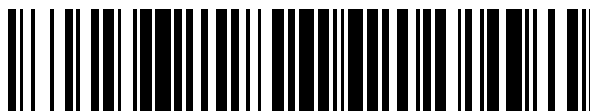


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 747 772**

51 Int. Cl.:

A61K 39/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.12.2014 PCT/EP2014/003403**

87 Fecha y número de publicación internacional: **25.06.2015 WO15090584**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.12.2014 E 14821508 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.08.2019 EP 3082850**

54 Título: **Vacuna de ADN dirigida a MSLN para la inmunoterapia del cáncer**

30 Prioridad:

18.12.2013 EP 13005896

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

11.03.2020

73 Titular/es:

**VAXIMM GMBH (100.0%)
Harrlachweg 2
68163 Mannheim, DE**

72 Inventor/es:

**SPRINGER, MARCO y
LUBENAU, HEINZ**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

Observaciones:

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o
Bemerkungen) en el folleto original publicado por
la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 747 772 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

Vacuna de ADN dirigida a MSLN para la inmunoterapia del cáncer

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a una cepa mutante atenuada de Salmonella que comprende una molécula de ADN recombinante que codifica Mesotelina para su uso como una vacuna en la inmunoterapia del cáncer.

Antecedentes de la invención

10 La mesotelina es una glicoproteína anclada por glicosil-fosfatidilinositol presente en la superficie celular de varios tumores sólidos humanos. La mesotelina se identificó por primera vez con el anticuerpo monoclonal (mAb) K1 (Chang et al., 1992). El gen de la Mesotelina (MSLN) codifica una proteína precursora de 71 kDa que se procesa en una proteína anclada por glicosil-fosfatidilinositol de 40 kDa, la porción madura a la que se une el mAb K1, denominada Mesotelina, y un fragmento de 31 kDa NH2 terminal llamado factor de potenciación de megacariocitos que se libera de la célula. La mesotelina es un antígeno de diferenciación tumoral presente en niveles bajos en un conjunto restringido de tejidos adultos normales, tales como el mesotelio, pero que se sobreexpresa de manera aberrante en mesoteliomas, cánceres de ovario y pancreático (Hassan et al., 2004). Por lo tanto, la MSLN es un candidato prometedor para el desarrollo de vacunas contra el cáncer.

15 La mesotelina (MSLN) se ha descrito como un antígeno diana para la inmunoterapia (Hassan et al., Clin Cancer Res, 2004). Se han usado varias estrategias inmunoterapéuticas para tomar como diana los tipos de tumores que sobreexpresan MSLN. Hassan et al. (Clin Cancer Res, 2004) describen la inmunotoxina antimesotelina SS1P [SS1 (dsFv)PE38] que presenta actividad antitumoral en ratones desnudos adultos. En los últimos años, se han iniciado
20 varios ensayos clínicos de fase temprana basados en la administración de la inmunotoxina antimesotelina SS1P o del anticuerpo monoclonal quimérico antimesotelina MORAb-009 mediante inyección en bolo o infusión intravenosa continua (resumido exhaustivamente en Kelly et al., Mol Cancer Ther 2012). Otra estrategia inmunoterapéutica ensayada actualmente en ensayos clínicos de fase I/II se basa en la administración de linfocitos modificados antimesotelina (ClinicalTrials.gov; Identificadores NCT01355965 y NCT01439152). Dung et al. (Clin Cancer Res, 2012)
25 describe una vacuna de mesotelina basada en Listeria monocytogenes, que se administra por vía intravenosa. Yamasaki et al. (Int J Cancer, 2013) describe una vacuna intravenosa genética de Mesotelina basada en el adenovirus humano 40.

30 Los derivados atenuados de Salmonella enterica son vehículos atractivos para la administración de antígenos heterólogos al sistema inmune de los mamíferos, ya que las cepas de S. enterica pueden administrarse potencialmente a través de las rutas mucosales de inmunización, es decir, por vía oral o nasal, lo que ofrece ventajas de simplicidad y seguridad en comparación con la administración parenteral. Además, las cepas de Salmonella incitan fuertes respuestas inmunes humorales y celulares a nivel de los compartimientos tanto sistémico como mucosal. Los costes de preparación de lotes son relativamente bajos y las formulaciones de vacunas bacterianas vivas son altamente estables. La atenuación se puede lograr mediante la delección de varios genes, incluidos los genes de virulencia,
35 reguladores y metabólicos.

Se ha demostrado que varias cepas de Salmonella typhimurium atenuadas por mutaciones *aro* son vehículos de administración seguros y efectivos para antígenos heterólogos en modelos animales.

40 En el documento WO 03/073995 se describen estrategias para administrar construcciones de ADN que codifican antígenos, en particular el antígeno de estroma tumoral VEGFR, a través de cepas de Salmonella typhimurium atenuadas vivas en células diana de ratón. Niethammer et al., (Nature Medicine 2002, 8 (12), 1369) demostraron que la cepa atenuada de S. typhimurium *aroA* SL7207 que porta un vector de expresión que codifica el receptor del factor de crecimiento del endotelio vascular murino 2 (VEGFR-2 o FLK-1), que es esencial para la angiogénesis tumoral, es funcional como una vacuna contra el cáncer.

45 Sin embargo, solo hay una cepa atenuada de Salmonella enterica serovar, a saber, Salmonella enterica serovar typhi Ty21a (abreviatura: S. typhi Ty21a), que se ha aceptado para su uso en seres humanos y se distribuye bajo el nombre comercial de Vivotif® (Berna Biotech Ltd., Crucell Company, Suiza; número de autorización de comercialización PL 15747/0001 fechada el 16 de diciembre de 1996).

50 Esta vacuna viva oral bien tolerada contra la fiebre tifoidea se derivó por mutagénesis química del aislado bacteriano virulento de tipo salvaje S. typhi Ty2 y porta una mutación de pérdida de función en el gen *galE*, así como otras mutaciones menos definidas. Se ha autorizado como vacuna contra la fiebre tifoidea en muchos países después de que se mostrara que es eficaz y segura en ensayos de campo.

El documento WO 2013/091898 describe un método para crecer cepas mutantes atenuadas de Salmonella typhi que carecen de actividad de galactosa epimerasa y que portan una molécula de ADN recombinante.

55 El documento US 2012/0076752 describe composiciones de vacuna que comprenden una bacteria que expresa mesotelina. Sin embargo, no se muestra ninguna vacunación ni tratamiento para una cepa atenuada de Salmonella

typhimurium.

La MSLN es un antígeno tumoral prometedor para el desarrollo de vacunas contra el cáncer. Las principales limitaciones de las vacunas de MSLN disponibles anteriormente son la administración a través de la ruta de administración intravenosa y los efectos secundarios asociados. Hasta ahora, no se ha satisfecho la gran necesidad de mejorar las estrategias de la terapia del cáncer basadas en tomar MSLN como diana.

Objetos de la invención

A la vista de la técnica anterior, es un objeto de la presente invención proporcionar una nueva vacuna oral contra el cáncer dirigida a MSLN para su uso en la inmunoterapia del cáncer. Dicha vacuna contra el cáncer dirigida a MSLN ofrecería grandes ventajas para mejorar las opciones de tratamiento para pacientes con cáncer.

Resumen de la invención

En un aspecto, la presente invención se refiere a una cepa mutante atenuada de Salmonella que comprende al menos una copia de una molécula de ADN recombinante que comprende un casete de expresión eucariota que codifica Mesotelina (MSLN) para su uso como una vacuna en la inmunoterapia del cáncer.

Se ha mostrado que la cepa atenuada de Salmonella para uso de la presente invención incita una fuerte respuesta inmune en ratones sanos. Hasta donde sabe el inventor, esta nueva cepa atenuada de Salmonella es la primera vacuna oral contra el cáncer dirigida a MSLN. Dado que MSLN se sobreexpresa en mesoteliomas, cánceres de ovario y pancreático, y en una amplia variedad de otros tumores, la cepa atenuada de Salmonella de la presente invención tiene un gran potencial como vacuna contra el cáncer para el tratamiento de estas indicaciones.

En un primer estudio, se ha demostrado que la vacuna para uso de acuerdo con la presente invención (VXM04) incita una fuerte respuesta inmune específica de MSLN en ratones sanos. Estos resultados indican que la vacunación con VXM04 puede conducir a una respuesta inmune y al desarrollo de una memoria inmune contra las células tumorales que sobreexpresan MSLN. Es notable y sorprendente que la nueva vacuna VXM04 sea efectiva a dosis relativamente bajas. La cepa mutante atenuada de Salmonella para uso de la presente invención puede aplicarse en monoterapia o en combinación con una segunda cepa mutante atenuada de Salmonella que comprende una molécula de ADN que codifica un segundo antígeno tumoral. Además, la cepa mutante atenuada para uso de la presente invención puede administrarse en combinación con quimioterapia, radioterapia o terapia biológica del cáncer. El tratamiento con VXM04 también puede ser efectivo, si el paciente ha desarrollado resistencia a la quimioterapia (pacientes quimio-refractarios). Por lo tanto, la nueva cepa atenuada de Salmonella para uso de la presente invención podría ser útil en estrategias novedosas y altamente mejoradas de terapia del cáncer.

En realizaciones particulares, la cepa mutante atenuada de Salmonella es de la especie Salmonella enterica. En realizaciones particulares, la cepa mutante atenuada de Salmonella es Salmonella typhi Ty21a.

En realizaciones particulares, la MSLN se selecciona del grupo que consiste en MSLN humana.

En realizaciones particulares, la MSLN tiene la secuencia de aminoácidos como se encuentra en la SEQ ID NO 1.

En realizaciones particulares, la molécula de ADN recombinante comprende el gen de resistencia al antibiótico kanamicina, el pMB1 ori y un casete de expresión eucariota que codifica MSLN humana bajo el control de un promotor de CMV, en donde la MSLN humana tiene la secuencia de ácido nucleico como se encuentra en la SEQ ID NO 2.

La cepa mutante atenuada de Salmonella es para usarse como una vacuna en la inmunoterapia del cáncer.

En realizaciones particulares, la inmunoterapia del cáncer comprende además la administración de una o más cepas mutantes atenuadas adicionales de Salmonella que comprenden al menos una copia de una molécula de ADN recombinante que comprende un casete de expresión que codifica un antígeno tumoral y/o un antígeno de estroma tumoral. En realizaciones particulares, dicha una o más cepas mutantes atenuadas adicionales de Salmonella son Salmonella typhi Ty21a que comprenden un casete de expresión eucariota. En realizaciones particulares, dicha una o más cepas mutantes atenuadas adicionales de Salmonella comprenden una o unas cepas mutantes atenuadas de Salmonella que codifican el antígeno de estroma tumoral humano VEGFR-2 y/o el antígeno tumoral, proteína de tumor de Wilms humano (WT1).

En realizaciones particulares, la cepa mutante atenuada de Salmonella se coadministra con dicha una o más cepas mutantes atenuadas adicionales de Salmonella.

En realizaciones particulares, la inmunoterapia del cáncer se acompaña de quimioterapia, radioterapia o terapia biológica del cáncer.

En realizaciones particulares, la cepa mutante atenuada de Salmonella se administra durante la quimioterapia o el ciclo de tratamiento de radioterapia o durante la terapia biológica del cáncer.

En realizaciones particulares, la cepa mutante atenuada de Salmonella se administra antes de la quimioterapia o del

ciclo de tratamiento de radioterapia o antes de la terapia biológica del cáncer.

En realizaciones particulares, la cepa mutante atenuada de Salmonella se administra después de la quimioterapia o del ciclo de tratamiento de radioterapia o después de la terapia biológica del cáncer.

5 En realizaciones adicionales, la cepa mutante atenuada de Salmonella se administra antes y durante al menos uno de la quimioterapia, el ciclo de tratamiento de radioterapia y la terapia biológica del cáncer. En los casos en que se lleva a cabo más de una de la quimioterapia, la radioterapia y la terapia biológica del cáncer, la cepa mutante atenuada de Salmonella se puede administrar antes o durante o antes y durante al menos una de estas terapias, particularmente durante al menos dos de estas terapias

En realizaciones particulares, la cepa mutante atenuada de Salmonella se administra por vía oral.

10 En realizaciones particulares, el cáncer se selecciona de mesoteliomas, cánceres de ovario y pancreático, carcinomas de células escamosas del cuello uterino, cabeza y cuello, vulva, pulmón y esófago, adenocarcinomas de pulmón, carcinomas endometriales, sarcomas sinoviales bifásicos, tumores desmoplásicos de células pequeñas y redondas y adenocarcinomas gástricos.

15 En realizaciones particulares, la dosis única es de aproximadamente 10^5 a aproximadamente 10^{11} , particularmente de aproximadamente 10^6 a aproximadamente 10^{10} , más particularmente de aproximadamente 10^6 a aproximadamente 10^9 , más particularmente de aproximadamente 10^6 a aproximadamente 10^8 , lo más particularmente de aproximadamente 10^6 a aproximadamente 10^7 unidades formadoras de colonias (UFC).

20 En realizaciones particulares, la cepa mutante atenuada de Salmonella es para uso en inmunoterapia personalizada del cáncer que comprende la etapa de evaluar el patrón de expresión de MSLN y/o la respuesta preinmune contra MSLN de un paciente.

Descripción detallada de la invención

La presente invención puede entenderse más fácilmente por referencia a la siguiente descripción detallada de la invención y a los ejemplos incluidos en la misma.

25 En un aspecto, la presente invención se refiere a una cepa mutante atenuada de Salmonella que comprende al menos una copia de una molécula de ADN recombinante que comprende un casete de expresión eucariota que codifica Mesotelina (MSLN) para su uso como una vacuna en la inmunoterapia del cáncer.

De acuerdo con la invención, la cepa atenuada de Salmonella funciona como el vehículo bacteriano de la molécula de ADN recombinante que comprende un casete de expresión que codifica Mesotelina (MSLN) para la administración de dicha molécula de ADN recombinante en una célula diana.

30 En el contexto de la presente invención, el término "atenuada" se refiere a una cepa bacteriana de virulencia reducida en comparación con la cepa bacteriana parental, que no porta la mutación atenuante. Las cepas bacterianas atenuadas han perdido preferiblemente su virulencia, pero retienen su capacidad para inducir inmunidad protectora. La atenuación se puede lograr mediante la delección de varios genes, incluidos los genes de virulencia, reguladores y metabólicos. Las bacterias atenuadas se pueden encontrar de forma natural o se pueden producir artificialmente en el laboratorio, por ejemplo, mediante la adaptación a un nuevo medio o cultivo celular o se pueden producir mediante tecnología de ADN recombinante.

En el contexto de la presente invención, el término "cepa mutante" se refiere a una cepa bacteriana que porta una mutación en su genoma. En este contexto, el término "mutación" se refiere a un cambio en una secuencia de ácido nucleico, que incluye mutaciones puntuales, inserciones, delecciones, translocaciones e inversiones.

40 En el contexto de la presente invención, el término "comprende" o "que comprende" significa "que incluye, pero no se limita a". El término está destinado a ser abierto, para especificar la presencia de cualesquiera características, elementos, números enteros, etapas o componentes declarados, pero no para impedir la presencia o adición de una o más características, elementos, números enteros, etapas, componentes o grupos adicionales de los mismos. El término "que comprende" incluye así los términos más restrictivos "que consiste en" y "que consiste esencialmente en". En una realización, el término "que comprende" tal y como se usa en toda la solicitud y en particular en las reivindicaciones puede reemplazarse por el término "que consiste en".

50 En el contexto de la presente invención, el término "molécula de ADN recombinante" se refiere a una construcción de ADN preparada por ingeniería, preferiblemente compuesta de partes de ADN de origen diferente. La molécula de ADN recombinante puede ser un ácido nucleico lineal, o preferiblemente, un plásmido de ADN recombinante circular generado mediante la introducción de un marco de lectura abierto que codifica MSLN en un plásmido de vector de expresión.

En el contexto de la presente invención, el término "casete de expresión" se refiere a una unidad de ácido nucleico que comprende al menos el gen de MSLN bajo el control de secuencias reguladoras que controlan su expresión. El casete de expresión comprendido en la cepa mutante atenuada de Salmonella puede mediar preferiblemente la

transcripción del marco de lectura abierto incluido que codifica MSLN en una célula diana. Los casetes de expresión comprenden típicamente un promotor, al menos un marco de lectura abierto y una señal de terminación de la transcripción.

5 La mesotelina es una glicoproteína de la superficie celular de 40 kDa presente en las células mesoteliales normales y sobreexpresada en varios tumores humanos, incluidos el mesotelioma y el adenocarcinoma de ovario y pancreático. El gen de la mesotelina codifica una proteína precursora de 71 kDa que se procesa para producir una proteína escindida de 31 kDa llamada factor de potenciación de megacariocitos (MPF) y el fragmento de mesotelina unido a la célula de 40 kDa. Se mostró que la mesotelina exhibía actividad formadora de colonias de megacariocitos en presencia de interleuquina-3. La mesotelina es un antígeno de diferenciación tumoral presente en niveles bajos en un conjunto restringido de tejidos adultos normales, tales como el mesotelio, pero que está sobreexpresada de manera aberrante en una amplia variedad de tumores humanos, incluidos mesoteliomas, cánceres de ovario y pancreático, carcinomas de células escamosas del cuello uterino, cabeza y cuello, vulva, pulmón y esófago, adenocarcinomas de pulmón, carcinomas endometriales, sarcomas sinoviales bifásicos, tumores desmoplásicos de células pequeñas y redondas y adenocarcinomas gástricos. Se desconoce la función biológica normal de la Mesotelina. Los estudios en ratones con inactivación de mesotelina no revelaron un fenotipo detectable, y tanto los ratones machos como las hembras produjeron descendencia sana. Los estudios en cáncer pancreático sugieren que la mesotelina juega un papel en la tumorigénesis al aumentar la proliferación celular, la migración y las poblaciones de células en fase S. Además, hay evidencia de que la mesotelina es una proteína inmunogénica. Debido a su perfil de expresión, sus funciones oncogénicas y su potencial inmunogénico, el antígeno tumoral mesotelina es un candidato prometedor para el desarrollo de vacunas contra el cáncer.

La mesotelina es un antígeno de diferenciación tumoral presente en niveles bajos en un conjunto restringido de tejidos adultos normales, tales como el mesotelio, pero que está sobreexpresada de manera aberrante en mesoteliomas, cánceres de ovario y pancreático (Hassan et al., 2004). Por lo tanto, la MSLN es un candidato prometedor para el desarrollo de vacunas contra el cáncer.

25 En realizaciones particulares, la cepa mutante atenuada de Salmonella es de la especie Salmonella enterica. En realizaciones particulares, la cepa mutante atenuada de Salmonella es Salmonella typhi Ty21a. La cepa atenuada S. typhi Ty21a es el componente activo de Typhoral L®, también conocido como Vivotif® (fabricado por Berna Biotech Ltd., una compañía Crucell, Suiza). Actualmente, es la única vacuna oral viva autorizada contra la fiebre tifoidea. Esta vacuna se ha ensayado ampliamente y ha demostrado ser segura con respecto a la toxicidad del paciente, así como con respecto a su transmisión a terceros (Wahdan et al., J. Infectious Diseases 1982, 145: 292-295). La vacuna está autorizada en más de 40 países. El número de autorización de comercialización de Typhoral L® es PL 15747/0001 fechada el 16 de diciembre de 1996. Una dosis de vacuna contiene al menos 2×10^9 unidades formadoras de colonias viables de S. typhi Ty21a y al menos 5×10^9 células no viables de S. typhi Ty21a.

35 Una de las propiedades bioquímicas de la cepa bacteriana Salmonella typhi Ty21a es su incapacidad para metabolizar la galactosa. La cepa bacteriana atenuada tampoco es capaz de reducir el sulfato a sulfuro, lo que la diferencia de la cepa de tipo salvaje Salmonella typhi Ty2. Con respecto a sus características serológicas, la cepa Salmonella typhi Ty21a contiene el antígeno O9 que es un polisacárido de la membrana externa de la bacteria y carece del antígeno O5, que a su vez es un componente característico de Salmonella typhimurium. Esta característica serológica respalda la justificación para incluir el ensayo respectivo en un panel de ensayos de identidad para la liberación de lotes.

40 En el contexto de la presente invención, el término "casete de expresión eucariota" se refiere a un casete de expresión que permite la expresión del marco de lectura abierto en una célula eucariota. Se ha mostrado que la cantidad de antígeno heterólogo requerida para inducir una respuesta inmune adecuada puede ser tóxica para la bacteria y provocar la muerte celular, la atenuación excesiva o la pérdida de expresión del antígeno heterólogo. El uso de un casete de expresión eucariota que no se expresa en el vector bacteriano, sino solo en la célula diana puede superar este problema de toxicidad y la proteína expresada puede exhibir un patrón de glicosilación eucariota.

45 Un casete de expresión eucariota comprende secuencias reguladoras que son capaces de controlar la expresión de un marco de lectura abierto en una célula eucariota, preferiblemente un promotor y una señal de poliadenilación. Los promotores y las señales de poliadenilación incluidas en las moléculas de ADN recombinante comprendidas por la cepa mutante atenuada de Salmonella para el uso de la presente invención se seleccionan preferiblemente para que sean funcionales dentro de las células del sujeto a inmunizar. Los ejemplos de promotores adecuados, especialmente para la producción de una vacuna de ADN para seres humanos, incluyen pero no se limitan a, promotores de Citomegalovirus (CMV), tales como el promotor de CMV fuerte inmediato temprano, Virus de Simio 40 (SV40), Virus de Tumor Mamario de Ratón (MMTV), Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH), tal como el promotor de Repetición Terminal Larga (LTR) del VIH, el virus de Moloney, el virus de Epstein Barr (EBV) y del virus del Sarcoma de Rous (RSV), así como los promotores de genes humanos tales como la actina humana, miosina humana, hemoglobina humana, creatina muscular humana y metalotioneína humana. En una realización particular, el casete de expresión eucariota contiene el promotor de CMV. En el contexto de la presente invención, el término "promotor de CMV" se refiere al promotor de citomegalovirus fuerte inmediato temprano.

60 Los ejemplos de señales de poliadenilación adecuadas, especialmente para la producción de una vacuna de ADN para seres humanos, incluyen, pero no se limitan a, el sitio de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovino

(BGH), las señales de poliadenilación de SV40 y las señales de poliadenilación de LTR. En una realización particular, el casete de expresión eucariota incluido en la molécula de ADN recombinante comprendida por la cepa mutante atenuada de Salmonella de la presente invención comprende el sitio de poliadenilación de BGH.

5 Además de los elementos reguladores requeridos para la expresión del gen de MSLN heterólogo, como un promotor y una señal de poliadenilación, también se pueden incluir otros elementos en la molécula de ADN recombinante. Dichos elementos adicionales incluyen potenciadores. El potenciador puede ser, por ejemplo, el potenciador de actina humana, miosina humana, hemoglobina humana, creatina muscular humana y potenciadores virales tales como los de CMV, RSV y EBV.

10 Las secuencias reguladoras y los codones generalmente dependen de la especie, por lo que para maximizar la producción de proteínas, las secuencias reguladoras y los codones se seleccionan preferiblemente para que sean efectivos en la especie que se va a inmunizar. El experto en la técnica puede producir moléculas de ADN recombinante que son funcionales en una especie de sujeto dada.

En realizaciones particulares, la MSLN es MSLN humana.

15 En este contexto, el término "alrededor de" o "aproximadamente" significa dentro del 80% al 120%, alternativamente dentro del 90% al 110%, incluido dentro del 95% al 105% de un valor o rango dado.

20 La proteína puede ser de origen natural, p. ej., un homólogo de MSLN de una especie diferente, o una proteína preparada por ingeniería, p. ej., un derivado de MSLN preparado por ingeniería. Se sabe que el uso de codones es diferente entre especies. Por lo tanto, cuando se expresa una proteína heteróloga en una célula diana, puede ser necesario, o al menos útil, adaptar la secuencia de ácido nucleico al uso de codones de la célula diana. Los métodos para diseñar y construir derivados de una proteína dada son bien conocidos por cualquier experto en la técnica.

25 La MSLN humana puede contener una o más mutaciones que comprenden una adición, una delección y/o una sustitución de uno o más aminoácidos. Los métodos y algoritmos para determinar la identidad de la secuencia, incluida la comparación de una proteína parental y su derivado que tiene delecciones, adiciones y/o sustituciones en relación con una secuencia parental, son bien conocidos por el experto en la técnica. A nivel de ADN, las secuencias de ácido nucleico que codifican la proteína pueden diferir en mayor medida debido a la degeneración del código genético.

En realizaciones particulares, la MSLN tiene la secuencia de aminoácidos como se encuentra en la SEQ ID NO 1.

30 En realizaciones particulares, la molécula de ADN recombinante comprende el gen de resistencia al antibiótico kanamicina, el pMB1 ori y un casete de expresión eucariota que codifica la MSLN humana bajo el control de un promotor de CMV, en donde la MSLN humana tiene la secuencia de ácido nucleico como se encuentra en la SEQ ID NO 2.

35 En realizaciones particulares, la molécula de ADN recombinante se deriva del plásmido de expresión pVAX1™ disponible comercialmente (Invitrogen, San Diego, California). Este vector de expresión se modificó reemplazando el origen de replicación pUC de alto número de copias por el origen de replicación pMB1 de bajo número de copias de pBR322. La modificación de bajo número de copias se realizó con el fin de reducir la carga metabólica y para hacer que la construcción sea más estable. El esqueleto del vector de expresión generado se designó pVAX10. La inserción de MSLN humana con la secuencia de ácido nucleico como se encuentra en la SEQ ID NO 2 en el esqueleto de este vector de expresión a través de *NheI/XhoI* produjo el plásmido de expresión pVAX10.hMSLN. El plásmido de expresión pVAX10.hMSLN se representa esquemáticamente en la Figura 3.

La cepa mutante atenuada de Salmonella es para uso como vacuna en la inmunoterapia del cáncer.

40 En el contexto de la presente invención, el término "vacuna" se refiere a un agente que es capaz de inducir una respuesta inmune en un sujeto tras su administración. Una vacuna preferiblemente puede prevenir, mejorar o tratar una enfermedad. Una vacuna para uso de acuerdo con la presente invención comprende una cepa mutante atenuada de Salmonella, preferiblemente *S. typhi* Ty21a. La vacuna para uso de acuerdo con la presente invención comprende además al menos una copia de una molécula de ADN recombinante que comprende un casete de expresión eucariota que codifica MSLN, preferiblemente MSLN humana.

45 La cepa mutante atenuada viva de Salmonella para uso de acuerdo con la presente invención que comprende una molécula de ADN recombinante que codifica MSLN puede usarse como un vehículo para la administración oral de esta molécula de ADN recombinante. Dicho vector de administración que comprende una molécula de ADN que codifica un antígeno heterólogo, tal como MSLN, se denomina vacuna de ADN.

50 La inmunización genética podría ser ventajosa sobre la vacunación convencional. El ADN diana puede detectarse durante un período de tiempo considerable, actuando así como un depósito del antígeno. Los restos de secuencia en algunos plásmidos, como las islas GpC, son inmunoestimuladores y pueden funcionar como adyuvantes promovidos por la inmunoestimulación debido a LPS y otros componentes bacterianos.

Los vectores bacterianos vivos producen sus propios factores inmunomoduladores, tales como los lipopolisacáridos

- (LPS) *in situ*, lo que puede constituir una ventaja sobre otras formas de administración, tales como la microencapsulación. Además, el uso de la ruta de entrada natural resulta beneficioso ya que muchas bacterias, como Salmonella, salen de la luz intestinal a través de las células M de los parches de Peyer y eventualmente migran hacia los ganglios linfáticos y el bazo, lo que permite dirigir las vacunas a sitios inductivos del sistema inmune. Se ha demostrado que la cepa de vacuna de Salmonella typhi, Ty21a, hasta la fecha tiene un excelente perfil de seguridad. Al salir de la luz intestinal a través de las células M, las bacterias son captadas por las células fagocíticas, tales como los macrófagos y las células dendríticas. Estas células son activadas por el patógeno y comienzan a diferenciarse, y probablemente migran hacia los ganglios linfáticos y el bazo. Debido a sus mutaciones atenuantes, las bacterias de la cepa S. typhi Ty21 no pueden persistir en estas células fagocíticas, y mueren en este momento. Las moléculas de ADN recombinante se liberan y posteriormente se transfieren al citosol de las células inmunes fagocíticas, ya sea a través de un sistema de transporte específico o por filtración endosómica. Finalmente, las moléculas de ADN recombinante entran en el núcleo, donde se transcriben, dando lugar a la expresión de MSLN en el citosol de las células fagocíticas. Las células T citotóxicas específicas contra MSLN son inducidas por las células presentadoras de antígeno activadas.
- No hay datos disponibles hasta la fecha que indiquen que S. typhi Ty21a sea capaz de entrar en el torrente sanguíneo sistémicamente. La cepa de vacuna viva atenuada Salmonella typhi Ty21a permite, por lo tanto, el direccionamiento específico al sistema inmune mientras exhibe un excelente perfil de seguridad. Por el contrario, las vacunas de ADN basadas en adenovirus pueden tener un riesgo inherente de replicación viral no intencionada.
- Los derivados atenuados de Salmonella enterica son atractivos como vehículos para la administración de antígenos heterólogos al sistema inmunitario de los mamíferos porque las cepas de S. enterica pueden administrarse potencialmente a través de rutas mucosales de inmunización, es decir, por vía oral o nasal, lo que ofrece ventajas de simplicidad y seguridad en comparación con la administración parenteral. Además, las cepas de Salmonella incitan fuertes respuestas inmunes humorales y celulares a nivel de los compartimientos tanto sistémicos como mucosales.
- La cepa mutante atenuada de Salmonella es para uso como vacuna en la inmunoterapia del cáncer.
- En realizaciones particulares, la inmunoterapia del cáncer comprende además la administración de una o más cepas mutantes atenuadas adicionales de Salmonella que comprenden al menos una copia de una molécula de ADN recombinante que comprende un casete de expresión que codifica un antígeno tumoral y/o un antígeno de estroma tumoral. En realizaciones particulares, dicha una o más cepas mutantes adicionales de Salmonella son Salmonella typhi Ty21a que comprende un casete de expresión eucariota. En realizaciones particulares, dicha una o más cepas adicionales de Salmonella comprenden una cepa mutante atenuada de Salmonella que codifica VEGFR-2 humano y/o Proteína de Tumor de Wilms humano (WT1).
- La combinación de la cepa mutante atenuada de Salmonella de la presente invención con una segunda cepa mutante atenuada que comprende una molécula de ADN que codifica un segundo antígeno tumoral puede tener efectos antitumorales sinérgicos. En particular, el direccionamiento simultáneo a diferentes antígenos tumorales puede minimizar el riesgo de escape tumoral. La combinación de la inmunoterapia del cáncer basada en MSLN con la inmunoterapia basada en VEGFR-2 puede mostrarse especialmente efectiva, ya que se atacan al mismo tiempo las células tumorales que sobreexpresan MSLN y la vasculatura tumoral.
- En realizaciones particulares, la cepa mutante atenuada de Salmonella se coadministra con dicha una o más cepas mutantes atenuadas adicionales de Salmonella.
- En el contexto de la presente invención, el término "coadministración" o "coadministrar" significa la administración de dos cepas mutantes atenuadas diferentes de Salmonella en tres días consecutivos, más particularmente, en dos días consecutivos, más particularmente, el mismo día, más particularmente en 12 horas. Más particularmente, en el contexto de la presente invención, el término "coadministración" se refiere a la administración simultánea de dos cepas mutantes atenuadas diferentes de Salmonella.
- En realizaciones particulares, la inmunoterapia del cáncer se acompaña de quimioterapia, radioterapia o terapia biológica del cáncer. Para la cura del cáncer, puede ser esencial la erradicación completa de las células madre del cáncer. Para una eficacia máxima, puede ser beneficiosa una combinación de diferentes estrategias terapéuticas.
- En el contexto de la presente invención, el término "terapia biológica del cáncer" se refiere a la terapia del cáncer que implica el uso de organismos vivos, sustancias derivadas de organismos vivos o versiones producidas en el laboratorio de dichas sustancias. Algunas terapias biológicas para el cáncer tienen como objetivo estimular el sistema inmunitario del cuerpo para que actúe contra las células cancerosas (llamada inmunoterapia biológica del cáncer). Las estrategias de terapia biológica del cáncer incluyen la administración de antígenos tumorales, la administración de anticuerpos terapéuticos como fármacos, la administración de citoquinas inmunoestimulantes y la administración de células inmunes. Los anticuerpos terapéuticos incluyen anticuerpos dirigidos a antígenos tumorales o antígenos de estroma tumoral, así como anticuerpos que funcionan como inhibidores de puntos de control, tales como anti-PD-1, anti-PD-L1 y anti-CTLA4.
- Los agentes quimioterapéuticos que se pueden usar en combinación con la cepa mutante atenuada de Salmonella de la presente invención pueden ser, por ejemplo: gemcitabina, amifostina (etiol), cabazitaxel, cisplatino, dacarbazina

- (DTIC), dactinomicina, docetaxel, mecloretamina, estreptozocina, ciclofosfamida, carnustina (BCNU), lomustina (CCNU), doxorubicina (adriamicina), doxorubicina lipo (doxil), ácido folínico, gemcitabina (gemzar), daunorubicina, daunorubicina lipo (daunoxoma), procarbazona, ketokonazol, mitomicina, citarabina, etopósido, metotrexato, 5-fluorouracilo (5-FU), vinblastina, vincristina, bleomicina, paclitaxel (taxol), docetaxel (taxotere), aldesleucina, asparaginasa, busulfán, carboplatino, cladribina, camptotecina, CPT-11, 10-hidroxi-7-etil-camptotecina (SN38), dacarbazina, floxuridina, fludarabina, hidroxiaurea, ifosfamida, idarrubicina, mesna, interferón alfa, interferón beta, irinotecán, mitoxantrona, topotecán, leuprolido, megestrol, melfalán, mercaptopurina, oxaliplatino, plicamicina, mitotano, pegaspargasa, pentostatina, pipobromano, plicamicina, estreptozocina, tamoxifeno, tenipósido, testolactona, tioguanina, tiotepa, mostaza de uracilo, vinorelbina, clorambucilo y combinaciones de los mismos.
- 5
- 10 Los agentes quimioterapéuticos más preferidos de acuerdo con la invención en combinación con VXM04 son cabazitaxel, carboplatino, oxaliplatino, cisplatino, ciclofosfamida, docetaxel, gemcitabina, doxorubicina, paclitaxel (taxol), irinotecán, vincristina, vinblastina, vinorelbina, ácido folínico, 5-fluorouracilo y bleomicina, especialmente gemcitabina.
- 15 También puede ser favorable dependiendo de la aparición de posibles efectos secundarios, incluir un tratamiento con antibióticos o agentes antiinflamatorios.
- En el caso en el que ocurran eventos adversos que se parezcan a reacciones de hipersensibilidad mediadas por histamina, leucotrienos o citoquinas, están disponibles opciones de tratamiento para la fiebre, anafilaxia, inestabilidad de la presión arterial, broncoespasmo y disnea. Las opciones de tratamiento en el caso de autoagresión derivada de células T no deseada se derivan de esquemas de tratamiento estándar en la enfermedad de injerto contra huésped aguda y crónica aplicada después del trasplante de células madre. Se proponen ciclosporina y glucocorticoides como opciones de tratamiento.
- 20
- En el caso improbable de infección sistémica por el tipo de Salmonella typhi Ty21a, se recomienda una terapia antibiótica apropiada, por ejemplo, con fluoroquinolonas que incluyen ciprofloxacina u ofloxacina. Las infecciones bacterianas del tracto gastrointestinal deben tratarse con agentes respectivos, tales como la rifaximina.
- 25 En realizaciones particulares, la cepa mutante atenuada de Salmonella se administra durante la quimioterapia o el ciclo de tratamiento de radioterapia o durante la terapia biológica del cáncer.
- En realizaciones particulares, la cepa mutante atenuada de Salmonella se administra antes de la quimioterapia o del ciclo de tratamiento de radioterapia o antes de la terapia biológica del cáncer. Esta estrategia puede tener la ventaja de que la quimioterapia o la radioterapia se pueden realizar en condiciones de inmunidad frente al cáncer potenciada.
- 30 En realizaciones particulares, la cepa mutante atenuada de Salmonella se administra después de la quimioterapia o del ciclo de tratamiento de radioterapia o después de la terapia biológica del cáncer.
- En realizaciones particulares, la cepa mutante atenuada de Salmonella se administra por vía oral. La administración oral es más simple, segura y cómoda que la administración parenteral. En contraste, la administración intravenosa de vacunas bacterianas vivas tales como la vacuna de mesotelina basada en Listeria monocytogenes descrita en Dung et al. (Clin Cancer Res, 2012) inicialmente causa una bacteriemia asociada con riesgos de seguridad del tipo sepsis. Por lo tanto, la administración intravenosa de vacunas bacterianas vivas requiere una observación cuidadosa y una monitorización de los síntomas clínicos, tales como la liberación de citoquinas. La administración oral de la cepa mutante atenuada para el uso de la presente invención puede superar, al menos en parte, los riesgos descritos. Sin embargo, debe observarse que la cepa mutante atenuada de Salmonella para el uso de la presente invención también puede administrarse por cualquier otra ruta adecuada. Preferiblemente, se administra una dosis terapéuticamente efectiva al sujeto, y esta dosis depende de la aplicación particular, del tipo de malignidad, del peso, la edad, el sexo y el estado de salud del sujeto, de la forma de administración y la formulación, etc. La administración puede ser única o múltiple, según se requiera.
- 35
- 40
- 45 La cepa mutante atenuada de Salmonella para uso de la presente invención se puede proporcionar en la forma de una disolución, una suspensión, liofilizado o cualquier otra forma adecuada. Se puede proporcionar en combinación con vehículos, diluyentes y/o excipientes farmacéuticamente aceptables. También se pueden incluir agentes para ajustar el valor del pH, tampones, agentes para ajustar la toxicidad y similares. En el contexto de la presente invención, el término "farmacéuticamente aceptable" se refiere a entidades moleculares y otros ingredientes de composiciones farmacéuticas que son fisiológicamente tolerables y que típicamente no producen reacciones adversas cuando se administran a un mamífero (p. ej., un ser humano). El término "farmacéuticamente aceptable" también puede significar aprobado por una agencia reguladora de un gobierno federal o estatal o enumerado en la Farmacopea de EE. UU. u otra farmacopea generalmente reconocida para su uso en mamíferos y, más particularmente, en seres humanos.
- 50
- 55 En realizaciones particulares, el cáncer se selecciona de mesoteliomas, cánceres de ovario y pancreático, carcinomas de células escamosas del cuello uterino, cabeza y cuello, vulva, pulmón y esófago, adenocarcinomas de pulmón, carcinomas endometriales, sarcomas sinoviales bifásicos, tumores desmoplásicos de células pequeñas y redondas y adenocarcinomas gástricos.
- La vacuna para el uso de la presente invención es sorprendentemente efectiva a dosis relativamente bajas. En

realizaciones particulares, la dosis única es de aproximadamente 10^5 a aproximadamente 10^{11} , particularmente de aproximadamente 10^6 a aproximadamente 10^{10} , más particularmente de aproximadamente 10^6 a aproximadamente 10^9 , más particularmente de aproximadamente 10^6 a aproximadamente 10^8 , lo más particularmente de aproximadamente 10^6 a aproximadamente 10^7 unidades formadoras de colonias (UFC). La administración de dosis bajas de esta vacuna bacteriana viva minimiza el riesgo de excreción y, por lo tanto, de transmisión a terceros.

En este contexto, el término "alrededor de" o "aproximadamente" significa dentro de un factor de 3, alternativamente dentro de un factor de 2, incluido dentro de un factor de 1,5 de un valor o rango dado.

En realizaciones particulares, la cepa mutante atenuada de Salmonella es para uso en inmunoterapia del cáncer individualizada que comprende la etapa de evaluar el patrón de expresión de MSLN y/o la respuesta preinmune contra MSLN de un paciente.

VXM04 se puede usar - ya sea solo o en combinación con otras vacunas contra el cáncer basadas en Salmonella typhi Ty21a que comprenden sistemas de expresión eucariotas - para el tratamiento de varios tipos de cáncer. En realizaciones particulares, VXM04 se puede usar para el tratamiento individualizado del cáncer específico del paciente. Para este propósito, puede evaluarse el patrón de expresión de antígenos tumorales y/o estromal del paciente y/o las respuestas preinmunes del paciente contra los antígenos tumorales y/o estromales en una primera etapa, por ejemplo, mediante diagnósticos complementarios dirigidos al patrón de antígenos tumorales y/o estromales específicos del paciente. Dependiendo del patrón de expresión de los antígenos tumorales y/o estromales del paciente o de las respuestas preinmunes del paciente contra los antígenos tumorales y/o estromales, VMX04 puede administrarse bien solo o en combinación con una o más vacunas adecuadas contra el cáncer basadas en Salmonella typhi Ty21a adicionales que comprenden sistemas de expresión eucariotas. Sin embargo, las combinaciones de VXM04 con una o más vacunas adicionales contra el cáncer basadas en Salmonella typhi Ty21a también se pueden administrar como combinaciones fijas. Estas mezclas que combinan dos o más vacunas contra el cáncer basadas en Salmonella typhi Ty21a pueden estar compuestas por productos comerciales independientes. Las combinaciones, ya sean fijas o individualizadas, pueden contener VXM01 (WO 2013/091898) como terapia de base antiangiogénica.

Breve descripción de las figuras y tablas

Figura 1: secuencia de aminoácidos de MSLN humana codificada por el ADNc de MSLN contenido en el plásmido pVAX10.hMSLN

Figura 2: secuencia de ácido nucleico de pVAX10.hMSLN

Figura 3: mapa del plásmido de pVAX10.hMSLN

Figura 4: porcentajes de células CD8+ mesoespecíficas en bazo de ratones C57Bl/6 sanos detectados por MSLN-GSL-Penta. Se muestran porcentajes individuales de la totalidad de los ratones tratados con VXM-04m vacío en comparación con la totalidad de los ratones tratados con VXM-04m.

Figura 5: porcentajes de células CD8+ mesoespecíficas en bazo de ratones C57Bl/6 sanos detectados por MSLN-GSL-Penta. Se muestran porcentajes individuales divididos de acuerdo con los grupos de tratamiento.

Figura 6: porcentajes de células CD8+ mesoespecíficas en bazo de ratones C57Bl/6 sanos detectados por MSLN-GSL-Penta. Se muestran porcentajes individuales divididos de acuerdo con los grupos de tratamiento.

Figura 7: porcentajes de células CD8+ mesoespecíficas en bazo de ratones C57Bl/6 sanos detectados por MSLN-IQL-Penta. Se muestran porcentajes individuales de la totalidad de los ratones tratados con VXM-04m vacío en comparación con la totalidad de los ratones tratados con VXM-04m.

Figura 8: porcentajes de células CD8+ mesoespecíficas en bazo de ratones C57Bl/6 sanos detectados por MSLN-IQL-Penta. Se muestran porcentajes individuales divididos de acuerdo con los grupos de tratamiento.

Figura 9: porcentajes de células CD8+ mesoespecíficas en bazo de ratones C57Bl/6 sanos detectados por MSLN-IQL-Penta. Se muestran porcentajes individuales divididos de acuerdo con los grupos de tratamiento.

Tabla 1: pentámeros de MHC recombinantes Pro5® usados en el análisis de pentámeros.

Ejemplos

Ejemplo 1: preparación de los plásmidos recombinantes pVAX10.mMSLN y pVAX10.hMSLN

La MSLN humana (1893 pb, secuencia de MSLN según la secuencia de referencia NCBI NM_013404.4) y la MSLN murina (1878 pb, secuencia de MSLN según la secuencia de referencia NCBI NM_018857.1) se clonaron en el esqueleto de pVAX10 derivado de pVAX10.VR2-1. Los fragmentos de ADN de MSLN se generaron mediante síntesis de genes de doble cadena, donde los oligonucleótidos se unieron entre sí usando una ligasa termoestable. Los productos de ligación obtenidos se amplificaron por PCR. Tras la amplificación, los fragmentos de ADN sintetizados *in vitro* de MSLN humana y murina se clonaron en el esqueleto de pVAX10 a través de *NheI/XhoI* (la región codificadora

de VEGFR-2 del plásmido recombinante pVAX10.VR2-1 fue reemplazada por MSLN humana o murina). Para el control de calidad, los plásmidos completos se secuenciaron y se alinearon con la secuencia de referencia respectiva después de la transformación en *E. coli*. Se mostró que ambas secuencias carecían de errores. Los plásmidos resultantes se designaron pVAX10.mMSLN y pVAX10.hMSLN.

5 Ejemplo 2: transformación de cepas atenuadas de Salmonella con los plásmidos recombinantes:

S. typhi Ty 21a se transformó con el plásmido pVAX10.hMSLN. *S. typhimurium* SL7207 (aroA⁻) se transformó con el plásmido pVAX10.mMSLN. La transformación se realizó por electroporación.

Preparación de células competentes de Salmonella:

10 Se inocularon cultivos de glicerol de *S. typhi* Ty21a y *S. typhimurium* SL7207 en placas LB (peptona de soja libre de componentes animales [ACF]). Las placas se incubaron a 37 °C toda la noche. Se usó una colonia de cada una para el precultivo líquido de toda la noche. Se incubaron 3 ml de medio LB (peptona de soja ACF) inoculados con una colonia cada uno a 37 °C y 180 rpm toda la noche. Para preparar células competentes, se inocularon 2 x 300 ml de medio LB (peptona de soja ACF) con 3 ml del cultivo de toda la noche y se incubaron a 37 °C y 180 rpm hasta una DO₆₀₀ de aproximadamente 0,5. Los cultivos se pusieron entonces en hielo durante 10 minutos. Posteriormente, las bacterias se centrifugaron durante 10 minutos a 3.000xg a 4 °C y cada sedimento se resuspendió en 500 mL de H₂O_{dest} enfriada en hielo. Después de una nueva etapa de centrifugación, los sedimentos bacterianos se lavaron dos veces en glicerol al 10% enfriado en hielo. Ambos sedimentos se juntaron en 2 ml de glicerol al 10% y, finalmente, se congelaron en partes alícuotas de 50 µL en hielo seco. El glicerol usado no contenía ningún ingrediente animal (Sigma Aldrich, G5150).

20 Transformación de células competentes de Salmonella:

Para cada reacción de transformación, se descongeló una parte alícuota de 50 µl de células competentes en hielo durante 10 minutos. Después de añadir 3-5 µL de ADN de plásmido (pVAX10.hMSLN para las células competentes de *S. typhi* Ty21a y pVAX10.mMSLN para las células competentes de *S. typhimurium* SL7207), las mezclas se incubaron en hielo durante cinco minutos. Posteriormente, las mezclas se transfirieron a cubetas preenfriadas (1 mm de espesor). El pulso eléctrico se llevó a cabo a 12,5 kV/cm. Inmediatamente después, se añadió 1 ml de medio LB (peptona de soja ACF) a las células, las células se transfirieron a un tubo Eppendorf de 2 ml y se agitaron durante 1 hora a 37 °C. Después de una etapa de centrifugación corta en una centrifuga de mesa (16.600 rcf, 20 s), el sedimento bacteriano se resuspendió en 200 µl de medio LB (soja peptona ACF) sin antibióticos. Las mezclas se aplicaron con una espátula Drigalski en placas de LB (peptona de soja ACF) que contenía kanamicina (concentración = 25 µg/ml o 50 µg/ml). Las placas se incubaron a 37 °C toda la noche.

Preparación de plásmidos de clones de Salmonella recombinantes:

Se incubaron tres clones de cada cepa de Salmonella recombinante toda la noche en 3 ml de medio LB (peptona de soja ACF) que contenía kanamicina (50 µg/ml) a 37 °C. El cultivo bacteriano se sedimentó entonces por centrifugación (16.600 rcf, 30 s). El aislamiento del plásmido se realizó usando el kit de plásmido NucleoSpin de Macherey-Nagel. El ADN del plásmido se eluyó de las columnas de gel de sílice con 50 µl de agua. Se usaron 5 µl del eluato en la electroforesis en gel de agarosa para el control.

Para el almacenamiento a largo plazo, se produjeron cultivos de glicerol de 1ml de los clones positivos. Para este propósito, se añadieron 172 µl de glicerol (sin ingredientes animales) a 828 µl de medio de un cultivo en crecimiento logarítmico de 3 ml en 1 microtubo con tapón de rosca de pocos ml. Las muestras se almacenaron a -70 °C hasta su uso posterior.

Secuenciación completa del ADN plasmídico recombinante aislado de Salmonella:

Se inocularon 3ml de medio líquido LB-Kan (peptona de soja ACF) con una colonia de Salmonella recombinante (*S. typhi* Ty21a que porta pVAX10.hMSLN y *S. typhimurium* SL7207 que porta pVAX10.mMSLN) y se incubaron toda la noche a 37 °C y 180 rpm. El cultivo de toda la noche se sedimentó por centrifugación a 1.300 rpm durante 30 s en una centrifuga de mesa (Biofuge pico, Heraeus). El aislamiento del plásmido se realizó con el kit de plásmido NucleoSpin de Macherey-Nagel. Después de la lisis alcalina y la precipitación de ADN genómico de alto peso molecular y componentes celulares, el ADN plasmídico se cargó en columnas con una membrana de sílice. Después de una etapa de lavado, los plásmidos se eluyeron de la columna con 50 µl de agua estéril y se secuenciaron. Las secuencias se compararon entonces con la secuencia de referencia respectiva mediante alineamientos específicos de clones, es decir, las secuencias de plásmidos de cada clon de Salmonella se alinearon una por una con la secuencia de referencia. Todas las secuencias estaban en línea con las secuencias de referencia respectivas. Las cepas de Salmonella recombinantes se designaron VXM04 (*S. typhi* Ty21a que porta el plásmido pVAX10.hMSLN) y VXM04m (*S. typhimurium* SL7207 que porta el plásmido pVAX10.mMSLN).

Ejemplo 3: evaluación de la inmunocinética de VXM04m en ratones C57Bl/6 sanos

55 La cinética de la activación inmune específica contra la Mesotelina murina en ratones C57Bl/6 sanos se evaluó

mediante análisis de pentámeros y ELISpot. Como control negativo, se incluyó un grupo de control de vector (que recibió VXM04m-vacío = *Salmonella typhimurium* que no contiene plásmido de expresión) en la configuración del estudio para discriminar el efecto inmunológico deseado de cualquier estimulación de fondo inespecífica causada por el vector vacío de *Salmonella*. La monitorización inmune se llevó a cabo en D5, D7, D10, D14 y D21 después de la vacunación después de la vacunación 4 veces cada dos días con VXM04m y VXM04m vacío (cada uno 10^{10} UFC/dosis).

1. Mantenimiento de los animales

Se obtuvieron 52 ratones hembra C57Bl/6 sanos, de 6 semanas de edad en la recepción, de JANVIER (Le Genest St Isle, Francia) y se observaron durante 7 días en una unidad de cuidado de animales libre de patógenos específicos (SPF) antes de comenzar el procedimiento. Los animales se mantuvieron en habitaciones bajo condiciones controladas de temperatura (23 ± 2 °C), humedad ($45 \pm 10\%$), fotoperiodo (12 h de luz/12 h de oscuridad) e intercambio de aire. Los animales se mantuvieron en condiciones SPF. La temperatura ambiente y la humedad se monitorizaron continuamente. El sistema de tratamiento de aire se programó para 14 cambios de aire/hora, sin recirculación. Se pasó aire exterior fresco a través de una serie de filtros, antes de ser difundido uniformemente en cada habitación. Se mantuvo una presión positiva (20 ± 4 Pa) en la sala de experimentación para evitar la contaminación o la propagación de patógenos dentro de una colonia de roedores. Los animales se estabularon en jaulas de policarbonato (Techniplast, Limonest, Francia) que estaban equipadas para proporcionar alimento y agua. Las jaulas con área estándar usadas tenían 800 cm² con un máximo de 10 ratones por jaula (del mismo grupo). Las camas para los animales fue cama de mazorca de maíz estéril (ref: LAB COB 12, SERLAB, Cergy-Pontoise, Francia), reemplazadas dos veces por semana. Se adquirió madera para animales en DIETEX (Saint-Gratien, Francia). Se usó RM1 irradiada como gránulos controlados estériles. Se proporcionaron alimentos *ad libitum* a partir de botellas de agua equipadas con tapones de goma y tubos de presión. Las botellas de agua se esterilizaron por filtración estéril y se reemplazaron dos veces por semana. En D0, 50 ratones de 52 se distribuyeron de acuerdo con su peso corporal individual en 2 grupos de 25 ratones cada uno usando el software Vivo manager® (Biosystemes, Couteron, Francia). El peso corporal medio de ambos grupos no fue estadísticamente diferente (análisis de varianza).

2. Programa de tratamiento

Los ratones de los grupos 1 a 5 recibieron administraciones de VXM04m-vacío, los animales de los grupos 6 a 10 recibieron administraciones de VXM04m. Tanto VXM04m-vacío como VXM04m se descongelaron y administraron en 30 min, las disoluciones de trabajo se descartaron después de su uso. La dosis de tratamiento de VXM04m-vacío y VXM04m fue de 10^{10} UFC en 100 µl por administración. VXM04m-vacío y VXM04m se administraron mediante sonda oral (*per os*, PO) a través de una cánula con un volumen de 0,1 ml. Independientemente de los grupos de animales, cada animal recibió un tampón de aplicación previo a la dosis para neutralizar el ácido en el estómago antes de la dosificación (100 µl/animal/aplicación). Así, el tampón estaba compuesto por la disolución de 2,6 g de hidrógenocarbonato de sodio, 1,7 g de ácido L-ascórbico, 0,2 g de monohidrato de lactosa en 100 ml de agua potable y se aplicó dentro de los 30 min previos a la aplicación de VXM04m-vacío y VXM04m. El programa de tratamiento fue el siguiente:

Los ratones de los grupos 1 a 5 recibieron administraciones diarias PO de VXM04m-vacío a 10^{10} en UFC cada dos días durante cuatro veces consecutivas (Q2Dx4).

Los ratones de los grupos 6 a 10 recibieron administraciones diarias PO de VXM04m a 10^{10} en UFC cada dos días durante cuatro veces consecutivas (Q2Dx4).

3. Monitorización y sacrificio de los animales.

La viabilidad y el comportamiento de los animales se registraron todos los días, los pesos corporales se midieron dos veces por semana.

Independientemente de la vacuna de *Salmonella* administrada, los ratones se sacrificaron después de 5 (grupos 1 y 6), 7 (grupos 2 y 7), 10 (grupos 3 y 8), 14 (grupos 4 y 9) y 21 (grupos 5 y 10) días después de la fase de vacunación (5 ratones por grupo de animales y punto de tiempo). Se usó isoflurano (Baxter, Francia) para anestesiarse a los animales antes del sacrificio. Los animales se sacrificaron por dislocación cervical. Se realizó una autopsia (examen macroscópico de corazón, pulmones, hígado, bazo, riñones y tracto gastrointestinal) en todos los animales sacrificados. En el momento del sacrificio de los ratones, se recogieron los bazos y se colocaron individualmente en tubos únicos etiquetados con ID que contenían PBS enfriado ($2-8$ °C) cada uno y se almacenaron toda la noche a $2-8$ °C. Se usaron esplenocitos recién aislados y purificados para el análisis de pentámeros. Se usaron células CD8+ recién preparadas para el análisis ELISpot.

4. Preparación de los esplenocitos

La preparación de los esplenocitos se realizó de la siguiente manera: en una etapa de lavado, una parte del PBS se desechó y se reemplazó por PBS nuevo. Se enganchó un filtro celular de nilón de 100 µm (BD Falcon) en la abertura de un Falcon de 50 ml que contenía 5 ml de $1 \times$ PBS. Los bazos se cortaron con un escalpelo y se empujaron entonces a través del filtro celular con el sello de una jeringa de 5 ml. Se usó un filtro por bazo, el filtro siempre se enjuagó

entremedias con 1 x PBS estéril. Las células se centrifugaron a 1.500 rpm (aproximadamente 450 g) durante 10 min a 2-8 °C y se descartó el sobrenadante. Se añadió 1 ml de tampón ACK-Ery-Lysis (8,3 g/l de NH₄, 1g/l de KHCO₃, 0,037 g/l de EDTA; pH 7,2 - 7,4) por bazo para lisar los glóbulos rojos. La disolución se incubó durante 30 seg a RT. Se añadieron 10 ml de PBS y las células se centrifugaron nuevamente a 1.500 rpm durante 10 min a 2-8 °C, se descartó el sobrenadante. El sedimento se resuspendió en 10 ml de medio DMEM. La tinción de células vivas/muertas se realizó con azul de tripán y se contó el número de células. La suspensión celular se dividió para los análisis posteriores. Aproximadamente un tercio se usó para el análisis de pentámeros, el resto se usó para el análisis ELISpot.

5. Análisis de pentámeros

El análisis de pentámeros incluyó una tinción de viabilidad y la tinción de pentámeros. Para la tinción de viabilidad, un vial del colorante reactivo fluorescente (Naranja del Pacífico - componente A) y el vial de DMSO anhidro (componente B) se llevaron a temperatura ambiente antes de retirar las tapas. Se añadieron 50 µl de DMSO (componente B) al vial de colorante reactivo (componente A). Posteriormente, el pocillo se mezcló y se confirmó visualmente que todo el colorante se había disuelto. La disolución de colorante reactivo se usó sin demora, a las pocas horas de la reconstitución. La suspensión de células que contenía al menos 1 x 10⁶ células se centrifugó y se descartó el sobrenadante. Las células se lavaron una vez con 1 ml de PBS y se resuspendieron en 1 ml de PBS. Las células se contaron y la densidad se ajustó con PBS a 1 x 10⁶ células en un volumen de 1 ml. Se añadió 1 µl del colorante reactivo fluorescente reconstituido a 1 ml de la suspensión celular. La suspensión se mezcló entonces concienzudamente y se incubó a temperatura ambiente durante 30 min, protegida de la luz. Las células se lavaron una vez con 1 ml de PBS con suero fetal de ternera (FCS) al 1% y se resuspendieron en 1 ml de PBS con FCS al 1%.

Para la tinción de pentámeros, se usaron esplenocitos previamente marcados con Naranja del Pacífico para la activación de la viabilidad. Los pentámeros de MHC recombinantes Pro5® usados se enumeran en la siguiente Tabla 1:

Descripción de pentámeros incluyendo la secuencia	Nomenclatura de los pentámeros	Posición de inicio de mMesotelina
Pentámero de MHC Pro5 no marcado H-2Db GQKMNAQAI Mesotelina	MSLN-GAI-Penta	406
Pentámero de MHC Pro5 no marcado H-2Kb ACAHFFSL Mesotelina	MSLN-ASL-Penta	138
Pentámero de MHC Pro5 no marcado H-2Kb CSRSFLLL Mesotelina	MSLN-CLL-Penta	18
Pentámero de MHC Pro5 no marcado H-2Kb GAADFASL Mesotelina	MSLN-GSL-Penta	54
Pentámero de MHC Pro5 no marcado H-2Kb IPFTYEQL Mesotelina	MSLN-IQL-Penta	344
Etiqueta fluorescente Pro5 R-PE		

Los Pentámeros Pro5® se centrifugaron en microcentrífuga enfriada a 14.000xg durante 5-10 minutos para recoger los agregados de proteínas presentes en la disolución en el fondo del vial con el fin de evitar la tinción no específica. El sobrenadante se usó para la tinción de pentámeros. Todos los reactivos se mantuvieron en hielo, protegidos de la luz, hasta que se requirieron. Se asignaron 1x10⁶ esplenocitos por condición de tinción. Las células se lavaron con 2 ml de tampón de lavado (PBS con FCS al 1%) y se centrifugaron (500 x g durante 5 minutos), el sobrenadante se desechó y las células se resuspendieron en el volumen residual (~ 50 µl).

Los tubos se mantuvieron fríos en hielo para todas las etapas posteriores, excepto cuando se indique otra cosa. Se añadió un ensayo (2 µl) de pentámero sin marcar a las células y la disolución se mezcló por pipeteo y se incubó a temperatura ambiente (22 °C) durante 10 min, protegida de la luz. Las células se lavaron entonces con 2 ml de tampón de lavado y se resuspendieron en el líquido residual (~ 50 µl). Se centrifugó la etiqueta fluorescente Pro5® R-PE en una microcentrífuga enfriada a 14.000 x g durante 3 minutos para eliminar los agregados de proteínas que de otro modo contribuirían a la unión no específica. Los reactivos se mantuvieron en hielo, protegidos de la luz, hasta que se requirieron. El sobrenadante se usó para la tinción de pentámero. Se añadieron 8 µl de etiqueta fluorescente Pro5® y 1 µl de anti-CD8 FITC y 0,5 µl de anticuerpos anti-CD3 APC/Cy-7 y la disolución se mezcló por pipeteo. Las muestras se incubaron en hielo durante 20 minutos, protegidas de la luz. Las células se lavaron dos veces con 2 ml de tampón de lavado y cada tubo se mezcló. Se añadieron 200 µl de disolución de fijación (FCS al 1%, formaldehído al 2,5% en PBS) y los tubos se agitaron con vórtex. La agitación con vórtex concienzuda era importante para evitar la formación de agregados celulares. Los tubos se almacenaron en la oscuridad en el refrigerador hasta que estuvieran listos para la adquisición de datos. En cualquier caso, las muestras se dejaron durante 3 horas antes de proceder con la

adquisición de datos debido a cambios en la morfología después de la fijación.

5 Se investigó la unión específica a pentámeros de cada uno (fabricado por Proimmune). Se contaron las células T CD8+ específicas de mMesotelina después de seleccionar las ventanas apropiadas. Las relaciones de células T CD8+ específicas de mMesotelina se calcularon sobre la base de la afinidad de unión a los pentámeros. Las relaciones se compararon entre el grupo de VXM04m y el grupo de control de VXM04m-vacío y dentro de los grupos a lo largo del tiempo. Todos los análisis estadísticos se realizaron usando el software Vivo manager® (Biosystems, Dijon, Francia). Un valor de $p < 0,05$ se consideró significativo. Los porcentajes individuales de las células CD8+ mesoespecíficas se presentan en las Figuras 4 - 9. Las Figuras 4 a 6 representan las células CD8+ mesoespecíficas detectadas por MSLN-GSL-Penta; las figuras 7 a 9 representan las células CD8+ mesoespecíficas detectadas por MSLN-IQL-Penta. La cinética inmune (valores medios) alcanzó su punto máximo a los 10 días después de la vacunación. El porcentaje de células CD8+ mesoespecíficas en el día 10 aumentó significativamente en comparación con el grupo control, independientemente de los pentámeros usados.

Listado de secuencias

- 15 <110> Vaximm GmbH
- <120> Nueva vacuna de ADN dirigida a MSLN para la inmunoterapia del cáncer
- <130> 110154P885PC
- 20 <160> 2
- <170> PatentIn versión 3.5
- 25 <210> 1
- <211> 630
- <212> PRT
- <213> Homo sapiens
- 30 <400> 1

ES 2 747 772 T3

Met Ala Leu Pro Thr Ala Arg Pro Leu Leu Gly Ser Cys Gly Thr Pro
1 5 10 15

Ala Leu Gly Ser Leu Leu Phe Leu Leu Phe Ser Leu Gly Trp Val Gln
20 25 30

Pro Ser Arg Thr Leu Ala Gly Glu Thr Gly Gln Glu Ala Ala Pro Leu
35 40 45

Asp Gly Val Leu Ala Asn Pro Pro Asn Ile Ser Ser Leu Ser Pro Arg
50 55 60

Gln Leu Leu Gly Phe Pro Cys Ala Glu Val Ser Gly Leu Ser Thr Glu
65 70 75 80

Arg Val Arg Glu Leu Ala Val Ala Leu Ala Gln Lys Asn Val Lys Leu
85 90 95

Ser Thr Glu Gln Leu Arg Cys Leu Ala His Arg Leu Ser Glu Pro Pro
100 105 110

Glu Asp Leu Asp Ala Leu Pro Leu Asp Leu Leu Leu Phe Leu Asn Pro
115 120 125

Asp Ala Phe Ser Gly Pro Gln Ala Cys Thr Arg Phe Phe Ser Arg Ile
130 135 140

Thr Lys Ala Asn Val Asp Leu Leu Pro Arg Gly Ala Pro Glu Arg Gln
145 150 155 160

Arg Leu Leu Pro Ala Ala Leu Ala Cys Trp Gly Val Arg Gly Ser Leu
165 170 175

Leu Ser Glu Ala Asp Val Arg Ala Leu Gly Gly Leu Ala Cys Asp Leu
180 185 190

Pro Gly Arg Phe Val Ala Glu Ser Ala Glu Val Leu Leu Pro Arg Leu

ES 2 747 772 T3

		195					200	-----					205					
Val	Ser ₂₁₀	Cys	Pro	Gly	Pro	Leu ₂₁₅	Asp	Gln	Asp	Gln	Gln ₂₂₀	Glu	Ala	Ala	Arg			
Ala ₂₂₅	Ala	Leu	Gln	Gly	Gly ₂₃₀	Gly	Pro	Pro	Tyr	Gly ₂₃₅	Pro	Pro	Ser	Thr	Trp ₂₄₀			
Ser	Val	Ser	Thr	Met ₂₄₅	Asp	Ala	Leu	Arg	Gly ₂₅₀	Leu	Leu	Pro	Val	Leu ₂₅₅	Gly			
Gln	Pro	Ile	Ile ₂₆₀	Arg	Ser	Ile	Pro	Gln ₂₆₅	Gly	Ile	Val	Ala	Ala ₂₇₀	Trp	Arg			
Gln	Arg	Ser ₂₇₅	Ser	Arg	Asp	Pro	Ser ₂₈₀	Trp	Arg	Gln	Pro	Glu ₂₈₅	Arg	Thr	Ile			
Leu	Arg ₂₉₀	Pro	Arg	Phe	Arg	Arg ₂₉₅	Glu	Val	Glu	Lys	Thr ₃₀₀	Ala	Cys	Pro	Ser			
Gly ₃₀₅	Lys	Lys	Ala	Arg	Glu ₃₁₀	Ile	Asp	Glu	Ser	Leu ₃₁₅	Ile	Phe	Tyr	Lys	Lys ₃₂₀			
Trp	Glu	Leu	Glu	Ala ₃₂₅	Cys	Val	Asp	Ala	Ala ₃₃₀	Leu	Leu	Ala	Thr	Gln ₃₃₅	Met			
Asp	Arg	Val	Asn ₃₄₀	Ala	Ile	Pro	Phe	Thr ₃₄₅	Tyr	Glu	Gln	Leu	Asp ₃₅₀	Val	Leu			
Lys	His	Lys ₃₅₅	Leu	Asp	Glu	Leu	Tyr ₃₆₀	Pro	Gln	Gly	Tyr	Pro ₃₆₅	Glu	Ser	Val			
Ile	Gln ₃₇₀	His	Leu	Gly	Tyr	Leu ₃₇₅	Phe	Leu	Lys	Met	Ser ₃₈₀	Pro	Glu	Asp	Ile			
Arg ₃₈₅	Lys	Trp	Asn	Val	Thr ₃₉₀	Ser	Leu	Glu	Thr	Leu ₃₉₅	Lys	Ala	Leu	Leu	Glu ₄₀₀			
Val	Asn	Lys	Gly	His ₄₀₅	Glu	Met	Ser	Pro	Gln ₄₁₀	Ala	Pro	Arg	Arg	Pro ₄₁₅	Leu			
Pro	Gln	Val	Ala ₄₂₀	Thr	Leu	Ile	Asp	Arg ₄₂₅	Phe	Val	Lys	Gly	Arg ₄₃₀	Gly	Gln			
Leu	Asp	Lys ₄₃₅	Asp	Thr	Leu	Asp	Thr ₄₄₀	Leu	Thr	Ala	Phe	Tyr ₄₄₅	Pro	Gly	Tyr			
Leu	Cys ₄₅₀	Ser	Leu	Ser	Pro	Glu ₄₅₅	Glu	Leu	Ser	Ser	Val ₄₆₀	Pro	Pro	Ser	Ser			
Ile	Trp	Ala	Val	Arg	Pro	Gln	Asp	Leu	Asp	Thr	Cys	Asp	Pro	Arg	Gln			

ES 2 747 772 T3

465			470				475				480				
Leu	Asp	Val	Leu	Tyr	Pro	Lys	Ala	Arg	Leu	Ala	Phe	Gln	Asn	Met	Asn
			485						490					495	
Gly	Ser	Glu	Tyr	Phe	Val	Lys	Ile	Gln	Ser	Phe	Leu	Gly	Gly	Ala	Pro
			500					505					510		
Thr	Glu	Asp	Leu	Lys	Ala	Leu	Ser	Gln	Gln	Asn	Val	Ser	Met	Asp	Leu
		515					520					525			
Ala	Thr	Phe	Met	Lys	Leu	Arg	Thr	Asp	Ala	Val	Leu	Pro	Leu	Thr	Val
	530					535					540				
Ala	Glu	Val	Gln	Lys	Leu	Leu	Gly	Pro	His	Val	Glu	Gly	Leu	Lys	Ala
545					550					555					560
Glu	Glu	Arg	His	Arg	Pro	Val	Arg	Asp	Trp	Ile	Leu	Arg	Gln	Arg	Gln
				565					570					575	
Asp	Asp	Leu	Asp	Thr	Leu	Gly	Leu	Gly	Leu	Gln	Gly	Gly	Ile	Pro	Asn
			580					585					590		
Gly	Tyr	Leu	Val	Leu	Asp	Leu	Ser	Met	Gln	Glu	Ala	Leu	Ser	Gly	Thr
		595					600					605			
Pro	Cys	Leu	Leu	Gly	Pro	Gly	Pro	Val	Leu	Thr	Val	Leu	Ala	Leu	Leu
	610					615					620				
Leu	Ala	Ser	Thr	Leu	Ala										
625					630										

- <210> 2
- <211> 1893
- <212> ADN
- <213> Homo sapiens

5

<400> 2

atggccttgc caacggctcg acccctgttg gggctctgtg ggacccccgc cctcggcagc	60
ctctgttcc tgctcttcag cctcggatgg gtgcagccct cgaggaccct ggctggagag	120
acagggcagg aggctgcgcc cctggacgga gtcctggcca acccacctaa catttcagc	180
ctctcccctc gccaaactct tggcttcccg tgtgcggagg tgtccggcct gagcacggag	240
cgtgtccggg agctggctgt ggccttgcca cagaagaatg tcaagctctc aacagagcag	300
ctgcgctgtc tggctcaccg gctctctgag ccccccgagg acctggacgc cctcccattg	360
gacctgctgc tattcctcaa cccagatgcg ttctcggggc cccaggcctg caccgtttc	420
ttctcccgca tcacgaaggc caatgtggac ctgctcccga ggggggctcc cgagcgacag	480
cggctgctgc ctgcggctct ggcctgctgg ggtgtgcggg ggtctctgct gagcgaggct	540
gatgtgcggg ctctgggagg cctggcttgc gacctgcctg ggcgctttgt ggccgagtcg	600

10

ES 2 747 772 T3

gccgaagtgc	tgctaccccg	gctggtgagc	tgcccgggac	ccctggacca	ggaccagcag	660
gaggcagcca	gggCGGctct	gcagggcggg	ggacccccct	acggcccccc	gtcgacatgg	720
tctgtctcca	cgatggacgc	tctgcggggc	ctgctgcccg	tgctgggcca	gcccatactc	780
cgcagcatcc	cgcagggcat	cgtggcccg	tggcggcaac	gctcctctcg	ggacccatcc	840
tggcggcagc	ctgaacggac	catcctccgg	ccgcggttcc	ggcgggaagt	ggagaagaca	900
gcctgtcctt	caggcaagaa	ggcccgcgag	atagacgaga	gcctcatctt	ctacaagaag	960
tgggagctgg	aagcctgcgt	ggatgcggcc	ctgctggcca	cccagatgga	ccgcgtgaac	1020
gccatccccct	tcacctacga	gcagctggac	gtcctaaagc	ataaactgga	tgagctctac	1080
ccacaagggtt	accccgagtc	tgtgatccag	cacctgggct	acctcttctt	caagatgagc	1140
cctgaggaca	ttcgcaagtg	gaatgtgacg	tccttgaga	ccctgaaggc	tttgcttgaa	1200
gtcaacaaag	ggcacgaaat	gagtcctcag	gctcctcggc	ggccccctcc	acaggtggcc	1260
acctgatcgc	accgctttgt	gaagggaaag	ggccagctag	acaaagacac	cctagacacc	1320
ctgaccgcct	tctaccctgg	gtacctgtgc	tcctcagcc	ccgaggagct	gagctccgtg	1380
ccccccagca	gcattctggc	ggtcaggccc	caggacctgg	acacgtgtga	cccaaggcag	1440
ctggacgtcc	tctatcccaa	ggcccgcctt	gctttccaga	acatgaacgg	gtccgaatac	1500
ttcgtgaaga	tccagtcctt	cctgggtggg	gccccacgg	aggatttgaa	ggcgctcagt	1560
cagcagaatg	tgagcatgga	cttggccacg	ttcatgaagc	tgcggacgga	tgcggtgctg	1620
ccgttgactg	tggctgaggt	gcagaaactt	ctgggacccc	acgtggaggg	cctgaaggcg	1680
gaggagcggc	accgcccggg	gcgggactgg	atcctacggc	agcggcagga	cgacctggac	1740
acgctggggc	tggggctaca	gggcggcatc	cccaacggct	acctggtcct	agacctcagc	1800
atgcaagagg	ccctctcggg	gacgccctgc	ctcctaggac	ctggacctgt	tctcaccgtc	1860
ctggcactgc	tcctagcctc	caccctggcc	tga			1893

REIVINDICACIONES

1. Una cepa mutante atenuada de Salmonella que comprende al menos una copia de una molécula de ADN recombinante que comprende un casete de expresión eucariota que codifica Mesotelina (MSLN) para uso como una vacuna en la inmunoterapia del cáncer.
- 5 2. La cepa mutante atenuada de Salmonella para uso de la reivindicación 1, en donde la cepa mutante atenuada de Salmonella es Salmonella typhi Ty21a.
3. La cepa mutante atenuada de Salmonella para uso de las reivindicaciones 1 o 2, en donde MSLN tiene la secuencia de aminoácidos como se encuentra en la SEQ ID NO 1.
- 10 4. La cepa mutante atenuada de Salmonella para uso de la reivindicación 3, en donde la molécula de ADN recombinante comprende el gen de resistencia al antibiótico kanamicina, el pMB1 ori y un casete de expresión eucariota que codifica MSLN humana bajo el control de un promotor de CMV, en donde la MSLN humana tiene la secuencia de ácido nucleico como se encuentra en la SEQ ID NO 2.
- 15 5. La cepa mutante atenuada de Salmonella para uso de la reivindicación 4, en donde la inmunoterapia del cáncer comprende además la administración de una o más cepas mutantes atenuadas adicionales de Salmonella que comprenden al menos una copia de una molécula de ADN recombinante que comprende un casete de expresión que codifica un antígeno tumoral y/o un antígeno de estroma tumoral.
6. La cepa mutante atenuada de Salmonella para uso de la reivindicación 5, en donde dicha una o más cepas mutantes atenuadas adicionales de Salmonella comprenden una cepa mutante atenuada de Salmonella que codifica VEGFR-2 humano y/o proteína de tumor de Wilms humano (WT1).
- 20 7. La cepa mutante atenuada de Salmonella para uso de la reivindicación 5 o 6, en donde la cepa mutante atenuada de Salmonella se coadministra con dicha una o más cepas mutantes atenuadas adicionales de Salmonella.
8. La cepa mutante atenuada de Salmonella para uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde la inmunoterapia del cáncer se acompaña de quimioterapia, radioterapia o terapia biológica del cáncer.
- 25 9. La cepa mutante atenuada de Salmonella para uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde la cepa mutante atenuada de Salmonella se administra por vía oral.
10. La cepa mutante atenuada de Salmonella para uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde el cáncer se selecciona de mesoteliomas, cánceres de ovario y pancreático, carcinomas de células escamosas del cuello uterino, cabeza y cuello, vulva, pulmón y esófago, adenocarcinomas de pulmón, carcinomas endometriales, sarcomas sinoviales bifásicos, tumores desmoplásicos de células pequeñas y redondas y adenocarcinomas gástricos.
- 30 11. La cepa mutante atenuada de Salmonella para uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde la dosis única comprende de aproximadamente 10^5 a aproximadamente 10^{11} unidades formadoras de colonias (UFC).
- 35 12. La cepa mutante atenuada de Salmonella para uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en donde es para uso en inmunoterapia individualizada del cáncer, en donde la inmunoterapia individualizada del cáncer comprende la etapa de evaluar el patrón de expresión de MSLN y/o la respuesta preinmune contra MSLN de un paciente.

Figura 1:

MALPTARPLLGSCGTPALGSLLFLLFSLGWVQPSRTLGETGQEAAPLDGVLANPP
NISSLSRQLLGFPCAIEVSGLSTERVRELAVALAQKNVKLSTEQLRCLAHRLSEPPE
DLDALPLDLLLFLNPDAFSGPQACTRFFSRITKANVDLLPRGAPERQRLPAALACW
GVRGSLLSEADVRLGGLACDLPGRFVAESAIEVLLPRLVSCPGPLDQDQQAARA
ALQGGGPPYGPPSTWSVSTMDALRGLLPVLGQPPIIRSIPQGIVAAWRQRSSRDPSW
RQPERTILRPRFRREVEKTACPSGKKAREIDESLIFYKKWELEACVDAALLATQMDR
VNAIPFTYEQLDVLKHKLDELYPQGYVESVIQHLGYLFLKMSPEDIRKWNVTSLET
ALLEVNKGHEMSPQAPRRPLPQVATLIDRFVKGRGQLDKDTLDTLTAFYPGYLCSL
SPEELSSVPPSSIWAVRPQDLDTCDPRQLDVLYPKARLAFQNMNGSEYFVKIQSFL
GGAPTEDLKALSQQNVSMDLATFMKLRTDAVLPLTVAEVQKLLGPHVEGLKAEERH
RPVRDWILRQRQDDLDLTLGLGLQGGIPNGYLVLDLSMQEALSGTPCLLGGPVLTV
LALLASTLA

Figura 2:

TGGGCTTTTGCTGGCCTTTTGCTCACATGTTCTTGACTCTTCGCGATGTACGGG
 CCAGATATACGCGTTGACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACG
 GGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCGCGTTACATAACTTACGGTAA
 ATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCGCCATTGACGTCAATAATG
 ACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTG
 GACTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAA
 GTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCC
 AGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCAT
 CGCTATTACCATGGTGATGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCG
 GTTTGACTCACGGGGATTTCCAAGTCTCCACCCATTGACGTCAATGGGAGTTT
 GTTTTGGCACCAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAACAACTCCGCCCC
 ATTGACGCAAATGGGCGGTAGGCGGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAG
 CTCTCTGGCTAACTAGAGAACCCACTGCTTACTGGCTTATCGAAATTAATACGAC
 TCACTATAGGGAGACCCAAGCTGGCTAGCATGGCCTTGCCAACGGCTCGACCC
 CTGTTGGGGTCTGTGGGACCCCGCCCTCGGCAGCCTCCTGTTCTGCTCTT
 CAGCCTCGGATGGGTGCAGCCCTCCAGGACCCTGGCTGGAGAGACAGGGCAG
 GAGGCTGCGCCCCTGGACGGAGTCTTGCCAACCCACCTAACATTTCCAGCCT
 CTCCCCTCGCCAACTCCTTGGCTTCCCGTGTGCGGAGGTGTCCGGCCTGAGCA
 CGGAGCGTGTCCGGGAGCTGGCTGTGGCCTTGGCACAGAAGAATGTCAAGCTC
 TCAACAGAGCAGCTGCGCTGTCTGGCTCACCGGCTCTCTGAGCCCCCGAGGA
 CCTGGACGCCCTCCCATTGGACCTGCTGCTATTCTCAACCCAGATGCGTTCTC
 GGGGCCCCAGGCCTGCACCCGTTTCTTCTCCCGCATCACGAAGGCCAATGTGG
 ACCTGCTCCCGAGGGGGGCTCCCGAGCGACAGCGGCTGCTGCCTGCGGCTCT
 GGCCTGCTGGGGTGTGCGGGGGTCTCTGCTGAGCGAGGCTGATGTGCGGGCT
 CTGGGAGGCCTGGCTTGCAGCCTGCCTGGGCGCTTTGTGGCCGAGTCGGCCG
 AAGTGCTGCTACCCCGGCTGGTGAGCTGCCCGGGACCCCTGGACCAGGACCA
 ACAGGAGGCAGCCAGGGCGGCTCTGCAGGGCGGGGGACCCCTACGGCCC
 CCCGTGACATGGTCTGTCTCCACGATGGACGCTCTGCGGGGCTGCTGCCCG
 TGCTGGGCCAGCCATCATCCGCAGCATCCCGCAGGGCATCGTGGCCGCGTG
 GCGGCAACGCTCCTCTCGGGACCCATCCTGGCGGCAGCCTGAACGGACCATC
 CTCCGGCCGCGGTTCCGGCGGGAAGTGGAGAAGACAGCCTGTCCTTCAGGCA
 AGAAGGCCCGCGAGATAGACGAGAGCCTCATCTTCTACAAGAAGTGGGAGCTG
 GAAGCCTGCGTGGATGCGGCCCTGCTGGCCACCCAGATGGACC GCGTGAACG
 CCATCCCCTTACCTACGAGCAGCTGGACGTCCTAAAGCATAAACTGGATGAGC
 TCTACCACAAGGTTACCCCGAGTCTGTGATCCAGCACCTGGGCTACCTCTTCC
 TCAAGATGAGCCCTGAGGACATTCGCAAGTGGAAATGTGACGTCCCTGGAGACC
 CTGAAGGCTTTGCTTGAAGTCAACAAAGGGCACGAAATGAGTCCTCAGGCTCCT
 CGGCGGCCCTCCACAGGTGGCCACCCTGATCGACCGCTTTGTGAAGGGAA
 GGGGCCAGCTAGACAAAGACACCCTAGACACCCTGACCGCCTTCTACCCTGGG
 TACCTGTGCTCCCTCAGCCCCGAGGAGCTGAGCTCCGTGCCCCCAGCAGCAT
 CTGGGCGGTCAGGCCCCAGGACCTGGACACGTGTGACCCAAGGCAGCTGGAC
 GTCCTCTATCCCAAGGCCCGCCTTGCTTTCCAGAACATGAACGGGTCCGAATAC
 TTCGTGAAGATCCAGTCTTCTGGGTGGGGCCCCCACGGAGGATTTGAAGGC
 GCTCAGTCAGCAGAATGTGAGCATGGACTTGGCCACGTTTATGAAGCTGCGGA
 CGGATGCGGTGCTGCCGTTGACTGTGGCTGAGGTGCAGAACTTCTGGGACCC
 CACGTGGAGGGCCTGAAGGCGGAGGAGCGGCACCGCCCGGTGCGGGACTGG
 ATCCTACGGCAGCGGCAGGACGACCTGGACACGCTGGGGCTGGGGCTACAGG
 GCGGCATCCCCAACGGCTACCTGGTCTTAGACCTCAGCATGCAAGAGGCCCTC
 TCGGGGACGCCCTGCCTCTAGGACCTGGACCTGTTCTCACCGTCTGGCACT

GCTCCTAGCCTCCACCCTGGCCTGACTCGAGTCTAGAGGGCCCGTTTAAACCC
 GCTGATCAGCCTCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCCT
 CCCCCGTGCCTTCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCCTGTCCTTTCTAAT
 AAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGG
 GTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCA
 TGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGCTTCTACTGGGCGGTTTTATGGACAGC
 AAGCGAACCGBAATTGCCAGCTGGGGCGCCCTCTGGTAAGGTTGGGAAGCCCT
 GCAAAGTAACTGGATGGCTTTCTCGCCGCCAAGGATCTGATGGCGCAGGGGA
 TCAAGCTCTGATCAAGAGACAGGATGAGGATCGTTTCGCATGATTGAACAAGAT
 GGATTGCACGCAGGTTCTCCGGCCGCTTGGGTGGAGAGGCTATTCCGGCTATGA
 CTGGGCACAACAGACAATCGGCTGCTCTGATGCCGCCGTGTTCCGGCTGTCAG
 CGCAGGGGCGCCCGGTTCTTTTTGTCAAGACCGACCTGTCCGGTGCCCTGAAT
 GAACTGCAAGACGAGGCAGCGCGGCTATCGTGGCTGGCCACGACGGGCGTTC
 CTTGCGCAGCTGTGCTCGACGTTGCTACTGAAGCGGGAAGGGACTGGCTGCTA
 TTGGGCGAAGTGCCGGGGCAGGATCTCCTGTCATCTCACCTTGCTCCTGCCGA
 GAAAGTATCCATCATGGCTGATGCAATGCGGGCGGCTGCATACGCTTGATCCGG
 CTACCTGCCATTGACCACCAAGCGAAACATCGCATCGAGCGAGCACGTACT
 CGGATGGAAGCCGGTCTTGTCGATCAGGATGATCTGGACGAAGAGCATCAGGG
 GCTCGCGCCAGCCGAACGTTCGCCAGGCTCAAGGCGAGCATGCCCGACGGC
 GAGGATCTCGTCTGACCCATGGCGATGCCTGCTTGCCGAATATCATGGTGA
 AAATGGCCGCTTTTCTGGATTCATCGACTGTGGCCGGCTGGGTGTGGCGGACC
 GCTATCAGGACATAGCGTTGGCTACCCGTGATATTGCTGAAGAGCTTGCCGGC
 GAATGGGCTGACCGCTTCTCGTGCTTTACGGTATCGCCGCTCCCGATTGCGA
 GCGCATCGCCTTCTATCGCCTTCTTGACGAGTCTTCTGAATTATTAACGCTTAC
 AATTTCTGATGCGGTATTTTCTCCTTACGCATCTGTGCGGTATTTTACACCGCA
 TACAGGTGGCACTTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTATTTTTC
 TAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCCTGATAAATGCTTCA
 ATAATAGCACGTGCTAAAACCTTCAATTTTAAATTTAAAGGATCTAGGTGAAGATCC
 TTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTTAAACGTGAGTTTTTCGTTCCACTGAGC
 GTCAGACCCCATCAGTGACCAAAACAGGAAAAAACCGCCCTTAAACATGGCCCG
 CTTTATCAGAAGCCAGACATTAACGCTTCTGGAGAACTCAACGAGCTGGACGC
 GGATGAACAGGCAGACATCTGTGAATCGCTTACGACCACGCTGATGAGCTTTA
 CCGCAGCTGCCTCGCGCGTTTTCGGTGATGACGGTGAAAACCTCTGACACATGC
 AGCTCCCGGAGACGGTCACAGCTTGTCTGTAAGCGGATGCCGGGAGCAGACAA
 GCCCGTCAGGGCGCGTCAGCGGGTGTGGCGGGTGTGGGGGCGCAGCCATGA
 CCCAGTCACGTAGCGATAGCGGAGTGTATACTGGCTTAACTATGCGGCATCAGA
 GCAGATTGTAAGTGCACCATATGCGGTGTGAAATACCGCACAGATGCGT
 AAGGAGAAAATACCGCATCAGGCGCTTCCGCTTCTCGCTCACTGACTCGCT
 GCGCTCGGTCGTTCCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAA
 TACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAG
 GCCAGCAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCAT
 AGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTG
 GCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATAACAGGCGTTTTCCCCCTGGAAGCTCCC
 TCGTGCGCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCCTTTC
 TCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTT
 CGGTGTAGGTCGTTCCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCCGTTTCCAG
 CCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGA
 CACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAG
 GTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACAC
 TAGAAGGACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAA
 AAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAACACCGCTGGTAGCGGTGGTTT

ES 2 747 772 T3

TTTTGTTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCC
TTTGATC

Figura 3:

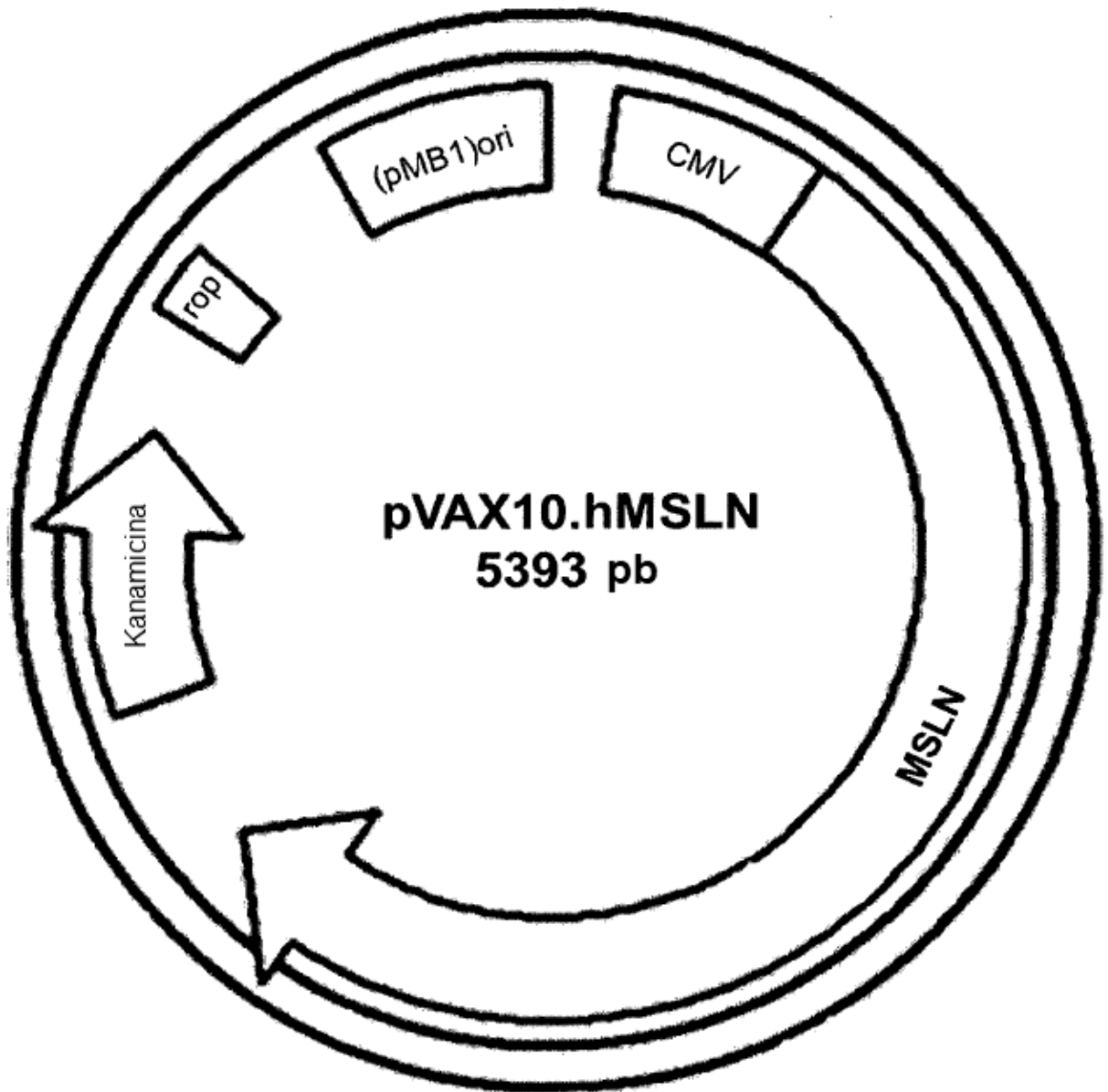


Figura 4:

Valor p	0,0002
Resumen del valor p	***

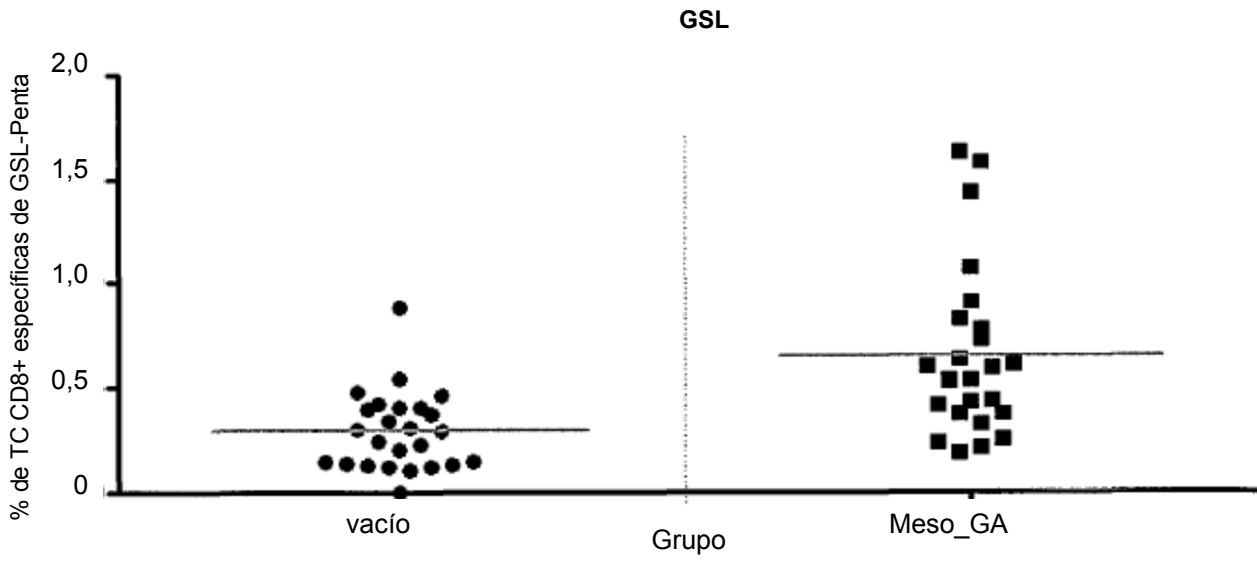


Figura 5:

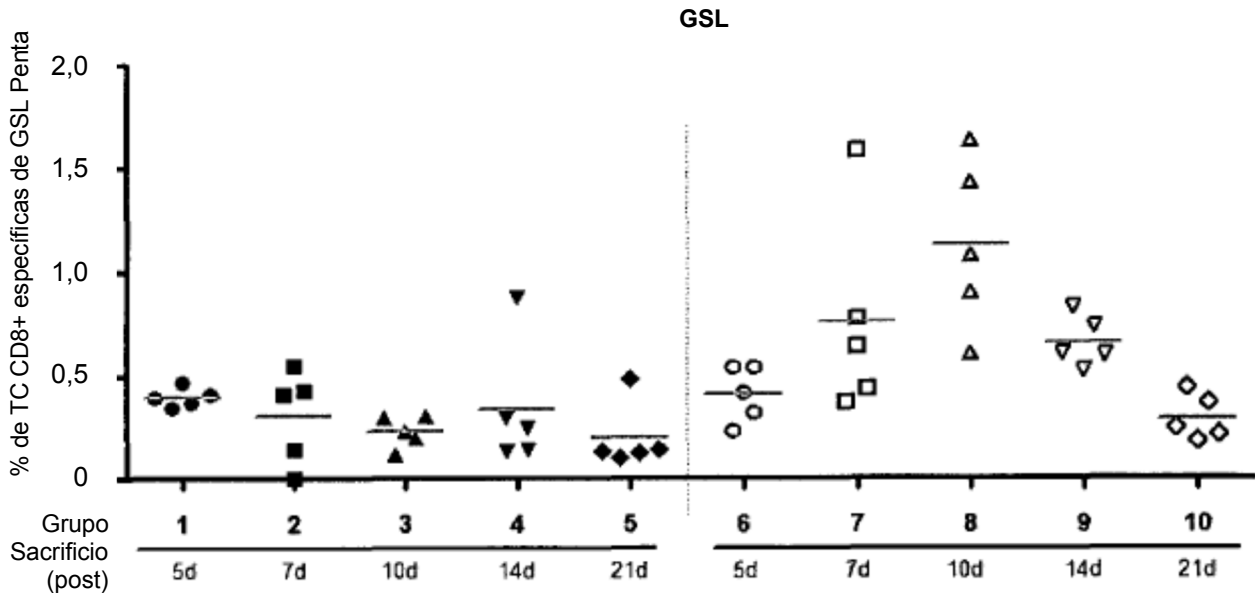


Figura 6:

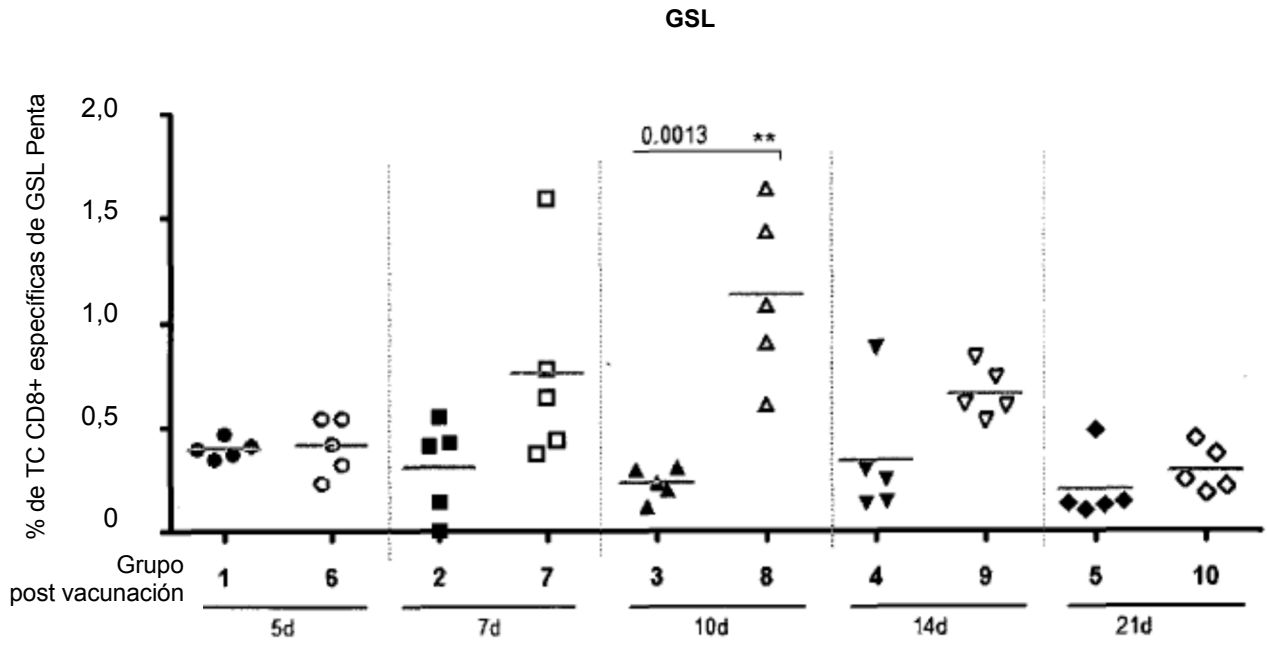


Figura 7:

Valor p	0,0195
Resumen del valor p	*

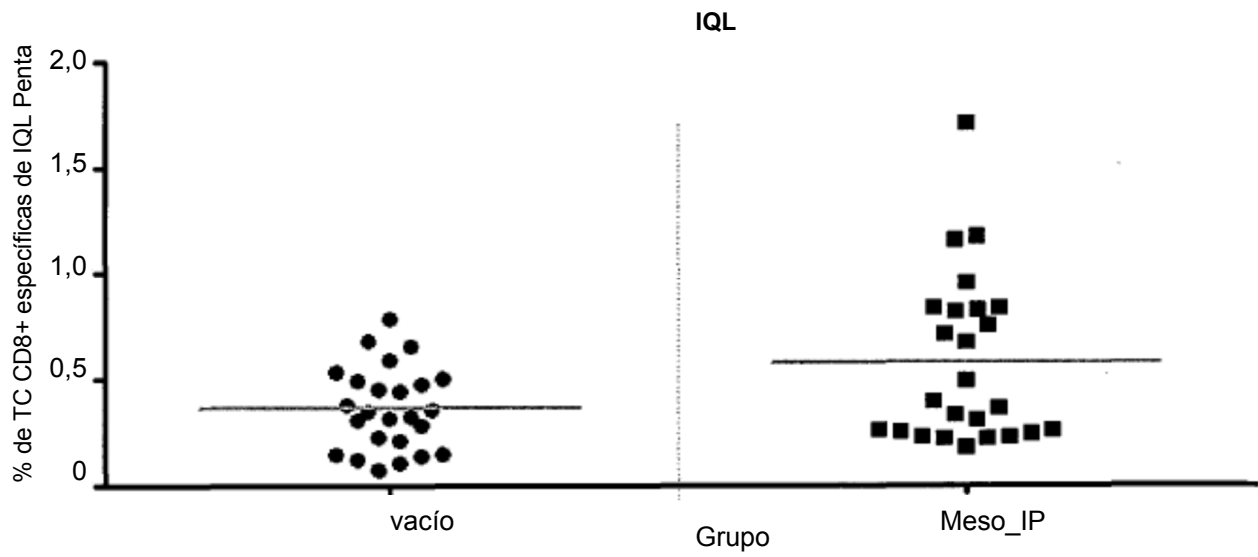


Figura 8:

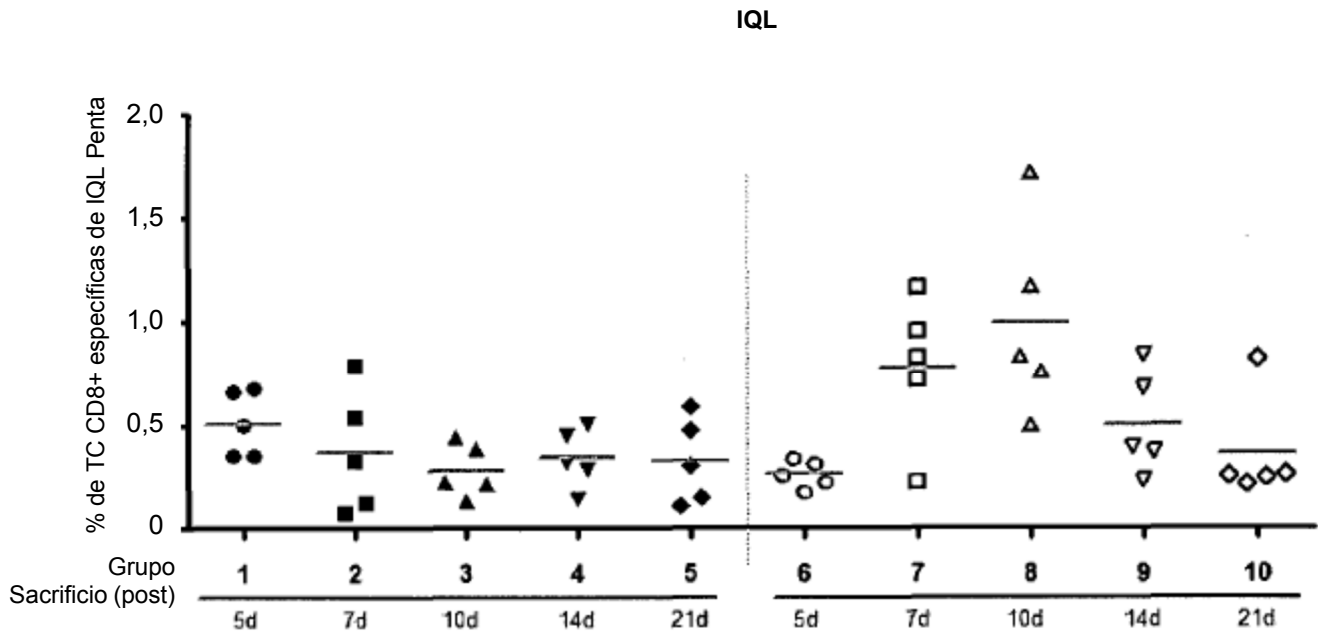


Figura 9:

