(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 760 699**

(51) Int. CI.:

***A61K 39/00*** (2006.01)
***A61K 39/39*** (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.06.2016 PCT/EP2016/001004**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **22.12.2016 WO16202459**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.06.2016 E 16736381 (1)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.11.2019 EP 3310379**

(54) Título: **Vacuna de ADN dirigida al VEGFR-2 para terapia de combinación**

(30) Prioridad:

**18.06.2015 EP 15001803**

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
**14.05.2020**

(73) Titular/es:

**VAXIMM AG (100.0%)**
**Hochbergerstrasse 60c**
**4057 Basel, CH**

(72) Inventor/es:

**LUBENAU, HEINZ**

(74) Agente/Representante:

**SÁNCHEZ SILVA, Jesús Eladio**

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 al VEGFR-2 para terapia de combinación

Campo de la invención

La presente invención se refiere a una cepa atenuada de Salmonella typhi Ty21a que comprende al menos una copia de una molécula de ADN que comprende un casete de expresión eucariota que codifica una proteína receptora de VEGF, para su uso en el tratamiento del cáncer, en donde el tratamiento comprende, además, la administración de al menos otro agente contra el cáncer, particularmente de al menos un inhibidor de punto de control seleccionado del grupo que consiste en un anticuerpo contra PD-1, PD-L1 y CTLA4. La presente invención se refiere, además, a una composición farmacéutica que comprende una cepa atenuada de Salmonella typhi Ty21a que comprende al menos una copia de una molécula de ADN que comprende un casete de expresión eucariota que codifica una proteína receptora de VEGF para su uso en terapia, en donde la composición farmacéutica comprende, además, al menos una cepa atenuada adicional de Salmonella typhi Ty21a que comprende al menos una copia de una molécula de ADN adicional que comprende un casete de expresión eucariota adicional que codifica un antígeno tumoral o un antígeno de estroma tumoral, y en donde el tratamiento comprende, además, la administración de al menos un inhibidor de punto de control seleccionado del grupo que consiste en un anticuerpo contra PD-1, PD-L1 y CTLA4.

Antecedentes de la invención

El hallazgo de que los tumores pueden ser inmunogénicos condujo al desarrollo de una serie de inmunoterapias contra el cáncer diseñadas para emplear el sistema inmune para eliminar selectivamente las células malignas mientras se conserva el tejido normal. Sin embargo, los beneficios de supervivencia de solamente la vacunación contra los antígenos tumorales aún son modestos. Las vacunas contra el cáncer enfrentan numerosos desafíos, uno de ellos es el microambiente inmunosupresor. La vasculatura tumoral anormal crea un microambiente hipóxico que polariza las células inflamatorias hacia la supresión inmune. Además, los tumores alteran sistémicamente la proliferación, diferenciación, y función de las células inmunes mediante la secreción de factores de crecimiento y citoquinas.

Para la cura del cáncer, la erradicación completa de las células madre del cáncer es de importancia crucial. Los numerosos mecanismos de escape inmunitario de los tumores humanos permanecen como un desafío importante en la inmunoterapia contra el cáncer. Por lo tanto, existe una gran necesidad de enfoques de terapia contra el cáncer mejorados, que no se encuentran hasta ahora.

El documento WO 2014/005683 describe una cepa mutante atenuada de Salmonella que comprende una molécula de ADN recombinante que codifica una proteína receptora de VEGF para su uso en la inmunoterapia contra el cáncer, particularmente para su uso en el tratamiento del cáncer pancreático.

El documento WO 2014/173542 describe una cepa atenuada de Salmonella que comprende una molécula de ADN recombinante que codifica la proteína tumoral de Wilms (WT1) para su uso en la inmunoterapia contra el cáncer.

El documento WO 2013/09189 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.

Objeto de la invención

En vista de la técnica anterior, es un objeto de la presente invención proporcionar novedosas terapias contra el cáncer. Dichas terapias novedosas ofrecerían 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 atenuada de Salmonella typhi Ty21a que comprende al menos una copia de una molécula de ADN que comprende un casete de expresión eucariota que codifica una proteína receptora de VEGF, para su uso en el tratamiento del cáncer, en donde el tratamiento comprende, además, la administración de al menos un inhibidor de punto de control seleccionado del grupo que consiste en un anticuerpo contra PD-1, PD-L1 y CTLA4.

Sorprendentemente, se encontró que la cepa atenuada de Salmonella que codifica una proteína receptora de VEGF aumenta fuertemente la eficacia de las terapias contra el cáncer que se basan en el empleo del sistema inmunitario del paciente, tal como el tratamiento con vacunas contra el cáncer que codifican antígenos tumorales o antígenos de estroma tumoral, tratamiento células T modificadas por ingeniería genética que se diseñan para atacar a las células tumorales, tratamiento con anticuerpos biespecíficos diseñados para mediar la unión de las células inmunes a las células tumorales y tratamiento con inhibidores de punto de control que tienen como objetivo prevenir la inhibición inducida por el tumor de la proliferación de células T.

Sorprendentemente, se observó que la administración de la cepa atenuada de Salmonella que codifica una proteína receptora de VEGF conduce a una infiltración significativamente aumentada del tumor por las células T $CD8^+$ y $CD4^+$. Además, la administración de la cepa atenuada de Salmonella que codifica una proteína receptora de VEGF puede conducir a un aumento en el número de células T $CD8^+$ y $CD4^+$ activadas y/o a una reducción en el número de células linfoides inmunosupresoras tales como las células Treg. Sin desear limitarse a la teoría, se cree que la administración de la cepa atenuada de Salmonella que codifica una proteína receptora de VEGF mejora la eficacia de las inmunoterapias contra el cáncer al mejorar el compromiso de las células T en la erradicación del tumor. Se demostró que la combinación de la cepa atenuada de Salmonella que codifica una proteína receptora de VEGF con otros agentes contra el cáncer, tales como las células T modificadas por ingeniería genética, inhibidores de punto de control, anticuerpos biespecíficos y vacunas de ADN que codifican antígenos tumorales o antígenos del estroma tumoral tienen efectos sinérgicos sobre las respuestas de células T específicas contra el tumor y la supervivencia general.

En realizaciones particulares, el tratamiento comprende, además, la administración de al menos una vacuna de ADN que codifica un antígeno tumoral o un antígeno de estroma tumoral.

En realizaciones particulares, el casete de expresión y el casete de expresión adicional son un casete de expresión eucariota que comprende un promotor de CMV.

En realizaciones particulares, la proteína receptora de VEGF se selecciona del grupo que consiste en VEGFR-2 humano que tiene la secuencia de aminoácidos como se encuentra en la SEQ ID NO 1 y una proteína que comparte al menos una identidad de secuencia de alrededor del 80% con la misma.

En realizaciones particulares, el VEGFR-2 humano tiene la secuencia de aminoácidos como se encuentra en la SEQ ID NO 1.

En realizaciones particulares, la molécula de ADN y la molécula de ADN adicional comprenden el gen de resistencia al antibiótico kanamicina, el ori pMB1, y un promotor de CMV.

En realizaciones particulares, la molécula de ADN y la molécula de ADN adicional comprenden la secuencia de ADN como se encuentra en la SEQ ID NO 2.

En realizaciones particulares, el antígeno tumoral codificado por dicha cepa atenuada adicional de Salmonella se selecciona del grupo que consiste en la proteína tumoral de Wilms humana (WT1) que tiene la secuencia de aminoácidos como se encuentra en la SEQ ID NO 3 y una proteína que comparte al menos una identidad de secuencia de alrededor del 80% con la misma, Mesotelina humana (MSLN) que tiene la secuencia de aminoácidos como se encuentra en la SEQ ID NO 4 y una proteína que comparte al menos una identidad de secuencia de alrededor del 80% con la misma, CEA humano que tiene la secuencia de aminoácidos como se encuentra en la SEQ ID NO 5 y una proteína que comparte al menos una identidad de secuencia de alrededor del 80% con la misma, CMV pp65 que tiene la secuencia de aminoácidos como se encuentra en la SEQ ID NO 6 y una proteína que comparte al menos una identidad de secuencia de alrededor del 80% con la misma, CMV pp65 que tiene la secuencia de aminoácidos como se encuentra en SEQ ID NO 7 y una proteína que comparte al menos una identidad de secuencia de alrededor del 80% con la misma y CMV pp65 que tiene la secuencia de aminoácidos como se encuentra en SEQ ID NO 8 y una proteína que comparte al menos una identidad de secuencia de alrededor del 80% con la misma, y el antígeno de estroma tumoral codificado por dicha cepa atenuada adicional de Salmonella se selecciona del grupo que consiste en proteína de activación de fibroblastos humanos (FAP).

En realizaciones particulares, la proteína tumoral de Wilms humana (WT1) tiene la secuencia de aminoácidos como se encuentra en la SEQ ID NO 3, Mesotelina humana (MSLN) tiene la secuencia de aminoácidos como se encuentra en la SEQ ID NO 4, CEA humano tiene la secuencia de aminoácidos como se encuentra en SEQ ID NO 5, y CMV pp65 tiene la secuencia de aminoácidos como se encuentra en la SEQ ID NO 6, SEQ ID NO 7 o SEQ ID NO 8.

En realizaciones particulares, la cepa atenuada de Salmonella se administra simultáneamente con o antes de dicho al menos un inhibidor de punto de control.

En realizaciones particulares, el tratamiento se acompaña con quimioterapia y/o radioterapia. Particularmente, la cepa atenuada de Salmonella se administra antes o durante el ciclo de tratamiento con quimioterapia o radioterapia. En otras realizaciones particulares, la cepa atenuada de Salmonella se administra antes y durante el ciclo de tratamiento con quimioterapia o radioterapia.

En realizaciones particulares, la cepa atenuada de Salmonella y la al menos una cepa atenuada adicional de Salmonella se administran por vía oral.

En realizaciones particulares, el cáncer se selecciona de cáncer colorrectal, cáncer pancreático, cáncer de pulmón, cáncer de ovario, mesotelioma, leucemia mieloide aguda, leucemia mieloide crónica, glioblastoma, cáncer gástrico, cáncer hepatocelular, cáncer de células renales, cáncer de próstata, y cáncer cervical.

En realizaciones particulares, la dosis única de la cepa atenuada de Salmonella y de la al menos una cepa atenuada adicional de Salmonella comprende de alrededor de $10^5$ a alrededor de $10^{11}$, particularmente de alrededor de $10^6$ a alrededor de $10^{10}$, más particularmente de alrededor de $10^6$ a alrededor de $10^9$, más particularmente de alrededor de $10^6$ a alrededor de $10^8$, lo más particularmente de alrededor de $10^6$ a alrededor de $10^7$ unidades formadoras de colonias (CFU).

En realizaciones particulares, el tratamiento es inmunoterapia individualizada contra el cáncer que comprende la etapa de evaluar el patrón de expresión y/o la respuesta preinmune contra dicho antígeno tumoral en un paciente.

En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende una cepa atenuada de Salmonella typhi Ty21a que comprende al menos una copia de una molécula de ADN que comprende un casete de expresión eucariota que codifica una proteína receptora de VEGF para su uso en el tratamiento del cáncer, en donde la composición farmacéutica comprende, además, al menos una cepa atenuada adicional de Salmonella que comprende al menos una copia de una molécula de ADN adicional que comprende un casete de expresión adicional que codifica un antígeno tumoral o un antígeno de estroma tumoral, y en donde el tratamiento comprende, además, la administración de al menos un inhibidor de punto de control seleccionado del grupo que consiste en un anticuerpo contra PD-1, PD-L1 y CTLA4.

En realizaciones particulares, el casete de expresión y el casete de expresión adicional son un casete de expresión eucariota que comprende un promotor de CMV.

En realizaciones particulares, la proteína receptora de VEGF se selecciona del grupo que consiste en VEGFR-2 humano que tiene la secuencia de aminoácidos como se encuentra en la SEQ ID NO 1 y una proteína que comparte al menos una identidad de secuencia de alrededor del 80% con la misma.

En realizaciones particulares, el VEGFR-2 humano tiene la secuencia de aminoácidos como se encuentra en la SEQ ID NO 1.

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.

En un aspecto, la presente invención se refiere a una cepa atenuada de Salmonella typhi Ty21a que comprende al menos una copia de una molécula de ADN que comprende un casete de expresión eucariota que codifica una proteína receptora de VEGF, para su uso en el tratamiento del cáncer, en donde el tratamiento comprende, además, la administración de al menos un inhibidor de punto de control seleccionado del grupo que consiste en un anticuerpo contra PD-1, PD-L1 y CTLA4.

Las proteínas receptoras de VEGF son receptores de tirosina quinasas específicas de células endoteliales que pueden unirse por el factor de crecimiento endotelial vascular del ligando (VEGF) que hace que se dimericen y se activen mediante la transfosforilación. La familia de factores de crecimiento VEGF (Kd 75-760 pM) abarca 6 miembros de la familia, VEGF-A (también conocido como VEGF) a través de E y PLGF (factor de crecimiento placentario, también conocido como PGF o PIGF-2). Los factores de crecimiento VEGF regulan el crecimiento y la diferenciación de múltiples componentes del sistema vascular, especialmente los vasos sanguíneos y linfáticos. Hay tres subtipos principales de VEGFR, VEGFR-1 (o FLT1), VEGFR-2 (o KDR, FLK1) y VEGFR-3 (o FLT4). Los receptores de VEGF unidos a la membrana tienen una porción extracelular que consta de 7 dominios similares a inmunoglobulina, una única región que se expande por la transmembrana y una porción intracelular que contiene un dominio dividido de tirosina-quinasa. Las transcripciones de VEGFR también dan lugar a variantes de empalme alternativas que codifican proteínas receptoras de VEGF solubles.

De acuerdo con la invención, la cepa atenuada de Salmonella funciona como el portador bacteriano de la molécula de ADN recombinante que comprende un casete de expresión que codifica una proteína receptora de VEGF para la administración de dicha molécula de ADN recombinante en una célula diana. Dicho vector de administración que comprende una molécula de ADN que codifica un antígeno heterólogo, tal como una proteína receptora de VEGF - un antígeno de estroma tumoral, se denomina vacuna de ADN.

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.

La cepa de Salmonella viva atenuada de acuerdo con la presente invención lleva establemente una molécula de ADN recombinante que codifica una proteína receptora de VEGF. Puede usarse como vehículo para la administración oral de esta molécula de ADN recombinante.

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 de Salmonella atenuada viva producen sus propios factores inmunomoduladores tales como lipopolisacáridos (LPS) *in situ* lo que puede constituir una ventaja sobre otras formas de administración tales como la microencapsulación. Además, la vacuna mucosal de acuerdo con la presente invención tiene un modo de acción intralinfático, lo que demuestra ser beneficioso. Después de la ingestión de la vacuna atenuada de acuerdo con la presente invención, las bacterias modificadas invaden los macrófagos y otras células en los parches de Peyer del intestino. Las bacterias son absorbidas por estas células fagocíticas. 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, y conducen a la expresión masiva de la proteína receptora de VEGF en el citosol de las células fagocíticas. Las células infectadas sufren apoptosis, se cargan con el antígeno del receptor de VEGF, y se absorben y procesan por el sistema inmune intestinal. Las señales de peligro de la infección bacteriana sirven como un fuerte adyuvante en este proceso, lo que conduce a una fuerte respuesta de anticuerpos y de células T CD8+ específicas para el antígeno diana a nivel de los compartimientos tanto sistémicos como mucosales. La respuesta inmune alcanza su punto máximo alrededor de diez días después de la vacunación. La falta de respuesta contra el portador permite reforzar con la misma vacuna muchas veces.

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 deleción 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. La administración de alrededor de $10^{11}$ CFU de la cepa atenuada de Salmonella de acuerdo con la presente invención preferiblemente causa salmonelosis en menos del 5%, con mayor preferencia menos del 1%, con la máxima preferencia menos del 1% de los sujetos.

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".

La molécula de ADN que comprende un casete de expresión que codifica una proteína receptora de VEGF es adecuadamente una molécula de ADN recombinante, es decir, una construcción de ADN modificada por ingeniería genética, preferiblemente compuesta de piezas de ADN de diferente origen. La molécula de ADN puede ser un ácido nucleico lineal, o preferiblemente, un plásmido de ADN circular generado mediante la introducción de un marco de lectura abierto que codifica una proteína receptora de VEGF en un plásmido 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 un marco de lectura abierto (ORF) bajo el control de secuencias reguladoras que controlan su expresión. Los casetes de expresión pueden mediar preferiblemente la transcripción del marco de lectura abierto incluido que codifica un antígeno tumoral o un antígeno de estroma tumoral, tal como la proteína receptora de VEGF, 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.

En realizaciones particulares, el tratamiento comprende, además, la administración de al menos una vacuna de ADN que codifica un antígeno tumoral o un antígeno de estroma tumoral, de al menos una célula T modificada por ingeniería genética, de al menos un anticuerpo biespecífico que exhibe especificidad de unión por una proteína de superficie de célula T y por un antígeno tumoral o antígeno de estroma tumoral, o de cualquier combinación de los mismos.

En realizaciones particulares, el al menos un anticuerpo biespecífico exhibe especificidad de unión por un antígeno tumoral seleccionado de CD19, EpCAM, HER2, EGFR, CEA, CD33, EphA2 y MCSP.

En realizaciones particulares, la al menos una célula T modificada por ingeniería genética comprende al menos una proteína de unión a antígeno tumoral en su superficie celular, en donde el antígeno tumoral se selecciona de CEA, FBP, GD2, GD3, Her2-neu, MAGE-A1, MSLN, PSCA, PSMA.

En realizaciones particulares, el tratamiento comprende, además, la administración de vacunas de ADN adicionales que codifica un antígeno tumoral o un antígeno de estroma tumoral, en particular de una cepa atenuada adicional de Salmonella que comprende al menos una copia de una molécula de ADN adicional que comprende un casete de expresión adicional que codifica un antígeno tumoral o un antígeno de estroma tumoral.

En realizaciones particulares, la administración de la cepa atenuada de Salmonella typhi Ty21a que codifica una proteína receptora de VEGF y el inhibidor de punto de control se combina con la administración de dos cepas atenuadas adicionales de Salmonella typhi Ty21a que codifican cada una un antígeno tumoral.

En realizaciones particulares, la administración de la cepa atenuada de Salmonella typhi Ty21a que codifica una proteína receptora de VEGF se combina con la administración de una cepa atenuada adicional de Salmonella typhi Ty21a que codifica un antígeno tumoral y un inhibidor de punto de control.

En realizaciones particulares, la administración de la cepa atenuada de Salmonella que codifica una proteína receptora de VEGF se combina con la administración de una célula T modificada por ingeniería genética y un inhibidor de punto de control.

En realizaciones particulares, la administración de la cepa atenuada de Salmonella que codifica una proteína receptora de VEGF se combina con la administración de un anticuerpo biespecífico y un inhibidor de punto de control.

En realizaciones particulares, la al menos una vacuna de ADN que codifica un antígeno tumoral o un antígeno de estroma tumoral se selecciona de al menos una cepa atenuada adicional de Salmonella typhi Ty21a que comprende al menos una copia de una molécula de ADN adicional que comprende un casete de expresión eucariota adicional que codifica un antígeno tumoral o antígeno de estroma tumoral.

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 sistémicos como mucosales. Los costes de preparación de lotes son bajos y las formulaciones de vacunas bacterianas vivas son altamente estables. La atenuación se puede lograr mediante la deleción de varios genes, incluidos los genes de virulencia, 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.

La cepa atenuada de Salmonella y la al menos una cepa atenuada adicional de Salmonella de acuerdo con la invención son Salmonella typhi Ty21a. La cepa de S. typhi Ty21a atenuada, viva es el componente activo de Typhoral L®, también conocido como Vivotif® (fabricado por Berna Biotech Ltd., una Crucell Company, 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 se autorizó en más de 40 países y se usó en millones de personas incluidos miles de niños para la vacunación profiláctica contra la fiebre tifoidea. Tiene un historial de seguridad incomparable. No hay datos disponibles que indiquen que S. typhi Ty21a sea capaz de entrar en el torrente sanguíneo sistémicamente. La cepa de la vacuna viva atenuada de Salmonella typhi Ty21a permite así la focalización específica del sistema inmune en el intestino, a la vez que es segura y bien tolerada. 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 $2x10^9$ unidades formadoras de colonias viables de S. typhi Ty21a y al menos $5x10^9$ células no viables de S. typhi Ty21a.

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 *gal*E que resulta en su incapacidad para metabolizar la galactosa. La cepa bacteriana atenuada, además, 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.

En realizaciones particulares, el casete de expresión y el casete de expresión adicional son un casete de expresión eucariota que comprende un promotor de CMV. 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 demostrado que la cantidad de antígeno heterólogo requerida para inducir una respuesta inmune adecuada puede ser tóxica para la bacteria y puede resultar en la muerte celular, atenuación excesiva o 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 exhibe típicamente un patrón de glicosilación eucariota.

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 atenuada de Salmonella 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 Simios 40 (SV40), Virus de Tumor Mamario de Ratón (MMTV), Virus de la Inmunodeficiencia Humana (HIV), tal como el promotor de Repetición de Terminal Larga (LTR) del HIV, el virus de Moloney, el virus de Epstein Barr (EBV), y el virus del Sarcoma de Rous (RSV), el promotor de CAG sintético compuesto del elemento potenciador temprano de CMV, el promotor, el primer exón y el primer intrón del gen de la beta actina de pollo y el aceptor de empalme del gen de la beta globina de conejo, así como los promotores de genes humanos tales como 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.

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 atenuada de Salmonella de la presente invención comprende el sitio de poliadenilación de BGH.

Además de los elementos reguladores requeridos para la expresión del gen del antígeno de estroma tumoral o antígeno tumoral heterólogo, como un promotor y una señal de poliadenilación, también pueden incluirse 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.

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 proteína receptora de VEGF se selecciona del grupo que consiste en VEGFR-2 humano que tiene la secuencia de aminoácidos como se encuentra en la SEQ ID NO 1 y una proteína que comparte al menos una identidad de secuencia de alrededor del 80% con la misma.

El VEGFR-2, también conocido como receptor que contiene el dominio de inserción de quinasa (KDR), parece mediar en casi todas las respuestas celulares conocidas al VEGF. Por ejemplo, el papel de VEGF en la angiogénesis parece estar mediado por la interacción de esta proteína con VEGFR-2. El VEGFR-2 es un receptor de alta afinidad de peso molecular de 200-230 kDa, de 1356 aminoácidos de longitud para VEGF, así como para VEGF-C y VEGF-D. Identificado en humanos a través de la selección de ADNc endotelial para receptores de tirosina quinasa, VEGFR-2 comparte una identidad de secuencia del 85% con la quinasa 1 de hígado fetal de ratón descubierta previamente (Flk-1). VEGFR-2 normalmente se expresa en precursores endoteliales y hematopoyéticos, así como en células endoteliales, células madre hematopoyéticas nacientes y el estroma del cordón umbilical. Sin embargo, en la vasculatura adulta en reposo, el ARNm de VEGFR-2 parece estar regulado negativamente.

El dominio extracelular de VEGFR-2 contiene 18 sitios potenciales de glicosilación unidos a N. VEGFR-2 se sintetiza inicialmente como una proteína de 150 kDa y se glucosila rápidamente a una forma intermedia de 200 kDa, y luego se glucosila más a una velocidad más lenta a una proteína madura de 230 kDa que se expresa en la superficie celular.

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.

En el contexto de la presente invención, el término "proteína que comparte al menos una identidad de secuencia de alrededor del 80% con una proteína dada (la proteína de referencia) se refiere a una proteína que puede diferir en la secuencia de aminoácidos y/o la secuencia de ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos de la proteína de referencia. La proteína puede ser de origen natural, p. ej., una versión mutante de una proteína de tipo salvaje, p. ej., una versión mutante de una proteína receptora de VEGF de tipo salvaje, o un homólogo de una especie diferente, o una proteína modificada por ingeniería genética, p. ej., una proteína receptora de VEGF modificada por ingeniería genética. 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.

La proteína que comparte al menos una identidad de secuencia de alrededor del 80% con una proteína dada puede contener una o más mutaciones que comprenden una adición, una deleción y/o una sustitución de uno o más aminoácidos en comparación con la proteína de referencia dada. De acuerdo con las enseñanzas de la presente invención, dichos aminoácidos eliminados, adicionados y/o sustituidos pueden ser aminoácidos consecutivos o pueden espaciarse a lo largo de la secuencia de aminoácidos de la proteína que comparte al menos una identidad de secuencia de alrededor del 80% con una proteína de referencia dada. De acuerdo con la enseñanza de la presente invención, pueden adicionarse, eliminarse y/o sustituirse cualquier número de aminoácidos, siempre que la identidad de secuencia de aminoácidos con la proteína de referencia sea al menos de alrededor del 80% y la proteína mutada sea inmunogénica. Preferiblemente, la inmunogenicidad de la proteína que comparte al menos una identidad de secuencia de alrededor del 80% con una proteína de referencia de una secuencia de aminoácidos dada se reduce en menos del 50%, menos del 40%, menos del 30%, menos del 20%, menos superior al 10%, menos del 5% o menos del 1% en comparación con la proteína de referencia de la secuencia de aminoácidos dada, medida por ELISA. Los métodos para diseñar y construir homólogos de proteínas y para probar dichos homólogos en cuanto a su potencial inmunogénico son bien conocidos por cualquier experto en la técnica. En realizaciones particulares, la identidad de secuencia con la proteína de referencia es al menos de alrededor del 80%, al menos de alrededor del 85%, al menos de alrededor del 90%, o más particularmente al menos de alrededor del 95%. Los métodos y algoritmos para determinar la identidad de la secuencia, incluida la comparación de una proteína parental y su derivado que tiene deleciones, 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 que comparte al menos una identidad de secuencia de alrededor del 80% con la proteína receptora de VEGF pueden diferir en mayor medida debido a la degeneración del código genético.

En realizaciones particulares, el VEGFR-2 humano tiene la secuencia de aminoácidos como se encuentra en la SEQ ID NO 1.

En realizaciones particulares, la molécula de ADN y la molécula de ADN adicional comprenden el gen de resistencia al antibiótico kanamicina, el ori pMB1, y un promotor de CMV. 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.

En realizaciones particulares, la molécula de ADN y la molécula de ADN adicional comprenden la secuencia de ADN como se encuentra en la SEQ ID NO 2 (esqueleto del vector pVAX10).

La inserción del ORF que codifica la proteína receptora de VEGF con la secuencia de ácido nucleico como se encuentra en la SEQ ID NO 9 en este esqueleto del vector de expresión a través de *Nhe*I/*Xho*I produjo el plásmido de expresión pVAX10.VR2-1 (documento WO 2013/091898). El plásmido de expresión pVAX10.VR2-1 se representa esquemáticamente en la Figura 16. La vacuna de ADN que comprende la cepa de Salmonella atenuada Ty21a que porta el plásmido de expresión pVAX10.VR2-1 se denomina VXM01 (documento WO 2013/091898).

La inserción del ORF humano, que codifica WT1 truncado con la secuencia de ácido nucleico como se encuentra en la SEQ ID NO 10 en el esqueleto del vector de expresión a través de *Nhe*I/*Xho*I produjo el plásmido de expresión pVAX10.hWT1. La expresión del plásmido pVAX10.hWT1 se representa esquemáticamente en la Figura 17. La vacuna de ADN que comprende la cepa de Salmonella atenuada Ty21a que porta el plásmido de expresión pVAX10.hWT1 se denomina VXM06 (documento WO 2014/173542).

La inserción del ORF que codifica la MSLN humana con la secuencia de ácido nucleico como se encuentra en la SEQ ID NO 11 en este esqueleto del vector de expresión a través de *Nhe*I/*Xho*I produjo el plásmido de expresión pVAX10.hMSLN. El plásmido de expresión pVAX10.hMSLN se representa esquemáticamente en la Figura 18. La vacuna de ADN que comprende la cepa atenuada de Salmonella Ty21a que porta el plásmido de expresión pVAX10.hMSLN se denomina VXM04.

La inserción del ORF que codifica CEA con la secuencia de ácido nucleico como se encuentra en la SEQ ID NO 12 en el esqueleto del vector de expresión a través de *Nhe*I/*Xho*I produjo el plásmido de expresión pVAX10.hCEA. La expresión del plásmido pVAX10.hCEA se representa esquemáticamente en la Figura 19. La vacuna de ADN que comprende la cepa atenuada de Salmonella Ty21a que porta el plásmido de expresión pVAX10.hCEA se denomina VXM08.

La inserción del ORF que codifica CMV pp65 con la secuencia de ácido nucleico como se encuentra en la SEQ ID NO 13 en el esqueleto del vector de expresión a través de *Nhe*I/*Xho*I produjo el plásmido de expresión pVAX10.CMVpp65_1. La expresión del plásmido pVAX10.CMVpp65_1 se representa esquemáticamente en la Figura

20. La vacuna de ADN que comprende la cepa atenuada de Salmonella Ty21a que porta el plásmido de expresión pVAX10.CMVpp65_1 se denomina VXM65_1.

La inserción del ORF que codifica CMV pp65 con la secuencia de ácido nucleico como se encuentra en la SEQ ID NO 14 en el esqueleto del vector de expresión a través de *Nhe*I/*Xho*I produjo el plásmido de expresión pVAX10.CMVpp65_2. La expresión del plásmido pVAX10.CMVpp65_2 se representa esquemáticamente en la Figura 21. La vacuna de ADN que comprende la cepa atenuada de Salmonella Ty21a que porta el plásmido de expresión pVAX10.CMVpp65_2 se denomina VXM65_2.

La inserción del ORF que codifica CMV pp65 con la secuencia de ácido nucleico como se encuentra en la SEQ ID NO 15 en el esqueleto del vector de expresión a través de *Nhe*I/*Xho*I produjo el plásmido de expresión pVAX10.CMVpp65_3. La expresión del plásmido pVAX10.CMVpp65_3 se representa esquemáticamente en la Figura 22. La vacuna de ADN que comprende la cepa atenuada de Salmonella Ty21a que porta el plásmido de expresión pVAX10.CMVpp65_3 se denomina VXM65_3.

En realizaciones particulares, el antígeno tumoral codificado por dicha cepa atenuada adicional de Salmonella typhi Ty21a se selecciona del grupo que consiste en la proteína tumoral de Wilms humana (WT1) que tiene la secuencia de aminoácidos como se encuentra en la SEQ ID NO 3 y una proteína que comparte al menos una identidad de secuencia de alrededor del 80% con la misma, Mesotelina humana (MSLN) que tiene la secuencia de aminoácidos como se encuentra en la SEQ ID NO 4 y una proteína que comparte al menos una identidad de secuencia de alrededor del 80% con la misma, CEA humano que tiene la secuencia de aminoácidos como se encuentra en la SEQ ID NO 5 y una proteína que comparte al menos una identidad de secuencia de alrededor del 80% con la misma, CMV pp65 que tiene la secuencia de aminoácidos como se encuentra en la SEQ ID NO 6 y una proteína que comparte al menos una identidad de secuencia de alrededor del 80% con la misma, CMV pp65 que tiene la secuencia de aminoácido como se encuentra en la SEQ ID NO 7 y una proteína que comparte al menos una identidad de secuencia de alrededor del 80% con la misma y CMV pp65 que tiene la secuencia de aminoácidos como se encuentra en la SEQ ID NO 8 y una proteína que comparte al menos una identidad de secuencia de alrededor del 80% con la misma, y el antígeno de estroma tumoral codificado por dicha cepa atenuada adicional de Salmonella se selecciona del grupo que consiste en la proteína de activación de fibroblastos humanos (FAP).

En realizaciones particulares, la proteína tumoral de Wilms humana (WT1) tiene la secuencia de aminoácidos como se encuentra en la SEQ ID NO 3, Mesotelina humana (MSLN) tiene la secuencia de aminoácidos como se encuentra en la SEQ ID NO 4, CEA humano tiene la secuencia de aminoácidos como se encuentra en SEQ ID NO 5, y CMV pp65 tiene la secuencia de aminoácidos como se encuentra en SEQ ID NO 6, o SEQ ID NO 7, o SEQ ID NO 8.

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 demostró 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 tumorogénesis 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.

El gen tumoral de Wilms 1 (WT1) codifica un factor de transcripción de dedo de zinc que participa en la proliferación y diferenciación celular. La proteína WT1 contiene cuatro restos de dedos de zinc en el extremo C y un dominio de unión al ADN rico en prolina/glutamina en el extremo N-terminal. Múltiples variantes de transcripciones, resultantes del empalme alternativo en dos exones de codificación, se caracterizaron bien. WT1 juega un papel esencial en el desarrollo del sistema urogenital y participa en la proliferación y diferenciación celular. El gen de WT1 se aisló como el gen responsable de una neoplasia renal infantil, el tumor de Wilms. Está altamente expresado en una amplia variedad de tumores malignos incluidos varios tipos de tumores malignos hematológicos y varios tumores sólidos. En contraste, la expresión tisular normal de WT1 en adultos se restringe a gónadas, útero, riñón, mesotelio y células progenitoras en varios tipos de tejidos. WT-1 afecta negativamente la diferenciación y promueve la proliferación de células progenitoras. Además, el WT1 sobreexpresado es inmunogénico; se observaron células T específicas para WT1 así como anticuerpos IgG anti-WT1 en pacientes con cáncer. Debido a su perfil de expresión, sus funciones oncogénicas y su potencial inmunogénico, el antígeno tumoral WT1 es un candidato prometedor para el desarrollo de vacunas contra el cáncer.

En realizaciones particulares, WT1 está truncado. En realizaciones particulares, se elimina el dominio de dedo de zinc de WT1. En realizaciones particulares, el WT1 truncado tiene la secuencia de aminoácidos como se encuentra en la SEQ ID NO 3.

El dominio de dedo de zinc en el extremo C de WT1 comprende cuatro restos de dedos de zinc. El WT1 truncado de la secuencia de aminoácidos como se encuentra en la SEQ ID NO 3 representa los aminoácidos del 1 al 371 de UniProt ref P19544-7. La eliminación del dominio de dedo de zinc minimiza el riesgo de reactividad cruzada inmunológica con otros factores de transcripción que contienen dedo de zinc. Además, el WT1 truncado que carece del dominio de dedo de zinc tiene mayor potencial inmunogénico que el WT1 de longitud completa. En adición, la eliminación de los restos de dedos de zinc, que son esenciales para la unión del ADN, anula el potencial oncogénico de WT1, y minimiza así el riesgo de oncogénesis.

La proteína tegumento CMV pp65 es una proteína inmunodominante importante del citomegalovirus humano (CMV). La función biológica del CMV pp65 no está clara, pero se cree que participa en la regulación del ciclo celular. CMV pp65 es una proteína nucleotrópica que exhibe actividad de proteína quinasa, que es capaz de unirse a la quinasa similar a polo 1 (PLK-1).

HCMV pp65 se expresa en más del 90% de las muestras de glioblastoma pero no en el cerebro normal circundante. Esta proteína viral es por lo tanto un candidato prometedor como diana específica de tumor para el desarrollo de nuevas inmunoterapias contra el cáncer.

La proteína CMV pp65 contiene dos señales de localización nuclear bipartita (NLS) en los aminoácidos del 415 al 438 y los aminoácidos del 537 al 561 cerca del extremo carboxilo y un sitio de unión a fosfato relacionado con su actividad quinasa en la lisina-436. La mutación de la lisina en la posición 436 a asparagina y la deleción de los aminoácidos del 537 al 561 dan como resultado una proteína sin actividad quinasa y una localización nuclear notablemente reducida. Esta proteína mutante exhibe inmunogenicidad inalterada.

En realizaciones particulares, la CMV pp65 tiene la secuencia de aminoácidos como se encuentra en la SEQ ID NO 6. La SEQ ID NO 6 representa la secuencia de aminoácidos de CMV pp65 humano de tipo salvaje.

En realizaciones particulares, la CMV pp65 tiene la secuencia de aminoácidos como se encuentra en la SEQ ID NO 7. La SEQ ID NO 7 representa la secuencia de aminoácidos de CMV pp65 humano, que porta la mutación K436N en relación con el CMV pp65 humano de tipo salvaje de la SEQ ID NO 6.

En realizaciones particulares, la CMV pp65 tiene la secuencia de aminoácidos como se encuentra en la SEQ ID NO 8. La SEQ ID NO 8 representa la secuencia de aminoácidos de una versión truncada de CMV pp65 de la SEQ ID NO 7, que carece de la segunda más NLS (secuencia de localización nuclear) C-terminal (es decir, aminoácidos del 537 al 561 de CMV pp65 de la SEQ ID NO 7).

El antígeno carcinoembrionario (CEA) (también conocido como CEACAM5 y CD66e) es miembro de una familia de glicoproteínas ancladas en la superficie celular glicosilfosfatidil inositol (GPI) altamente relacionadas que participan en la adhesión celular. El CEA se produce normalmente en el tejido gastrointestinal durante el desarrollo fetal; la expresión de proteínas termina antes del nacimiento. Por lo tanto, el CEA generalmente está presente solo a niveles muy bajos en la sangre de adultos sanos. Sin embargo, los niveles séricos se elevan en algunos tipos de cáncer, en particular el carcinoma colorrectal, que funciona así como marcador tumoral. Los niveles de CEA también pueden elevarse en el carcinoma gástrico, carcinoma pancreático, carcinoma de pulmón, carcinoma de mama, y carcinoma de tiroides medular, así como en algunas afecciones no neoplásicas como colitis ulcerosa, pancreatitis, cirrosis, COPD, enfermedad de Crohn e hipotiroidismo.

En realizaciones particulares, la cepa atenuada de Salmonella se administra simultáneamente con o antes de dicho al menos un inhibidor de punto de control.

En el contexto de la presente invención, el término "simultáneamente con" significa la administración de la cepa atenuada de Salmonella que codifica una proteína receptora de VEGF y el al menos un inhibidor de punto de control en el mismo día, más particularmente dentro de 12 horas, más particularmente dentro de 2 horas.

En realizaciones particulares, la administración de la cepa de Salmonella atenuada que codifica una proteína receptora de VEGF y el al menos un inhibidor de punto de control se produce dentro de ocho semanas consecutivas, más particularmente dentro de tres a seis semanas consecutivas. La cepa de Salmonella atenuada de acuerdo con la presente invención y el al menos un inhibidor de punto de control pueden administrarse por la misma ruta o por diferentes rutas.

En realizaciones particulares, el tratamiento se acompaña de quimioterapia, radioterapia o terapia biológica contra el 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 contra el cáncer" se refiere a la terapia contra el cáncer que implica el uso de sustancias derivadas de organismos vivos o versiones producidas en el laboratorio de dichas sustancias. Los enfoques de terapia biológica contra el cáncer incluyen la administración de citoquinas inmunoestimuladoras.

Los agentes quimioterapéuticos que pueden usarse 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, carrnustina (BCNU), lomustina (CCNU), doxorrubicina (adriamicina), doxorrubicina lipo (doxil), ácido folínico, gemcitabina (gemzar), daunorrubicina, daunorrubicina lipo (daunoxoma), procarbazina, 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, hidroxiurea, ifosfamida, idarrubicina, mesna, interferón alfa, interferón beta, irinotecán, mitoxantrona, topotecán, leuprólido, 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.

Los agentes quimioterapéuticos más preferidos de acuerdo con la invención son cabazitaxel, carboplatino, oxaliplatino, cisplatino, ciclofosfamida, docetaxel, gemcitabina, doxorrubicina, paclitaxel (taxol), irinotecán, vincristina, vinblastina, vinorelbina, ácido folínico, 5-fluorouracilo y bleomicina, especialmente gemcitabina.

Particularmente, la cepa mutante atenuada de Salmonella se administra antes o durante el ciclo de tratamiento con quimioterapia o radioterapia o la terapia biológica contra el cáncer. En otras realizaciones particulares, la cepa atenuada de Salmonella se administra antes y durante el ciclo de tratamiento con quimioterapia o radioterapia o durante la terapia biológica contra el cáncer.

En realizaciones particulares, la cepa atenuada de Salmonella y la al menos una cepa atenuada adicional de Salmonella se administran por vía oral. La administración oral es más simple, segura y cómoda que la administración parenteral. Sin embargo, debe observarse que la cepa atenuada de Salmonella 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.

La cepa atenuada de Salmonella que codifica una proteína receptora de VEGF y la al menos una cepa atenuada adicional de Salmonella que codifica un antígeno tumoral o un antígeno de estroma tumoral pueden proporcionarse en forma de una solución, una suspensión, un liofilizado, una cápsula con cubierta entérica, o cualquier otra forma adecuada. Típicamente, la cepa atenuada de Salmonella se formula como solución para beber. Esta realización ofrece la ventaja de una mejor conformidad del paciente. Preferiblemente, la solución para beber comprende medios para neutralizar los ácidos gástricos al menos en cierto grado, es decir, para acercar el pH del jugo gástrico a un pH de 7. Preferiblemente, la solución para beber es una suspensión tamponada que comprende la cepa atenuada de Salmonella de acuerdo con la presente invención. En una realización particular, la suspensión tamponada se obtiene mediante la suspensión de la cepa atenuada de Salmonella en un tampón adecuado, que contiene preferiblemente 2,6 g de hidrogenocarbonato de sodio, 1,7 g de ácido L-ascórbico, 0,2 g de lactosa monohidrato y 100 ml de agua potable.

El al menos un inhibidor de punto de control se administra preferiblemente en la formulación galénica aprobada del producto comercial.

En realizaciones particulares, el cáncer se selecciona de cáncer colorrectal, cáncer pancreático, cáncer de pulmón, cáncer de ovario, mesotelioma, leucemia mieloide aguda, leucemia mieloide crónica, glioblastoma, cáncer gástrico, cáncer hepatocelular, cáncer de células renales, cáncer de próstata, y cáncer cervical.

La cepa atenuada de Salmonella que codifica una proteína receptora de VEGF junto con al menos un inhibidor de punto de control sorprendentemente muestra efectos sinérgicos sobre las respuestas de células T y/o la supervivencia general a dosis relativamente bajas de la cepa atenuada de Salmonella que codifica una proteína receptora de VEGF. Similarmente, las vacunas de ADN que comprenden una cepa atenuada de Salmonella que codifica un antígeno tumoral o un antígeno de estroma tumoral son sorprendentemente efectivas a dosis relativamente bajas. La administración de dosis bajas de vacuna bacteriana viva minimiza el riesgo de excreción y por lo tanto de transmisión a terceras partes.

En realizaciones particulares, la dosis única de la cepa atenuada de Salmonella typhi Ty21a y la al menos una cepa atenuada adicional de Salmonella typhi Ty21a comprende de alrededor de $10^5$ a alrededor de $10^{11}$, particularmente de alrededor de $10^6$ a alrededor de $10^{10}$, más particularmente de alrededor de $10^6$ a alrededor de $10^9$, más particularmente de alrededor de $10^6$ a alrededor de $10^8$, lo más particularmente de alrededor de $10^6$ a alrededor de $10^7$ unidades formadoras de colonias (CFU).

En realizaciones particulares, la dosis única de la cepa atenuada de Salmonella typhi Ty21a que codifica una proteína receptora de VEGF y la al menos una cepa atenuada adicional de Salmonella typhi Ty21a que codifica un antígeno tumoral o un antígeno de estroma tumoral son esencialmente las mismas, ambas dosis individuales que comprende de alrededor de $10^5$ a alrededor de $10^{11}$, particularmente de alrededor de $10^6$ a alrededor de $10^{10}$, más particularmente de alrededor de $10^6$ a alrededor de $10^9$, más particularmente de alrededor de $10^6$ a alrededor de $10^8$, lo más particularmente de alrededor de $10^6$ a alrededor de $10^7$ unidades formadoras de colonias (CFU). En realizaciones particulares, la dosis única de la cepa atenuada de Salmonella typhi Ty21a que codifica una proteína receptora de VEGF es de alrededor de 10 a alrededor de 100 veces menor que la dosis única de al menos una cepa atenuada adicional de Salmonella typhi Ty21a que codifica un antígeno tumoral o un antígeno estroma tumoral. En otras realizaciones particulares, la dosis única de la cepa atenuada de Salmonella typhi Ty21a que codifica una proteína receptora de VEGF es de alrededor de 10 a alrededor de 100 veces mayor que la dosis única de la al menos una cepa atenuada adicional de Salmonella typhi Ty21a que codifica un antígeno tumoral o un antígeno estroma tumoral.

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, el tratamiento es inmunoterapia individualizada contra el cáncer que comprende la etapa de evaluar el patrón de expresión y/o la respuesta preinmune contra dicho antígeno tumoral en un paciente. Puede evaluarse el patrón de expresión de los antígenos tumorales y/o del estroma del paciente y/o las respuestas preinmunes del paciente contra los antígenos tumorales y/o del estroma en una primera etapa, por ejemplo, mediante diagnósticos complementarios dirigidos al patrón de antígenos tumorales y/o del estroma específicos del paciente. En dependencia del patrón de expresión de los antígenos tumorales y/o del estroma del paciente o de las respuestas preinmunes del paciente contra los antígenos tumorales y/o del estroma del paciente, la cepa atenuada de Salmonella typhi Ty21a que codifica una proteína receptora de VEGF puede administrarse en combinación con una o más vacunas adecuadas contra el cáncer basadas en Salmonella typhi Ty21a adicionales que comprenden sistemas de expresión eucariotas.

En dependencia de la aparición de posibles efectos secundarios, puede ser favorable 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.

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.

En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende una cepa atenuada de Salmonella typhi Ty21a que comprende al menos una copia de una molécula de ADN que comprende un casete de expresión eucariota que codifica una proteína receptora de VEGF para su uso en el tratamiento del cáncer, en donde la composición farmacéutica comprende, además, al menos una cepa atenuada adicional de Salmonella typhi Ty21a que comprende al menos una copia de una molécula de ADN adicional que comprende un casete de expresión adicional que codifica un antígeno tumoral o un antígeno de estroma tumoral, y en donde el tratamiento comprende, además, la administración de al menos un inhibidor de punto de control seleccionado del grupo que consiste en un anticuerpo contra PD-1, PD-L1 y CTLA4.

En realizaciones particulares, la composición farmacéutica comprende las vacunas de ADN VXM01 y VXM06.

En realizaciones particulares, la composición farmacéutica comprende las vacunas de ADN VXM01 y VXM04.

En realizaciones particulares, la composición farmacéutica comprende las vacunas de ADN VXM01 y VXM08.

En realizaciones particulares, la composición farmacéutica comprende las vacunas de ADN VXM01 y VXM65.

En realizaciones particulares, la al menos una cepa atenuada adicional de Salmonella typhi Ty21a comprende al menos una copia de una molécula de ADN adicional que comprende un casete de expresión eucariota adicional que codifica un antígeno tumoral o un antígeno de estroma tumoral seleccionado del grupo que consiste en la proteína tumoral de Wilms humana (WT1) que tiene la secuencia de aminoácidos como se encuentra en la SEQ ID NO 3 y una proteína que comparte al menos una identidad de secuencia de alrededor del 80% con la misma, Mesotelina humana (MSLN) que tiene la secuencia de aminoácidos como se encuentra en la SEQ ID NO 4 y una proteína que comparte al menos una identidad de secuencia de alrededor del 80% con la misma, CEA humano que tiene la secuencia de aminoácidos como se encuentra en la SEQ ID NO 5 y una proteína que comparte al menos una identidad de secuencia

de alrededor del 80% con la misma, CMV pp65 que tiene la secuencia de aminoácidos como se encuentra en la SEQ ID NO 6 y una proteína que comparte al menos una identidad de secuencia de alrededor del 80% con la misma, CMV pp65 que tiene la secuencia de aminoácidos como se encuentra en la SEQ ID NO 7 y una proteína que comparte al menos una identidad de secuencia de alrededor del 80% con la misma y CMV pp65 que tiene la secuencia de aminoácidos como se encuentra en la SEQ ID NO 8 y una proteína que comparte al menos una identidad de secuencia de alrededor del 80% con la misma, particularmente en donde la proteína del tumor de Wilms humana (WT1) tiene la secuencia de aminoácidos como se encuentra en la SEQ ID NO 3, Mesotelina humana (MSLN) tiene la secuencia de aminoácidos como se encuentra en la SEQ ID NO 4, CEA humano tiene la secuencia de aminoácidos como se encuentra en la SEQ ID NO 5 y CMV pp65 tiene la secuencia de aminoácidos como se encuentra en la SEQ ID NO 6, SEQ ID NO 7 o SEQ ID NO 8, y en donde el antígeno de estroma tumoral se selecciona de la proteína de activación de fibroblastos (FAP).

La composición farmacéutica de la presente invención puede estar en forma de una solución, una suspensión, una cápsula con recubrimiento entérico, un polvo liofilizado o cualquier otra forma adecuada para el uso pretendido.

La composición farmacéutica de la presente invención puede comprender, además, uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables.

En el contexto de la presente invención, el término "excipiente" se refiere a una sustancia natural o sintética formulada junto con el ingrediente activo de un medicamento. Los excipientes adecuados incluyen antiadherentes, aglutinantes, revestimientos, desintegrantes, sabores, colorantes, lubricantes, deslizantes, sorbentes, conservantes y edulcorantes.

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.

En realizaciones particulares, la al menos una cepa atenuada adicional de Salmonella typhi Ty21a que comprende portar un antígeno tumoral o un antígeno de estroma tumoral, la composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención puede proporcionarse adecuadamente como solución para beber. Esta realización ofrece la ventaja de una mejor conformidad del paciente y permite programas de vacunación masiva rápidos, factibles y asequibles, especialmente en geografías pobres.

En particular, las soluciones para beber adecuadas comprenden medios para neutralizar los ácidos gástricos al menos en cierto grado, es decir, para acercar el pH del jugo gástrico a un pH de 7. En una realización particular, la solución para beber es una suspensión tamponada obtenida mediante la suspensión de la cepa atenuada de Salmonella de acuerdo con la presente invención en un tampón adecuado, preferiblemente en un tampón que neutraliza los ácidos gástricos al menos en cierto grado, preferiblemente en un tampón que contiene 2,6 g de hidrogenocarbonato de sodio, 1,7 g de ácido L-ascórbico, 0,2 g de lactosa monohidrato y 100 ml de agua potable.

En realizaciones particulares, el casete de expresión y el casete de expresión adicional son un casete de expresión eucariota que comprende un promotor de CMV.

En realizaciones particulares, la proteína receptora de VEGF se selecciona del grupo que consiste en VEGFR-2 humano que tiene la secuencia de aminoácidos como se encuentra en la SEQ ID NO 1 y una proteína que comparte al menos una identidad de secuencia de alrededor del 80% con la misma.

En realizaciones particulares, el VEGFR-2 humano tiene la secuencia de aminoácidos como se encuentra en la SEQ ID NO 1.

En realizaciones particulares, el tratamiento comprende una o varias administraciones de la cepa atenuada de Salmonella que codifica una proteína receptora de VEGF o la composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención. La dosis única de las administraciones puede ser igual o diferente. En particular, el tratamiento comprende 1, 2, 3, 4, 5 o 6 administraciones de la cepa atenuada de Salmonella que codifica una proteína receptora de VEGF o la composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención, preferiblemente en donde las administraciones múltiples ocurren dentro de tres a seis meses consecutivos.

Breve descripción de las figuras y tablas

Figura 1: Secuencia de aminoácidos del VEGFR-2 humano codificado por el ADNc de VEGFR-2 contenido en el plásmido pVAX10.VR2-1 (correspondiente a la SEQ ID NO 1)
Figura 2: Secuencia de ácido nucleico comprendida en el vector de expresión vacío pVAX10 (secuencia del vector de expresión pVAX10 sin la porción del sitio de clonación múltiple que se encuentra entre los sitios de restricción *Nhe*I y *Xho*I (SEQ ID NO 2).

Figura 3: Secuencia de aminoácidos de WT-1 humana truncada codificada por el ADNc de WT-1 contenido en el plásmido pVAX10.hWT1 (SEQ ID NO 3)
Figura 4: Secuencia de aminoácidos de MSLN humana codificada por el ADNc de MSLN contenido en el plásmido pVAX10.hMSLN (SEQ ID NO 4)
Figura 5: Secuencia de aminoácidos de CEA humano codificado por el ADNc de CEA contenido en el plásmido pVAX10.hCEA (SEQ ID NO 5)
Figura 6: Secuencia de aminoácidos de CMV pp65 codificada por el ADNc de CMV pp65 contenido en el plásmido pVAX10.CMVpp65_1 (SEQ ID NO 6)
Figura 7: Secuencia de aminoácidos de CMV pp65 codificada por el ADNc de CMV pp65 contenido en el plásmido pVAX10.CMVpp65_2 (SEQ ID NO 7)
Figura 8: Secuencia de aminoácidos de CMV pp65 codificada por el ADNc de CMV pp65 contenido en el plásmido pVAX10.CMVpp65_3 (SEQ ID NO 8)
Figura 9: Secuencia de ácido nucleico contenida en el plásmido pVAX10.VR2-1 y que codifica VEGFR-2 humano de la SEQ ID NO 1
Figura 10: Secuencia de ácido nucleico contenida en el plásmido pVAX10.hWT1 y que codifica WT-1 humano de la SEQ ID NO 3
Figura 11: Secuencia de ácido nucleico contenida en el plásmido pVAX10.hMSLN y que codifica MSLN humano de la SEQ ID NO 4
Figura 12: Secuencia de ácido nucleico contenida en el plásmido pVAX10.hCEA y que codifica CEA humano de la SEQ ID NO 5
Figura 13: Secuencia de ácido nucleico contenida en el plásmido pVAX10.CMVpp65_1 y que codifica CMV pp65 de la SEQ ID NO 6
Figura 14: Secuencia de ácido nucleico contenida en el plásmido pVAX10.CMVpp65_2 y que codifica CMV pp65 de la SEQ ID NO 7
Figura 15: Secuencia de ácido nucleico contenida en el plásmido pVAX10.CMVpp65_3 y que codifica CMV pp65 de la SEQ ID NO 8
Figura 16: Mapa plasmídico de pVAX10.VR2-1
Figura 17: Mapa plasmídico de pVAX10.hWT1
Figura 18: mapa plasmídico de pVAX10.hMSLN
Figura 19: Mapa plasmídico de pVAX10.hCEA
Figura 20: Mapa plasmídico de pVAX10.CMVpp65_1
Figura 21: Mapa plasmídico de pVAX10.CMVpp65_2
Figura 22: Mapa plasmídico de pVAX10.CMVpp65_3
Figura 23: Efectos de la administración combinada de VXM01 y anti-CTLA4 en un modelo de tumor de ratón MC38 - crecimiento tumoral
Figura 24: Efectos de la administración combinada de VXM01 y anti-CTLA4 en un modelo de tumor de ratón MC38 - supervivencia
Figura 25: Efectos de la administración combinada de VXM01 y anti-CTLA4 en el modelo de tumor de ratón B16 - supervivencia
Figura 26: Programa de tratamiento Ejemplo 3
Figura 27: Efecto del tratamiento con VXM01 con o sin ciclofosfamida sobre el tamaño del tumor [$mm^3$] en el día 30. Cada punto representa el resultado del tumor de un animal.
Figura 28: Porcentajes de células $CD8^+$ específicas para VEGFR-2 en bazos de ratones BALB/C con células tumorales de colon CT26 subcutáneas. Cada punto representa los resultados de un bazo. Los resultados se dan en % total de 3 pentámeros de VEGFR2 agrupados.
Figura 29: Tinción inmunohistoquímica anti-CD3 de muestras tumorales de animales tratados con el vector vacío y VXM01, respectivamente. Las células CD3 positivas aparecen en color marrón (ver flecha, por ejemplo); aumento x200.
Figura 30: Cuantificación de infiltrados de células inmunes e inducción en veces media de PD-L1 en muestras tumorales de animales tratados con VXM01 o VXM01 más ciclofosfamida en comparación con animales tratados con el control de vector vacío. Los datos se derivan del recuento absoluto de células/área de tejido [$mm^2$]; Aumento x200.
Figura 31: Porcentajes de células $CD8^+$ específicas para VEGFR-2- y CEA en bazos de ratones sanos tratados con ratones que tienen células tumorales de colon CT26 subcutáneas. Cada punto representa los resultados de un bazo. Los resultados se dan en % total de 2 pentámeros de VEGFR2 agrupados.

**Ejemplos**

Ejemplo 1: Estudio combinado anti-CTLA4 de carcinoma de colon MC38:

Cuatro grupos de ratones C57/BI6/6J (n=6 cada uno) se retaron con una administración subcutánea de $5x10^5$ células tumorales MC38 en el día 0 del estudio.

Los animales se trataron con VXM01 mlow (Salmonella typhimurium que llevaba un casete de expresión eucariota que codificaba VEGFR-2 murino, fabricado por Richter-Helm BioLogics, Hannover, Alemania) solo a una dosis de $10^8$ CFU por sonda oral el día -1, día 1, día 4 y día 6 (n=6), o con VXM01mlow en la misma dosis, vía de administración, y

esquema de administración más el anticuerpo anti-CTLA4 murino los días 12, 14, 16 y 18 (n=6), o con el anticuerpo antiCTLA4 murino los días 12, 14, 16 y 18 solo (n=6), o sin tratamiento (n=6, control).

El crecimiento tumoral se midió mediante el uso de un microcalibrador. Los animales se sacrificaron tan pronto como el volumen tumoral alcanzó 1500 $mm^3$ por razones de bienestar animal.

La supervivencia de los animales de prueba se registró una vez al día.

El crecimiento tumoral se representa gráficamente en la Figura 23.

La supervivencia de los animales de prueba se muestra en un diagrama de Kaplan-Meier en la Figura 24.

Ejemplo 2: Estudio combinado anti-CTLA4 de melanoma B16-F10:

Cuatro grupos de ratones C57/BI6/6J (n=6 cada uno) se retaron con una administración intravenosa de $2x10^5$ células tumorales B16-F10 en el día 0 del estudio.

Los animales se trataron con un VXM01 mlow (Salmonella typhimurium que llevaba un casete de expresión eucariota que codificaba VEGFR-2 murino, fabricado por Richter-Helm BioLogics, Hannover, Alemania) solo a una dosis de $10^8$ CFU por sonda oral el día 5, día -3, día 0 y día 2 (n=6), o con VXM01 mlow a la misma dosis, vía de administración, y esquema de administración más el anticuerpo anti-CTLA4 murino en los días 8, 10, 12 y 14 (n=6), o con el anticuerpo antiCTLA4 murino el día 8, 10, 12 y 14 solo (n=6), o sin tratamiento (n=6, control).

La supervivencia de los animales de prueba se registró una vez al día.

La supervivencia de los animales de prueba se muestra en un diagrama de Kaplan-Meier en la Figura 25.

Ejemplo 3: actividad antitumoral de la vacuna VMX01 en el modelo de tumor murino CT26

El objetivo de este estudio fue evaluar la actividad antitumoral de VXM01 con o sin ciclofosfamida en ratones BALB/C con tumores de colon CT26 subcutáneos, y caracterizar las respuestas inmunes provocadas por los tratamientos en bazo y tumor.

El control VXMOm vacío (control de vector de S. typhimurium sin plásmido de expresión) y VXM01mlow (Salmonella typhimurium que lleva un casete de expresión eucariota que codifica VEGFR-2 murino) se administraron a $10^8$ CFU/adm por sonda oral (por os, PO) a través de un tubo de sonda. Independientemente de los grupos de animales, cada animal recibió un tampón de aplicación PO previo a la dosis para neutralizar el ácido en el estómago antes de la dosificación (100 µl/animal/aplicación). Este tampón estaba compuesto por la disolución de 2,6 g de hidrogenocarbonato de sodio, 1,7 g de ácido L-ascórbico, 0,2 g de lactosa monohidrato en 100 ml de agua potable y se aplicó dentro de los 30 min previos a la aplicación de VXM0m vacío y VXM01m mlow.

Se inyectó ciclofosfamida a 100 mg/kg/adm en la cavidad peritoneal de los ratones (intraperitonealmente, IP). El volumen de inyección IP no superó los 10 ml/kg y se calculó de acuerdo con el peso corporal más reciente de los ratones.

El tratamiento comenzó en el día 0 (D0), un día después de la aleatorización que se consideró como el día -1 (D-1). 33 ratones BALB/C (BALB/CByJ) hembras sanas, de 6 semanas de edad, se aleatorizaron de acuerdo con su peso corporal en 4 grupos de 11 animales, cada uno mediante el uso del software Vivo manager® (Biosystemes, Couternon, Francia). Se realizó una prueba estadística (análisis de varianza) para evaluar la homogeneidad entre los grupos.

El programa de tratamiento fue el siguiente:
Grupo 1: Los animales del grupo 1 recibieron un total de 6 administraciones PO de VXMOm vacío en D1, D3, D5, D7, D14 y D21.
Grupo 2: Los animales del grupo 2 recibieron un total de 6 administraciones PO de VXM01 mlow en D1, D3, D5, D7, D14 y D21.
Grupo 3: Los animales del grupo 3 recibieron una única inyección IP de ciclofosfamida en D0 y un total de 6 administraciones PO de VXM01mlow en D1, D3, D5, D7, D14 y D21.

El programa de tratamiento se resume en la Tabla 1 y la Figura 26.

| Tab. 1: Programa de tratamiento | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| **Grupo** | **Núm. Animales** | **Tratamiento** | **Dosis** | **Ruta** | **Programa de tratamiento** |
| 1* | 11 | Vector vacío | $10^8$ CFU/adm | PO | D1, D3, D5, D7, D14 y D21 |
| 2* | 11 | VXM01 mlow | $10^8$ CFU/adm | PO | D1, D3, D5, D7, D14 y D21 |
| 3* | 11 | VXM01 mlow | $10^8$ CFU/adm | PO | D1, D3, D5, D7, D14 y D21 |
| | | Ciclofosfamida | 100 mg/kg/adm | IP | D0 |
| TOTAL | 33 | | | | |
| * Cada animal recibió un tampón de aplicación previo a la dosis por vía oral (PO) para neutralizar el ácido en el estómago antes de la dosificación | | | | | |

Los tumores se indujeron por inyección subcutánea de $1x10^6$ de células CT26 en 200 µl de RPMI 1640 en el flanco derecho de los animales de prueba el día 8 (D8).

El día de la terminación (D30, es decir, 22 días después de la inoculación del tumor), se recolectaron los tumores de todos los ratones y se midió el tamaño tumoral.

Los resultados se representan gráficamente en la Figura 27. El tamaño tumoral disminuyó significativamente en animales tratados con VXM01 solo o con VXM01 más ciclofosfamida en comparación con el control de vector vacío. La reducción del tamaño tumoral fue más pronunciada en los animales tratados con ciclofosfamida y la vacuna VXM01.

El día de la finalización, se recolectaron los bazos de todos los ratones (11 muestras por grupo) y se colocaron individualmente en tubos que contenían PBS enfriado (2-8 °C). Se realizó un inmunomonitoreo de las respuestas de células T específicas para VEGFR-2 mediante el uso de citometría de flujo con pentámeros.

Para este propósito, las muestras de bazo se lavaron con PBS y posteriormente se homogeneizaron sumergiéndolas a través de un filtro de células de nylon de 100 µm. Durante la homogeneización, el filtro se enjuagó varias veces con PBS estéril frío. Las muestras se centrifugaron a 1.500 rpm durante 10 minutos a 2-8 °C, el sobrenadante se desechó y el sedimento celular se resuspendió en 2 ml de tampón de lisis de glóbulos rojos ACK (1 ml de tampón por bazo). Las células se incubaron en el tampón de lisis durante 1 minuto a temperatura ambiente. Luego, se añadió PBS hasta 40 ml para detener la lisis y la suspensión celular se tamizó a través de un filtro nuevo (40 µm) y el flujo que pasó a través se recolectó en un nuevo tubo de 50 ml. Luego de la centrifugación a 1.500 rpm durante 10 minutos a 2-8 °C, el sobrenadante se desechó y el sedimento se resuspendió en 5 ml de medio DMEM suplementado con II-2. Las células se incubaron durante la noche a 37 °C y 5% de $CO_2$.

Antes de la tinción de los pentámeros, se realizó una tinción viva/muerta (L/D) mediante el uso del kit Live Dead (L/D) Fixable Yellow Dead Cell Stain de Invitrogen de acuerdo con las instrucciones del fabricante, con el fin de excluir las células muertas mediante su inclusión en la población negativa.

La tinción de los pentámeros se realizó mediante el uso de Pro5® Recombinant MHC Pentamers por Proimmune, Oxford, Reino Unido, de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Se usaron los siguientes pentámeros KDR (VEGFR-2):

| | |
|---|---|
| H-2Kd - SYQYGTMQTL | **KDR-STL** |
| H-2Kd - KYLSYPAPDI | **KDR-KDI** |
| H-2Kd - RFVPDGNRI | **KDR-RRI** |
| H-2Kd - TYQSIMYIV | **KDR-TIV** |
| H-2Kd - DFLTLEHLI | **KDR-DLI** |

Los resultados de la tinción de los pentámeros se muestran en la Figura 28.

El número de células T citotóxicas $CD8^+$ específicas para VEGFR-2 aumentó significativamente en animales tratados con VXM01 solo o con VXM01 más ciclofosfamida en comparación con el control de vector vacío. El tratamiento con ciclofosfamida junto con VXM01 aumentó significativamente la respuesta del pentámero KDR en comparación con la respuesta obtenida con la vacuna VXM01 sola.

Los tumores de 5 ratones en cada grupo se analizaron por inmunohistoquímica (IHC).

Para ese propósito, los tumores se fijaron en 10% de formalina tamponada neutra durante de 24 h a 48 h, se transfirieron a etanol y luego se embebieron en parafina. Las muestras embebidas se sometieron a tinción inmunohistoquímica. Los resultados se representan gráficamente en las Figuras 29 y 30.

Se encontró que el número medio de células T por unidad de tejido aumentaba en los tumores de ratones tratados con VXM01 solo o con VXM01 más ciclofosfamida en comparación con el control de vector vacío. Se encontró que las poblaciones de células $CD3^+$ y $CD8^+$ aumentaron aproximadamente tres veces en las muestras tumorales de ratones tratados con VXM01 más ciclofosfamida y aproximadamente dos veces en muestras tumorales de ratones tratados con VXM01 solo. También la población de células T $CD4^+$ aumentó en los animales tratados con la vacuna VXM01 con y sin pretratamiento con ciclofosfamida, con un aumento de 1,7 veces en el número medio de células $CD4^+$ / área de tejido en ambos grupos de vacunas en comparación con el control de vector vacío.

Además, el número de células inmunes positivas para PD-1 aumentó en un factor de 2,0 y 2,1 y el tumor se enriqueció en células que expresan PD-L1 tras el tratamiento con VXM01 como agente único o en combinación con ciclofosfamida, lo que indica claramente que el tratamiento con VXM01 podría aumentar la susceptibilidad de los tumores hacia el tratamiento con inhibidores de punto de control anti-PD-1 y anti-PD-L1.

Ejemplo 4: estudio de combinación VXM01 / VXM08 en ratones C56BL/6J sanos

El objetivo de este estudio fue evaluar la capacidad de VXM01mlow y VXM08hm para desencadenar una respuesta inmune en ratones sanos.

Se administraron el control VXMOm vacío (control de vector de S. typhimurium sin plásmido de expresión), la vacuna VXM01mlow (Salmonella typhimurium que porta un casete de expresión eucariota que codifica VEGFR-2 murino) y la vacuna VXM08hm (Salmonella typhimurium que porta un casete de expresión eucariota que codifica CEA humano) a $10^8$ CFU/adm en 50 µl por aplicación por sonda oral (por os, PO) a través de un tubo de sonda. Independientemente de los grupos de animales, cada animal recibió el tampón PO de aplicación previa a la dosis para neutralizar el ácido en el estómago antes de la dosificación (50 µl/animal/aplicación antes de la administración de la vacuna única; 100 µl/animal/aplicación antes de la administración combinada de VXM01 y VXM08). Este tampón estaba compuesto por la disolución de 2,6 g de hidrogenocarbonato de sodio, 1,7 g de ácido L-ascórbico, 0,2 g de lactosa monohidrato en 100 ml de agua potable y se aplicó dentro de los 30 min previos a la aplicación de VXM0m vacío, VXM01 mlow y/o VXM08hm.

40 ratones C57BU6J hembras sanas, de 6-7 semanas de edad, se aleatorizaron el día 0 (D0) de acuerdo con su peso corporal en 5 grupos de 8 animales cada uno mediante el uso del software Vivo manager® (Biosystemes, Couternon, Francia). Se realizó una prueba estadística (análisis de varianza) para evaluar la homogeneidad entre los grupos.

El programa de tratamiento fue el siguiente:
Grupo 1: Los animales del grupo 1 recibieron un total de 6 administraciones PO de VXMOm vacío en D1, D3, D5, D7, D14 y D21.
Grupo 2: Los animales del grupo 2 recibieron un total de 6 administraciones PO de VXM01 mlow en D1, D3, D5, D7, D14 y D21.
Grupo 3: Los animales del grupo 3 recibieron un total de 6 administraciones PO de VXM08hm en D2, D4, D6, D8, D15 y D22.
Grupo 4: Los animales del grupo 4 recibieron un total de 6 administraciones PO de VXM01 mlow en D2, D4, D6, D8, D15 y D22 y un total de 6 administraciones PO de VXM08hm en D2, D4, D6, D8, D15 y D22.
Grupo 5: Los animales del grupo 5 recibieron un total de 6 administraciones PO de VXM01mlow en D1, D3, D5, D7, D14 y D21 y un total de 6 administraciones PO de VXM08hm en D2, D4, D6, D8, D15 y D22.

El programa de tratamiento se resume en la Tabla 2.

| Grupo | Núm. Ratones | Tratamiento | Dosis (CFU/adm) | Volumen (µl) | Ruta | Programa de tratamiento |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 8 | Vector vacío | | 50 | PO | Sensibilización: D1, D3, D5, D7<br>Refuerzo: D14, D21 |
| 2 | 8 | VXM01mlow | $10^8$ | 50 | PO | Sensibilización: D1, D3, D5, D7<br>Refuerzo: D14, D21 |
| 3 | 8 | VXM08hm | $10^8$ | 50 | PO | Sensibilización: D2, D4, D6, D8<br>Refuerzo: D15, D22 |
| 4 | 8 | VXM01mlow | $10^8$ | 50 | PO | Sensibilización: D2, D4, D6, D8<br>Refuerzo: D15 y D22 |
| | | VXM08hm* (concomitante) | $10^8$ | 50 | PO | Sensibilización: D2, D4, D6, D8<br>Refuerzo: D15, D22 |

| | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 5 | 8 | VXM01mlow | $10^8$ | 50 | PO | Sensibilización: D1, D3, D5, D7<br>Refuerzo: D14, D21 |
| | | VXM08hm (días alternos) | $10^8$ | 50 | PO | Sensibilización: D2, D4, D6, D8<br>Refuerzo: D15, D22 |
| *VXM08 se administró justo después de VMX01, el mismo día de la aplicación. | | | | | | |

El día de la finalización (es decir, D29), se recolectaron los bazos de todos los ratones (8 muestras por grupo) y se colocaron individualmente en tubos que contenían PBS enfriado (2-8 °C). Se realizó el inmunomonitoreo de las respuestas de células T específicas para VEGFR-2 y CEA mediante el uso de citometría de flujo con pentámeros. El análisis de los pentámeros incluida la tinción viva/muerta anterior se realizó como se describe en el Ejemplo 3.

Los siguientes pentámeros KDR (VEGFR-2) se usaron como una mezcla de grupo en la misma proporción:

H-2Db-VILTNPISM **KDR2**
H-2Db-FSNSTNDILI **KDR3**

Los siguientes pentámeros CEA se usaron como una mezcla de grupo en la misma proporción:

H-2Db-CGIQNSVSA **CEA-CSA-Penta**
H-2Db-LQLSNGNRTL **CEA-LTL-Penta**
H-2Db-CGIQNKLSV **CEA-CSV-Penta**

Los resultados de la tinción de los pentámeros se muestran en la Figura 31. La frecuencia media de las células T $CD8^+$ específicas para VEGFR-2 (KDR) fue 1,71, 4,36 y 2,76 veces mayor en los ratones tratados con VXM01mlow, VXM01mlow/VXM08hm (concomitante) y VXM01 mlow/VXM08hm (días alternos) respectivamente que en el grupo de control. Los ratones tratados con VXM01 mlow/VXM08hm ya sea concomitantemente o en días alternos mostraron una mayor frecuencia de células T $CD8^+$ específicas para VEGFR-2 en comparación con los ratones tratados con VXM01 mlow solo. Aunque no fue estadísticamente significativo, la sinergia fue ligeramente mayor cuando VXM01 mlow y la vacuna VXM08hm se aplicaron concomitantemente, es decir, el mismo día en comparación con el régimen de días alternos.

La frecuencia media de células T $CD8^+$ específicas para CEA fue 1,29, 2,23 y 1,95 veces mayor en ratones tratados con VXM08hm, VXM01mlow/VXM08hm (concomitante) y VXM01mlow/VXM08hm (días alternos) respectivamente que en el grupo de control. Los ratones tratados con VXM01 mlow/VXM08hm concomitantemente o en días alternos mostraron una mayor frecuencia de células T $CD8^+$ específicas para CEA en comparación con los ratones tratados con VXM08hm solo. Aunque no fue estadísticamente significativo, la sinergia fue ligeramente mayor cuando VXM01 mlow y la vacuna VXM08hm se aplicaron concomitantemente, es decir, el mismo día en comparación con el régimen de días alternos.

**REIVINDICACIONES**

1. Una cepa atenuada de *Salmonella typhi Ty21a que* comprende al menos una copia de una molécula de ADN que comprende un casete de expresión eucariota que codifica una proteína receptora de VEGF, para su uso en el tratamiento del cáncer, en donde el tratamiento comprende, además, la administración de al menos un inhibidor de punto de control seleccionado del grupo que consiste en un anticuerpo contra PD-1, PD-L1 y CTLA4.

2. La cepa atenuada de *Salmonella* para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la proteína receptora de VEGF se selecciona del grupo que consiste en VEGFR-2 humano que tiene la secuencia de aminoácidos como se encuentra en la SEQ ID NO 1 y una proteína que comparte al menos una identidad de secuencia de alrededor del 80% con la misma.

3. La cepa atenuada de *Salmonella* para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la molécula de ADN comprende el gen de resistencia al antibiótico kanamicina, el ori pMB1 y un promotor de CMV.

4. La cepa atenuada de *Salmonella* para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el tratamiento comprende, además, la administración de al menos una cepa atenuada adicional de Salmonella typhi Ty21a que comprende al menos una copia de una molécula de ADN adicional que comprende un casete de expresión eucariota adicional que codifica un antígeno tumoral o un antígeno de estroma tumoral.

5. La cepa atenuada de *Salmonella* para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicho antígeno tumoral codificado por dicha cepa atenuada adicional de Salmonella se selecciona del grupo que consiste en la proteína tumoral de Wilms humana (WT1) que tiene la secuencia de aminoácidos como se encuentra en la SEQ ID NO 3 y una proteína que comparte al menos una identidad de secuencia de alrededor del 80% con la misma, la Mesotelina humana (MSLN) que tiene la secuencia de aminoácidos como se encuentra en la SEQ ID NO 4 y una proteína que comparte al menos una identidad de secuencia de alrededor del 80% con la misma, CEA humano que tiene la secuencia de aminoácidos como se encuentra en SEQ ID NO 5 y una proteína que comparte al menos una identidad de secuencia de alrededor del 80% con la misma, CMV pp65 que tiene la secuencia de aminoácidos como se encuentra en la SEQ ID NO 6 y una proteína que comparte al menos una identidad de secuencia de alrededor del 80% con la misma, CMV pp65 que tiene la secuencia de aminoácidos como se encuentra en la SEQ ID NO 7 y una proteína que comparte al menos una identidad de secuencia de alrededor del 80% con la misma, y CMV pp65 que tiene la secuencia de aminoácidos como se encuentra en SEQ ID NO 8 y una proteína que comparte al menos una identidad de secuencia de alrededor del 80% con la misma, particularmente en donde la proteína tumoral de Wilms humana (WT1) tiene la secuencia de aminoácidos como se encuentra en la SEQ ID NO 3, la Mesotelina humana (MSLN) tiene la secuencia de aminoácidos como se encuentra en la SEQ ID NO 4, CEA humano tiene la secuencia de aminoácidos como se encuentra en la SEQ ID NO 5, y CMV pp65 tiene la secuencia de aminoácidos como se encuentra en la SEQ ID NO 6, SEQ ID NO 7 o SEQ ID NO 8, y en donde dicho antígeno de estroma tumoral codificado por dicha cepa atenuada adicional de Salmonella se selecciona del grupo que consiste en proteína de activación de fibroblastos (FAP) humana.

6. La cepa atenuada de *Salmonella* para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la cepa atenuada de Salmonella se administra simultáneamente con o antes de dicho al menos un inhibidor de punto de control.

7. La cepa atenuada de *Salmonella* para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el tratamiento se acompaña de quimioterapia o radioterapia.

8. La cepa atenuada de *Salmonella* para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la cepa atenuada de Salmonella se administra por vía oral.

9. La cepa atenuada de *Salmonella* para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el cáncer se selecciona de cáncer colorrectal, cáncer pancreático, cáncer de pulmón, cáncer de ovario, mesotelioma, leucemia mieloide aguda, leucemia mieloide crónica, glioblastoma, cáncer gástrico, cáncer hepatocelular, cáncer de células renales, cáncer de próstata, y cáncer cervical.

10. La cepa atenuada de *Salmonella* para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde una dosis única de la cepa atenuada de Salmonella comprende de alrededor de $10^6$ a alrededor de $10^9$ unidades formadoras de colonias (CFU).

11. La cepa atenuada de *Salmonella* para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el tratamiento es inmunoterapia individualizada contra el cáncer que comprende la etapa de evaluar el patrón de expresión y/o la respuesta preinmune contra dicho antígeno tumoral en un paciente.

12. Una composición farmacéutica que comprende una cepa atenuada de *Salmonella typhi Ty21a que* comprende al menos una copia de una molécula de ADN que comprende un casete de expresión eucariota que codifica una proteína receptora de VEGF para su uso en el tratamiento del cáncer, en donde la composición farmacéutica comprende, además, al menos una cepa atenuada adicional de Salmonella que comprende al menos una copia de una molécula de ADN adicional que comprende un casete de expresión adicional que codifica un antígeno tumoral o un antígeno de estroma tumoral, y en donde el tratamiento comprende, además, la administración de al menos un inhibidor de punto de control seleccionado del grupo que consiste en un anticuerpo contra PD-1, PD-L1 y CTLA4.

13. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 12, en donde la proteína receptora de VEGF se selecciona del grupo que consiste en VEGFR-2 humano que tiene la secuencia de aminoácidos como se encuentra en la SEQ ID NO 1 y una proteína que comparte al menos una identidad de secuencia de alrededor del 80% con la misma.

Figura 1

```
        10         20         30         40         50         60
MQSKVLLAVA LWLCVETRAA SVGLPSVSLD LPRLSIQKDI LTIKANTTLQ ITCRGQRDLD

        70         80         90        100        110        120
WLWPNNQSGS EQRVEVTECS DGLFCKTLTI PKVIGNDTGA YKCFYRETDL ASVIYVYVQD

       130        140        150        160        170        180
YRSPFIASVS DQHGVVYITE NKNKTVVIPC LGSISNLNVS LCARYPEKRF VPDGNRISWD

       190        200        210        220        230        240
SKKGFTIPSY MISYAGMVFC EAKINDESYQ SIMYIVVVVG YRIYDVVLSP SHGIELSVGE

       250        260        270        280        290        300
KLVLNCTART ELNVGIDFNW EYPSSKHQHK KLVNRDLKTQ SGSEMKKFLS TLTIDGVTRS

       310        320        330        340        350        360
DQGLYTCAAS SGLMTKKNST FVRVHEKPFV AFGSGMESLV EATVGERVRI PAKYLGYPPP

       370        380        390        400        410        420
EIKWYKNGIP LESNHTIKAG HVLTIMEVSE RDTGNYTVIL TNPISKEKQS HVVSLVVYVP

       430        440        450        460        470        480
PQIGEKSLIS PVDSYQYGTT QTLTCTVYAI PPPHHIHWYW QLEEECANEP SQAVSVTNPY

       490        500        510        520        530        540
PCEEWRSVED FQGGNKIEVN KNQFALIEGK NKTVSTLVIQ AANVSALYKC EAVNKVGRGE

       550        560        570        580        590        600
RVISFHVTRG PEITLQPDMQ PTEQESVSLW CTADRSTFEN LTWYKLGPQP LPIHVGELPT

       610        620        630        640        650        660
PVCKNLDTLW KLNATMFSNS TNDILIMELK NASLQDQGDY VCLAQDRKTK KRHCVVRQLT
```

Figura 1 (cont.)

```
      670        680        690        700        710        720
VLERVAPTIT GNLENQTTSI GESIEVSCTA SGNPPPQIMW FKDNETLVED SGIVLKDGNR.

      730        740        750        760        770        780
NLTIRRVRKE DEGLYTCQAC SVLGCAKVEA FFIIEGAQEK TNLEIIILVG TAVIAMFFWL

      790        800        810        820        830        840
LLVIILRTVK RANGGELKTG YLSIVMDPDE LPLDEHCERL PYDASKWEFP RDRLKLGKPL

      850        860        870        880        890        900
GRGAFGQVIE ADAFGIDKTA TCRTVAVKML KEGATHSEHR ALMSELKILI HIGHHLNVVN

      910        920        930        940        950        960
LLGACTKPGG PLMVIVEFCK FGNLSTYLRS KRNEFVPYKT KGARFRQGKD YVGAIPVDLK

      970        980        990       1000       1010       1020
RRLDSITSSQ SSASSGFVEE KSLSDVEEEE APEDLYKDFL TLEHLICYSF QVAKGMEFLA

     1030       1040       1050       1060       1070       1080
SRKCIHRDLA ARNILLSEKN VVKICDFGLA RDIYKDPDYV RKGDARLPLK WMAPETIFDR

     1090       1100       1110       1120       1130       1140
VYTIQSDVWS FGVLLWEIFS LGASPYPGVK IDEEFCRRLK EGTRMRAPDY TTPEMYQTML

     1150       1160       1170       1180       1190       1200
DCWHGEPSQR PTFSELVEHL GNLLQANAQQ DGKDYIVLPI SETLSMEEDS GLSLPTSPVS

     1210       1220       1230       1240       1250       1260
CMEEEEVCDP KFHYDNTAGI SQYLQNSKRK SRPVSVKTFE DIPLEEPEVK VIPDDNQTDS

     1270       1280       1290       1300       1310       1320
GMVLASEELK TLEDRTKLSP SFGGMVPSKS RESVASEGSN QTSGYQSGYH SDDTDTTVYS
```

Figura 1 (cont.)

```
      1330        1340        1350
SEEAELLKLI EIGVQTGSTA QILQPDSGTT LSSPPV
```

Figura 2

TGGGCTTTTGCTGGCCTTTTGCTCACATGTTCTTGACTCTTCGCGATGTACGGGCCA
GATATACGCGTTGACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTC
ATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCC
GCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTC
CCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGACTATTTACGGT
AAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTG
ACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTATGG
GACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGATG
CGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTGACTCACGGGGATTTCC
AAGTCTCCACCCCATTGACGTCAATGGGAGTTTGTTTTGGCACCAAAATCAACGGG
ACTTTCCAAAATGTCGTAACAACTCCGCCCCATTGACGCAAATGGGCGGTAGGCGT
GTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCTCTGGCTAACTAGAGAACCCACTGC
TTACTGGCTTATCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGACCCAAGCTGGCTAGCC
TCGAGTCTAGAGGGCCCGTTTAAACCCGCTGATCAGCCTCGACTGTGCCTTCTAGT
TGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCCCTCCCCCGTGCCTTCCTTGACCCTGGAAGGTGC
CACTCCCACTGTCCTTTCCTAATAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAG
GTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTG
GGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGCTTCTACTGGG
CGGTTTTATGGACAGCAAGCGAACCGGAATTGCCAGCTGGGGCGCCCTCTGGTAA
GGTTGGGAAGCCCTGCAAAGTAAACTGGATGGCTTTCTCGCCGCCAAGGATCTGAT
GGCGCAGGGGATCAAGCTCTGATCAAGAGACAGGATGAGGATCGTTTCGCATGATT
GAACAAGATGGATTGCACGCAGGTTCTCCGGCCGCTTGGGTGGAGAGGCTATTCG
GCTATGACTGGGCACAACAGACAATCGGCTGCTCTGATGCCGCCGTGTTCCGGCT
GTCAGCGCAGGGGCGCCCGGTTCTTTTTGTCAAGACCGACCTGTCCGGTGCCCTG
AATGAACTGCAAGACGAGGCAGCGCGGCTATCGTGGCTGGCCACGACGGGCGTTC
CTTGCGCAGCTGTGCTCGACGTTGTCACTGAAGCGGGAAGGGACTGGCTGCTATT
GGGCGAAGTGCCGGGGCAGGATCTCCTGTCATCTCACCTTGCTCCTGCCGAGAAA
GTATCCATCATGGCTGATGCAATGCGGCGGCTGCATACGCTTGATCCGGCTACCTG
CCCATTCGACCACCAAGCGAAACATCGCATCGAGCGAGCACGTACTCGGATGGAA
GCCGGTCTTGTCGATCAGGATGATCTGGACGAAGAGCATCAGGGGCTCGCGCCAG
CCGAACTGTTCGCCAGGCTCAAGGCGAGCATGCCCGACGGCGAGGATCTCGTCGT
GACCCATGGCGATGCCTGCTTGCCGAATATCATGGTGGAAAATGGCCGCTTTTCTG
GATTCATCGACTGTGGCCGGCTGGGTGTGGCGGACCGCTATCAGGACATAGCGTT
GGCTACCCGTGATATTGCTGAAGAGCTTGGCGGCGAATGGGCTGACCGCTTCCTC
GTGCTTTACGGTATCGCCGCTCCCGATTCGCAGCGCATCGCCTTCTATCGCCTTCT
TGACGAGTTCTTCTGAATTATTAACGCTTACAATTTCCTGATGCGGTATTTTCTCCTT
ACGCATCTGTGCGGTATTTCACACCGCATACAGGTGGCACTTTTCGGGGAAATGTG
CGCGGAACCCCTATTTGTTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGA
GACAATAACCCTGATAAATGCTTCAATAATAGCACGTGCTAAAACTTCATTTTTAATT
TAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTTAACGT
GAGTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCCATCAGTGACCAAACAGGAAAAAACC
GCCCTTAACATGGCCCGCTTTATCAGAAGCCAGACATTAACGCTTCTGGAGAAACT
CAACGAGCTGGACGCGGATGAACAGGCAGACATCTGTGAATCGCTTCACGACCAC

Figura 2 (cont.)

GCTGATGAGCTTTACCGCAGCTGCCTCGCGCGTTTCGGTGATGACGGTGAAAACCT
CTGACACATGCAGCTCCCGGAGACGGTCACAGCTTGTCTGTAAGCGGATGCCGGG
AGCAGACAAGCCCGTCAGGGCGCGTCAGCGGGTGTTGGCGGGTGTCGGGGCGCA
GCCATGACCCAGTCACGTAGCGATAGCGGAGTGTATACTGGCTTAACTATGCGGCA
TCAGAGCAGATTGTACTGAGAGTGCACCATATGCGGTGTGAAATACCGCACAGATG
CGTAAGGAGAAAATACCGCATCAGGCGCTCTTCCGCTTCCTCGCTCACTGACTCGC
TGCGCTCGGTCGTTCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAAT
ACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAGGCC
AGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTC
CGCCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACC
CGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCT
CCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCCTTTCTCCCTTCGGGAAG
CGTGGCGCTTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCGTTC
GCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCCGTTCAGCCCGACCGCTGCGCCTT
ATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGG
CAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGA
GTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGGACAGTATTTGGTATCTG
CGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCA
AACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTGTTTGCAAGCAGCAGATTACGCGC
AGAAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATC

Figura 3

```
          10         20         30         40         50         60
MGSDVRDLNA LLPAVPSLGG GGGCALPVSG AAQWAPVLDF APPGASAYGS LGGPAPPPAP

          70         80         90        100        110        120
PPPPPPPPHS FIKQEPSWGG AEPHEEQCLS AFTVHFSGQF TGTAGACRYG PFGPPPPSQA

         130        140        150        160        170        180
SSGQARMFPN APYLPSCLES QPAIRNQGYS TVTFDGTPSY GHTPSHHAAQ FPNHSFKHED

         190        200        210        220        230        240
PMGQQGSLGE QQYSVPPPVY GCHTPTDSCT GSQALLLRTP YSSDNLYQMT SQLECMTWNQ

         250        260        270        280        290        300
MNLGATLKGV AAGSSSSVKW TEGQSNHSTG YESDNHTTPI LCGAQYRIHT HGVFRGIQDV

         310        320        330        340        350        360
RRVPGVAPTL VRSASETSEK RPFMCAYPGC NKRYFKLSHL QMHSRKHTGE KPYQCDFKDC

         370
ERRFSRSDQL K
```

Figura 4

MALPTARPLLGSCGTPALGSLLFLLFSLGWVQPSRTLAGETGQEAAPLDGVLANPPNISSLS
PRQLLGFPCAEVSGLSTERVRELAVALAQKNVKLSTEQLRCLAHRLSEPPEDLDALPLDLLL
FLNPDAFSGPQACTRFFSRITKANVDLLPRGAPERQRLLPAALACWGVRGSLLSEADVRAL
GGLACDLPGRFVAESAEVLLPRLVSCPGPLDQDQQEAARAALQGGGPPYGPPSTWSVST
MDALRGLLPVLGQPIIRSIPQGIVAAWRQRSSRDPSWRQPERTILRPRFRREVEKTACPSGK
KAREIDESLIFYKKWELEACVDAALLATQMDRVNAIPFTYEQLDVLKHKLDELYPQGYPESVI
QHLGYLFLKMSPEDIRKWNVTSLETLKALLEVNKGHEMSPQAPRRPLPQVATLIDRFVKGR
GQLDKDTLDTLTAFYPGYLCSLSPEELSSVPPSSIWAVRPQDLDTCDPRQLDVLYPKARLAF
QNMNGSEYFVKIQSFLGGAPTEDLKALSQQNVSMDLATFMKLRTDAVLPLTVAEVQKLLGP
HVEGLKAEERHRPVRDWILRQRQDDLDTLGLGLQGGIPNGYLVLDLSMQEALSGTPCLLGP
GPVLTVLALLLASTLA

Figura 5

MESPSAPPHRWCIPWQRLLLTASLLTFWNPPTTAKLTIESTPFNVAEGKEVLLLVHNLP
QHLFGYSWYKGERVDGNRQIIGYVIGTQQATPGPAYSGREIIYPNASLLIQNIIQNDTGFY
TLHVIKSDLVNEEATGQFRVYPELPKPSISSNNSKPVEDKDAVAFTCEPETQDATYLWW
VNNQSLPVSPRLQLSNGNRTLTLFNVTRNDTASYKCETQNPVSARRSDSVILNVLYGPD
APTISPLNTSYRSGENLNLSCHAASNPPAQYSWFVNGTFQQSTQELFIPNITVNNSGSY
TCQAHNSDTGLNRTTVTTITVYAEPPKPFITSNNSNPVEDEDAVALTCEPEIQNTTYLW
WVNNQSLPVSPRLQLSNDNRTLTLLSVTRNDVGPYECGIQNKLSVDHSDPVILNVLYGP
DDPTISPSYTYYRPGVNLSLSCHAASNPPAQYSWLIDGNIQQHTQELFISNITEKNSGLY
TCQANNSASGHSRTTVKTITVSAELPKPSISSNNSKPVEDKDAVAFTCEPEAQNTTYLW
WVNGQSLPVSPRLQLSNGNRTLTLFNVTRNDARAYVCGIQNSVSANRSDPVTLDVLYG
PDTPIISPPDSSYLSGANLNLSCHSASNPSPQYSWRINGIPQQHTQVLFIAKITPNNNGTY
ACFVSNLATGRNNSIVKSITVSASGTSPGLSAGATVGIMIGVLVGVALI

Figura 6

MESRGRRCPEMISVLGPISGHVLKAVFSRGDTPVLPHETRLLQTGIHVRVSQPSLILVSQ
YTPDSTPCHRGDNQLQVQHTYFTGSEVENVSVNVHNPTGRSICPSQEPMSIYVYALPL
KMLNIPSINVHHYPSAAERKHRHLPVADAVIHASGKQMWQARLTVSGLAWTRQQNQW
KEPDVYYTSAFVFPTKDVALRHVVCAHELVCSMENTRATKMQVIGDQYVKVYLESFCE
DVPSGKLFMHVTLGSDVEEDLTMTRNPQPFMRPHERNGFTVLCPKNMIIKPGKISHIML
DVAFTSHEHFGLLCPKSIPGLSISGNLLMNGQQIFLEVQAIRETVELRQYDPVAALFFFDI
DLLLQRGPQYSEHPTFTSQYRIQGKLEYRHTWDRHDEGAAQGDDDVWTSGSDSDEEL
VTTERKTPRVTGGGAMAGASTSAGRKRKSASSATACTAGVMTRGRLKAESTVAPEED
TDEDSDNEIHNPAVFTWPPWQAGILARNLVPMVATVQGQNLKYQEFFWDANDIYRIFA
ELEGVWQPAAQPKRRRHRQDALPGPCIASTPKKHRG

Figura 7

MESRGRRCPEMISVLGPISGHVLKAVFSRGDTPVLPHETRLLQTGIHVRVSQPSLILVSQ
YTPDSTPCHRGDNQLQVQHTYFTGSEVENVSVNVHNPTGRSICPSQEPMSIYVYALPL
KMLNIPSINVHHYPSAAERKHRHLPVADAVIHASGKQMWQARLTVSGLAWTRQQNQW
KEPDVYYTSAFVFPTKDVALRHVVCAHELVCSMENTRATKMQVIGDQYVKVYLESFCE
DVPSGKLFMHVTLGSDVEEDLTMTRNPQPFMRPHERNGFTVLCPKNMIIKPGKISHIML
DVAFTSHEHFGLLCPKSIPGLSISGNLLMNGQQIFLEVQAIRETVELRQYDPVAALFFFDI
DLLLQRGPQYSEHPTFTSQYRIQGKLEYRHTWDRHDEGAAQGDDDVWTSGSDSDEEL
VTTERKTPRVTGGGAMAGASTSAGRNRKSASSATACTAGVMTRGRLKAESTVAPEED
TDEDSDNEIHNPAVFTWPPWQAGILARNLVPMVATVQGQNLKYQEFFWDANDIYRIFA
ELEGVWQPAAQPKRRRHRQDALPGPCIASTPKKHRG

Figura 8

MESRGRRCPEMISVLGPISGHVLKAVFSRGDTPVLPHETRLLQTGIHVRVSQPSLILVSQ
YTPDSTPCHRGDNQLQVQHTYFTGSEVENVSVNVHNPTGRSICPSQEPMSIYVYALPL
KMLNIPSINVHHYPSAAERKHRHLPVADAVIHASGKQMWQARLTVSGLAWTRQQNQW
KEPDVYYTSAFVFPTKDVALRHVVCAHELVCSMENTRATKMQVIGDQYVKVYLESFCE
DVPSGKLFMHVTLGSDVEEDLTMTRNPQPFMRPHERNGFTVLCPKNMIIKPGKISHIML
DVAFTSHEHFGLLCPKSIPGLSISGNLLMNGQQIFLEVQAIRETVELRQYDPVAALFFFDI
DLLLQRGPQYSEHPTFTSQYRIQGKLEYRHTWDRHDEGAAQGDDDVWTSGSDSDEEL
VTTERKTPRVTGGGAMAGASTSAGRNRKSASSATACTAGVMTRGRLKAESTVAPEED
TDEDSDNEIHNPAVFTWPPWQAGILARNLVPMVATVQGQNLKYQEFFWDANDIYRIFA
ELEGVWQPAAQ

Figura 9

atgcagagcaaggtgctgctggccgtcgccctgtggctctgcgtggagacccgggccgcctctgtgggtttgcctagtgtttct
cttgatctgcccaggctcagcatacaaaaagacatacttacaattaaggctaatacaactcttcaaattacttgcaggggac
agagggacttggactggctttggcccaataatcagagtggcagtgagcaaagggtggaggtgactgagtgcagcgatgg
cctcttctgtaagacactcacaattccaaaagtgatcggaaatgacactggagcctacaagtgcttctaccgggaaactgac
ttggcctcggtcatttatgtctatgttcaagattacagatctccatttattgcttctgttagtgaccaacatggagtcgtgtacattact
gagaacaaaaacaaaactgtggtgattccatgtctcgggtccatttcaaatctcaacgtgtcactttgtgcaagatacccaga
aaagagatttgttcctgatggtaacagaatttcctgggacagcaagaagggctttactattcccagctacatgatcagctatgc
tggcatggtcttctgtgaagcaaaaattaatgatgaaagttaccagtctattatgtacatagttgtcgttgtagggtataggattta
tgatgtggttctgagtccgtctcatggaattgaactatctgttggagaaaagcttgtcttaaattgtacagcaagaactgaacta
aatgtggggattgacttcaactgggaataccccttcttcgaagcatcagcataagaaacttgtaaaccgagacctaaaaacc
cagtctgggagtgagatgaagaaatttttgagcaccttaactatagatggtgtaacccggagtgaccaaggattgtacacct
gtgcagcatccagtgggctgatgaccaagaagaacagcacatttgtcagggtccatgaaaaaccttttgttgcttttggaagt
ggcatggaatctctggtggaagccacggtgggggagcgtgtcagaatccctgcgaagtaccttggttacccacccccaga
aataaaatggtataaaaatggaataccccttgagtccaatcacacaattaaagcggggcatgtactgacgattatggaagt
gagtgaaagagacacaggaaattacactgtcatccttaccaatcccatttcaaaggagaagcagagccatgtggtctctct
ggttgtgtatgtcccaccccagattggtgagaaatctctaatctctcctgtggattcctaccagtacggcaccactcaaacgct
gacatgtacggtctatgccattcctcccccgcatcacatccactggtattggcagttggaggaagagtgcgccaacgagccc
agccaagctgtctcagtgacaaacccataccccttgtgaagaatggagaagtgtggaggacttccagggaggaaataaaa
ttgaagttaataaaaatcaatttgctctaattgaaggaaaaaacaaaactgtaagtacccttgttatccaagcggcaaatgtgt
cagctttgtacaaatgtgaagcggtcaacaaagtcgggagaggagagagggtgatctccttccacgtgaccaggggtcct
gaaattactttgcaacctgacatgcagcccactgagcaggagagcgtgtctttgtggtgcactgcagacagatctacgtttga
gaacctcacatggtacaagcttggcccacagcctctgccaatccatgtgggagagttgcccacacctgtttgcaagaacttg
gatactctttggaaattgaatgccaccatgttctctaatagcacaaatgacattttgatcatggagcttaagaatgcatccttgca
ggaccaaggagactatgtctgccttgctcaagacaggaagaccaagaaaagacattgcgtggtcaggcagctcacagtc
ctagagcgtgtggcacccacgatcacaggaaacctggagaatcagacgacaagtattggggaaagcatcgaagtctcat
gcacggcatctgggaatccccctccacagatcatgtggtttaaagataatgagacccttgtagaagactcaggcattgtattg
aaggatgggaaccggaacctcactatccgcagagtgaggaaggaggacgaaggcctctacacctgccaggcatgcag
tgttcttggctgtgcaaaagtggaggcatttttcataatagaaggtgcccaggaaaagacgaacttggaaatcattattctagt
aggcacggcggtgattgccatgttcttctggctacttcttgtcatcatcctacggaccgttaagcgggccaatggaggggaact
gaagacaggctacttgtccatcgtcatggatccagatgaactcccattggatgaacattgtgaacgactgccttatgatgcca
gcaaatgggaattccccagagaccggctgaagctaggtaagcctcttggccgtggtgcctttggccaagtgattgaagcag
atgcctttggaattgacaagacagcaacttgcaggacagtagcagtcaaaatgttgaaagaaggagcaacacacagtga
gcatcgagctctcatgtctgaactcaagatcctcattcatattggtcaccatctcaatgtggtcaaccttctaggtgcctgtacca
agccaggagggccactcatggtgattgtggaattctgcaaatttggaaacctgtccacttacctgaggagcaagagaaatg
aatttgtcccctacaagaccaaaggggcacgattccgtcaagggaaagactacgttggagcaatccctgtggatctgaaa
cggcgcttggacagcatcaccagtagccagagctcagccagctctggatttgtggaggagaagtccctcagtgatgtaga
agaagaggaagctcctgaagatctgtataaggacttcctgaccttggagcatctcatctgttacagcttccaagtggctaagg
gcatggagttcttggcatcgcgaaagtgtatccacagggacctggcggcacgaaatatcctcttatcggagaagaacgtgg
ttaaaatctgtgactttggcttggcccgggatatttataaagatccagattatgtcagaaaaggagatgctcgcctccctttgaa
atggatggccccagaaacaatttttgacagagtgtacacaatccagagtgacgtctggtcttttggtgttttgctgtgggaaata
ttttccttaggtgcttctccatatcctggggtaaagattgatgaagaattttgtaggcgattgaaagaaggaactagaatgagg
gcccctgattatactacaccagaaatgtaccagaccatgctggactgctggcacggggagcccagtcagagacccacgtt
ttcagagttggtggaacatttgggaaatctcttgcaagctaatgctcagcaggatggcaaagactacattgttcttccgatatca
gagactttgagcatggaagaggattctggactctctctgcctacctcacctgtttcctgtatggaggaggaggaagtatgtgac
cccaaattccattatgacaacacagcaggaatcagtcagtatctgcagaacagtaagcgaaagagccggcctgtgagtgt
aaaaacatttgaagatatcccgttagaagaaccagaagtaaaagtaatcccagatgacaaccagacggacagtggtatg
gttcttgcctcagaagagctgaaaactttggaagacagaaccaaattatctccatcttttggtggaatggtgcccagcaaaag
cagggagtctgtggcatctgaaggctcaaaccagacaagcggctaccagtccggatatcactccgatgacacagacacc
accgtgtactccagtgaggaagcagaacttttaaagctgatagagattggagtgcaaaccggtagcacagcccagattctc
cagcctgactcggggaccacactgagctctcctcctgtttaa

Figura 10

ATGGACTTCCTCTTGCTGCAGGACCCGGCTTCCACGTGTGTCCCGGAGCCGGCGTCTC
AGCACACGCTCCGCTCCGGGCCTGGGTGCCTACAGCAGCCAGAGCAGCAGGGAGTCC
GGGACCCGGGCGGCATCTGGGCCAAGTTAGGCGCCGCCGAGGCCAGCGCTGAACGT
CTCCAGGGCCGGAGGAGCCGCGGGGCGTCCGGGTCTGAGCCGCAGCAAATGGGCTC
CGACGTGCGGGACCTGAACGCGCTGCTGCCCGCCGTCCCCTCCCTGGGTGGCGGCG
GCGGCTGTGCCCTGCCTGTGAGCGGCGCGGCGCAGTGGGCGCCGGTGCTGGACTTTG
CGCCCCCGGGCGCTTCGGCTTACGGGTCGTTGGGCGGCCCCGCGCCGCCACCGGCT
CCGCCGCCACCCCCGCCGCCGCCGCCTCACTCCTTCATCAAACAGGAGCCGAGCTGG
GGCGGCGCGGAGCCGCACGAGGAGCAGTGCCTGAGCGCCTTCACTGTCCACTTTTCC
GGCCAGTTCACTGGCACAGCCGGAGCCTGTCGCTACGGGCCCTTCGGTCCTCCTCCG
CCCAGCCAGGCGTCATCCGGCCAGGCCAGGATGTTTCCTAACGCGCCCTACCTGCCCA
GCTGCCTGGAGAGCCAGCCCGCTATTCGCAATCAGGGTTACAGCACGGTCACCTTCGA
CGGGACGCCCAGCTACGGTCACACGCCCTCGCACCATGCGGCGCAGTTCCCCAACCA
CTCATTCAAGCATGAGGATCCCATGGGCCAGCAGGGCTCGCTGGGTGAGCAGCAGTAC
TCGGTGCCGCCCCCGGTCTATGGCTGCCACACCCCCACCGACAGCTGCACCGGCAGC
CAGGCTTTGCTGCTGAGGACGCCCTACAGCAGTGACAATTTATACCAAATGACATCCCA
GCTTGAATGCATGACCTGGAATCAGATGAACTTAGGAGCCACCTTAAAGGGAGTTGCTG
CTGGGAGCTCCAGCTCAGTGAAATGGACAGAAGGGCAGAGCAACCACAGCACAGGGTA
CGAGAGCGATAACCACACAACGCCCATCCTCTGCGGAGCCCAATACAGAATACACACG
CACGGTGTCTTCAGAGGCATTCAGTGA

Figura 11

ATGGCCTTGCCAACGGCTCGACCCCTGTTGGGGTCCTGTGGGACCCCCGCCCTCGGC
AGCCTCCTGTTCCTGCTCTTCAGCCTCGGATGGGTGCAGCCCTCCAGGACCCTGGCTG
GAGAGACAGGGCAGGAGGCTGCGCCCCTGGACGGAGTCCTGGCCAACCCACCTAACA
TTTCCAGCCTCTCCCCTCGCCAACTCCTTGGCTTCCCGTGTGCGGAGGTGTCCGGCCT
GAGCACGGAGCGTGTCCGGGAGCTGGCTGTGGCCTTGGCACAGAAGAATGTCAAGCT
CTCAACAGAGCAGCTGCGCTGTCTGGCTCACCGGCTCTCTGAGCCCCCCGAGGACCTG
GACGCCCTCCCATTGGACCTGCTGCTATTCCTCAACCCAGATGCGTTCTCGGGGCCCC
AGGCCTGCACCCGTTTCTTCTCCCGCATCACGAAGGCCAATGTGGACCTGCTCCCGAG
GGGGGCTCCCGAGCGACAGCGGCTGCTGCCTGCGGCTCTGGCCTGCTGGGGTGTGC
GGGGGTCTCTGCTGAGCGAGGCTGATGTGCGGGCTCTGGGAGGCCTGGCTTGCGACC
TGCCTGGGCGCTTTGTGGCCGAGTCGGCCGAAGTGCTGCTACCCCGGCTGGTGAGCT
GCCCGGGACCCCTGGACCAGGACCAACAGGAGGCAGCCAGGGCGGCTCTGCAGGGC
GGGGGACCCCCCTACGGCCCCCCGTCGACATGGTCTGTCTCCACGATGGACGCTCTG
CGGGGCCTGCTGCCCGTGCTGGGCCAGCCCATCATCCGCAGCATCCCGCAGGGCATC
GTGGCCGCGTGGCGGCAACGCTCCTCTCGGGACCCATCCTGGCGGCAGCCTGAACGG
ACCATCCTCCGGCCGCGGTTCCGGCGGGAAGTGGAGAAGACAGCCTGTCCTTCAGGC
AAGAAGGCCCGCGAGATAGACGAGAGCCTCATCTTCTACAAGAAGTGGGAGCTGGAAG
CCTGCGTGGATGCGGCCCTGCTGGCCACCCAGATGGACCGCGTGAACGCCATCCCCT
TCACCTACGAGCAGCTGGACGTCCTAAAGCATAAACTGGATGAGCTCTACCCACAAGGT
TACCCCGAGTCTGTGATCCAGCACCTGGGCTACCTCTTCCTCAAGATGAGCCCTGAGG
ACATTCGCAAGTGGAATGTGACGTCCCTGGAGACCCTGAAGGCTTTGCTTGAAGTCAAC
AAAGGGCACGAAATGAGTCCTCAGGCTCCTCGGCGGCCCCTCCCACAGGTGGCCACC
CTGATCGACCGCTTTGTGAAGGGAAGGGGCCAGCTAGACAAAGACACCCTAGACACCC
TGACCGCCTTCTACCCTGGGTACCTGTGCTCCCTCAGCCCCGAGGAGCTGAGCTCCGT
GCCCCCCAGCAGCATCTGGGCGGTCAGGCCCCAGGACCTGGACACGTGTGACCCAAG
GCAGCTGGACGTCCTCTATCCCAAGGCCCGCCTTGCTTTCCAGAACATGAACGGGTCC
GAATACTTCGTGAAGATCCAGTCCTTCCTGGGTGGGGCCCCCACGGAGGATTTGAAGG
CGCTCAGTCAGCAGAATGTGAGCATGGACTTGGCCACGTTCATGAAGCTGCGGACGGA
TGCGGTGCTGCCGTTGACTGTGGCTGAGGTGCAGAAACTTCTGGGACCCCACGTGGAG
GGCCTGAAGGCGGAGGAGCGGCACCGCCCGGTGCGGGACTGGATCCTACGGCAGCG
GCAGGACGACCTGGACACGCTGGGGCTGGGGCTACAGGGCGGCATCCCCAACGGCTA
CCTGGTCCTAGACCTCAGCATGCAAGAGGCCCTCTCGGGGACGCCCTGCCTCCTAGGA
CCTGGACCTGTTCTCACCGTCCTGGCACTGCTCCTAGCCTCCACCCTGGCCTGA

Figura 12

ATGGAGTCTCCCTCGGCCCCTCCCCACAGATGGTGCATCCCCTGGCAGAGGCTCC
TGCTCACAGCCTCACTTCTAACCTTCTGGAACCCGCCCACCACTGCCAAGCTCACT
ATTGAATCCACGCCGTTCAATGTCGCAGAGGGGAAGGAGGTGCTTCTACTTGTCCA
CAATCTGCCCCAGCATCTTTTTGGCTACAGCTGGTACAAAGGTGAAAGAGTGGATG
GCAACCGTCAAATTATAGGATATGTAATAGGAACTCAACAAGCTACCCCAGGGCCC
GCATACAGTGGTCGAGAGATAATATACCCCAATGCATCCCTGCTGATCCAGAACAT
CATCCAGAATGACACAGGATTCTACACCCTACACGTCATAAAGTCAGATCTTGTGAA
TGAAGAAGCAACTGGCCAGTTCCGGGTATACCCGGAGCTGCCCAAGCCCTCCATCT
CCAGCAACAACTCCAAACCCGTGGAGGACAAGGATGCTGTGGCCTTCACCTGTGAA
CCTGAGACTCAGGACGCAACCTACCTGTGGTGGGTAAACAATCAGAGCCTCCCGGT
CAGTCCCAGGCTGCAGCTGTCCAATGGCAACAGGACCCTCACTCTATTCAATGTCA
CAAGAAATGACACAGCAAGCTACAAATGTGAAACCCAGAACCCAGTGAGTGCCAGG
CGCAGTGATTCAGTCATCCTGAATGTCCTCTATGGCCCGGATGCCCCCACCATTTC
CCCTCTAAACACATCTTACAGATCAGGGGAAAATCTGAACCTCTCCTGCCACGCAG
CCTCTAACCCACCTGCACAGTACTCTTGGTTTGTCAATGGGACTTTCCAGCAATCCA
CCCAAGAGCTCTTTATCCCCAACATCACTGTGAATAATAGTGGATCCTATACGTGCC
AAGCCCATAACTCAGACACTGGCCTCAATAGGACCACAGTCACGACGATCACAGTC
TATGCAGAGCCACCCAAACCCTTCATCACCAGCAACAACTCCAACCCCGTGGAGGA
TGAGGATGCTGTAGCCTTAACCTGTGAACCTGAGATTCAGAACACAACCTACCTGT
GGTGGGTAAATAATCAGAGCCTCCCGGTCAGTCCCAGGCTGCAGCTGTCCAATGAC
AACAGGACCCTCACTCTACTCAGTGTCACAAGGAATGATGTAGGACCCTATGAGTG
TGGAATCCAGAACAAATTAAGTGTTGACCACAGCGACCCAGTCATCCTGAATGTCCT
CTATGGCCCAGACGACCCCACCATTTCCCCCTCATACACCTATTACCGTCCAGGGG
TGAACCTCAGCCTCTCCTGCCATGCAGCCTCTAACCCACCTGCACAGTATTCTTGG
CTGATTGATGGGAACATCCAGCAACACACACAAGAGCTCTTTATCTCCAACATCACT
GAGAAGAACAGCGGACTCTATACCTGCCAGGCCAATAACTCAGCCAGTGGCCACA
GCAGGACTACAGTCAAGACAATCACAGTCTCTGCGGAGCTGCCCAAGCCCTCCATC
TCCAGCAACAACTCCAAACCCGTGGAGGACAAGGATGCTGTGGCCTTCACCTGTGA
ACCTGAGGCTCAGAACACAACCTACCTGTGGTGGGTAAATGGTCAGAGCCTCCCAG
TCAGTCCCAGGCTGCAGCTGTCCAATGGCAACAGGACCCTCACTCTATTCAATGTC
ACAAGAAATGACGCAAGAGCCTATGTATGTGGAATCCAGAACTCAGTGAGTGCAAA
CCGCAGTGACCCAGTCACCCTGGATGTCCTCTATGGGCCGGACACCCCCATCATTT
CCCCCCCAGACTCGTCTTACCTTTCGGGAGCGAACCTCAACCTCTCCTGCCACTCG
GCCTCTAACCCATCCCCGCAGTATTCTTGGCGTATCAATGGGATACCGCAGCAACA
CACACAAGTTCTCTTTATCGCCAAAATCACGCCAAATAATAACGGGACCTATGCCTG
TTTTGTCTCTAACTTGGCTACTGGCCGCAATAATTCCATAGTCAAGAGCATCACAGT
CTCTGCATCTGGAACTTCTCCTGGTCTCTCAGCTGGGGCCACTGTCGGCATCATGA
TTGGAGTGCTGGTTGGGGTTGCTCTGATATAG

Figura 13

ATGGAATCCAGGGGGAGGAGGTGTCCGGAGATGATCTCAGTCCTCGGACCGATTA
GCGGTCACGTGCTCAAAGCGGTCTTCAGCAGAGGAGACACTCCGGTGCTGCCGCA
CGAAACAAGGCTCCTTCAGACGGGGATACACGTGCGTGTGAGTCAGCCCAGCCTG
ATCCTCGTGTCTCAATACACCCCTGACAGCACTCCCTGTCACAGAGGGGACAACCA
ACTCCAGGTCCAGCACACCTACTTCACTGGGAGCGAGGTCGAGAACGTCAGCGTG
AACGTGCACAACCCCACGGGAAGATCAATCTGCCCTAGCCAGGAGCCCATGAGCA
TCTACGTGTACGCCCTCCCGCTCAAGATGCTCAACATCCCCTCCATCAACGTCCAC
CACTATCCCTCCGCTGCCGAACGTAAACACCGACACTTGCCAGTTGCGGACGCCGT
GATACACGCTTCAGGGAAGCAGATGTGGCAAGCCAGGCTTACTGTGAGTGGACTC
GCCTGGACTAGGCAACAGAACCAGTGGAAGGAGCCCGACGTGTACTACACCAGCG
CCTTCGTGTTCCCCACAAAAGACGTCGCGCTGCGACATGTGGTGTGCGCTCACGAA
CTGGTGTGCAGCATGGAGAACACGCGAGCGACCAAGATGCAGGTGATCGGTGACC
AGTACGTCAAGGTGTACCTGGAGAGCTTCTGCGAGGATGTCCCGTCCGGAAAGCT
GTTCATGCACGTGACCCTGGGCAGTGACGTTGAGGAAGACCTGACCATGACGCGT
AACCCGCAGCCTTTCATGAGACCGCACGAGAGGAACGGATTCACCGTCCTGTGCC
CGAAGAACATGATCATCAAGCCCGGCAAGATCAGCCACATCATGCTCGACGTCGCC
TTCACCTCTCACGAACACTTCGGGCTGCTGTGTCCGAAGAGCATTCCGGGTCTGAG
CATCTCAGGCAACCTGCTGATGAACGGGCAGCAGATCTTCCTGGAAGTGCAGGCC
ATAAGGGAGACCGTGGAACTGAGGCAGTACGATCCTGTGGCTGCCCTGTTCTTCTT
CGACATCGACCTCTTGCTGCAAAGGGGTCCACAGTATAGCGAACACCCCACCTTCA
CCTCCCAGTACCGTATCCAGGGCAAGCTGGAGTACCGACACACTTGGGATAGGCA
CGACGAGGGTGCCGCTCAAGGTGACGACGATGTTTGGACTAGCGGCTCTGATAGC
GACGAAGAGCTGGTGACCACTGAGCGCAAAACTCCAAGAGTTACGGGCGGCGGCG
CAATGGCTGGCGCCTCTACTTCCGCGGGAAGGAAaAGGAAAAGCGCGTCTAGCGC
AACTGCATGCACTGCCGGTGTGATGACAAGGGGGAGACTGAAGGCCGAGAGTACA
GTGGCTCCGGAAGAGGATACCGACGAGGACTCTGACAACGAGATCCACAACCCCG
CAGTGTTTACGTGGCCACCTTGGCAAGCCGGCATCCTTGCTAGAAACCTGGTGCCC
ATGGTGGCCACAGTCCAAGGCCAGAACCTGAAGTACCAGGAGTTCTTCTGGGACG
CCAACGACATCTACCGTATCTTCGCCGAACTTGAAGGCGTCTGGCAGCCGGCGGC
TCAACCCAAAAGGAGACGTCACAGACAGGACGCGCTTCCCGGACCCTGTATTGCCT
CTACCCCCAAGAAACACCGGGGC

Figura 14

ATGGAATCCAGGGGGAGGAGGTGTCCGGAGATGATCTCAGTCCTCGGACCGATTA
GCGGTCACGTGCTCAAAGCGGTCTTCAGCAGAGGAGACACTCCGGTGCTGCCGCA
CGAAACAAGGCTCCTTCAGACGGGGATACACGTGCGTGTGAGTCAGCCCAGCCTG
ATCCTCGTGTCTCAATACACCCCTGACAGCACTCCCTGTCACAGAGGGGACAACCA
ACTCCAGGTCCAGCACACCTACTTCACTGGGAGCGAGGTCGAGAACGTCAGCGTG
AACGTGCACAACCCCACGGGAAGATCAATCTGCCCTAGCCAGGAGCCCATGAGCA
TCTACGTGTACGCCCTCCCGCTCAAGATGCTCAACATCCCCTCCATCAACGTCCAC
CACTATCCCTCCGCTGCCGAACGTAAACACCGACACTTGCCAGTTGCGGACGCCGT
GATACACGCTTCAGGGAAGCAGATGTGGCAAGCCAGGCTTACTGTGAGTGGACTC
GCCTGGACTAGGCAACAGAACCAGTGGAAGGAGCCCGACGTGTACTACACCAGCG
CCTTCGTGTTCCCCACAAAAGACGTCGCGCTGCGACATGTGGTGTGCGCTCACGAA
CTGGTGTGCAGCATGGAGAACACGCGAGCGACCAAGATGCAGGTGATCGGTGACC
AGTACGTCAAGGTGTACCTGGAGAGCTTCTGCGAGGATGTCCCGTCCGGAAAGCT
GTTCATGCACGTGACCCTGGGCAGTGACGTTGAGGAAGACCTGACCATGACGCGT
AACCCGCAGCCTTTCATGAGACCGCACGAGAGGAACGGATTCACCGTCCTGTGCC
CGAAGAACATGATCATCAAGCCCGGCAAGATCAGCCACATCATGCTCGACGTCGCC
TTCACCTCTCACGAACACTTCGGGCTGCTGTGTCCGAAGAGCATTCCGGGTCTGAG
CATCTCAGGCAACCTGCTGATGAACGGGCAGCAGATCTTCCTGGAAGTGCAGGCC
ATAAGGGAGACCGTGGAACTGAGGCAGTACGATCCTGTGGCTGCCCTGTTCTTCTT
CGACATCGACCTCTTGCTGCAAAGGGGTCCACAGTATAGCGAACACCCCACCTTCA
CCTCCCAGTACCGTATCCAGGGCAAGCTGGAGTACCGACACACTTGGGATAGGCA
CGACGAGGGTGCCGCTCAAGGTGACGACGATGTTTGGACTAGCGGCTCTGATAGC
GACGAAGAGCTGGTGACCACTGAGCGCAAAACTCCAAGAGTTACGGGCGGCGGCG
CAATGGCTGGCGCCTCTACTTCCGCGGGAAGGAAcAGGAAAAGCGCGTCTAGCGC
AACTGCATGCACTGCCGGTGTGATGACAAGGGGGAGACTGAAGGCCGAGAGTACA
GTGGCTCCGGAAGAGGATACCGACGAGGACTCTGACAACGAGATCCACAACCCCG
CAGTGTTTACGTGGCCACCTTGGCAAGCCGGCATCCTTGCTAGAAACCTGGTGCCC
ATGGTGGCCACAGTCCAAGGCCAGAACCTGAAGTACCAGGAGTTCTTCTGGGACG
CCAACGACATCTACCGTATCTTCGCCGAACTTGAAGGCGTCTGGCAGCCGGCGGC
TCAACCCAAAAGGAGACGTCACAGACAGGACGCGCTTCCCGGACCCTGTATTGCCT
CTACCCCCAAGAAACACCGGGGC

Figura 15

ATGGAATCCAGGGGGAGGAGGTGTCCGGAGATGATCTCAGTCCTCGGACCGATTA
GCGGTCACGTGCTCAAAGCGGTCTTCAGCAGAGGAGACACTCCGGTGCTGCCGCA
CGAAACAAGGCTCCTTCAGACGGGGATACACGTGCGTGTGAGTCAGCCCAGCCTG
ATCCTCGTGTCTCAATACACCCCTGACAGCACTCCCTGTCACAGAGGGGACAACCA
ACTCCAGGTCCAGCACACCTACTTCACTGGGAGCGAGGTCGAGAACGTCAGCGTG
AACGTGCACAACCCCACGGGAAGATCAATCTGCCCTAGCCAGGAGCCCATGAGCA
TCTACGTGTACGCCCTCCCGCTCAAGATGCTCAACATCCCCTCCATCAACGTCCAC
CACTATCCCTCCGCTGCCGAACGTAAACACCGACACTTGCCAGTTGCGGACGCCGT
GATACACGCTTCAGGGAAGCAGATGTGGCAAGCCAGGCTTACTGTGAGTGGACTC
GCCTGGACTAGGCAACAGAACCAGTGGAAGGAGCCCGACGTGTACTACACCAGCG
CCTTCGTGTTCCCCACAAAAGACGTCGCGCTGCGACATGTGGTGTGCGCTCACGAA
CTGGTGTGCAGCATGGAGAACACGCGAGCGACCAAGATGCAGGTGATCGGTGACC
AGTACGTCAAGGTGTACCTGGAGAGCTTCTGCGAGGATGTCCCGTCCGGAAAGCT
GTTCATGCACGTGACCCTGGGCAGTGACGTTGAGGAAGACCTGACCATGACGCGT
AACCCGCAGCCTTTCATGAGACCGCACGAGAGGAACGGATTCACCGTCCTGTGCC
CGAAGAACATGATCATCAAGCCCGGCAAGATCAGCCACATCATGCTCGACGTCGCC
TTCACCTCTCACGAACACTTCGGGCTGCTGTGTCCGAAGAGCATTCCGGGTCTGAG
CATCTCAGGCAACCTGCTGATGAACGGGCAGCAGATCTTCCTGGAAGTGCAGGCC
ATAAGGGAGACCGTGGAACTGAGGCAGTACGATCCTGTGGCTGCCCTGTTCTTCTT
CGACATCGACCTCTTGCTGCAAAGGGGTCCACAGTATAGCGAACACCCCACCTTCA
CCTCCCAGTACCGTATCCAGGGCAAGCTGGAGTACCGACACACTTGGGATAGGCA
CGACGAGGGTGCCGCTCAAGGTGACGACGATGTTTGGACTAGCGGCTCTGATAGC
GACGAAGAGCTGGTGACCACTGAGCGCAAAACTCCAAGAGTTACGGGCGGCGGCG
CAATGGCTGGCGCCTCTACTTCCGCGGGAAGGAAcAGGAAAAGCGCGTCTAGCGC
AACTGCATGCACTGCCGGTGTGATGACAAGGGGGAGACTGAAGGCCGAGAGTACA
GTGGCTCCGGAAGAGGATACCGACGAGGACTCTGACAACGAGATCCACAACCCCG
CAGTGTTTACGTGGCCACCTTGGCAAGCCGGCATCCTTGCTAGAAACCTGGTGCCC
ATGGTGGCCACAGTCCAAGGCCAGAACCTGAAGTACCAGGAGTTCTTCTGGGACG
CCAACGACATCTACCGTATCTTCGCCGAACTTGAAGGCGTCTGGCAGCCGGCGGC
TCAA

Figura 16

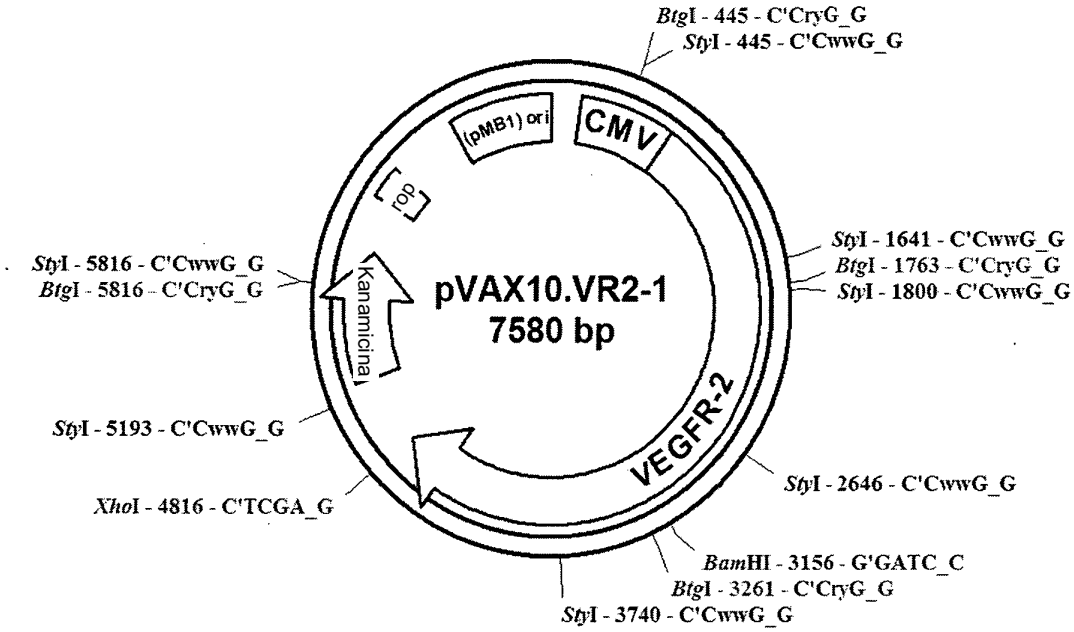

BtgI - 445 - C'CryG_G
StyI - 445 - C'CwwG_G
(pMB1) ori
CMV
rop
StyI - 1641 - C'CwwG_G
BtgI - 1763 - C'CryG_G
StyI - 1800 - C'CwwG_G
StyI - 5816 - C'CwwG_G
BtgI - 5816 - C'CryG_G
Kanamicina
pVAX10.VR2-1
7580 bp
StyI - 5193 - C'CwwG_G
VEGFR-2
StyI - 2646 - C'CwwG_G
XhoI - 4816 - C'TCGA_G
BamHI - 3156 - G'GATC_C
BtgI - 3261 - C'CryG_G
StyI - 3740 - C'CwwG_G

Figura 17

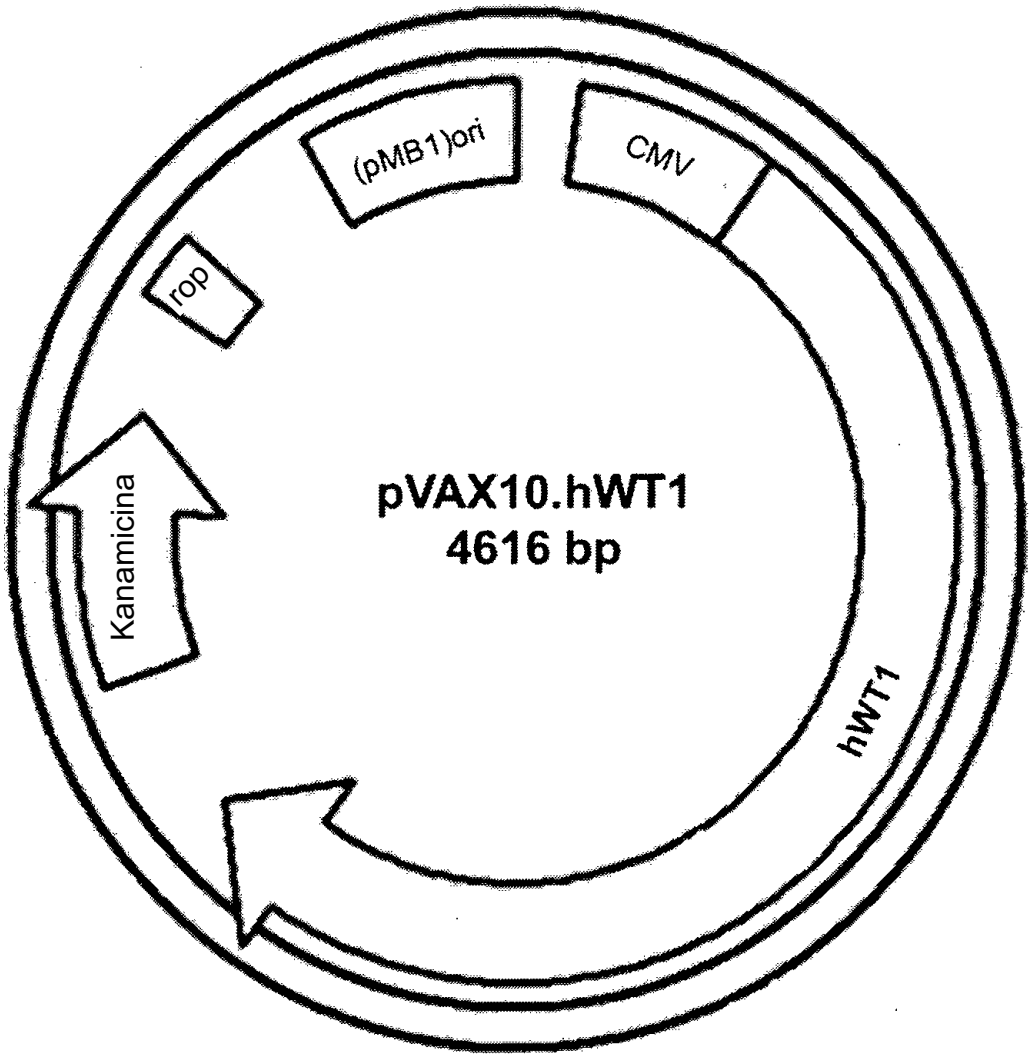


Figura 18

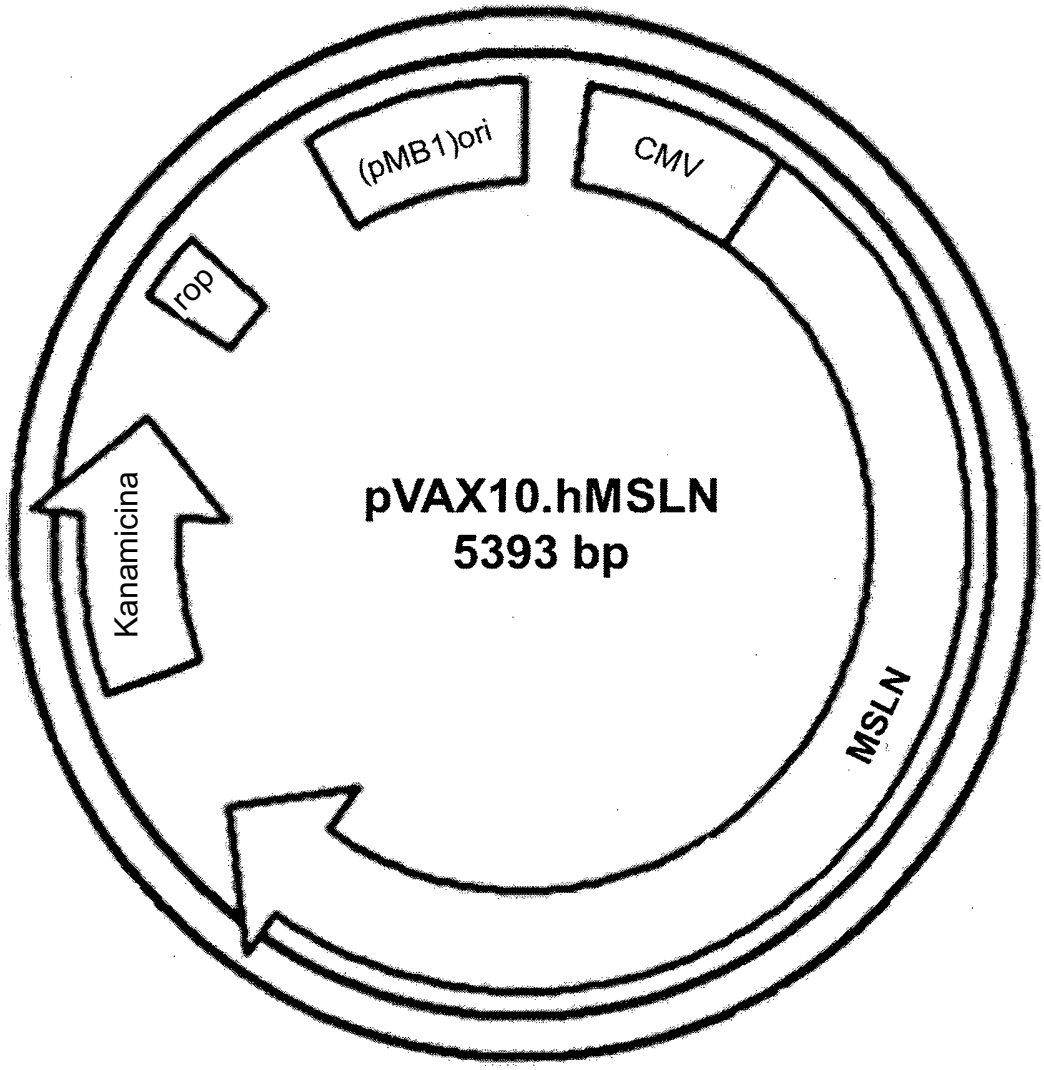


Figura 19

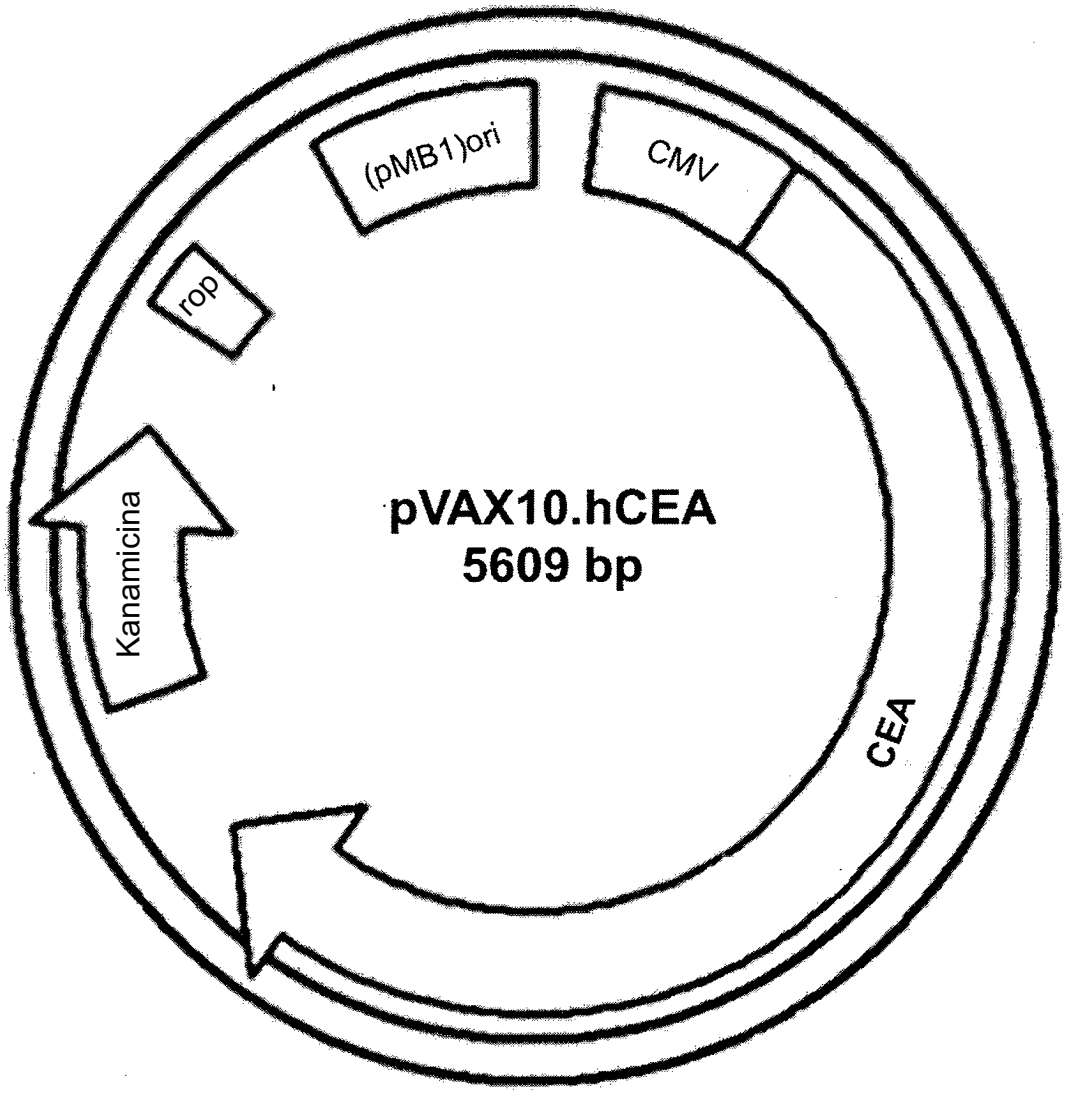


Figura 20

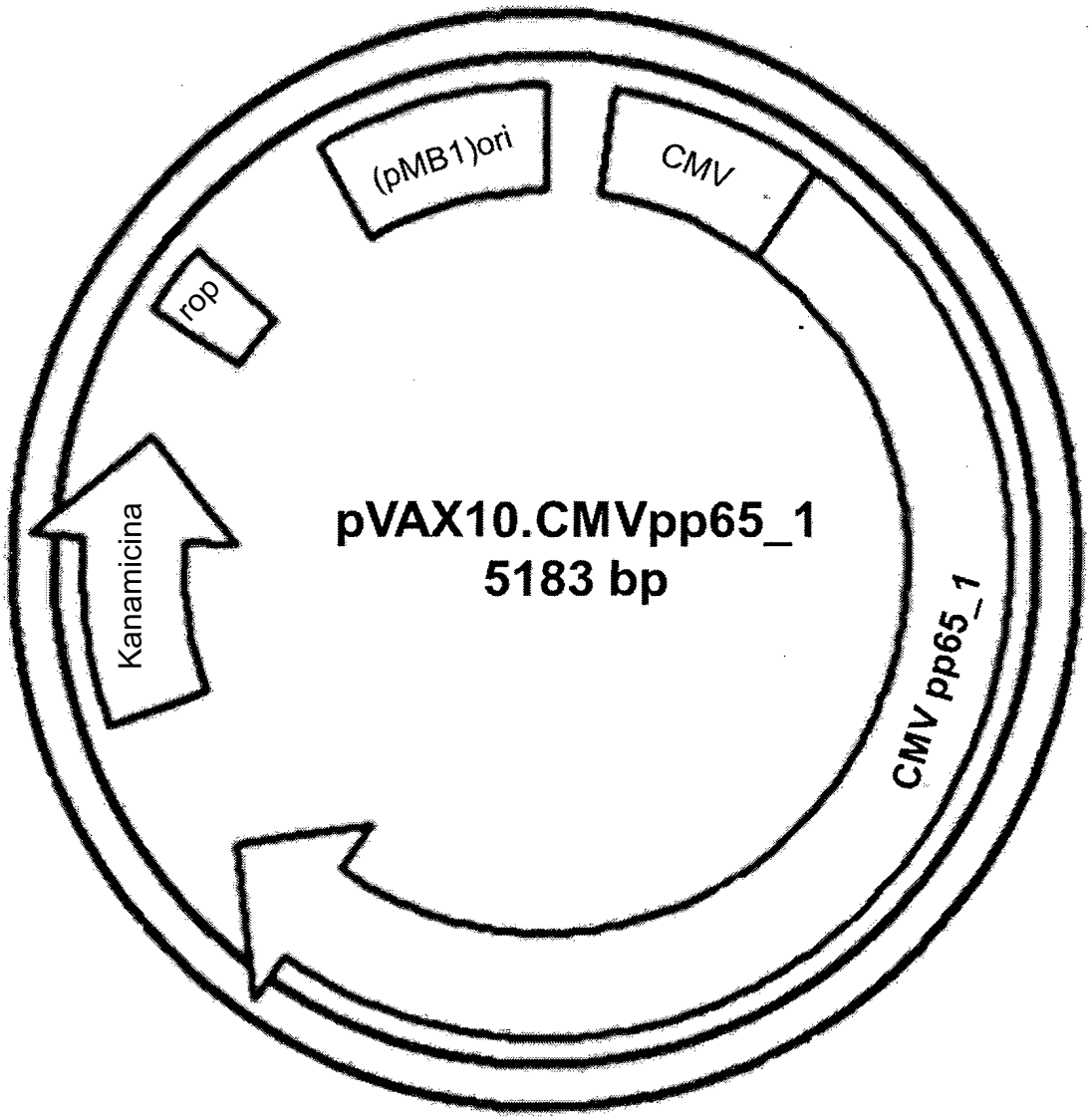

(pMB1)ori
CMV
rop
Kanamicina
pVAX10.CMVpp65_1
5183 bp
CMV pp65_1

Figura 21

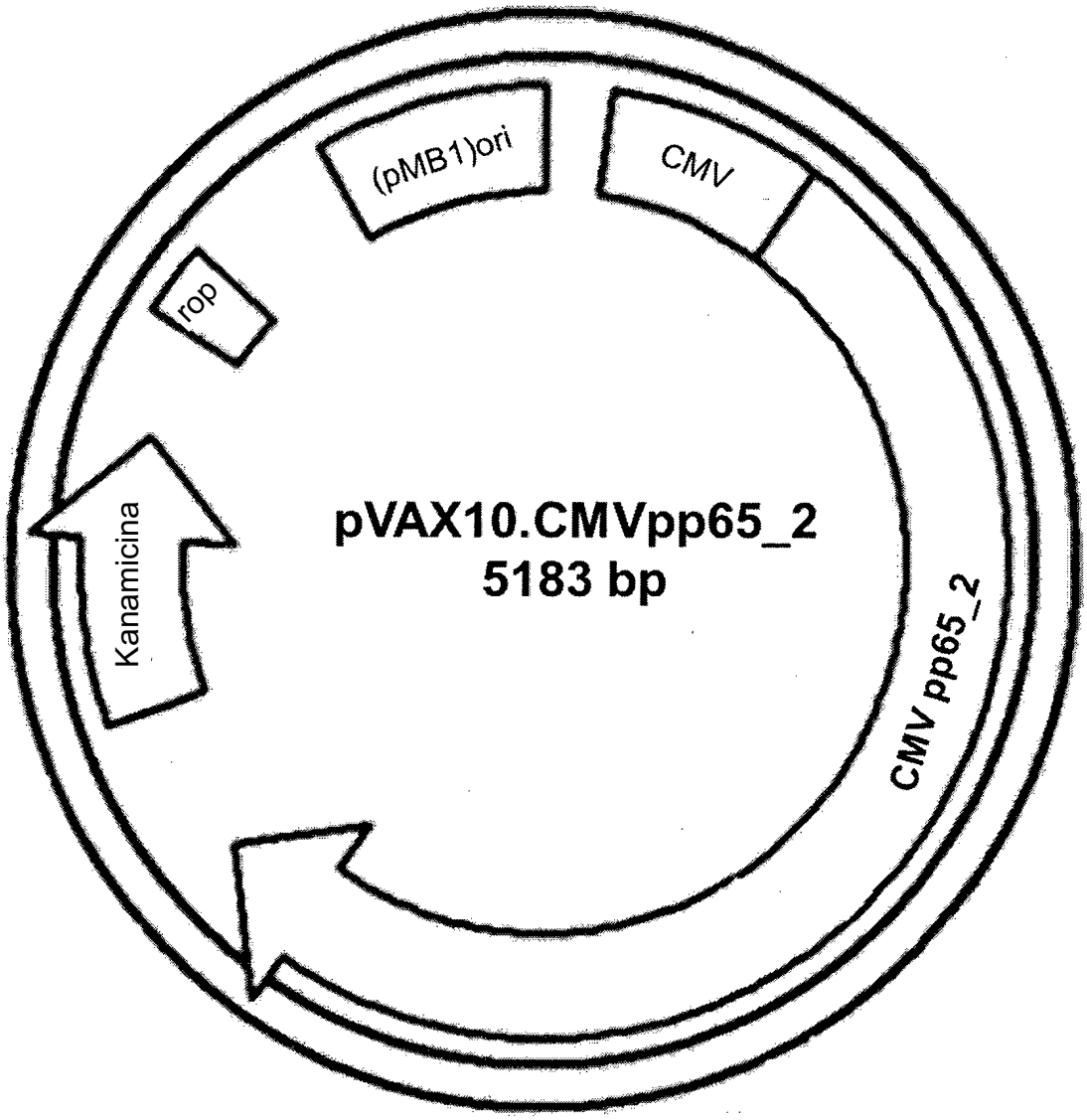

(pMB1)ori
CMV
rop
Kanamicina
pVAX10.CMVpp65_2
5183 bp
CMV pp65_2

Figura 22

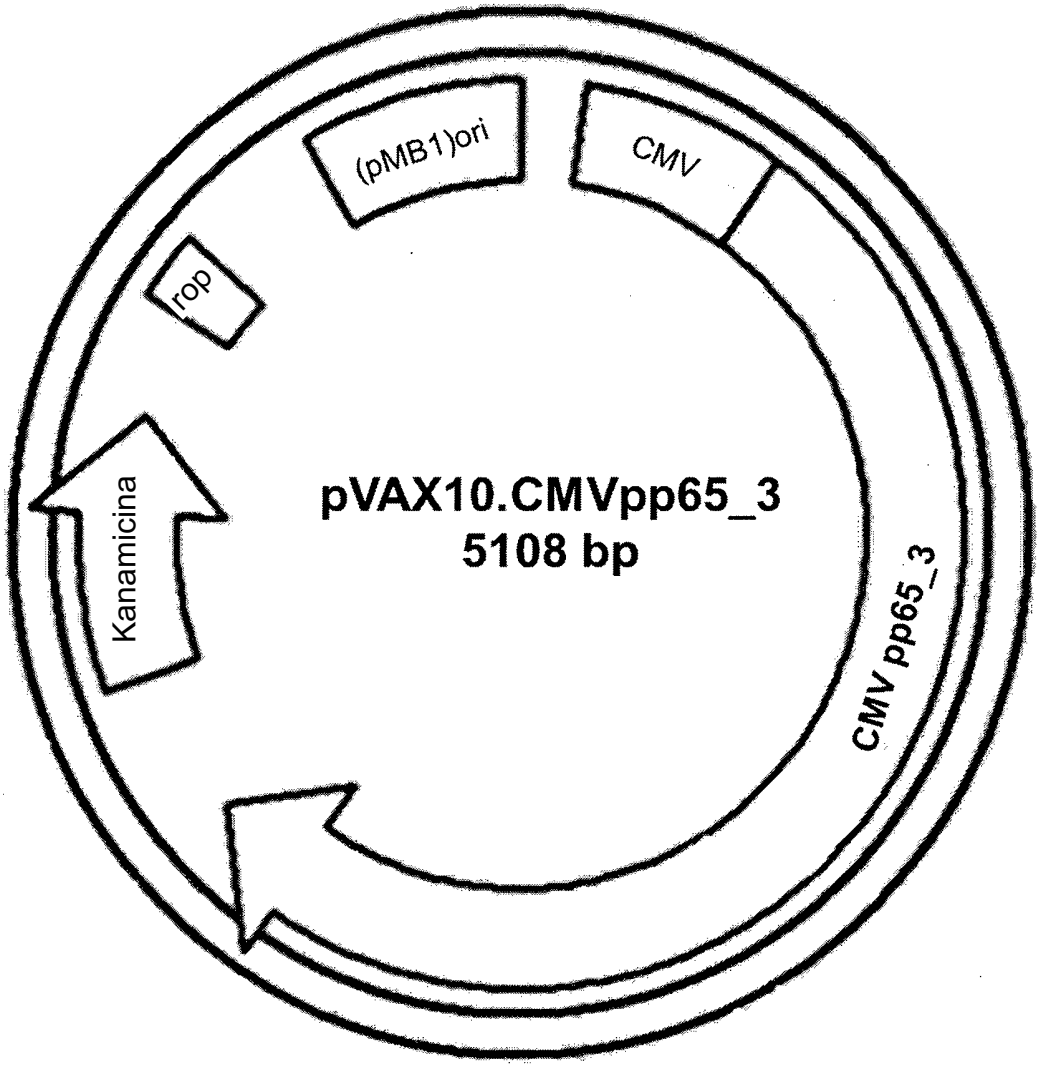

(pMB1)ori
CMV
rop
Kanamicina
pVAX10.CMVpp65_3
5108 bp
CMV pp65_3

Figura 23

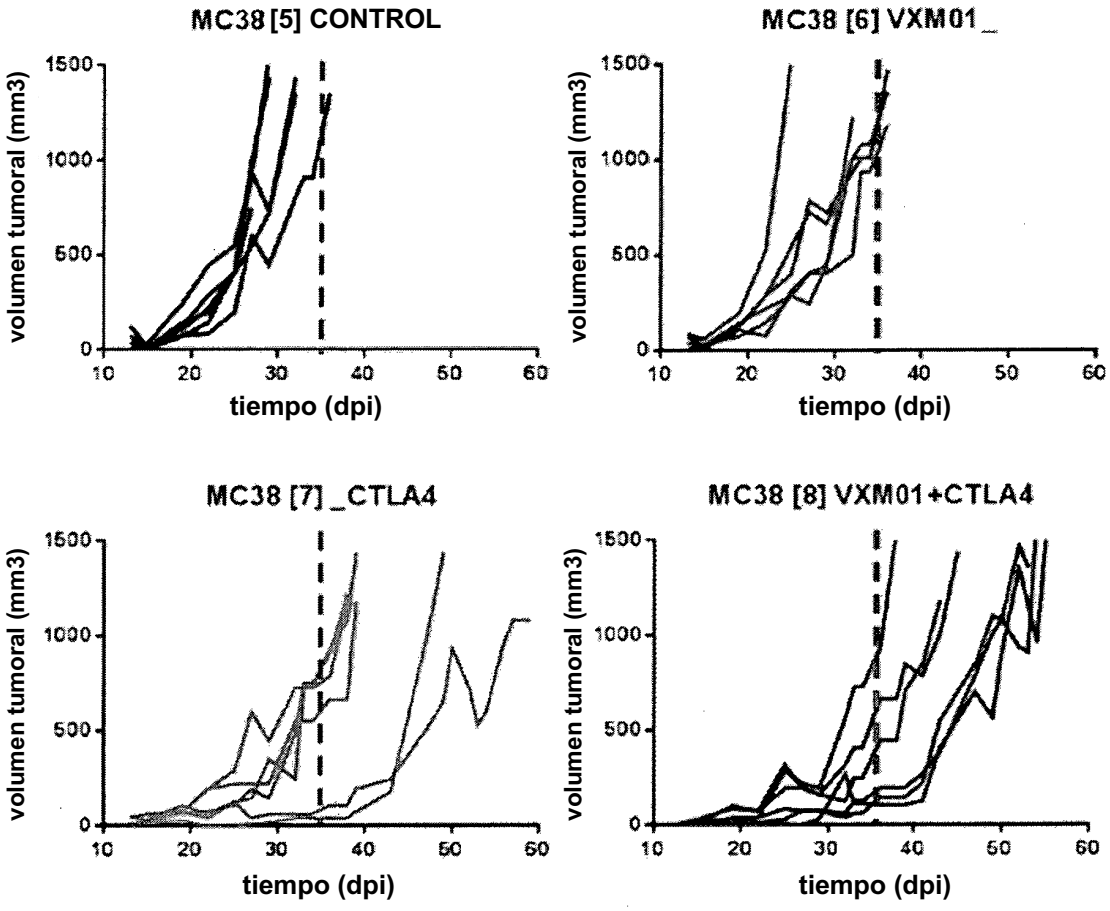

MC38 [5] CONTROL
MC38 [6] VXM01_
MC38 [7] _CTLA4
MC38 [8] VXM01+CTLA4
volumen tumoral (mm3)
tiempo (dpi)
0
500
1000
1500
10
20
30
40
50
60

Figura 24

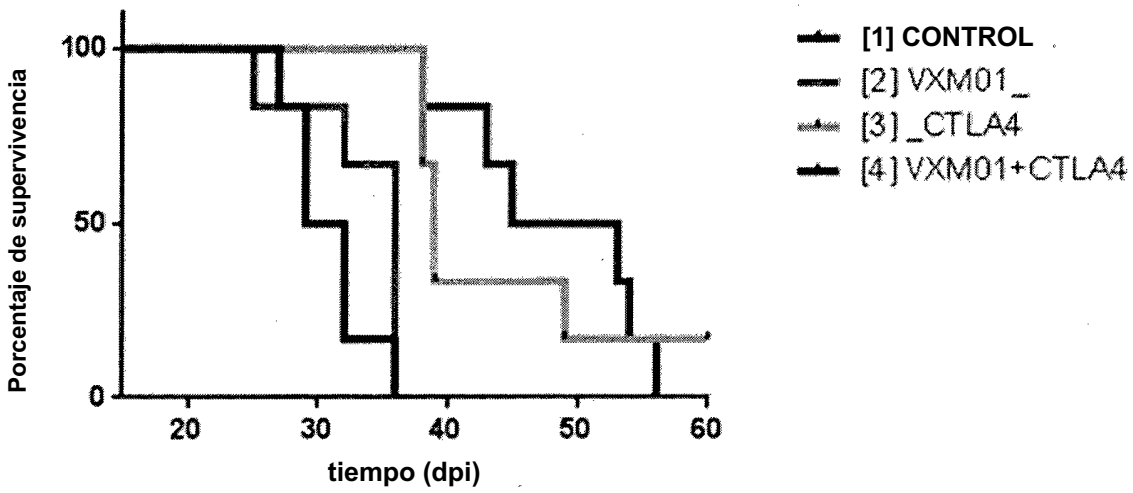

Porcentaje de supervivencia
100
50
0
20
30
40
50
60
tiempo (dpi)
[1] CONTROL
[2] VXM01_
[3] _CTLA4
[4] VXM01+CTLA4

Figura 25

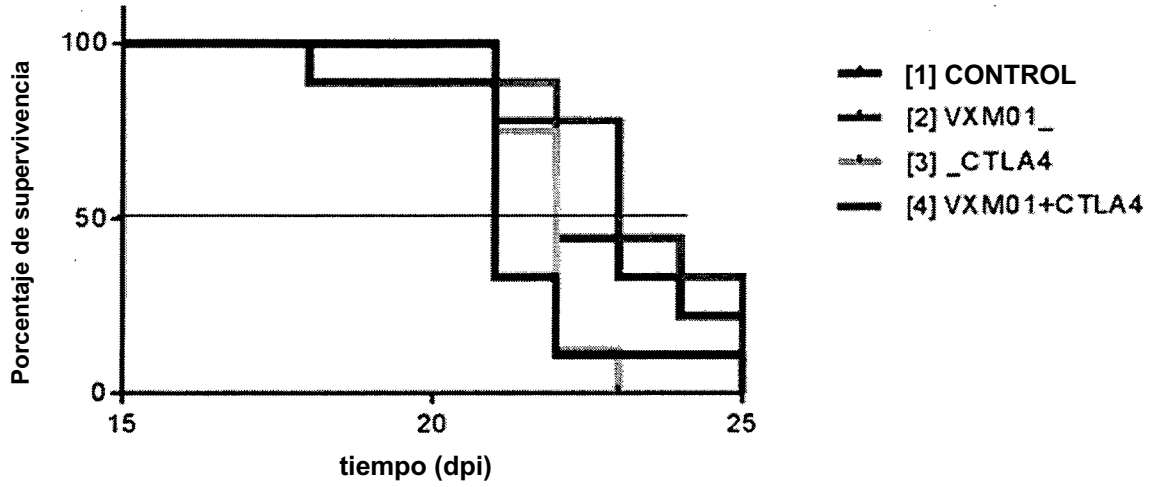

Porcentaje de supervivencia
100
50
0
15
20
25
tiempo (dpi)
[1] CONTROL
[2] VXM01_
[3] _CTLA4
[4] VXM01+CTLA4

Figura 26

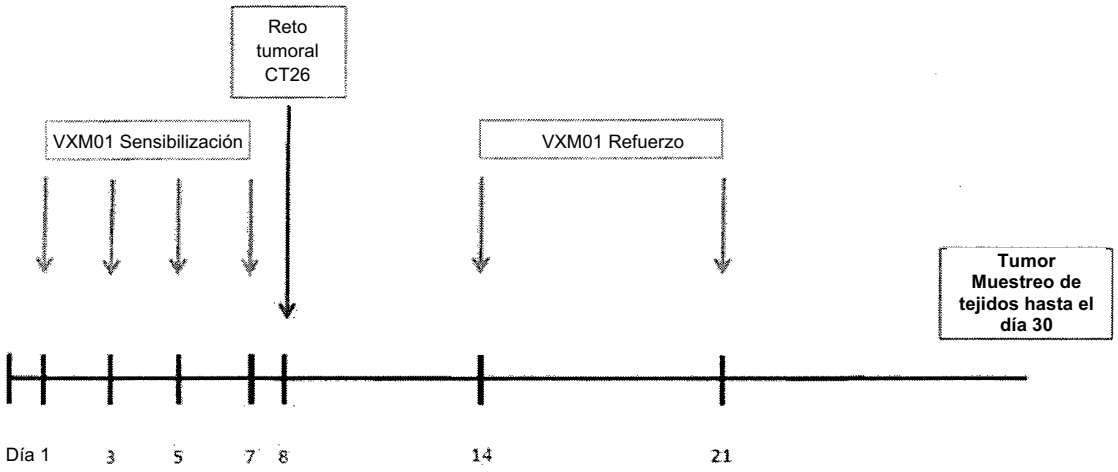

Reto tumoral CT26
VXM01 Sensibilización
VXM01 Refuerzo
Tumor Muestreo de tejidos hasta el día 30
Día 1
3
5
7
8
14
21

Figura 27

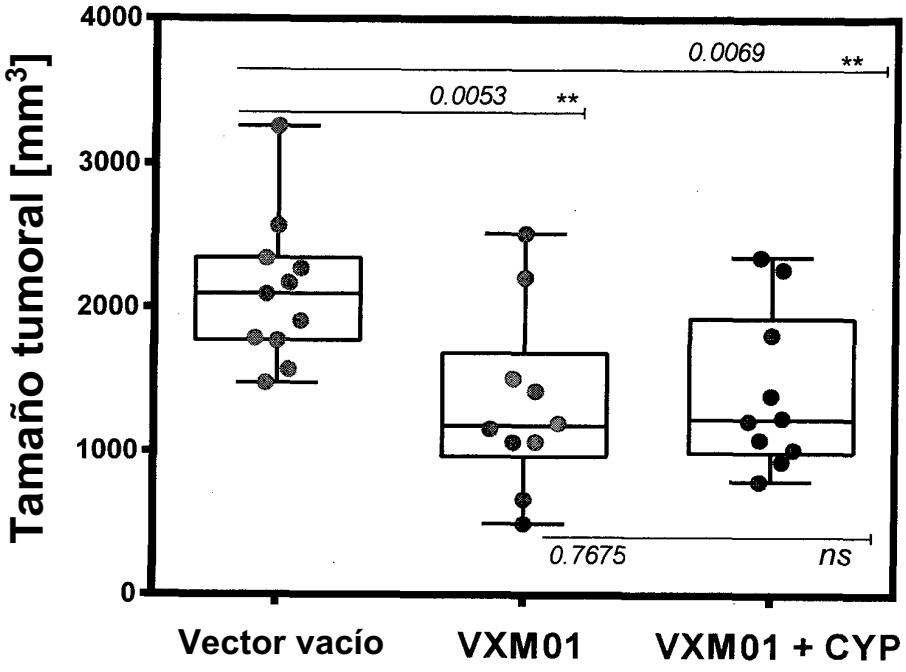

4000
3000
2000
1000
0
Tamaño tumoral [mm3]
0.0069
**
0.0053
**
0.7675
ns
Vector vacío
VXM01
VXM01 + CYP

Figura 28

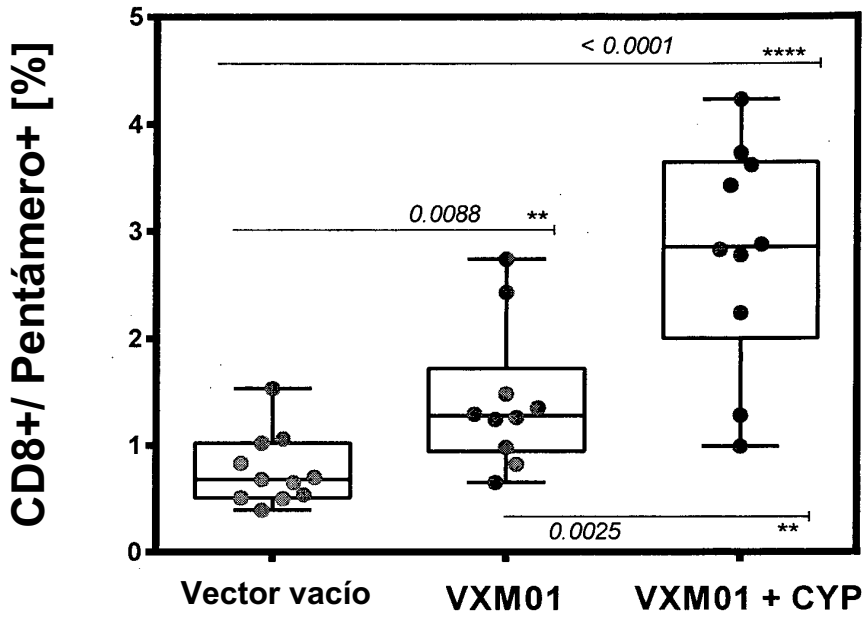

CD8+/ Pentámero+ [%]
5
4
3
2
1
0
< 0.0001
****
0.0088
**
0.0025
**
Vector vacío
VXM01
VXM01 + CYP

Figura 29

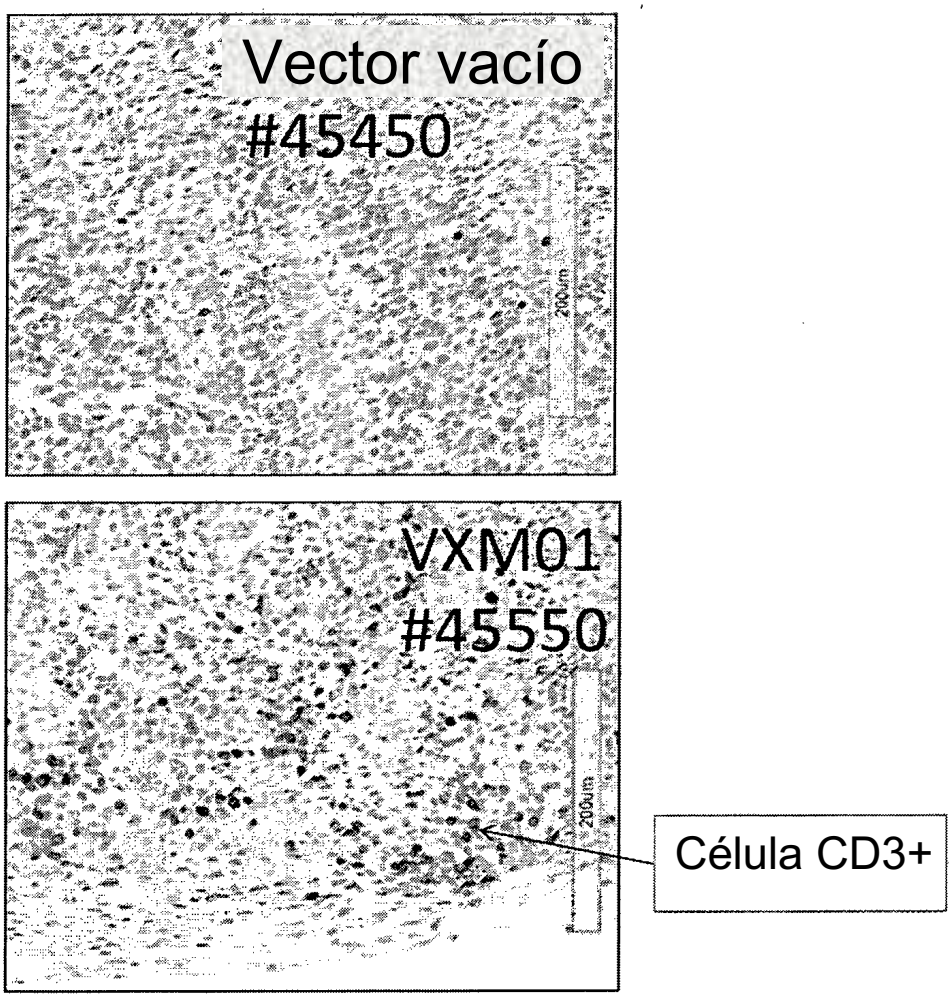


Figura 30

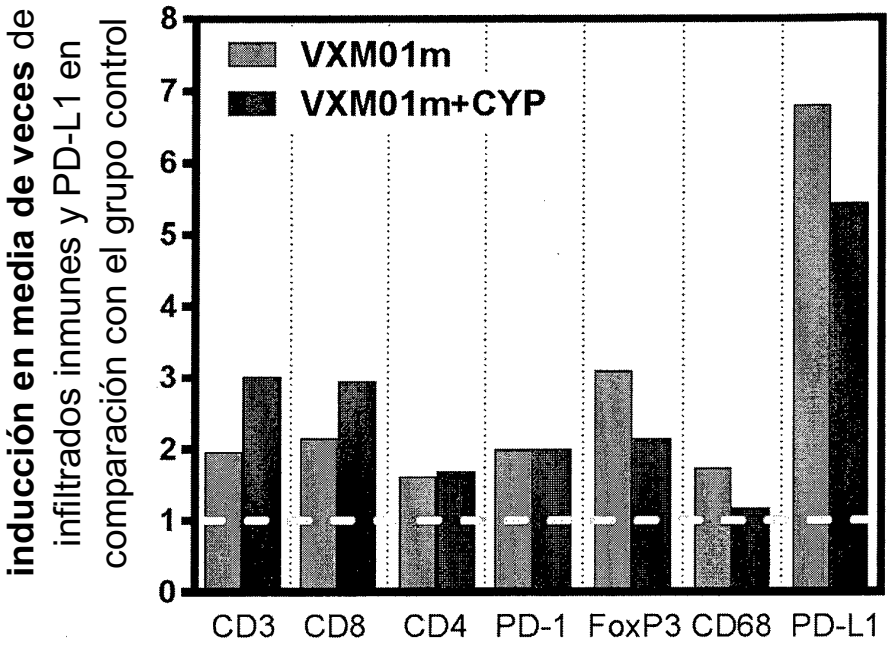
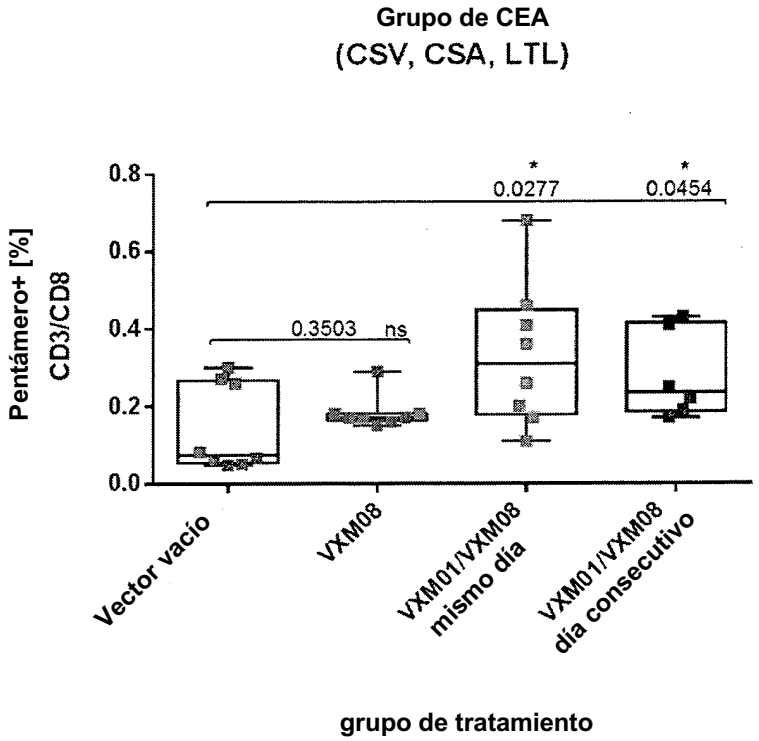
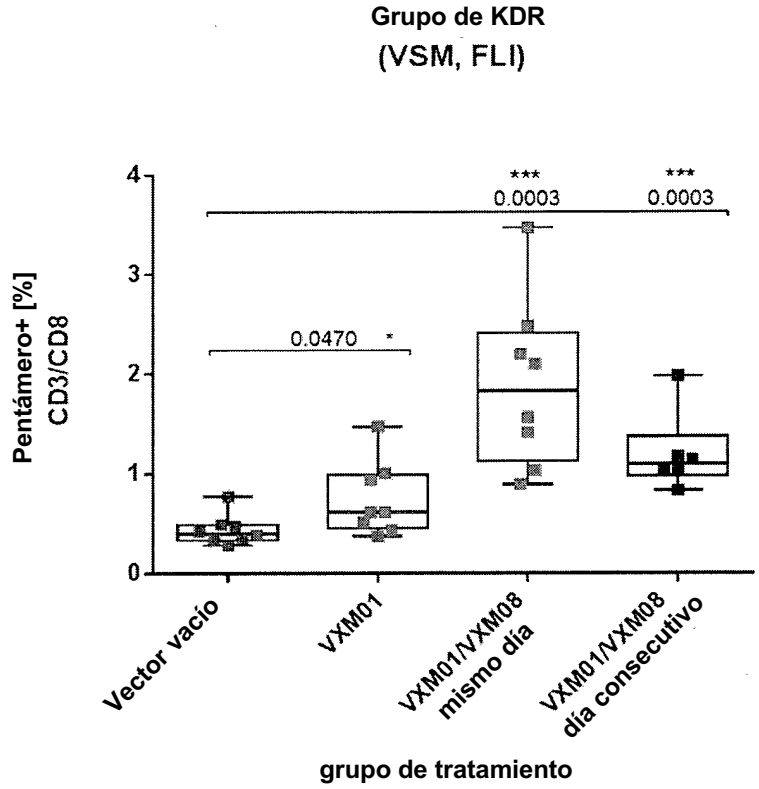

inducción en media de veces de infiltrados inmunes y PD-L1 en comparación con el grupo control
VXM01m
VXM01m+CYP
0
1
2
3
4
5
6
7
8
CD3
CD8
CD4
PD-1
FoxP3
CD68
PD-L1

Figura 31


Grupo de CEA
(CSV, CSA, LTL)
Pentámero+ [%]
CD3/CD8
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
*
0.0277
*
0.0454
0.3503
ns
Vector vacío
VXM08
VXM01/VXM08
mismo día
VXM01/VXM08
día consecutivo
grupo de tratamiento


Grupo de KDR
(VSM, FLI)
Pentámero+ [%]
CD3/CD8
4
3
2
1
0
***
0.0003
***
0.0003
0.0470
*
Vector vacío
VXM01
VXM01/VXM08
mismo día
VXM01/VXM08
día consecutivo
grupo de tratamiento