcaa tttcaccag ctgctgacta tcagcccact ggtggtggcc 1320
gaggggggca cagcctggct tgagtggagg catgtgcagc ccacgctgga cctgatggag 1380
gctgagctgc gcaaatccca ggtgctgttc agcgtgacct gaggggcacg ccatggcgag 1440
ctcgagctgg acatcccggg agcccaggca cgaaaaatgt tcaccctcct ggacgtggtg 1500
aaccgcaagg cccgcttcat ccacgatggc tctgaggaca cctccgacca gctggtgctg 1560
gaggtgtcgg tgacggctcg ggtgcccatg ccctcatgcc ttcggagggg ccaaacatac 1620
ctcctgcca tccaggtaaa ccctgtcaat gaccacccc acatcatctt cccacatggc 1680
agcctcatgg tgatcctgga acacacgag aagccgctgg ggcctgaggt tttccaggcc 1740
tatgaccggg actctgcctg tgagggcctc acctccagg tccttggcac ctctctggc 1800
ctccccgtgg agcggcgaga ccagcctggg gagccggcga ccgagttctc ctgccgggag 1860
ttggaggccg gcagcctagt ctatgtccac cggggtggtc ctgcacagga cttgacgttc 1920
cgggtcagcg atggactgca ggccagcccc ccggccacgc tgaagggtgt ggccatccgg 1980
ccggccatac agatccaccg cagcacaggg ttgcgactgg cccaaggctc tgccatgccc 2040
atcttcccc ccaacctgtc ggtggagacc aatgccgtgg ggcaggatgt gacgctgctg 2100
ttccgcgtca ctggggccct gcagtttggg gagctgcaga agcagggggc aggtggggtg 2160
gaggtgctg agtgggtggc cacacaggcg ttccaccagc gggatgtgga gcagggccgc 2220
gtgaggtacc tgagcactga cccacagcac cacgcttacg acaccgtgga gaacctggcc 2280
ctggaggtgc aggtgggcca ggagatcctg agcaatctgt ccttcccagt gaccatccag 2340
agagccactg tgtggatgct gcggtggag cactgcaca ctcagaacac ccagcaggag 2400
accctacca cagcccacct ggaggccacc ctggaggagg caggcccaag ccccccaacc 2460
ttcattatg aggtggttca ggctcccagg aaaggcaacc ttcaactaca gggcacaagg 2520
ctgtcagatg gccagggctt caccaggat gacatacagg ctggccgggt gacctatggg 2580
gccacagcac gtgcctcaga ggcagtogag gacacctcc gtttccgtgt cacagctcca 2640
ccatatttct cccactcta taccttcccc atccacattg gtggtgacct agatgcgct 2700

ES 2 741 730 T3

gtccctcacca atgtcctcct cgtggtgcct gaggggtggtg aggggtgtcct ctctgctgac 2760
 cacctcctttg tcaagagtct caacagtgcc agctacctct atgaggtcat ggagcggccc 2820
 cgccatggga ggttggtctg gcgtgggaca caggacaaga ccaactatggt gacatccttc 2880
 accaatgaag acctgttgcg tggccggctg gtctaccagc atgatgactc cgagaccaca 2940
 gaagatgata tcccatttgt tgctaccgcg cagggcgaga gcagtggatga catggcctgg 3000
 gaggaggtac ggggtgtcct cagagtggcc atccagcccg tgaatgacca cggcctgtg 3060
 cagaccatca gccggatcct ccatgtggcc cgggggtgggc ggcggtgct gactacagac 3120
 gacgtggcct tcagcgatgc tgactcgggc tttgctgacg cccagctggt gcttaccgc 3180
 aaggacctcc tctttggcag tatcgtggcc gtatgatgagc ccacgcggcc catctaccgc 3240
 ttcaccagcagg aggacctcag gaagaggcga gtactgttcg tgcactcagg ggctgaccgt 3300
 ggctggatcc agctgcagggt gtccgacggg caacaccagg ccaactgcgt gctggaggtg 3360
 caggcctcgg aacctacct cctgtggcc aacggctcca gccttgtggt ccctcaaggg 3420
 ggccagggca ccatcgacac ggccgtgctc cacctggaca ccaacctcga catccgcagt 3480
 ggggatgagg tccactacca cgtcacagct ggccctcgct ggggacagct agtccggct 3540
 ggtcagccag ccacagcctt cctccagcag gacctgctgg atggggccgt tctctatagc 3600
 cacaatggca gcctcagccc ccgcgacacc atggccttct ccgtggaagc agggccagtg 3660
 cacacggatg ccaccctaca agtgaccatt gccctagagg gccactggc cccactgaag 3720
 ctggtccggc acaagaagat ctacgtcttc cagggagagg cagctgagat cagaagggac 3780
 cagctggagg cagcccagga ggcatgcca cctgcagaca tcgtattctc agtgaagagc 3840
 ccaccgagtg ccggctacct ggtgatgggt tcgctggcg ccttggcaga tgagccacc 3900
 agcctggacc ctgtgcagag cttctcccag gaggcagtgg acacaggcag ggtcctgtac 3960
 ctgcactccc gccctgaggc ctggagcgat gccttctcgc tggatgtggc ctcaggcctg 4020
 ggtgctcccc tcgagggcgt ccttgtggag ctggaggtgc tgcccgtgc catcccacta 4080
 gaggcgcaaa acttcagcgt ccctgaggggt ggcagcctca ccctggcccc tccactgctc 4140
 cgtgtctccg ggccctactt cccactctc ctgggcctca gcctgcaggt gctggagcca 4200
 ccccagcatg gagccctgca gaaggaggac ggacctcaag ccaggaccct cagcgccttc 4260
 tcctggagaa tgggtgaaga gcagctgac cgtactgtgc atgacgggag cgagacactg 4320
 acagacagtt ttgtcctgat ggctaagcc tccgagatgg atcgccagag ccatcctgtg 4380
 gccttcaactg teactgtcct gcctgtcaat gaccaacccc ccatcctcac taaaaacaca 4440
 ggcctgcaga tgtgggaggg ggccactgcg cccatccctg cggaggctct gaggagcacg 4500
 gacggcgact ctgggtctga ggatctggtc tacaccatcg agcagcccag caacgggcgg 4560
 gtagtgtctc gggggcgccc gggcactgag gtgcgcagct tcacgcaggc ccagctggac 4620

ES 2 741 730 T3

ggcgggctcg tgctgttctc acacagagga accctggatg gaggttccg cttccgcctc 4680
 tctgacggcg agcacacttc ccccgacac ttcttccgag tgacggcca gaagcaagtg 4740
 ctctctcgc tgaagggcag ccagacactg actgtctgcc caggttccgt ccagccactc 4800
 agcagtca ga ccctcagggc cagctccagc gcaggcactg acccccagct cctgctctac 4860
 cgtgtggtgc ggggccccca gctaggccgg ctgttccacg cccagcagga cagcacaggg 4920
 gaggccttgg tgaacttcac tcaggcagag gtctacgctg ggaatattct gtatgagcat 4980
 gagatgcccc ccgagccctt ttgggaggcc catgataccc tagagctcca gctgtcctcg 5040
 ccgcctgcc gggacgtggc cgcacacctt gctgtggtg tgtcttttga ggctgcctgt 5100
 ccccagcgcc ccagccacct ctggaagaac aaaggtctct gggccccga gggccagcgg 5160
 gccagatca ccgtggctgc tctggatgcc tccaatctct tggccagcgt tccatcacc 5220
 cagcgtcag agcatgatgt gctcttccag gtcacacagt tcccagccg gggccagctg 5280
 ttggtgtccg aggagcccct ccatgctggg cagccccact tcctgcagtc ccagctggt 5340
 gcagggcagc tagtgtatgc ccacggcggg gggggcaccc agcaggatgg cttccacttt 5400
 cgtgcccacc tccaggggcc agcaggggcc tccgtggctg gaccccaaac ctcagaggcc 5460
 tttgcatca cggtgagga tgtaaatgag cggccccctc agccacaggc ctctgtcca 5520
 ctccggtca cccgaggtc tcgtgcccc atctcccggg cccagctgag tgtggtggac 5580
 ccagactcag ctcttgggga gattgagtac gaggtccagc gggcaccca caacggcttc 5640
 ctcagcctgg tgggtggtgg cctggggccc gtgaccgct tcacgcaagc cgatgtggat 5700
 tcaggggcgc tggccttctg ggccaacggg agcagcgtgg caggcatctt ccagctgagc 5760
 atgtctgatg gggccagccc acccctgccc atgtccctgg ctgtggacat cctaccatcc 5820
 gccatcgagg tgcagctgcg ggcacccctg gaggtgcccc aagctttggg gcgctcctca 5880
 ctgagccagc agcagctccg ggtggtttca gatcgggagg agccagaggc agcataccgc 5940
 ctcatccagg gaccccagta tgggcatctc ctggtggcg ggcggccac ctcggccttc 6000
 agccaattcc agatagacca gggcgagggt gtctttgcct tcaccaactt ctcctctct 6060
 catgaccact tcagagtcct ggcaactggc aggggtgtca atgcatcagc cgtagtgaac 6120
 gtcactgtga gggctctgct gcatgtgtgg gcagggtggc catggcccca ggggtgccacc 6180
 ctgcccctgg accccaccgt cctagatgct ggcgagctgg ccaaccgcac aggcagtgtg 6240
 ccgccttcc gcctcctgga gggaccccg catggcccg tggcccgct gccccgagcc 6300
 aggacggagc ccgggggcag ccagctggtg gagcagttca ctcagcagga ccttgaggac 6360
 gggaggctgg ggctggaggt gggcaggcca gaggggaggg cccccggccc cgcaggtgac 6420
 agtctcactc tggagctgtg ggcacagggc gtcccgcctg ctgtggcctc cctggacttt 6480

ES 2 741 730 T3

gccactgagc cttacaatgc tgcccggccc tacagcgtgg ccctgctcag tgtccccgag 6540
 gccgcccgga cggaagcagg gaagccagag agcagcaccc ccacaggcga gccaggcccc 6600
 atggcatcca gccctgagcc cgctgtggcc aaggaggct tcctgagctt ccttgaggcc 6660
 aacatgttca gcgtcatcat ccccatgtgc ctggtacttc tgctcctggc gctcatcctg 6720
 cccctgctct tctacctccg aaaacgcaac aagacgggca agcatgacgt ccaggtcctg 6780
 actgccaagc cccgcaacgg cctggctggt gacaccgaga cctttcgcaa ggtggagcca 6840
 ggccaggcca tcccgtcac agctgtgcct ggccaggggc ccctccagg aggccagcct 6900
 gaccagagc tgctgcagtt ctgccggaca cccaacctg ccottaagaa tggccagtac 6960
 tgggtgtgag gcctggcctg ggcccagatg ctgatcgggc cagggacag c 7011

<210> 21
 <211> 261
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

<400> 21

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

10

ES 2 741 730 T3

100 105 110

Lys Val Met Asp Leu Pro Thr Gln Glu Pro Ala Leu Gly Thr Thr Cys
115 120 125

Tyr Ala Ser Gly Trp Gly Ser Ile Glu Pro Glu Glu Phe Leu Thr Pro
130 135 140

Lys Lys Leu Gln Cys Val Asp Leu His Val Ile Ser Asn Asp Val Cys
145 150 155 160

Ala Gln Val His Pro Gln Lys Val Thr Lys Phe Met Leu Cys Ala Gly
165 170 175

Arg Trp Thr Gly Gly Lys Ser Thr Cys Ser Gly Asp Ser Gly Gly Pro
180 185 190

Leu Val Cys Tyr Gly Val Leu Gln Gly Ile Thr Ser Trp Gly Ser Glu
195 200 205

Pro Cys Ala Leu Pro Glu Arg Pro Ser Leu Tyr Thr Lys Val Val His
210 215 220

Tyr Arg Lys Trp Ile Lys Asp Thr Ile Val Ala Asn Pro
225 230 235

<210> 23
<211> 237
<212> PRT
<213> Homo sapiens

5

<400> 23

10

Ile Val Gly Gly Trp Glu Cys Glu Lys His Ser Gln Pro Trp Gln Val
1 5 10 15

Leu Val Ala Ser Arg Gly Arg Ala Val Cys Gly Gly Val Leu Val His
20 25 30

Pro Gln Trp Val Leu Thr Ala Ala His Cys Ile Arg Asn Lys Ser Val
35 40 45

Ile Leu Leu Gly Arg His Ser Leu Phe His Pro Glu Asp Thr Gly Gln
50 55 60

Val Phe Gln Val Ser His Ser Phe Pro His Pro Leu Tyr Asp Met Ser
65 70 75 80

Leu Leu Lys Asn Arg Phe Leu Arg Pro Gly Asp Asp Ser Ser His Asp

ES 2 741 730 T3

agacagggag ctgggctctt ttctgtctct cccagcccca cttcaagccc atacccccag 600
 tcccctccat attgcaacag tctctactcc cacaccaggt ccccgctccc tcccacttac 660
 cccagaactt tcttcccatt tgcccagcca gctccctgct cccagctgct ttactaaagg 720
 ggaagttcct gggcatctcc gtgtttctct ttgtggggct caaaacctcc aaggacctct 780
 ctcaatgcca ttggttctct ggaccgtatc actgggtccat ctctgagcc cctcaatcct 840
 atcacagtct actgactttt cccattcagc tgtgagtgtc caaccctatc ccagagacct 900
 tgatgcttgg cctcccaatc ttgccctagg ataccagat gcccaaccaga cacctccttc 960
 tttcctagcc aggctatctg gcctgagaca acaaatgggt ccctcagtct ggcaatggga 1020
 ctctgagaac tctctattcc ctgactctta gccccagact cttcattcag tggtccacat 1080
 tttccttagg aaaaacatga gcatccccag ccacaactgc cagctctctg agtccccaaa 1140
 tctgcatcct tttcaaaacc taaaaacaaa aagaaaaaca aataaaacaa aaccaactca 1200
 gaccagaact gttttctcaa cctgggactt cctaaacttt ccaaacctt cctcttccag 1260
 caactgaacc tcgccataag gcacttatcc ctggttccta gcaccctta tcccctcaga 1320
 atccacaact tgtaccaagt ttcccttctc ccagtccaag accccaaatc accacaaagg 1380
 acccaatccc cagactcaag atatggtctg ggcgctgtct tgtgtctcct acctgatcc 1440
 ctgggttcaa ctctgtctcc agagcatgaa gcctctccac cagcaccagc caccaacctg 1500
 caaacctagg gaagattgac agaattccca gcctttccca gctccccctg cccatgtccc 1560
 aggactccca gccttgggtc tctgccccg tgtcttttca aaccacatc ctaaattccat 1620
 ctctatccg agtccccag ttccccctgt caacctgat tcccctgatc tagcaccccc 1680
 tctgcaggcg ctgcgcccct catcctgtct cggattgtgg gaggctggga gtgcgagaag 1740
 cattcccaac cctggcaggt gcttgtggcc tctcgtggca gggcagtctg cggcgggtgtt 1800
 ctggtgcacc ccagtggggt cctcacagct gccactgca tcaggaagtg agtaggggcc 1860
 tgggtctctg ggagcaggtg tctgtgtccc agaggaataa cagctgggca ttttccccag 1920
 gataacctct aaggccagcc ttgggactgg gggagagagg gaaagtctg gttcaggtca 1980
 catggggagg cagggttggg gctggaccac cctccccatg gctgcctggg tctccatctg 2040
 tgtccctcta tgtctctttg tgtcgtttc attatgtctc ttggtaactg gcttcggttg 2100
 tgtctctccg tgtgactatt ttgttctctc tctccctctc ttctctgtct tcagtctcca 2160
 tatctcccc tctctctgtc cttctctggt ccctctctag ccagtgtgtc tcacctgta 2220
 tctctctgcc aggctctgtc tctcgtctc tgtctcacct gtgccttctc cctactgaac 2280
 acacgcacgg gatgggctct ggggaccctg agaaaaggaa gggctttggc tgggcgcggt 2340
 ggctcacacc tgtaatccca gcactttggg aggccaaggc aggtagatca cctgaggtca 2400
 ggagttcgag accagcctgg ccaactggtg aaaccctatc tctactaaaa atacaaaaaa 2460

ES 2 741 730 T3

ttagccaggc gtggtggcgc atgcctgtag tcccagctac tcaggagctg agggaggaga 2520
 attgcattga acctggaggt tgaggttgca gtgagccgag accgtgccac tgcactccag 2580
 cctgggtgac agagtgagac tccgcctcaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaga 2640
 aaagaaaaga aaagaaaagg aagtgtttta tccctgatgt gtgtgggtat gagggtatga 2700
 gagggccctt ctcaactccat tccttctcca ggacatccct ccaactcttg gagacacaga 2760
 gaaggctgg ttccagctgg agctgggagg ggcaattgag ggaggaggaa ggagaagggg 2820
 gaaggaaaac agggatggg ggaaaggacc ctggggagcg aagtggagga tacaaccttg 2880
 ggcctgcagg caggctacct acccaacttg aaaccacgc caaagccgca tctacagctg 2940
 agccactctg aggcctcccc tccccggcgg tccccactca gctccaaagt ctctctccct 3000
 tttctctccc acactttatc atccccgga ttctctcta cttggttctc attcttctt 3060
 tgacttctg ctccctttc tcattcatct gtttctcact ttctgcctgg ttttgttctt 3120
 ctctctctct ttctctggcc catgtctgtt tctctatggt tctgtctttt ctttctcacc 3180
 ctgtgtatth tcggctcacc ttgtttgtca ctgttctccc ctctgccctt tcattctctc 3240
 tgccctttta ccctcttctt tttcccttgg ttctctcagt tctgtatctg cccttcaccc 3300
 tctcacactg ctgtttccca actcgttgtc tgtatthtgg cctgaactgt gtcttcccaa 3360
 ccctgtgttt tctcaactgt tctttttctc ttttggagcc tcctccttgc tcctctgtcc 3420
 cttctctctt tccttatcat cctcgtcct cattcctgcy tctgtcttct cccagcaaa 3480
 agcgtgatct tgctgggtcg gcacagcctg tttcatcctg aagacacagg ccaggattht 3540
 caggctcagc acagcttccc acaccgcctc tacgatatga gcctcctgaa gaatcgattc 3600
 ctcaggccag gtgatgactc cagccaogac ctcatgctgc tccgcctgtc agagcctgcc 3660
 gagctcacgg atgctgtgaa ggtcatggac ctgcccaccc aggagccagc actggggacc 3720
 acctgctacg cctcaggctg gggcagcatt gaaccagagg agtgtacgcc tgggccagat 3780
 ggtgcagccg ggagcccaga tgcctgggtc tgagggagga ggggacagga ctctgggtc 3840
 tgagggagga gggccaagga accaggtggg gtccagccca caacagtgtt tttgcctggc 3900
 ccgtagtctt gaccccaaag aaacttcagt gtgtggacct ccatgttatt tccaatgacg 3960
 tgtgtgcgca agttcacctc cagaaggtga ccaagttcat gctgtgtgct ggacgctgga 4020
 cagggggcaa aagcacctgc tcggtgagtc atccctactc ccaagatctt gagggaaagg 4080
 tgagtgggac cttaattctg ggctgggtc tagaagccaa caaggcgtct gcctcccctg 4140
 ctccccagct gtagccatgc cacctccccg tgtctcatct cattcctctc ttccctcttc 4200
 tttgactccc tcaaggcaat aggttattct tacagcacia ctcatctgtt cctgcgttca 4260
 gcacacggtt actaggcacc tgctatgcac ccagcactgc cctagagcct gggacatagc 4320

ES 2 741 730 T3

Ala Ala Pro Leu Ile Leu Ser Arg Ile Val Gly Gly Trp Glu Cys Glu
 20 25 30

Lys His Ser Gln Pro Trp Gln Val Leu Val Ala Ser Arg Gly Arg Ala
 35 40 45

Val Cys Gly Gly Val Leu Val His Pro Gln Trp Val Leu Thr Ala Ala
 50 55 60

His Cys Ile Arg Asn Lys Ser Val Ile Leu Leu Gly Arg His Ser Leu
 65 70 75 80

Phe His Pro Glu Asp Thr Gly Gln Val Phe Gln Val Ser His Ser Phe
 85 90 95

Pro His Pro Leu Tyr Asp Met Ser Leu Leu Lys Asn Arg Phe Leu Arg
 100 105 110

Pro Gly Asp Asp Ser Ser His Asp Leu Met Leu Leu Arg Leu Ser Glu
 115 120 125

Pro Ala Glu Leu Thr Asp Ala Val Lys Val Met Asp Leu Pro Thr Gln
 130 135 140

Glu Pro Ala Leu Gly Thr Thr Cys Tyr Ala Ser Gly Trp Gly Ser Ile
 145 150 155 160

Glu Pro Glu Glu Phe Leu Thr Pro Lys Lys Leu Gln Cys Val Asp Leu
 165 170 175

His Val Ile Ser Asn Asp Val Cys Ala Gln Val His Pro Gln Lys Val
 180 185 190

Thr Lys Phe Met Leu Cys Ala Gly Arg Trp Thr Gly Gly Lys Ser Thr
 195 200 205

Cys Ser Trp Val Ile Leu Ile Thr Glu Leu Thr Met Pro Ala Leu Pro
 210 215 220

Met Val Leu His Gly Ser Leu Val Pro Trp Arg Gly Gly Val
 225 230 235

5

<210> 26
 <211> 1906
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 26

ES 2 741 730 T3

agccccaagc ttaccacctg caccocggaga gctgtgtcac catgtgggtc ccggttgtct 60
 tcctcaccct gtccgtgacg tggattggtg ctgcaccocct catcctgtct cggattgtgg 120
 gaggtcggga gtgcgagaag cattcccaac cctggcaggt gcttgtggcc tctcgtggca 180
 gggcagtctg cggcgggtgt ctggtgcacc ccagtggtt cctcacagct gcccaactgca 240
 tcaggaacaa aagcgtgatc ttgctgggtc ggcacagcct gtttcatcct gaagacacag 300
 gccaggtatt tcaggtcagc cacagcttcc cacaccocgt ctacgatatg agcctcctga 360
 agaatcgatt cctcaggcca ggtgatgact ccagccacga cctcatgctg ctccgcctgt 420
 cagagcctgc cgagctcacg gatgctgtga aggtcatgga cctgccacc caggagccag 480
 cactggggac cacctgctac gcctcaggct ggggcagcat tgaaccagag gatttcttga 540
 ccccaaagaa acttcagtgt gtggacctcc atgttatttc caatgacgtg tgtgccaag 600
 ttcaccctca gaaggtgacc aagttcatgc tgtgtgtgg acgctggaca gggggcaaaa 660
 gcacctgctc gtgggtcatt ctgatcaccg aactgaccat gccagccctg ccgatggtcc 720
 tccatggctc cctagtgcc tggagaggag gtgtctagtc agagagtagt cctggaagg 780
 ggcctctgtg aggagccacg gggacagcat cctgcagatg gtccctggccc ttgtcccacc 840
 gacctgtcta caaggactgt cctcgtggac cctcccctct gcacaggagc tggacctga 900
 agtcccttcc ccaccggcca ggactggagc ccctaccocct ctgttggaa cctgcccac 960
 cttctctctg aagtcggctc tggagacatt tctctcttct tccaaagctg ggaactgcta 1020
 tctgttatct gcctgtccag gtctgaaaga taggattgcc caggcagaaa ctgggactga 1080
 cctatctcac tctctccctg cttttaccct taggggtgatt ctgggggccc acttgtctgt 1140
 aatggtgtgc ttcaaggtat cacgtcatgg ggcagtgaa catgtgccct gcccgaaagg 1200
 ccttccctgt acaccaaggt ggtgcattac cggagtgga tcaaggacac catcgtggcc 1260
 aaccocctgag caccocctatc aaccocctat tgtagtaaac ttggaacctt ggaatgacc 1320
 aggccaagac tcaagcctcc ccagttctac tgaccttctg ccttaggtgt gaggtccagg 1380
 gttgctagga aaagaaatca gcagacacag gtgtagacca gagtgttct taaatggtgt 1440
 aattttgtcc tctctgtgtc ctggggaata ctggccatgc ctggagacat atcactcaat 1500
 ttctctgagg acacagatag gatggggtgt ctgtgttatt tgtgggttac agagatgaaa 1560
 gaggggtggg atccacactg agagagtgga gagtgacatg tgctggacac tgtccatgaa 1620
 gcactgagca gaagctggag gcacaacgca ccagacactc acagcaagga tggagctgaa 1680
 aacataaacc actctgtcct ggaggcactg ggaagcctag agaaggctgt gagccaagga 1740
 gggaggtctc tcctttggca tgggatgggg atgaagtaag gagagggact ggaccocctg 1800
 gaagctgatt cactatgggg ggaggtgtat tgaagtcctc cagacaaccc tcagatttga 1860
 tgatttctca gtagaactca cagaaataaa gagctgttat actgtg 1906

<210> 27
 <211> 69
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 27

5

ES 2 741 730 T3

Met Trp Val Pro Val Val Phe Leu Thr Leu Ser Val Thr Trp Ile Gly
 1 5 10 15

Ala Ala Pro Leu Ile Leu Ser Arg Ile Val Gly Gly Trp Glu Cys Glu
 20 25 30

Lys His Ser Gln Pro Trp Gln Val Leu Val Ala Ser Arg Gly Arg Ala
 35 40 45

Val Cys Gly Gly Val Leu Val His Pro Gln Trp Val Leu Thr Ala Ala
 50 55 60

His Cys Ile Arg Lys
 65

5
 <210> 28
 <211> 554
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

10
 <400> 28
 agccccaagc ttaccacctg caccgggaga gctgtgtcac catgtgggtc ccggttgtct 60
 tcctcaccct tccgtgacgt ggattggtgc tgcaccctc atcctgtctc ggattgtggg 120
 aggctgggag tgcgagaagc attccaacc ctggcagggtg cttgtggcct ctcgtggcag 180
 ggcagtctgc ggcggtgttc tgggtcaccc ccagtgggtc ctcacagctg cccactgcat 240
 caggaagtga gtaggggcct ggggtctggg gagcagggtg ctgtgtccca gaggaataac 300
 agctgggcat tttccccagg ataacctcta aggccagcct tgggactggg ggagagaggg 360
 aaagttctgg ttcaggtcac atggggaggc aggggtgggg ctggaccacc ctccccatgg 420
 ctgcctgggt ctccatctgt gttcctctat gtctctttgt gtcgctttca ttatgtctct 480
 tggtaactgg cttcggttgt gtctctccgt gtgactatth tgttctctct ctccctctct 540
 tctctgtctt cagt 554

15
 <210> 29
 <211> 220
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 29

ES 2 741 730 T3

Met Trp Val Pro Val Val Phe Leu Thr Leu Ser Val Thr Trp Ile Gly
1 5 10 15

Ala Ala Pro Leu Ile Leu Ser Arg Ile Val Gly Gly Trp Glu Cys Glu
20 25 30

Lys His Ser Gln Pro Trp Gln Val Leu Val Ala Ser Arg Gly Arg Ala
35 40 45

Val Cys Gly Gly Val Leu Val His Pro Gln Trp Val Leu Thr Ala Ala
50 55 60

His Cys Ile Arg Asn Lys Ser Val Ile Leu Leu Gly Arg His Ser Leu
65 70 75 80

Phe His Pro Glu Asp Thr Gly Gln Val Phe Gln Val Ser His Ser Phe
85 90 95

Pro His Pro Leu Tyr Asp Met Ser Leu Leu Lys Asn Arg Phe Leu Arg
100 105 110

Pro Gly Asp Asp Ser Ser Ile Glu Pro Glu Glu Phe Leu Thr Pro Lys
115 120 125

Lys Leu Gln Cys Val Asp Leu His Val Ile Ser Asn Asp Val Cys Ala
130 135 140

Gln Val His Pro Gln Lys Val Thr Lys Phe Met Leu Cys Ala Gly Arg
145 150 155 160

Trp Thr Gly Gly Lys Ser Thr Cys Ser Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu
165 170 175

Val Cys Asn Gly Val Leu Gln Gly Ile Thr Ser Trp Gly Ser Glu Pro
180 185 190

Cys Ala Leu Pro Glu Arg Pro Ser Leu Tyr Thr Lys Val Val His Tyr
195 200 205

Arg Lys Trp Ile Lys Asp Thr Ile Val Ala Asn Pro
210 215 220

<210> 30
<211> 1341
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 30

agccccaagc ttaccacctg caccggaga gctgtgtcac catgtgggtc cggttgtct

60

5

10

ES 2 741 730 T3

tcctcaccct gtcctgacg tggattggtg ctgcaccct catcctgtct cggattgtgg 120
gaggctggga gtgcgagaag cattcccaac cctggcaggt gcttgtggcc tctcgtggca 180
gggcagtctg cggcgggtgtt ctgggtgcacc cccagtgggt cctcacagct gccactgca 240
tcaggaacaa aagcgtgatc ttgctgggtc ggcacagcct gtttcatcct gaagacacag 300
gccaggtatt tcaggtcagc cacagcttcc cacaccgct ctacgatatg agcctcctga 360
agaatcgatt cctcaggcca ggtgatgact ccagcattga accagaggag ttcttgacc 420
caaagaaact tcagtgtgtg gacctccatg ttatttcaa tgacgtgtgt ggcgaagttc 480
accctcagaa ggtgaccaag ttcatgctgt gtgctggagc ctggacaggg ggcaaaagca 540
cctgctcggg tgattctggg ggcccacttg tctgtaatgg tgtgcttcaa ggtatcacgt 600
catggggcag tgaacatgt gccctgccc aaaggccttc cctgtacacc aaggtggtgc 660
attaccgga gtggatcaag gacaccatcg tggccaacc ctgagcacc ctatcaacc 720
cctattgtag taaacttga accttgaaa tgaccaggcc aagactcaag cctccccagt 780
tctactgacc tttgtcctta ggtgtgaggt ccagggttgc taggaaaaga aatcagcaga 840
cacaggtgta gaccagagt tttcttaaat ggtgtaattt tgtcctctct gtgtcctggg 900
gaatactggc catgcctgga gacatatcac tcaatttctc tgaggacaca gataggatgg 960
ggtgtctgtg ttatttggg ggtacagaga tgaaagaggg gtgggatcca cactgagaga 1020
gtggagagtg acatgtgctg gacactgtcc atgaagcact gagcagaagc tggaggcaca 1080
acgcaccaga cactcacagc aaggatggag ctgaaaacat aaccactct gtcctggagg 1140
cactgggaag cctagagaag gctgtgagcc aaggagggag ggtcttcctt tggcatggga 1200
tggggatgaa gtaaggagag ggactggacc ccctggaagc tgattcacta tggggggagg 1260
tgtattgaag tcctccagac aaccctcaga tttgatgatt tcctagtaga actcacagaa 1320
ataaagagct gttatactgt g 1341

<210> 31
<211> 218
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 31

Met Trp Val Pro Val Val Phe Leu Thr Leu Ser Val Thr Trp Ile Gly
1 5 10 15
Ala Ala Pro Leu Ile Leu Ser Arg Ile Val Gly Gly Trp Glu Cys Glu
20 25 30
Lys His Ser Gln Pro Trp Gln Val Leu Val Ala Ser Arg Gly Arg Ala
35 40 45

ES 2 741 730 T3

Val Cys Gly Gly Val Leu Val His Pro Gln Trp Val Leu Thr Ala Ala
 50 55 60

His Cys Ile Arg Lys Pro Gly Asp Asp Ser Ser His Asp Leu Met Leu
 65 70 75 80

Leu Arg Leu Ser Glu Pro Ala Glu Leu Thr Asp Ala Val Lys Val Met
 85 90 95

Asp Leu Pro Thr Gln Glu Pro Ala Leu Gly Thr Thr Cys Tyr Ala Ser
 100 105 110

Gly Trp Gly Ser Ile Glu Pro Glu Glu Phe Leu Thr Pro Lys Lys Leu
 115 120 125

Gln Cys Val Asp Leu His Val Ile Ser Asn Asp Val Cys Ala Gln Val
 130 135 140

His Pro Gln Lys Val Thr Lys Phe Met Leu Cys Ala Gly Arg Trp Thr
 145 150 155 160

Gly Gly Lys Ser Thr Cys Ser Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Val Cys
 165 170 175

Asn Gly Val Leu Gln Gly Ile Thr Ser Trp Gly Ser Glu Pro Cys Ala
 180 185 190

Leu Pro Glu Arg Pro Ser Leu Tyr Thr Lys Val Val His Tyr Arg Lys
 195 200 205

Trp Ile Lys Asp Thr Ile Val Ala Asn Pro
 210 215

<210> 32
 <211> 1325
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

5

<400> 32

10

agccccaagc ttaccacctg caccggaga gctgtgtcac catgtgggtc cggttgtct 60

tcctcaccct gtccgtgacg tggattggtg ctgcaccct catcctgtct cggattgtgg 120

gaggctggga gtgcgagaag cattcccaac cctggcaggt gcttgtggcc tctcgtggca 180

gggcagtctg cggcgggtgt ctggtgcacc cccagtgggt cctcacagct gccactgca 240

tcaggaagcc agtgatgac tccagccacg acctcatgct gctccgctg tcagagcctg 300

ccgagctcac ggatgctgtg aaggatcatgg acctgccac ccaggagcca gcaactgggga 360

ES 2 741 730 T3

ccacctgcta cgcctcaggc tggggcagca ttgaaccaga ggagttcttg accccaaaga 420
aacttcagtg tgtggacctc catgttattt ccaatgacgt gtgtgcgcaa gttcacctc 480
agaaggtgac caagtcatg ctgtgtgctg gacgctggac agggggcaaa agcacctgct 540
cgggtgattc tgggggccca cttgtctgta atggtgtgct tcaaggtatc acgtcatggg 600
gcagtgaacc atgtgccctg cccgaaaggc cttccctgta caccaagggtg gtgcattacc 660
caaggacacc atcgtggcca acccctgagc acccctatca accccctatt gtagtaaaact 720
tggaaccttg gaaatgacca ggccaagact caagcctccc cagttctact gacctttgtc 780
cttaggtgag aggtccaggg ttgctaggaa aagaaatcag cagacacagg tgtagaccag 840
agtgtttctt aaatggtgta attttgcct ctctgtgtcc tggggaatac tggccatgcc 900
tggagacata tcaactcaatt tctctgagga cacagatagg atggggtgtc tgtgttattt 960
gtgggttaca gagatgaaag aggggtgga tccacactga gagagtggag agtgacatgt 1020
gctggacact gtccatgaag cactgagcag aagctggagg cacaacgcac cagacactca 1080
cagcaaggat ggagctgaaa acataaccga ctctgtcctg gaggcactgg gaagcctaga 1140
gaaggctgtg agccaaggag ggagggctct cctttggcat gggatgggga tgaagtaagg 1200
agagggactg gaccccctgg aagctgattc actatggggg gaggtgtatt gaagtcctcc 1260
agacaaccct cagatttgat gatttcctag tagaactcac agaaataaag agctgttata 1320
ctgtg 1325

5

<210> 33
<211> 261
<212> PRT
<213> Homo sapiens

10

<400> 33

Met Trp Val Pro Val Val Phe Leu Thr Leu Ser Val Thr Trp Ile Gly
1 5 10 15
Ala Ala Pro Leu Ile Leu Ser Arg Ile Val Gly Gly Trp Glu Cys Glu
20 25 30
Lys His Ser Gln Pro Trp Gln Val Leu Val Ala Ser Arg Gly Arg Ala
35 40 45
Val Cys Gly Gly Val Leu Val His Pro Gln Trp Val Leu Thr Ala Ala
50 55 60
His Cys Ile Arg Asn Lys Ser Val Ile Leu Leu Gly Arg His Ser Leu
65 70 75 80

ES 2 741 730 T3

Phe His Pro Glu Asp Thr Gly Gln Val Phe Gln Val Ser His Ser Phe
85 90 95

Pro His Pro Leu Tyr Asp Met Ser Leu Leu Lys Asn Arg Phe Leu Arg
100 105 110

Pro Gly Asp Asp Ser Ser His Asp Leu Met Leu Leu Arg Leu Ser Glu
115 120 125

Pro Ala Glu Leu Thr Asp Ala Val Lys Val Met Asp Leu Pro Thr Gln
130 135 140

Glu Pro Ala Leu Gly Thr Thr Cys Tyr Ala Ser Gly Trp Gly Ser Ile
145 150 155 160

Glu Pro Glu Glu Phe Leu Thr Pro Lys Lys Leu Gln Cys Val Asp Leu
165 170 175

His Val Ile Ser Asn Asp Val Cys Ala Gln Val His Pro Gln Lys Val
180 185 190

Thr Lys Phe Met Leu Cys Ala Gly Arg Trp Thr Gly Gly Lys Ser Thr
195 200 205

Cys Ser Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Val Cys Asn Gly Val Leu Gln
210 215 220

Gly Ile Thr Ser Trp Gly Ser Glu Pro Cys Ala Leu Pro Glu Arg Pro
225 230 235 240

Ser Leu Tyr Thr Lys Val Val His Tyr Arg Lys Trp Ile Lys Asp Thr
245 250 255

Ile Val Ala Asn Pro
260

<210> 34
<211> 1464
<212> ADN
<213> Homo sapiens

5

<400> 34

10

agccccaagc ttaccacctg caccggaga gctgtgtcac catgtgggtc cggttgtct 60
tcctcaccct gtccgtgacg tggattggtg ctgcaccctt catcctgtct cggattgtgg 120
gaggctggga gtgcgagaag cattccaac cctggcaggt gcttgtggcc tctcgtggca 180
gggcagtctg cggcgggtgt ctggtgcacc cccagtgggt cctcacagct gccactgca 240
tcaggaacaa aagcgtgatc ttgctgggtc ggcacagcct gtttcatcct gaagacacag 300

ES 2 741 730 T3

gccaggtatt tcaggtcagc cacagcttcc cacacccgct ctacgatatg agcctcctga 360
 agaatcgatt cctcaggcca ggtgatgact ccagccacga cctcatgctg ctccgcctgt 420
 cagagcctgc cgagctcacg gatgctgtga aggtcatgga cctgccacc caggagccag 480
 cactggggac cacctgctac gcctcaggct ggggacagcat tgaaccagag gagttcctga 540
 ccccaaagaa acttcagtgt gtggacctcc atgttatttc caatgacgtg tgtgcgcaag 600
 ttcacctca gaagtgacc aagttcatgc tgtgtgctgg acgctggaca gggggcaaaa 660
 gcacctgctc gggtgattct gggggccac ttgtctgtaa tgggtgtgctt caaggtatca 720
 cgtcatgggg cagtgaacca tgtgccctgc ccgaaaggcc ttccctgtac accaagtggt 780
 tgcattaccg gaagtggatc aaggacacca tcgtggccaa ccctgagca cccctatcaa 840
 ccccctattg tagtaactt ggaaccttgg aaatgaccag gccaaagactc aagcctcccc 900
 agttctactg acctttgtcc ttaggtgtga ggtccagggt tgctaggaaa agaaatcagc 960
 agacacaggt gtagaccaga gtgtttctta aatggtgtaa ttttgcctc tctgtgtcct 1020
 ggggaatact ggcatgcct ggagacatat cactcaattt ctctgaggac acagatagga 1080
 tgggggtgtct gtgttatttg tggggtacag agatgaaaga ggggtgggat ccacactgag 1140
 agagtggaga gtgacatgtg ctggacactg tccatgaagc actgagcaga agctggaggc 1200
 acaacgcacc agacactcac agcaaggatg gagctgaaaa cataaccac tctgtcctgg 1260
 aggcactggg aagcctagag aaggctgtga gccaaaggag gagggctctc ctttgcatg 1320
 ggatggggat gaagtaagga gagggactgg accccctgga agctgattca ctatgggggg 1380
 aggtgtattg aagtcctcca gacaaccctc agattttagt atttctagat agaactcaca 1440
 gaaataaaga gctgttatac tgtg 1464

5

<210> 35
 <211> 261
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10

<400> 35

Met Trp Val Pro Val Val Phe Leu Thr Leu Ser Val Thr Trp Ile Gly
 1 5 10 15
 Ala Ala Pro Leu Ile Leu Ser Arg Ile Val Gly Gly Trp Glu Cys Glu
 20 25 30
 Lys His Ser Gln Pro Trp Gln Val Leu Val Ala Ser Arg Gly Arg Ala
 35 40 45
 Val Cys Gly Gly Val Leu Val His Pro Gln Trp Val Leu Thr Ala Ala
 50 55 60

ES 2 741 730 T3

His Cys Ile Arg Asn Lys Ser Val Ile Leu Leu Gly Arg His Ser Leu
65 70 75 80

Phe His Pro Glu Asp Thr Gly Gln Val Phe Gln Val Ser His Ser Phe
85 90 95

Pro His Pro Leu Tyr Asp Met Ser Leu Leu Lys Asn Arg Phe Leu Arg
100 105 110

Pro Gly Asp Asp Ser Ser His Asp Leu Met Leu Leu Arg Leu Ser Glu
115 120 125

Pro Ala Glu Leu Thr Asp Ala Val Lys Val Met Asp Leu Pro Thr Gln
130 135 140

Glu Pro Ala Leu Gly Thr Thr Cys Tyr Ala Ser Gly Trp Gly Ser Ile
145 150 155 160

Glu Pro Glu Glu Phe Leu Thr Pro Lys Lys Leu Gln Cys Val Asp Leu
165 170 175

His Val Ile Ser Asn Asp Val Cys Ala Gln Val His Pro Gln Lys Val
180 185 190

Thr Lys Phe Met Leu Cys Ala Gly Arg Trp Thr Gly Gly Lys Ser Thr
195 200 205

Cys Ser Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Val Cys Asn Gly Val Leu Gln
210 215 220

Gly Ile Thr Ser Trp Gly Ser Glu Pro Cys Ala Leu Pro Glu Arg Pro
225 230 235 240

Ser Leu Tyr Thr Lys Val Val His Tyr Arg Lys Trp Ile Lys Asp Thr
245 250 255

Ile Val Ala Asn Pro
260

5 <210> 36
<211> 1495
<212> ADN
<213> Homo sapiens

10 <400> 36
gggggagccc caagcttacc acctgcaccc ggagagctgt gtcaccatgt gggccccggt 60
tgtcttcctc accctgtccg tgacgtggat tgggtgtgca cccctcatcc tgtctcggat 120

ES 2 741 730 T3

tgtgggaggc tgggagtgcg agaagcattc ccaaccctgg caggtgcttg tggcctctcg 180
 tggcagggca gtctgcggcg gtgttctggt gcacccccag tgggtcctca cagctgcca 240
 ctgcatcagg aacaaaagcg tgatcttgct gggtcggcac agcctgtttc atcctgaaga 300
 cacaggccag gtatctcagg tcagccacag cttcccacac ccgctctacg atatgagcct 360
 cctgaagaat cgattcctca ggccaggtga tgactccagc cacgacctca tgctgctccg 420
 cctgtcagag cctgccgagc tcacggatgc tgtgaaggtc atggacctgc ccaccagga 480
 gccagcactg gggaccacct gctacgcctc aggctggggc agcattgaac cagaggagtt 540
 cttgacccca aagaaacttc agtgtgtgga cctccatggt atttccaatg acgtgtgtgc 600
 gcaagttcac cctcagaagg tgaccaagtt catgctgtgt gctggacgct ggacaggggg 660
 caaaagcacc tgctcgggtg attctggggg cccacttgtc tgtaatggtg tgcttcaagg 720
 tatcacgtca tggggcagtg aaccatgtgc cctgcccgaaggccttccc tgtacaccaa 780
 ggtggtgcat taccggaagt ggatcaagga caccatcgtg gccaacccct gagcaccct 840
 atcaactccc tattgtagta aacttggaac cttggaatg accaggccaa gactcaggcc 900
 tccccagttc tactgacctt tgtccttagg tgtgaggtcc agggttgcta ggaaaagaaa 960
 tcagcagaca caggtgtaga ccagagtgtt tcttaaatgg tgtaattttg tcctctctgt 1020
 gtcctgggga atactggcca tgccctggaga catatcactc aatttctctg aggacacaga 1080
 taggatgggg tgtctgtggt atttgtgggg tacagagatg aaagaggggt gggatccaca 1140
 ctgagagagt ggagagtgc atgtgctgga cactgtccat gaagcactga gcagaagctg 1200
 gaggcacaac gcaccagaca ctcacagcaa ggatggagct gaaaacataa cccactctgt 1260
 cctggaggca ctgggaagcc tagagaagcc tgtgagccaa ggagggaggg tcttcctttg 1320
 gcatgggatg gggatgaagt agggagaggg actggacccc ctggaagctg attcactatg 1380
 gggggaggtg tattgaagtc ctccagacaa ccctcagatt tgatgatttc ctagtagaac 1440
 tcacagaaat aaagagctgt tatactgcga aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaa 1495

5 <210> 37
 <211> 218
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10 <400> 37

Met Trp Val Pro Val Val Phe Leu Thr Leu Ser Val Thr Trp Ile Gly
 1 5 10 15

Ala Ala Pro Leu Ile Leu Ser Arg Ile Val Gly Gly Trp Glu Cys Glu
 20 25 30

ES 2 741 730 T3

Lys His Ser Gln Pro Trp Gln Val Leu Val Ala Ser Arg Gly Arg Ala
 35 40 45

Val Cys Gly Gly Val Leu Val His Pro Gln Trp Val Leu Thr Ala Ala
 50 55 60

His Cys Ile Arg Asn Lys Ser Val Ile Leu Leu Gly Arg His Ser Leu
 65 70 75 80

Phe His Pro Glu Asp Thr Gly Gln Val Phe Gln Val Ser His Ser Phe
 85 90 95

Pro His Pro Leu Tyr Asp Met Ser Leu Leu Lys Asn Arg Phe Leu Arg
 100 105 110

Pro Gly Asp Asp Ser Ser Ile Glu Pro Glu Glu Phe Leu Thr Pro Lys
 115 120 125

Lys Leu Gln Cys Val Asp Leu His Val Ile Ser Asn Asp Val Cys Ala
 130 135 140

Gln Val His Pro Gln Lys Val Thr Lys Phe Met Leu Cys Ala Gly Arg
 145 150 155 160

Trp Thr Gly Gly Lys Ser Thr Cys Ser Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu
 165 170 175

Val Cys Asn Gly Val Leu Gln Gly Ile Thr Ser Trp Gly Ser Glu Pro
 180 185 190

Cys Ala Leu Pro Glu Arg Pro Ser Leu Tyr Thr Lys Val Val His Tyr
 195 200 205

Arg Lys Trp Ile Lys Asp Thr Ile Val Ala
 210 215

<210> 38
 <211> 227
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 38

Met Trp Val Pro Val Val Phe Leu Thr Leu Ser Val Thr Trp Ile Gly
 1 5 10 15

Ala Ala Pro Leu Ile Leu Ser Arg Ile Val Gly Gly Trp Glu Cys Glu
 20 25 30

5

10

ES 2 741 730 T3

Lys His Ser Gln Pro Trp Gln Val Leu Val Ala Ser Arg Gly Arg Ala
 35 40 45

Val Cys Gly Gly Val Leu Val His Pro Gln Trp Val Leu Thr Ala Ala
 50 55 60

His Cys Ile Arg Asn Lys Ser Val Ile Leu Leu Gly Arg His Ser Leu
 65 70 75 80

Phe His Pro Glu Asp Thr Gly Gln Val Phe Gln Val Ser His Ser Phe
 85 90 95

Pro His Pro Leu Tyr Asp Met Ser Leu Leu Lys Asn Arg Phe Leu Arg
 100 105 110

Pro Gly Asp Asp Ser Ser His Asp Leu Met Leu Leu Arg Leu Ser Glu
 115 120 125

Pro Ala Glu Leu Thr Asp Ala Val Lys Val Met Asp Leu Pro Thr Gln
 130 135 140

Glu Pro Ala Leu Gly Thr Thr Cys Tyr Ala Ser Gly Trp Gly Ser Ile
 145 150 155 160

Glu Pro Glu Glu Phe Leu Thr Pro Lys Lys Leu Gln Cys Val Asp Leu
 165 170 175

His Val Ile Ser Asn Asp Val Cys Ala Gln Val His Pro Gln Lys Val
 180 185 190

Thr Lys Phe Met Leu Cys Ala Gly Arg Trp Thr Gly Gly Lys Ser Thr
 195 200 205

Cys Ser Val Ser His Pro Tyr Ser Gln Asp Leu Glu Gly Lys Gly Glu
 210 215 220

Trp Gly Pro
 225

5
 <210> 39
 <211> 104
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10
 <400> 39

Met Trp Val Pro Val Val Phe Leu Thr Leu Ser Val Thr Trp Ile Gly
 1 5 10 15

ES 2 741 730 T3

Glu Arg Gly His Gly Trp Gly Asp Ala Gly Glu Gly Ala Ser Pro Asp
 20 25 30

Cys Gln Ala Glu Ala Leu Ser Pro Pro Thr Gln His Pro Ser Pro Asp
 35 40 45

Arg Glu Leu Gly Ser Phe Leu Ser Leu Pro Ala Pro Leu Gln Ala His
 50 55 60

Thr Pro Ser Pro Ser Ile Leu Gln Gln Ser Ser Leu Pro His Gln Val
 65 70 75 80

Pro Ala Pro Ser His Leu Pro Gln Asn Phe Leu Pro Ile Ala Gln Pro
 85 90 95

Ala Pro Cys Ser Gln Leu Leu Tyr
 100

5

<210> 40
 <211> 261
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10

<400> 40

Met Trp Val Pro Val Val Phe Leu Thr Leu Ser Val Thr Trp Ile Gly
 1 5 10 15

Ala Ala Pro Leu Ile Leu Ser Arg Ile Val Gly Gly Trp Glu Cys Glu
 20 25 30

Lys His Ser Gln Pro Trp Gln Val Leu Val Ala Ser Arg Gly Arg Ala
 35 40 45

Val Cys Gly Gly Val Leu Val His Pro Gln Trp Val Leu Thr Ala Ala
 50 55 60

His Cys Ile Arg Asn Lys Ser Val Ile Leu Leu Gly Arg His Ser Leu
 65 70 75 80

Phe His Pro Glu Asp Thr Gly Gln Val Phe Gln Val Ser His Ser Phe
 85 90 95

Pro His Pro Leu Tyr Asp Met Ser Leu Leu Lys Asn Arg Phe Leu Arg
 100 105 110

Pro Gly Asp Asp Ser Ser His Asp Leu Met Leu Leu Arg Leu Ser Glu
 115 120 125

ES 2 741 730 T3

Pro Ala Glu Leu Thr Asp Ala Val Lys Val Met Asp Leu Pro Thr Gln
 130 135 140

Glu Pro Ala Leu Gly Thr Thr Cys Tyr Ala Ser Gly Trp Gly Ser Ile
 145 150 155 160

Glu Pro Glu Glu Phe Leu Thr Pro Lys Lys Leu Gln Cys Val Asp Leu
 165 170 175

His Val Ile Ser Asn Asp Val Cys Ala Gln Val His Pro Gln Lys Val
 180 185 190

Thr Lys Phe Met Leu Cys Ala Gly Arg Trp Thr Gly Gly Lys Ser Thr
 195 200 205

Cys Ser Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Val Cys Asn Gly Val Leu Gln
 210 215 220

Gly Ile Thr Ser Trp Gly Ser Glu Pro Cys Ala Leu Pro Glu Arg Pro
 225 230 235 240

Ser Leu Tyr Thr Lys Val Val His Tyr Arg Lys Trp Ile Lys Asp Thr
 245 250 255

Ile Val Ala Asn Pro
 260

<210> 41
 <211> 1778
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 41

5

10

aagtttccct tctcccagtc caagacccca aatcaccaca aaggacccaa tccccagact 60

caagatatgg tctgggcgct gtcttggtgc tcctaccctg atccctgggt tcaactctgc 120

tcccagagca tgaagcctct ccaccagcac cagccaccaa cctgcaaacc tagggaagat 180

tgacagaatt cccagccttt cccagctccc cctgcccattg tcccaggact cccagccttg 240

gttctctgcc cccgtgtctt ttcaaaccce catcctaaat ccatctccta tccgagtccc 300

ccagttcctc ctgtcaacct tgattcccct gatctagcac ccctctgca ggtgctgcac 360

ccctcatcct gtctcggatt gtgggaggct gggagtgcga gaagcattcc caaccctggc 420

aggtgcttgt agcctctcgt ggcagggcag tctgcggcgg tgttctggtg cacccccagt 480

gggtcctcac agctaccac tgcatcagga acaaaagcgt gatcttgctg ggtcggcaca 540

gcctgtttca tcctgaagac acaggccagg tatttcaggt cagccacagc tccccacacc 600

cgctctacga tatgagcctc ctgaagaatc gattcctcag gccaggtgat gactccagcc 660

ES 2 741 730 T3

acgacctcat gctgctccgc ctgtcagagc ctgccgagct cacggatgct atgaaggtca 720
 tggacctgcc cccccaggag ccagcactgg ggaccacctg ctacgcctca ggctggggca 780
 gcattgaacc agaggagttc ttgaccccaa agaaacttca gtgtgtggac ctccatgtta 840
 tttccaatga cgtgtgtgcg caagttcacc ctcagaaggt gaccaagttc atgctgtgtg 900
 ctggacgctg gacagggggc aaaagcacct gctcgggtga ttctgggggc ccacttgtct 960
 gtaatggtgt gcttcaaggt atcacgtcat ggggcagtga accatgtgcc ctgcccgaaa 1020
 ggccttccct gtacaccaag gtggtgcatt accggaagtg gatcaaggac accatcgtgg 1080
 ccaaccctg agcacccta tcaactccct attgtagtaa acttgaacc ttggaaatga 1140
 ccaggccaag actcaggcct cccagttct actgacctt gtccttaggt gtgaggtcca 1200
 gggttgctag gaaaagaaat cagcagacac aggtgtagac cagagtgttt cttaaagtgt 1260
 gtaatttgt cctctctgtg tcttgggaa tactggccat gcctggagac atatcactca 1320
 atttctctga ggacacagat aggatgggt gtctgtgtta tttgtgggt acagagatga 1380
 aagaggggtg ggtccacac tgagagagtg gagagtgaca tgtgctggac actgtccatg 1440
 aagcactgag cagaagctgg aggcacaacg caccagacac tcacagcaag gatggagctg 1500
 aaaacataac ccactctgtc ctggaggcac tgggaagcct agagaaggct gtgaaccaag 1560
 gagggaggggt cttcctttgg catgggatgg ggatgaagta aggagagggga ctgacccct 1620
 ggaagctgat tcactatggg gggaggtgta ttgaagtcct ccagacaacc ctcagatttg 1680
 atgatttct agtagaactc acagaaataa agagctgtta tactgtgaaa tgatttctca 1740
 gtagaactca cagaaataaa gagctgttat actgtgaa 1778

5 <210> 42
 <211> 1134
 <212> ADN
 <213> Listeria monocytogenes

10 <400> 42
 atggtgacag gctggcatcg tccaacatgg attgaaatag accgcgagc aattcgcgaa 60
 aatataaaaa atgaacaaaa taaactcccg gaaagtgtcg acttatggc agtagtcaaa 120
 gctaatgcat atggtcacgg aattatcgaa gttgctagga cggcgaaaga agctggagca 180
 aaaggtttct gcgtagccat tttagatgag gcactggctc ttagagaagc tggatttcaa 240
 gatgacttta ttcttgtgct tggtgcaacc agaaaagaag atgctaactc ggcagccaaa 300
 aaccacattt cacttactgt ttttagagaa gattggctag agaactaac gctagaagca 360
 acacttcgaa ttcatttaaa agtagatagc ggtatggggc gtctcggtat tcgtacgact 420
 gaagaagcac ggcgaattga agcaaccagt actaatgatc accaattaca actggaaggt 480
 atttacagc attttgcaac agccgaccag ctagaaacta gttattttga acaacaatta 540

ES 2 741 730 T3

gctaagttcc aaacgatttt aacgagtta aaaaaacgac caacttatgt tcatacagcc 600
aattcagctg cttcattggt acagccacaa atcgggtttg atgcgattcg ctttggtatt 660
tcgatgtatg gattaactcc ctccacagaa atcaaaacta gcttgccggt tgagcttaa 720
cctgcacttg cactctatac cgagatggtt catgtgaaag aacttgcacc aggcgatagc 780
gntagctacg gagcaactta tacagcaaca gagcgagaat gggttgcgac attaccaatt 840
ggctatgagg atggattgat tcgtcattac agtggtttcc atgttttagt agacggtgaa 900
ccagctccaa tcattggtcg agtttgatg gatcaaacca tcataaaact accacgtgaa 960
tttcaaactg gttcaaaagt aacgataatt ggcaaagatc atggtaacac ggtaacagca 1020
gatgatgccg ctcaatattt agatacaatt aattatgagg taacttgttt gttaaatgag 1080
cgcataccta gaaaatacat ccattagcgc atacctagaa aatacatcca ttag 1134

<210> 43
<211> 368
<212> PRT
<213> Listeria monocytogenes

<400> 43

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

ES 2 741 730 T3

Arg Ile Glu Ala Thr Ser Thr Asn Asp His Gln Leu Gln Leu Glu Gly
 145 150 155 160

Ile Tyr Thr His Phe Ala Thr Ala Asp Gln Leu Glu Thr Ser Tyr Phe
 165 170 175

Glu Gln Gln Leu Ala Lys Phe Gln Thr Ile Leu Thr Ser Leu Lys Lys
 180 185 190

Arg Pro Thr Tyr Val His Thr Ala Asn Ser Ala Ala Ser Leu Leu Gln
 195 200 205

Pro Gln Ile Gly Phe Asp Ala Ile Arg Phe Gly Ile Ser Met Tyr Gly
 210 215 220

Leu Thr Pro Ser Thr Glu Ile Lys Thr Ser Leu Pro Phe Glu Leu Lys
 225 230 235 240

Pro Ala Leu Ala Leu Tyr Thr Glu Met Val His Val Lys Glu Leu Ala
 245 250 255

Pro Gly Asp Ser Val Ser Tyr Gly Ala Thr Tyr Thr Ala Thr Glu Arg
 260 265 270

Glu Trp Val Ala Thr Leu Pro Ile Gly Tyr Ala Asp Gly Leu Ile Arg
 275 280 285

His Tyr Ser Gly Phe His Val Leu Val Asp Gly Glu Pro Ala Pro Ile
 290 295 300

Ile Gly Arg Val Cys Met Asp Gln Thr Ile Ile Lys Leu Pro Arg Glu
 305 310 315 320

Phe Gln Thr Gly Ser Lys Val Thr Ile Ile Gly Lys Asp His Gly Asn
 325 330 335

Thr Val Thr Ala Asp Asp Ala Ala Gln Tyr Leu Asp Thr Ile Asn Tyr
 340 345 350

Glu Val Thr Cys Leu Leu Asn Glu Arg Ile Pro Arg Lys Tyr Ile His
 355 360 365

<210> 44
 <211> 870
 <212> ADN
 <213> Listeria monocytogenes

<400> 44

5

10

ES 2 741 730 T3

atgaaagtat tagtaaataa ccatttagtt gaaagagaag atgccacagt tgacattgaa 60
gaccgcggat atcagtttgg tgatggtgta tatgaagtag ttcgtctata taatggaaaa 120
ttctttactt ataatgaaca cattgatcgc ttatatgcta gtgcagcaaa aattgactta 180
gttattcctt attccaaaga agagctacgt gaattacttg aaaaattagt tgccgaaaat 240
aatatcaata caggaatgt ctatttacia gtgactcgtg gtgttcaaaa cccacgtaat 300
catgtaatcc ctgatgattt ccctctagaa ggcgttttaa cagcagcagc tcgtgaagta 360
cctagaaaag agcgtcaatt cgttgaaggt ggaacggcga ttacagaaga agatgtgctg 420
tggttacgct gtgatattaa gagcttaaac cttttaggaa atattctagc aaaaaataaa 480
gcacatcaac aaaatgcttt ggaagctatt ttacatcgcg gggaacaagt aacagaatgt 540
tctgcttcaa acgtttctat tattaagat ggtgtattat ggacgcatgc ggcagataac 600
ttaatcttaa atggtatcac tcgtcaagtt atcattgatg ttgcgaaaaa gaatggcatt 660
cctgttaaag aagcggattt cactttaaca gaccttcgtg aagcggatga agtggtcatt 720
tcaagtacia ctattgaaat tacacctatt acgcatattg acggagttca agtagctgac 780
ggaaaacgtg gaccaattac agcgcaactt catcaatatt ttgtagaaga aatcactcgt 840
gcatgtggcg aattagagtt tgcaaaataa 870

<210> 45
<211> 289
<212> PRT
<213> Listeria monocytogenes

<400> 45

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

ES 2 741 730 T3

Asn Pro Arg Asn His Val Ile Pro Asp Asp Phe Pro Leu Glu Gly Val
 100 105 110

Leu Thr Ala Ala Ala Arg Glu Val Pro Arg Asn Glu Arg Gln Phe Val
 115 120 125

Glu Gly Gly Thr Ala Ile Thr Glu Glu Asp Val Arg Trp Leu Arg Cys
 130 135 140

Asp Ile Lys Ser Leu Asn Leu Leu Gly Asn Ile Leu Ala Lys Asn Lys
 145 150 155 160

Ala His Gln Gln Asn Ala Leu Glu Ala Ile Leu His Arg Gly Glu Gln
 165 170 175

Val Thr Glu Cys Ser Ala Ser Asn Val Ser Ile Ile Lys Asp Gly Val
 180 185 190

Leu Trp Thr His Ala Ala Asp Asn Leu Ile Leu Asn Gly Ile Thr Arg
 195 200 205

Gln Val Ile Ile Asp Val Ala Lys Lys Asn Gly Ile Pro Val Lys Glu
 210 215 220

Ala Asp Phe Thr Leu Thr Asp Leu Arg Glu Ala Asp Glu Val Phe Ile
 225 230 235 240

Ser Ser Thr Thr Ile Glu Ile Thr Pro Ile Thr His Ile Asp Gly Val
 245 250 255

Gln Val Ala Asp Gly Lys Arg Gly Pro Ile Thr Ala Gln Leu His Gln
 260 265 270

Tyr Phe Val Glu Glu Ile Thr Arg Ala Cys Gly Glu Leu Glu Phe Ala
 275 280 285

Lys
 <210> 46
 <211> 6523
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> plásmido pAdv142

<400> 46

cggagtgtat actggcttac tatggtggca ctgatgaggg tgtcagtgaa gtgcttcacg

60

5

10

ES 2 741 730 T3

tggcaggaga aaaaaggctg caccggtgcg tcagcagaat atgtgatata ggatatattc 120
 cgcttcctcg ctactgact cgctacgctc ggtcgttcga ctgcggcgag cggaaatggc 180
 ttacgaacgg ggcggagatt tcctggaaga tgccagggaag atacttaaca gggaggtgag 240
 agggccgcgg caaagccggt tttccatagg ctccgcccc ctgacaagca tcacgaaatc 300
 tgacgctcaa atcagtggtg gcgaaacccg acaggactat aaagatacca ggcgtttccc 360
 cctggcggct ccctcgtgcg ctctcctggt cctgcctttc ggtttaccgg tgcattccg 420
 ctgttatggc cgcgtttgtc tcattccacg cctgacactc agttccgggt aggcagttcg 480
 ctccaagctg gactgtatgc acgaaccccc cgttcagtcg gaccgctgcg ccttatccgg 540
 taactatcgt cttgagcca acccgaaaag acatgcaaaa gcaccactgg cagcagccac 600
 tggaattga tttagaggag ttagtcttga agtcatgctc cggttaaggc taaactgaaa 660
 ggacaagttt tggtgactgc gctcctccaa gccagttacc tcggttcaaa gaggttgtag 720
 ctgagagaac cttcgaaaaa ccgccctgca aggcggtttt ttcgttttca gagcaagaga 780
 ttacgcgcag accaaaacga tctcaagaag atcatcttat taatcagata aaatatttct 840
 agccctcctt tgattagtat attcctatct taaagttact tttatgtgga ggcattaaca 900
 tttgttaatg acgtcaaaag gatagcaaga ctagaataaa gctataaagc aagcatataa 960
 tattgcggtt catctttaga agcgaatttc gccaatatta taattatcaa aagagagggg 1020
 tggcaaacgg tatttggcat tattaggtta aaaaatgtag aaggagagtg aaacccatga 1080
 aaaaaataat gctagttttt attacactta tattagttag tctaccaatt gcgcaacaaa 1140
 ctgaagcaaa ggatgcatct gcattcaata aagaaaatc aatttcatcc atggcaccac 1200
 cagcatctcc gcctgcaagt cctaagacgc caatcgaaaa gaaacacgcg gatgaaatcg 1260
 ataagtatat acaaggattg gattacaata aaaacaatgt attagtatac cacggagatg 1320
 cagtgacaaa tgtgccgcca agaaaaggtt acaaatgagc aatgaatat attggtgtgg 1380
 agaaaaagaa gaaatccatc aatcaaaata atgcagacat tcaagttgtg aatgcaattt 1440
 cgagcctaac ctatccaggt gctctcgtaa aagcgaatc ggaattagta gaaaatcaac 1500
 cagatgttct ccctgtaaaa cgtgattcat taacactcag cattgatttg ccaggatga 1560
 ctaatcaaga caataaaata gttgtaaaa atgccactaa atcaaacggt aacaacgcag 1620
 taaatacatt agtggaaga tggaatgaaa aatatgctca agcttatcca aatgtaagtg 1680
 caaaaattga ttatgatgac gaaatggctt acagtgaatc acaattaatt gcgaaatttg 1740
 gtacagcatt taaagctgta aataatagct tgaatgtaaa cttcggcgca atcagtgaag 1800
 ggaaaatgca agaagaagtc attagtttta aacaaattha ctataacgtg aatgttaatg 1860
 aacctacaag accttccaga tttttcggca aagctgttac taaagagcag ttgcaagcgc 1920
 ttggagtgaa tgcagaaaat cctcctgcat atatctcaag tgtggcgtat ggcgctcaag 1980

ES 2 741 730 T3

tttatattgaa attatcaact aattcccata gtactaaagt aaaagctgct tttgatgctg 2040
 ccgtaagcgg aaaatctgtc tcaggtgatg tagaactaac aaatatcatc aaaaattctt 2100
 ccttcaaagc cgtaatttac ggaggttccg caaaagatga agttcaaadc atcgacggca 2160
 acctcgagaga cttacgcgat attttgaaaa aaggcgctac ttttaatcga gaaacaccag 2220
 gagttcccat tgcttataca acaacttcc taaaagacaa tgaattagct gttattaaaa 2280
 acaactcaga atatattgaa acaacttcaa aagcttatac agatggaaaa attaacatcg 2340
 atcactctgg aggatacgtt gctcaattca acatttcttg ggatgaagta aattatgatc 2400
 tcgagattgt gggaggctgg gagtgcgaga agcattccca accctggcag gtgcttgtgg 2460
 cctctcgtgg cagggcagtc tgcggcggtg ttctggtgca ccccagtggt gtcctcacag 2520
 ctgccactg catcaggaac aaaagcgtga tcttgctggg tcggcacagc ctgtttcatc 2580
 ctgaagacac aggccaggtt tttcaggtca gccacagctt cccacacccg ctctacgata 2640
 tgagcctcct gaagaatcga ttcctcaggc caggtgatga ctccagccac gacctcatgc 2700
 tgctccgcct gtcagagcct gccgagctca cggatgctgt gaaggtcatg gacctgccca 2760
 cccaggagcc agcactgggg accacctgct acgcctcagg ctggggcagc attgaaccag 2820
 aggagtctt gaccccaaag aaacttcagt gtgtggacct ccatgttatt tccaatgacg 2880
 tgtgtgcgca agttcacctc cagaaggtga ccaagttcat gctgtgtgct ggacgctgga 2940
 cagggggcaa aagcacctgc tcgggtgatt ctgggggccc acttgtctgt tatggtgtgc 3000
 ttcaaggtat cacgtcatgg ggcagtgaac catgtgccct gcccgaaagg ccttccctgt 3060
 acaccaaggt ggtgcattac cggaagtgga tcaaggacac catcgtggcc aaccctaac 3120
 ccgggccact aactcaacgc tagtagtgga tttaatcca aatgagcaa cagaaccaga 3180
 accagaaaca gaacaagtaa cattggagtt agaaatggaa gaagaaaaaa gcaatgattt 3240
 cgtgtgaata atgcacgaaa tcattgctta tttttttaa aagcgatata ctagatataa 3300
 cgaaacaacg aactgaataa agaatacaaa aaaagagcca cgaccagtta aagcctgaga 3360
 aactttaact gcgagcctta attgattacc accaatcaat taaagaagtc gagaccctaa 3420
 atttggtaaa gtatttaatt actttattaa tcagatactt aaatatctgt aaaccatta 3480
 tatcgggttt ttgaggggat ttcaagtctt taagaagata ccaggcaatc aattaagaaa 3540
 aacttagttg attgcctttt ttgttggat tcaacttga tcgtagcttc taactaatta 3600
 attttcgtaa gaaaggagaa cagctgaatg aatatccctt ttgtttaga aactgtgctt 3660
 catgacggct tgtaaagta caaatttaaa aatagtaaaa ttcgctcaat cactaccaag 3720
 ccaggtaaaa gtaaaggggc tatttttgcg tatcgtcaa aaaaaagcat gattggcgga 3780
 cgtggcgttg ttctgacttc cgaagaagcg attcacgaaa atcaagatac atttacgcat 3840

ES 2 741 730 T3

tgacaccaa acgtttatcg ttatggtacg tatgcagacg aaaaccgttc atacactaaa	3900
ggacattctg aaaacaatth aagacaaatc aataccttct ttattgattt tgatattcac	3960
acggaaaaag aaactatthc agcaagcgat atthtaacaa cagctattga tttaggthtt	4020
atgcctacgt taattatcaa atctgataaa ggttatcaag catatthtgt tttagaaacg	4080
ccagtctatg tgacttcaaa atcagaatth aaatctgtca aagcagccaa aataatctcg	4140
caaaatatcc gagaatatth tggaaagtct ttgccagttg atctaactg caatcathtt	4200
gggattgctc gtataccaag aacggacaat gtagaattht ttgatcccaa ttaccgtht	4260
tctthcaaa aatggcaaga ttggtctthc aaacaaacag ataataaggg cthtactcgt	4320
tcaagtctaa cggthttaag cggtagcaga ggcacaaaaac aagtagatga accctgthtt	4380
aatctcttat tgcacgaaac gaaatthtca ggagaaaagg gthtagtagg gcgcaatagc	4440
gthtagthta ccctctctth agcctactth agttcaggct attcaatcga aacgtgcgaa	4500
tataatatgt ttgagthta taatcgatta gatcaaccct tagaagaaaa agaagtaatc	4560
aaaatthta gaagtccta ttcagaaaac tatcaagggg ctaataggga atacattacc	4620
atthtthtga aagctthggg atcaagtgat thaaaccagta aagatthatt tgcctgthca	4680
gggtgthta aattcaagaa aaaaagaagc gaacgtcaac gtgthcatht gtcagaatgg	4740
aaagaagatt taatggctta tattagcga aaaagcagtg tatacaagcc thatttagcg	4800
acgacaaaa aagagattag agaagtgcta ggcattctcg aacggacatt agataaattg	4860
ctgaaggtag tgaaggcga tcaggaatth thctthtaaga thaaaccagg aagaaatgg	4920
ggcattcaac ttgctagtg taaatcattg ttgctatcga tcatthaaat aaaaaagaa	4980
gaacgagaaa gctatataaa ggcgctgaca gctthctthta atthtagaacg tacatthatt	5040
caagaaactc taaacaaatth ggcagaacgc ccaaaacgg acccacaact cgatthgtht	5100
agctacgata caggctgaaa ataaaaccg cactatgcca thacattht atctatgata	5160
cgtgthttht thctthttht ggctagctta atthctthata thtacctgca ataaaggatt	5220
thctactthc atthatactc caththtcaa aaacatacgg ggaacacggg aactthattg	5280
acaggccacc tcatagthaa tggthtthcag cthtctgca atctcatcca tggaaatata	5340
thcatcccc tgcgthctta thaatgtgac ththtthgccc ggcggatatt cctgatccag	5400
ctccaccata aatthgtcca tgcacaaatth gccggcaatth thcaggcgtth thcctthc	5460
aaggatgthc gthcctthtca atthtthcggg ccagcctgth gcatagccta caggcacctg	5520
cccgatccat gthtctththt ccgctgthta ctgthctthc tagctgacgc thctgcttht	5580
thctgatcagth ttgacatgth acagthtthc atgthcgggta aatgthcggac gcagctgaaa	5640
cggatctthc thcgcacatgth cagcagcgg gccgaaggcca tacatgthcga tgcgcaatct	5700
gactgcatth aaaaagctth ththcagcgg gagthcagcgc gcgctgthctg cgcagthggac	5760

ES 2 741 730 T3

cattagattc tttaacggca ggggagcaat cagctcttta aagcgctcaa actgcattaa 5820
 gaaatagcct ctttcttttt catccgctgt cgcaaaatgg gtaaataccc ctttgcactt 5880
 taaacgaggg ttgcgggtcaa gaattgccat cacgttctga acttcttcct ctgtttttac 5940
 accaagtctg ttcaccccc tatcgacctt cagatgaaaa tgaagagAAC cttttttcgt 6000
 gtggcggggt gcctcctgaa gccattcaac agaataaact gttaagggtca cgtcatactc 6060
 agcagcgatt gccacatact cggggggaac cgcgccaagc accaatatag ggcgcttcaa 6120
 tccctttttg cgcagtgaaa tcgcttcac caaaatggcc acggccaagc atgaagcacc 6180
 tgcgtcaaga gcagcctttg ctgtttctgc atcaccatgc ccgtaggcgt ttgctttcac 6240
 aactgccatc aagtggacat gttcacccat atgttttttc atattgctga ctttttcctt 6300
 tatcgcgac aagtcaattt ccgcccacgt atctctgtaa aaaggttttg tgctcatgga 6360
 aaactcctct cttttttcag aaaatcccag tacgtaatta agtatttgag aattaatttt 6420
 atattgatta atactaagtt taccagttt tcacctaaaa aacaaatgat gagataatag 6480
 ctccaaaggc taaagaggac tataccaact atttgttaat taa 6523

5 <210> 47
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Cebador Adv271-actAF1

<400> 47
 cggaaatcgg atccgcgcca aatcattggt tgattg 36

15 <210> 48
 <211> 37
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> Cebador Adv272-actAR1

<400> 48
 gcgagtcgac gtcgggggta atcgtaatgc aattggc 37

25 <210> 49
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

30 <220>
 <223> Cebador Adv273-actAF2

35 <400> 49
 gcgagtcgac ccatagcagc ttaattcttg caatg 35

40 <210> 50
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Cebador Adv274-actAR2
 <400> 50

ES 2 741 730 T3

5 gatactgcag ggatccttc cttctcgga atcagtcac 39
 <210> 51
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> cebador 3 que se une externamente a la región actA

 10 <400> 51
 tgggatggcc aagaaattc 19

 <210> 52
 <211> 22
 15 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> cebador 4 que se une externamente a la región actA
 20
 <400> 52
 ctaccatgct tccggtgct tg 22

 <210> 53
 <211> 10
 25 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 <400> 53
 His Cys Ile Arg Asn Lys Ser Val Ile Leu
 30 1 5 10

 <210> 54
 <211> 9
 <212> **PRT**
 35 <213> Virus de papiloma humano tipo 16

 <400> **54**

 Arg Ala His Tyr Asn Ile Val Thr Phe
 40 1 5

 <210> 55
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 45
 <400> 55

 Met Trp Val Pro Val Val Phe Leu Thr Leu Ser Val Thr Trp Ile Gly
 1 5 10 15

 Ala Ala Pro Leu Ile Leu Ser Arg
 20
 50

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una cepa de *Listeria* recombinante que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido de fusión antigénico de listeriolisina O (LLO) - antígeno prostático (PSA), en la que dicha *Listeria* recombinante es un mutante *dal/dat* auxotrófico atenuado, que comprende un vector de expresión episomal que comprende una enzima metabólica que complementa la auxotrofia de dicho mutante auxotrófico y en la que dicha *Listeria* recombinante comprende además una delección del gen *ActA* endógeno.
2. La *Listeria* recombinante de la reivindicación 1, en donde dicha molécula de ácido nucleico se integra de forma operable en el genoma de *Listeria* en un marco de lectura abierto con un gen LLO endógeno.
- 10 3. La *Listeria* recombinante de la reivindicación 1, en donde dicha molécula de ácido nucleico está en un plásmido en dicha cepa de *Listeria* recombinante.
4. La cepa de *Listeria* recombinante de la reivindicación 3, en la que dicho polipéptido PSA-LLO fusionado comprende un fragmento de LLO N-terminal.
5. La *Listeria* recombinante de la reivindicación 3 o 4, en donde dicho plásmido se mantiene de manera estable en dicha cepa de vacuna de *Listeria* recombinante en ausencia de selección con antibióticos.
- 15 6. La *Listeria* recombinante de cualquiera de las reivindicaciones 3-5, en donde dicho plásmido no confiere resistencia a los antibióticos en dicha *Listeria* recombinante.
7. La cepa de *Listeria* recombinante de cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde dicha enzima metabólica es una enzima alanina racemasa o una enzima D-aminoácido transferasa.
- 20 8. La cepa de *Listeria* recombinante de cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en la que dicha cepa de *Listeria* es una cepa de *Listeria monocytogenes*.
9. Una composición inmunogénica que comprende la cepa de *Listeria* recombinante de cualquiera de las reivindicaciones 1-8, y un adyuvante.
10. Una composición inmunogénica según la reivindicación 9, en la que dicho adyuvante comprende QS21 o un oligonucleótido que contiene CpG.
- 25 11. Una cepa de *Listeria* recombinante según cualquiera de las reivindicaciones 1-10, para el uso como un medicamento.
12. Una cepa de *Listeria* recombinante según cualquiera de las reivindicaciones 1-10, para el uso en la inducción de una respuesta inmune al PSA en un sujeto.
- 30 13. Una cepa de *Listeria* recombinante según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, para el uso en un método para prevenir o retrasar la aparición de un cáncer en un sujeto.
14. Una cepa de *Listeria* recombinante según cualquiera de las reivindicaciones 1-10, para el uso en el tratamiento, la supresión o la inhibición de un cáncer o un tumor en un sujeto.
15. La cepa de *Listeria* recombinante según la reivindicación 13 o 14 para el uso de acuerdo con la reivindicación 13 o 14, en donde dicho cáncer o tumor es un cáncer o tumor de próstata.

35

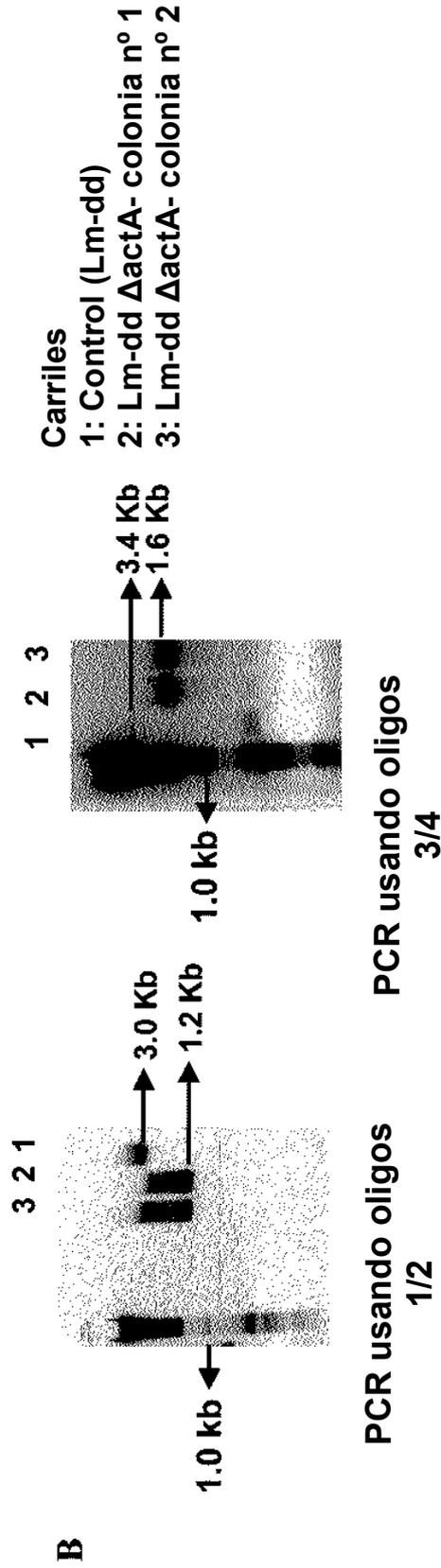
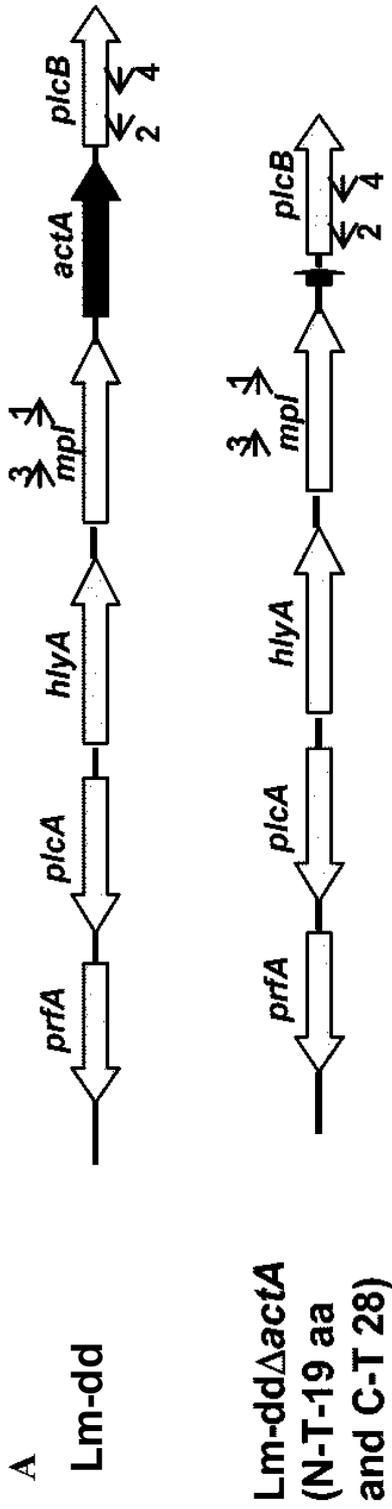
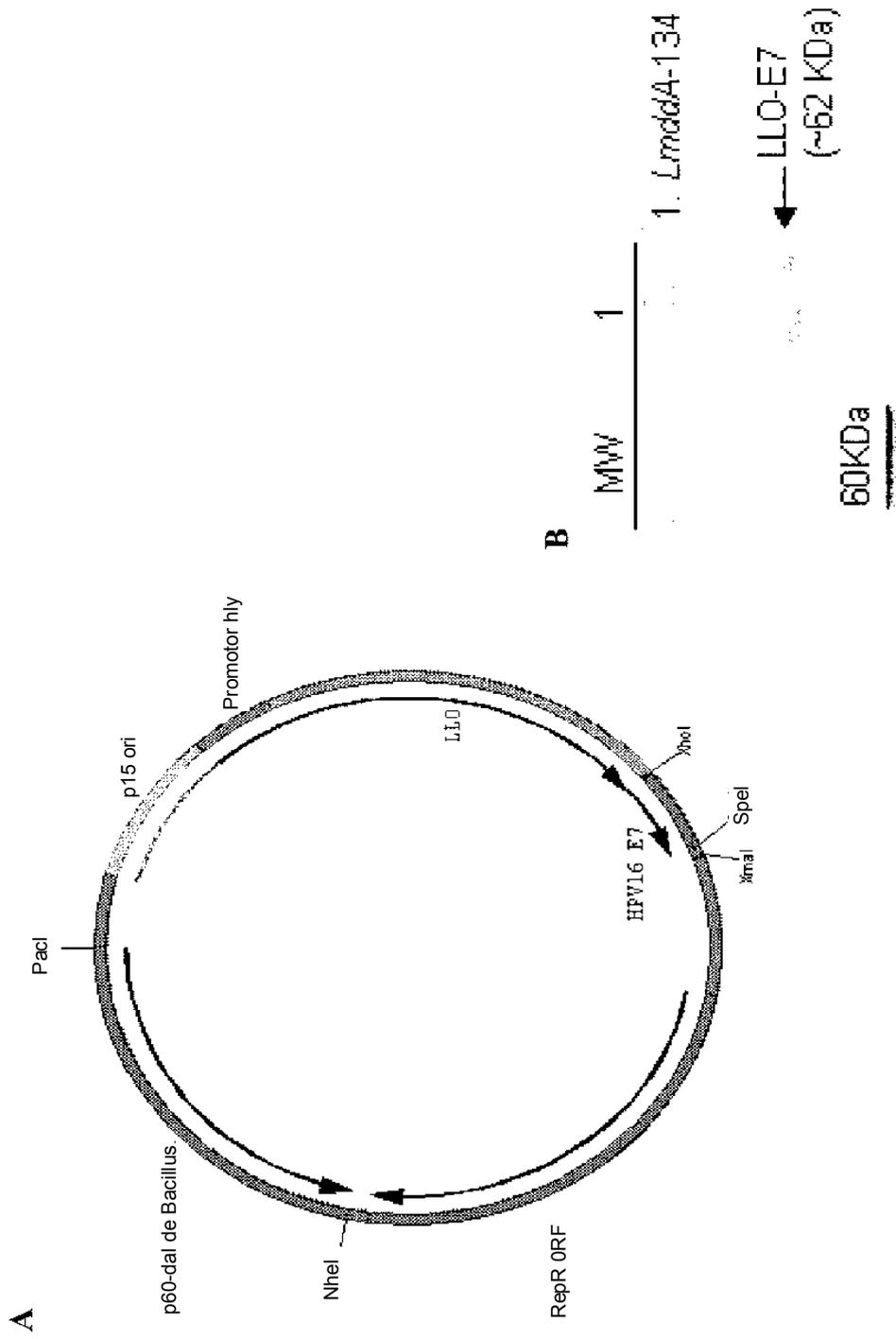


FIGURA 1



HPV16 E7 mAb

FIGURA 2

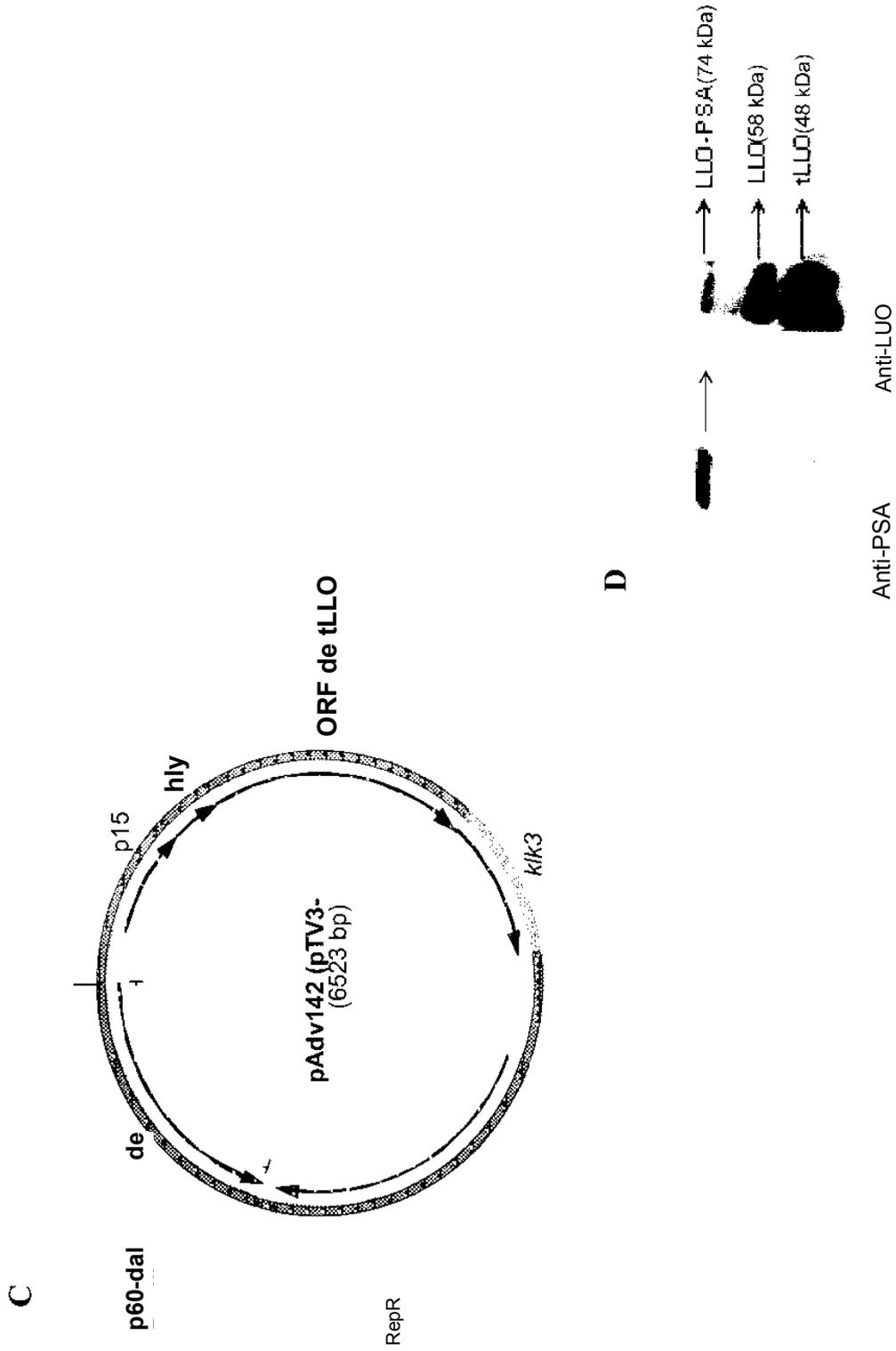


FIGURA 2

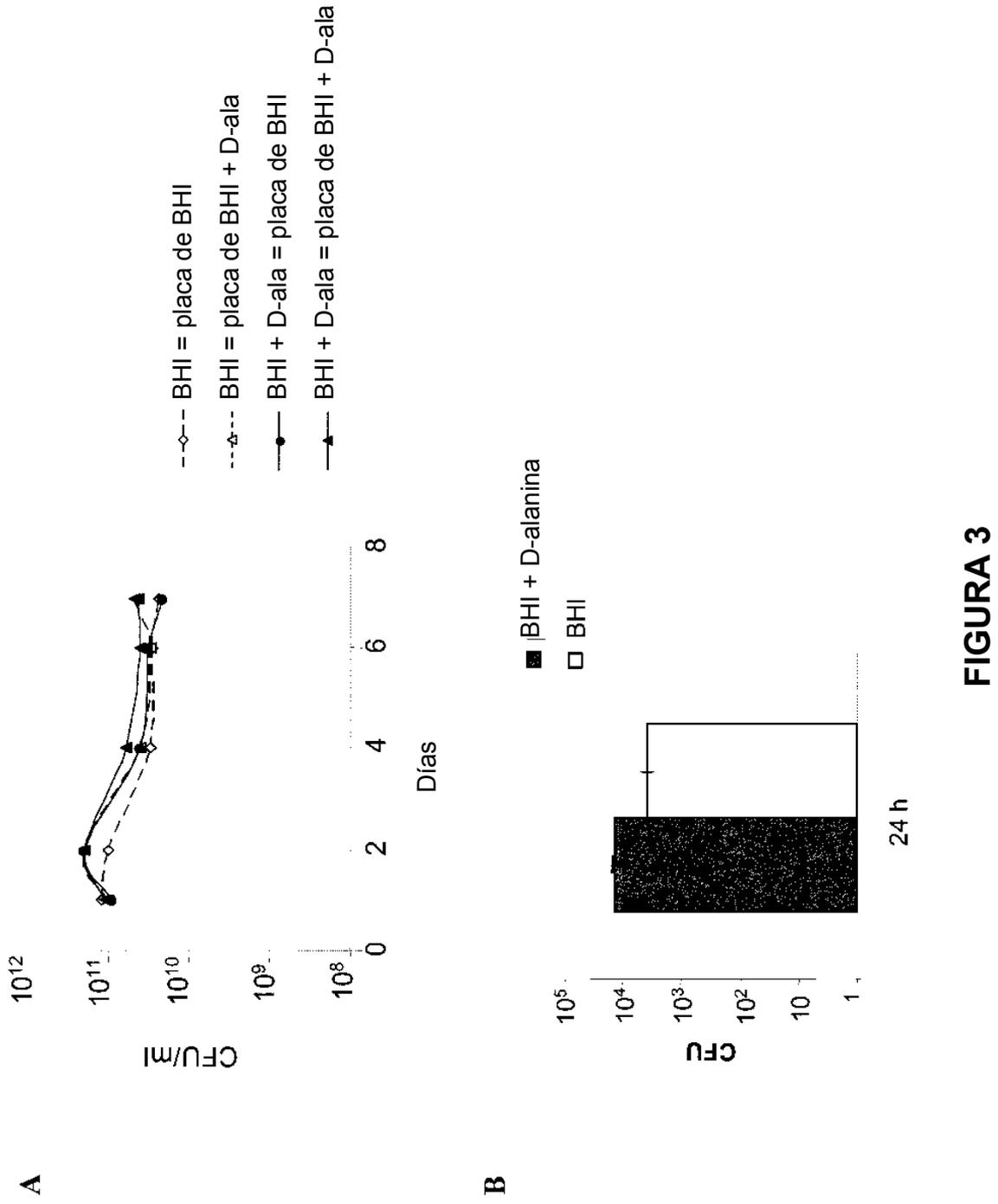


FIGURA 3

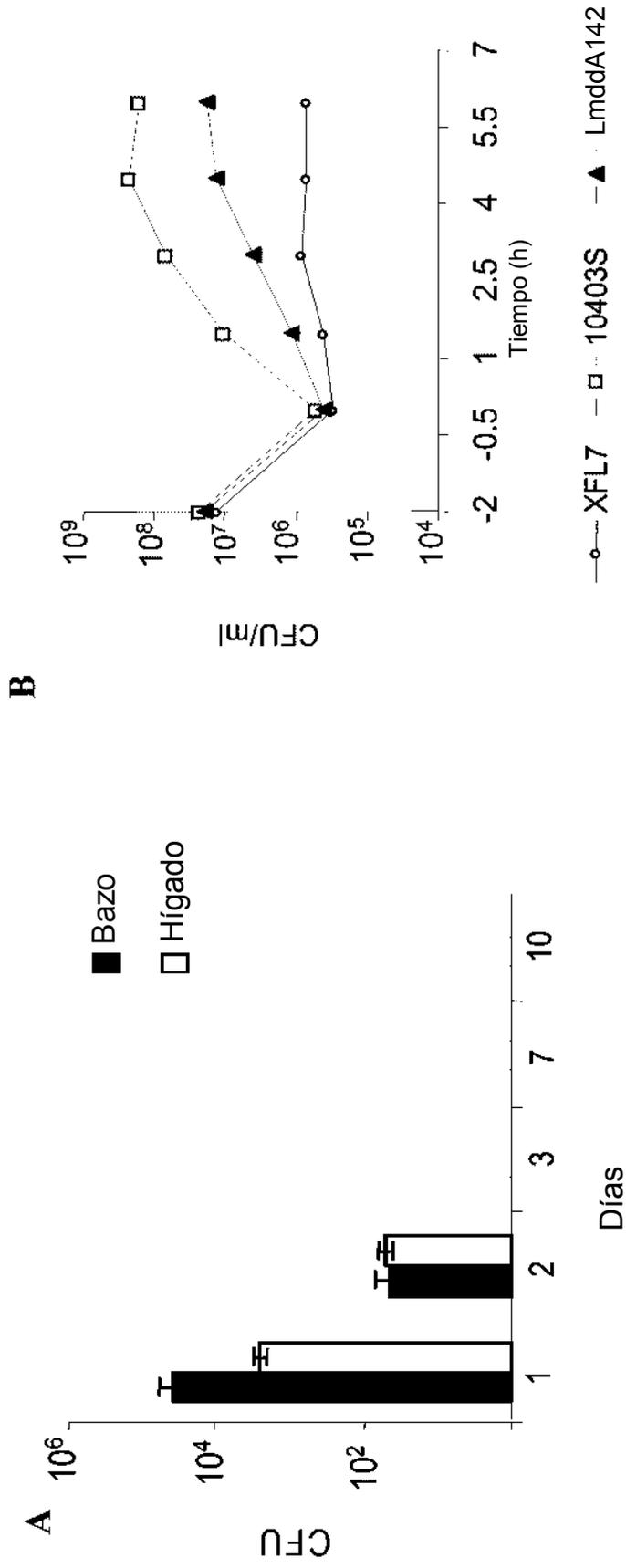


FIGURA 4

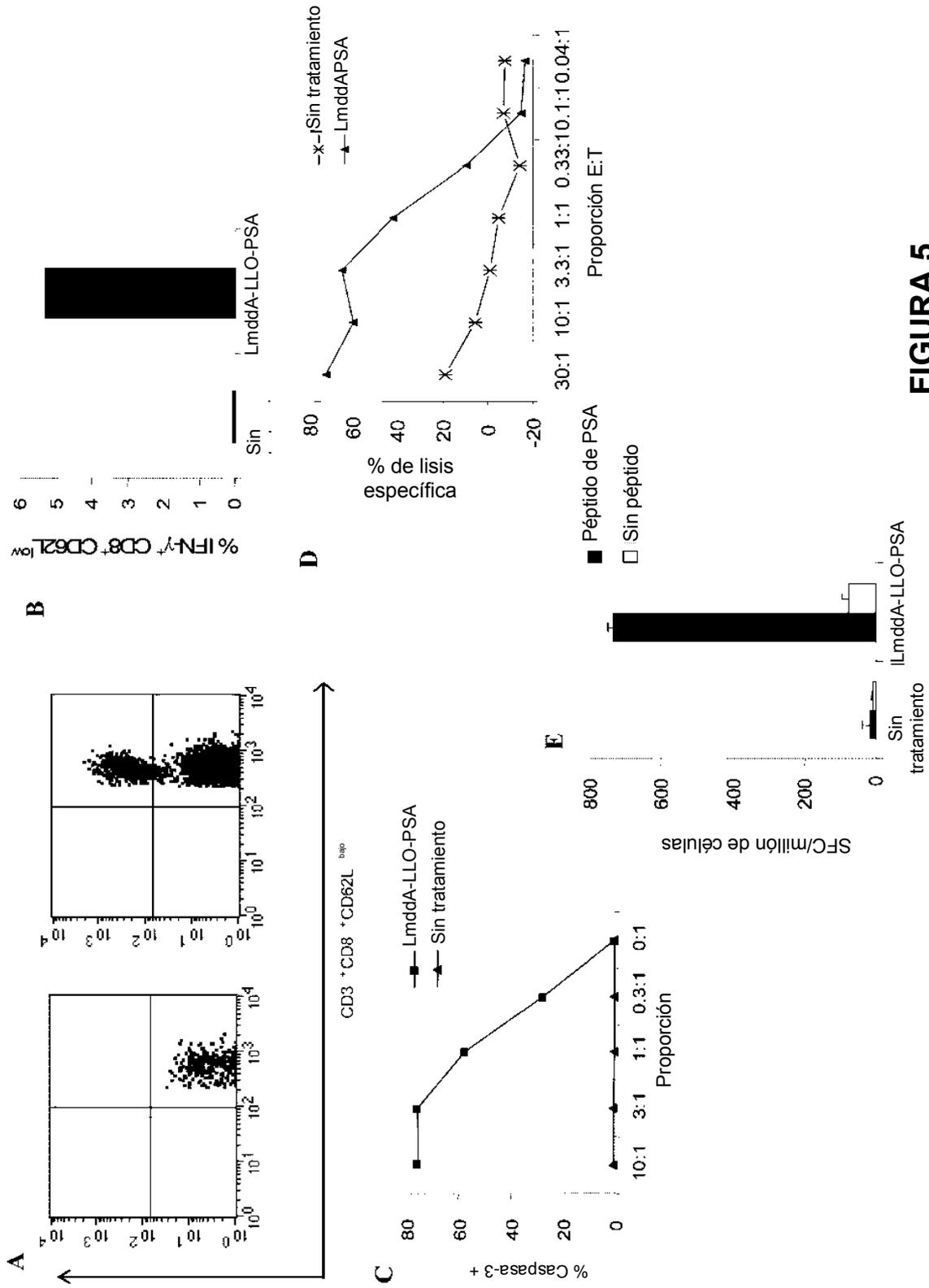


FIGURA 5

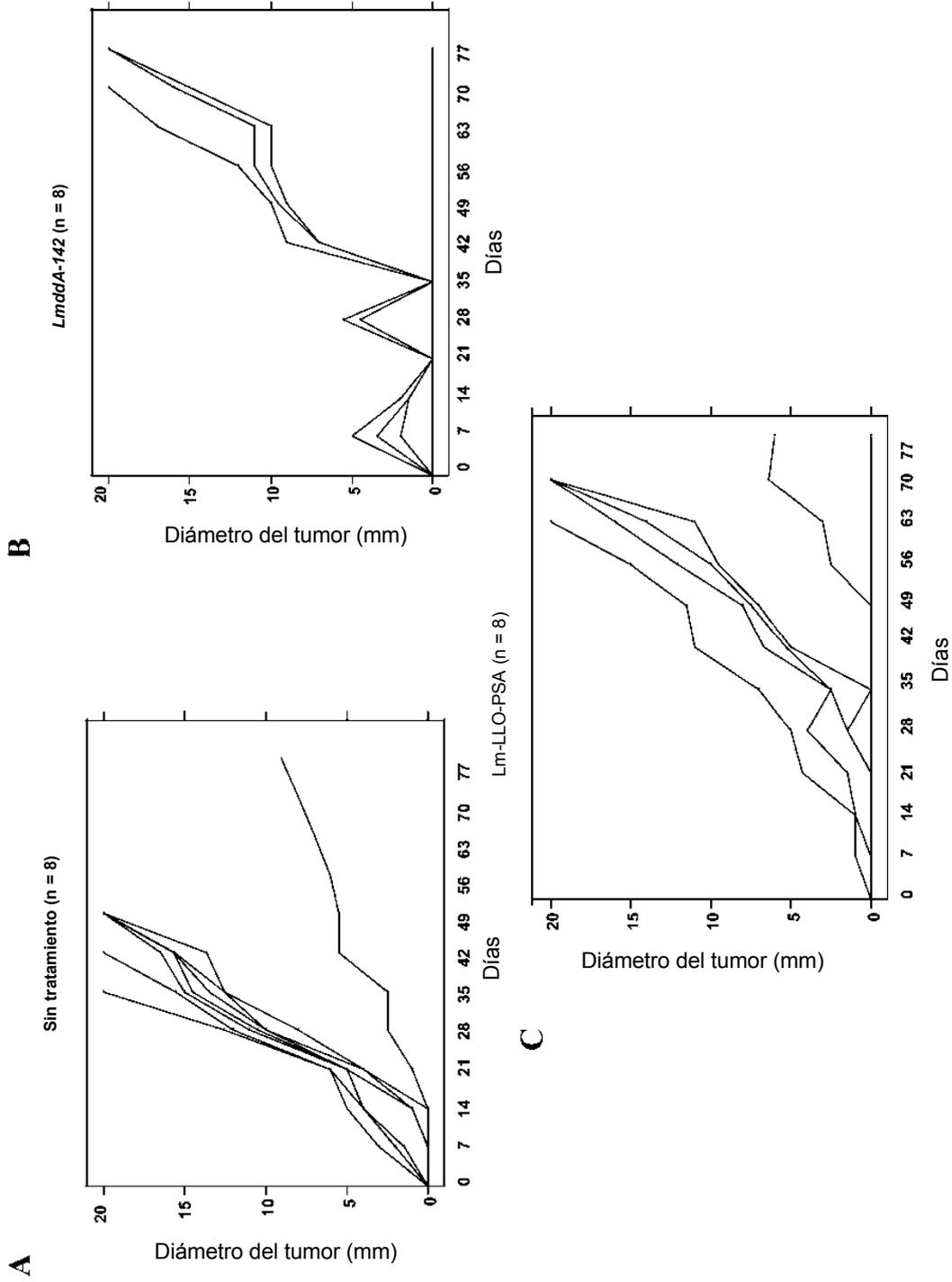


FIGURA 6

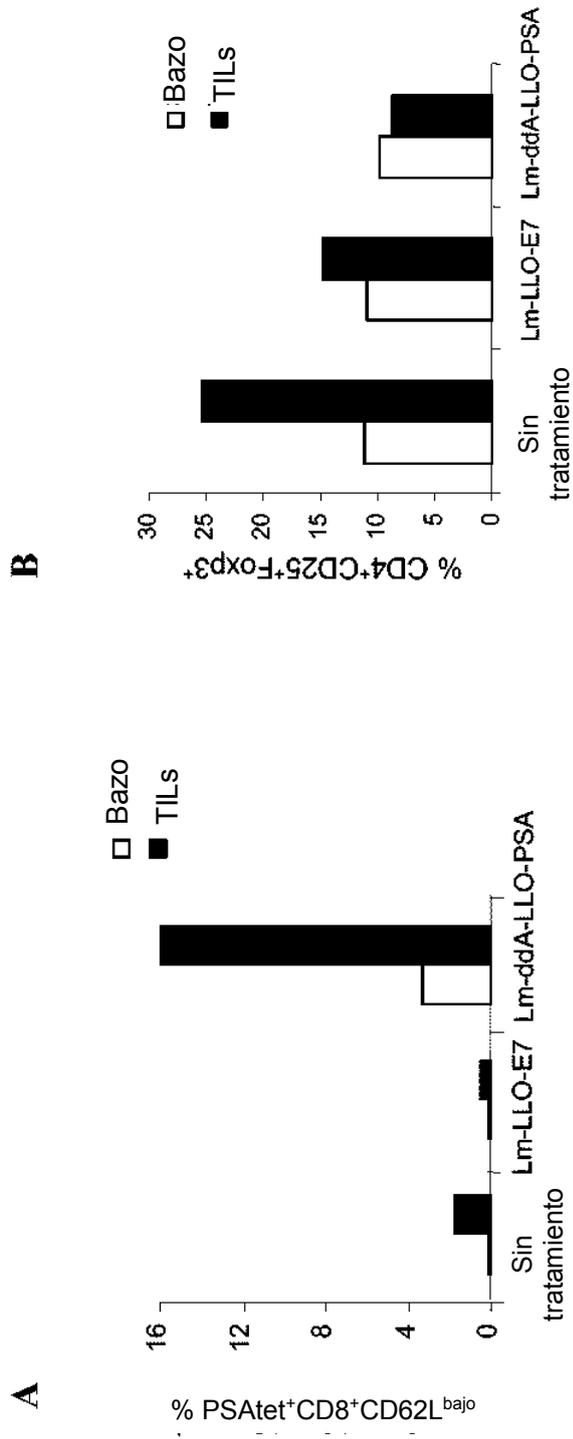


FIGURA 7

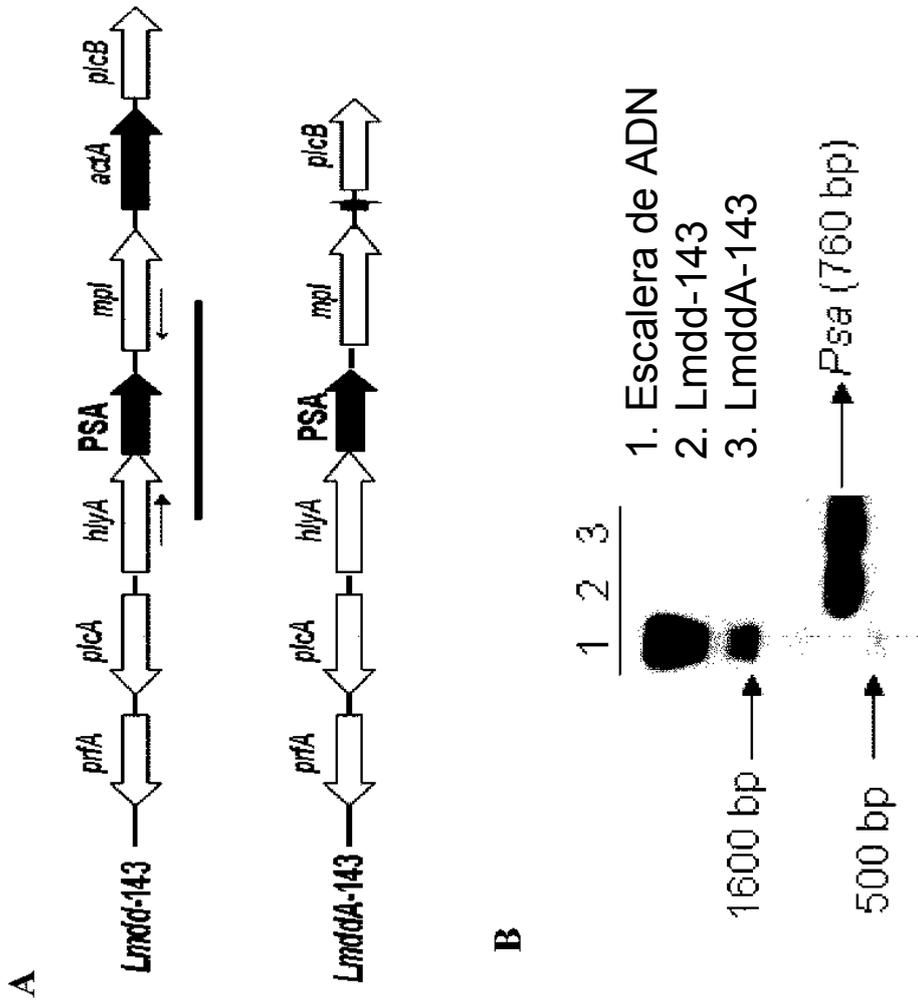


FIGURA 8

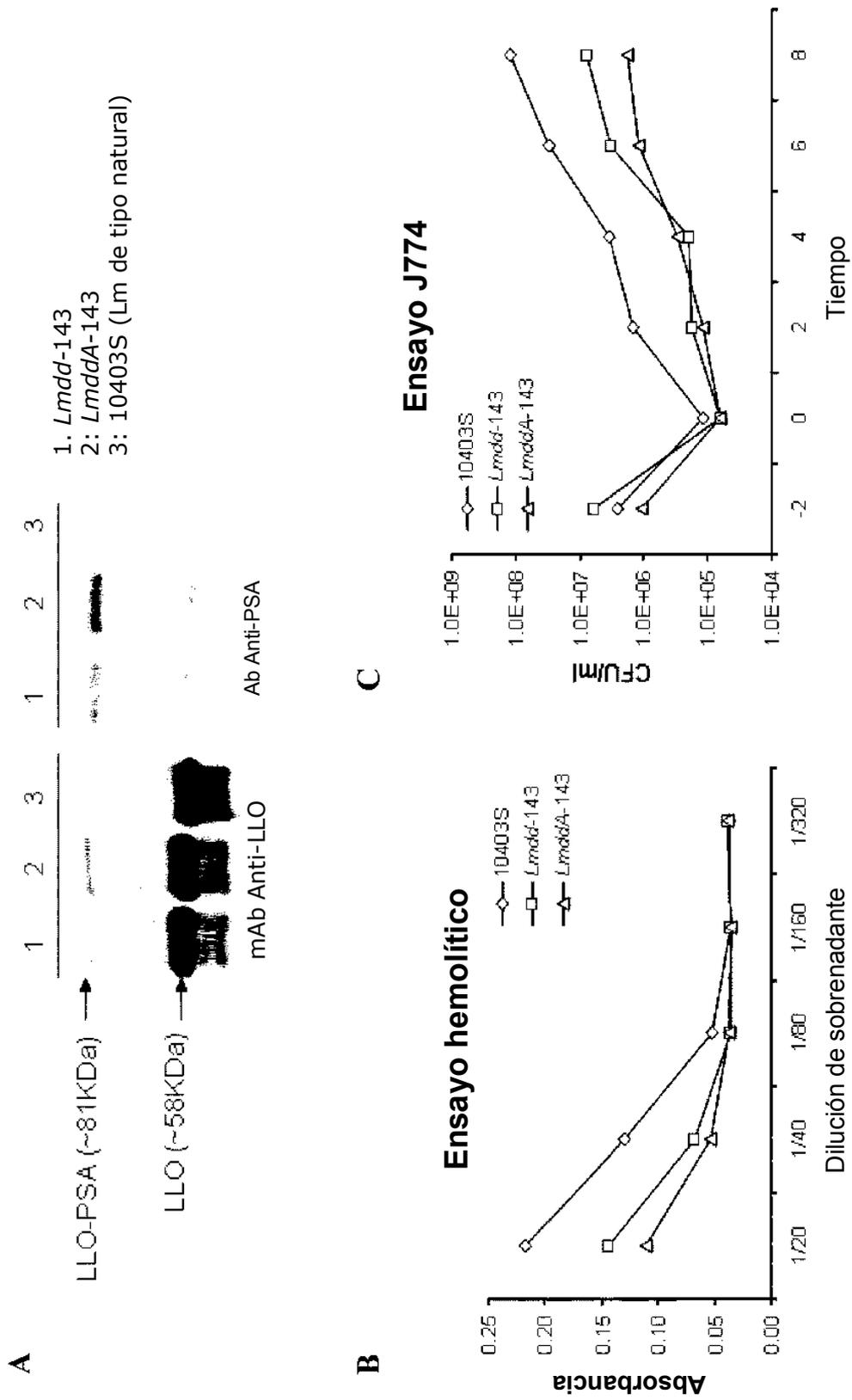


FIGURA 9

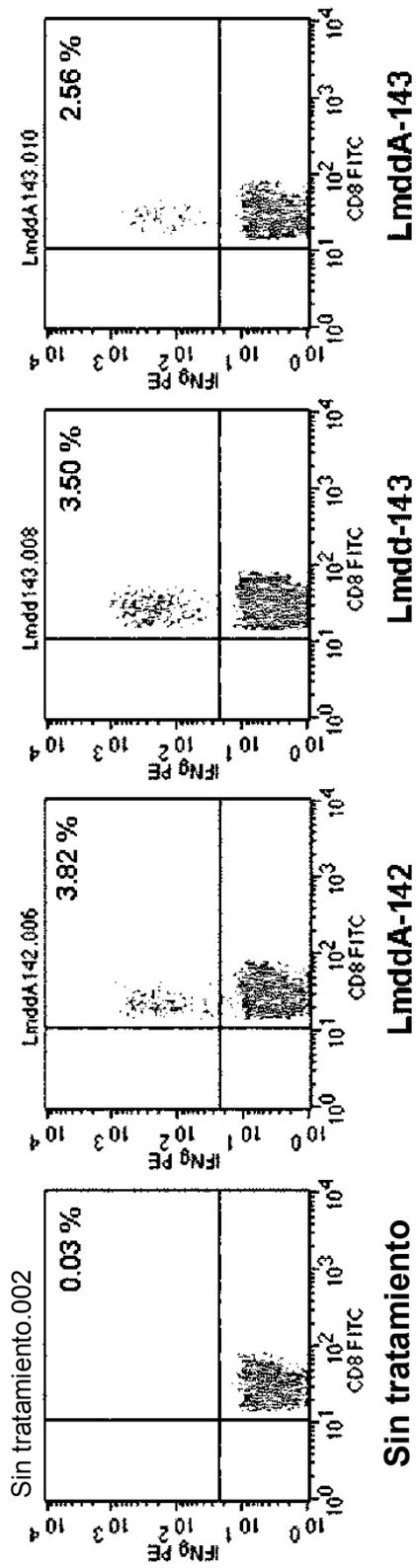


FIGURA 10

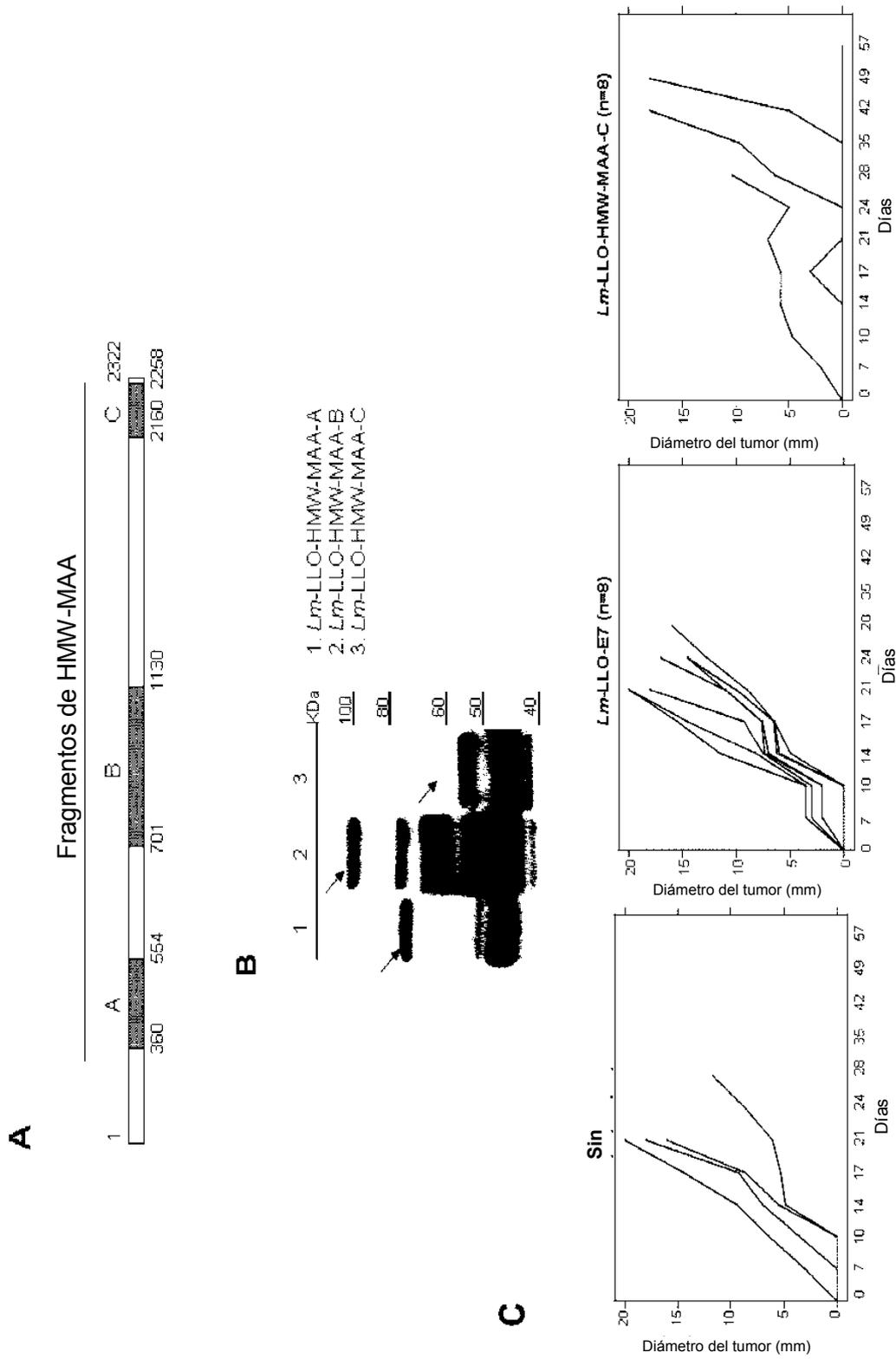
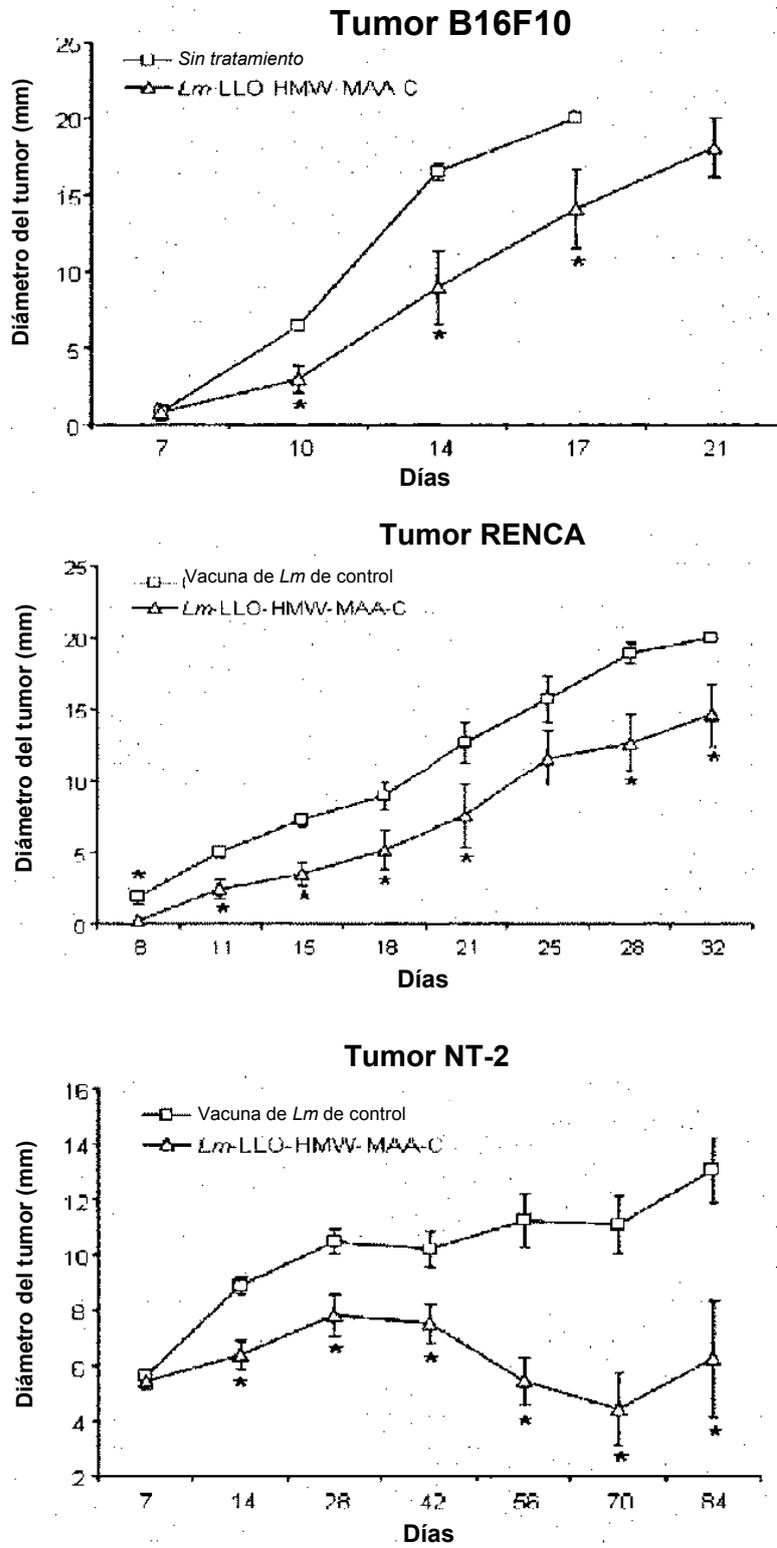


FIGURA 11

Fig. 11D



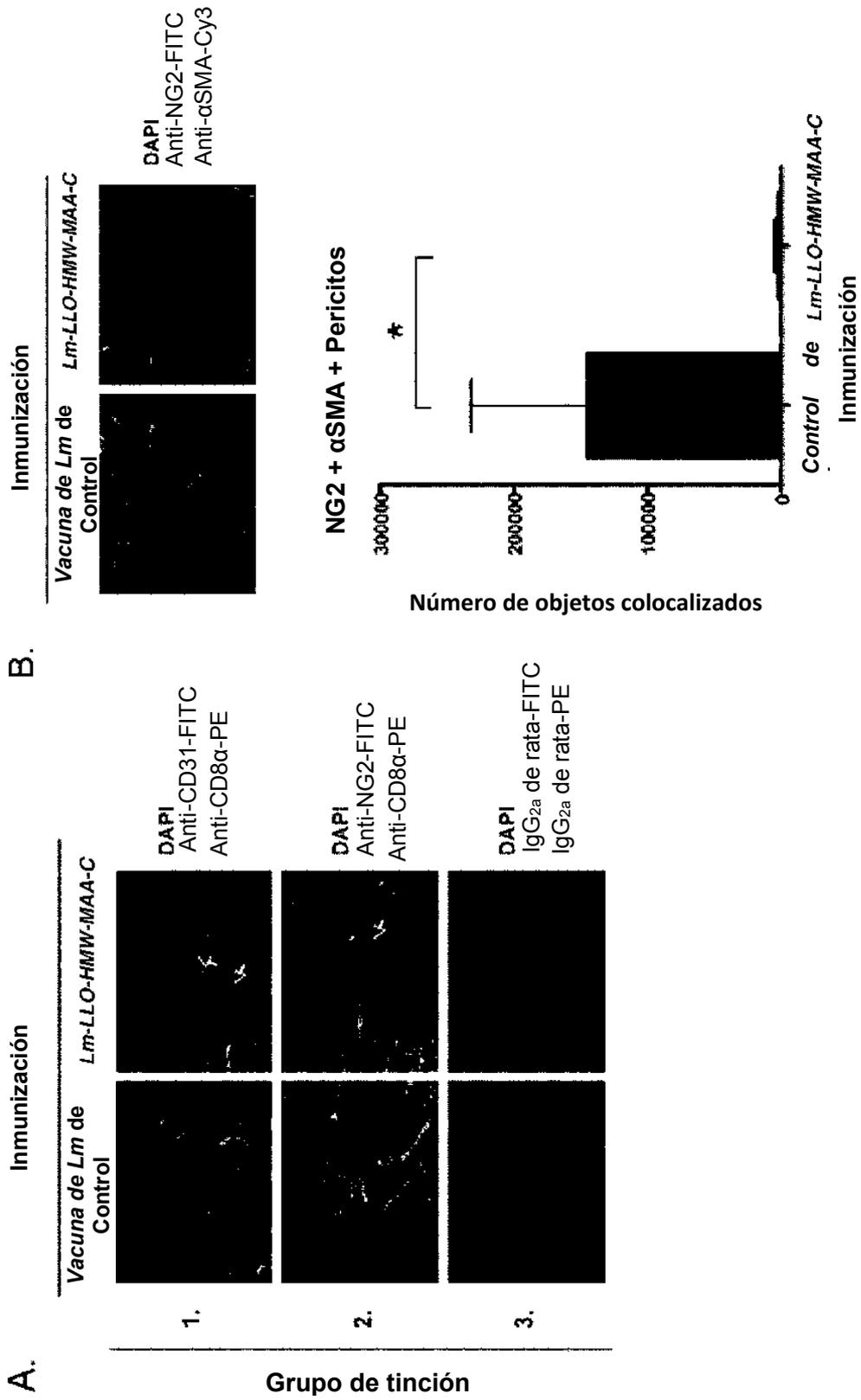


FIGURA 12