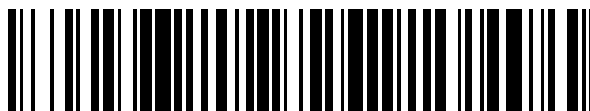


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 657 168**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/63** (2006.01)

**C12N 15/87** (2006.01)

**C12N 15/90** (2006.01)

**A61K 39/00** (2006.01)

**C12P 21/06** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.08.2007 E 15172620 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.10.2017 EP 2977456**

54 Título: **Composiciones que comprenden HMW-MAA y fragmentos de este para el tratamiento del cáncer**

30 Prioridad:

**15.08.2006 US 837608 P**

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

**01.03.2018**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**FERRONE, SOLDANO;  
PATERSON, YVONNE y  
MACIAG, PAULO**

74 Agente/Representante:

**PONS ARIÑO, Ángel**

ES 2 657 168 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Composiciones que comprenden HMW-MAA y fragmentos de este para el tratamiento del cáncer

## 5 Campo de la invención

Esta invención proporciona polipéptidos recombinantes que comprenden un fragmento de un Antígeno Asociado a Melanoma de Alto Peso Molecular (HMW-MAA) y cepas de *Listeria* recombinante para usar en los métodos para inducir una respuesta inmunitaria y tratar e impedir el crecimiento de tumores.

10

## Antecedentes de la invención

HMW-MAA, conocido además como el proteoglicano sulfato de condroitina asociado a melanoma (MCSP), es una proteína de membrana de 2322 residuos. HMW-MAA se expresa en más del 90 % de los nevos benignos y las lesiones de melanoma extirpados quirúrgicamente, y se expresa, además, en carcinoma de células basales, tumores originados en la cresta neural (por ejemplo astrocitomas, gliomas, neuroblastomas y sarcomas), leucemias en la infancia, y lesiones de carcinoma lobular de mama. El documento WO 2005/037233 describe vacunas contra diversos tipos de cáncer (que incluyen melanoma), que comprenden *Listeria* modificada genéticamente para expresar un antígeno de melanoma fusionado a LLO.

15

20

Los tratamientos y las curas para muchos tumores, por ejemplo, tumores que expresan HMW-MAA, así como métodos para la prevención especialmente en poblaciones de alto riesgo, se necesitan con urgencia en la técnica.

## Resumen de la invención

25

Esta invención proporciona el uso de un polipéptido recombinante que comprende (i) un fragmento de una proteína del Antígeno Asociado a Melanoma de Alto Peso Molecular (HMW-MAA) codificado por una secuencia de nucleótidos seleccionada de las secs. con núms. de ident.: 21, 22, o 23, y (ii) una secuencia PEST de *Listeria*, o una *Listeria* recombinante que comprende dicho polipéptido recombinante, para la preparación de una composición para inducir una respuesta inmunitaria contra un cáncer o tumor que no expresa HMW-MAA o para retrasar la progresión de un cáncer o tumor que no expresa HMW-MAA. La invención proporciona, además, el uso mencionado anteriormente, en donde el cáncer o tumor es un cáncer o tumor renal o de la piel.

30

35

La invención proporciona, además, el uso de un polipéptido recombinante que comprende (i) un fragmento de una proteína del Antígeno Asociado a Melanoma de Alto Peso Molecular (HMW-MAA) codificado por una secuencia de nucleótidos seleccionada de las secs. con núms. de ident.: 21, 22, o 23, y (ii) una secuencia PEST de *Listeria*, o una *Listeria* recombinante que comprende dicho polipéptido recombinante, para la preparación de una composición para inducir una respuesta inmunitaria contra un cáncer o tumor renal o de la piel o para retrasar la progresión de un cáncer o tumor renal o de la piel.

40

La invención proporciona, además, el uso mencionado anteriormente, en donde el cáncer o tumor renal o de la piel no expresan HMW-MAA.

45

La invención proporciona, además, cualquiera de los usos mencionados anteriormente, en donde el cáncer o tumor es un cáncer o tumor sólido, y la composición induce una respuesta inmunitaria contra un pericito de la vasculatura de dicho cáncer o tumor.

50

La invención proporciona, además, cualquiera de los usos mencionados anteriormente, en donde el cáncer o tumor de la piel es un melanoma.

La invención proporciona, además, cualquiera de los usos mencionados anteriormente, en donde la secuencia PEST está comprendida en un oligopéptido de Listeriolisina (LLO) o un fragmento de este, o en un oligopéptido de ActA o un fragmento de este.

55

La invención proporciona, además, cualquiera de los usos mencionados anteriormente, en donde HMW-MAA es una proteína HMW-MAA humana.

60

La invención proporciona, además, una composición que comprende un polipéptido recombinante que comprende (i) un fragmento de una proteína del Antígeno Asociado a Melanoma de Alto Peso Molecular (HMW-MAA) codificado por una secuencia de nucleótidos seleccionada de las secs. con núms. de ident.: 21, 22, o 23, y (ii) una secuencia PEST de *Listeria*, o una *Listeria* recombinante que comprende dicho polipéptido recombinante, para usar en la inducción de una respuesta inmunitaria contra un cáncer o tumor que no expresa HMW-MAA o para usar en el retraso de la progresión de un cáncer o tumor que no expresa HMW-MAA.

65

La invención proporciona, además, una composición para el uso mencionado anteriormente, en donde el cáncer o tumor es un cáncer o tumor renal o de la piel.

- La invención comprende, además, una composición que comprende un polipéptido recombinante que comprende (i) un fragmento de una proteína del Antígeno Asociado a Melanoma de Alto Peso Molecular (HMW-MAA) codificado por una secuencia de nucleótidos seleccionada de las secs. con núms. de ident.: 21, 22, o 23, y (ii) una secuencia PEST de *Listeria*, o una *Listeria* recombinante que comprende dicho polipéptido recombinante, para usar en la inducción de una respuesta inmunitaria contra un cáncer o tumor renal o de la piel o para usar en el retraso de la progresión de un cáncer o tumor renal o de la piel. La invención proporciona, además, cualquiera de las composiciones para el uso mencionado anteriormente, en donde la composición es una vacuna que comprende, además, un adyuvante, una citocina, una quimiocina, o una combinación de estos.
- 5 Breve descripción de las figuras
- Figura 1: Clonación de HMW-MAA en un plásmido basado en pGG55. Lm-LLO-HMW-MAA se generó mediante la transformación de la cepa prfA<sup>-</sup> XFL-7 con el plásmido pGG-55. pGG-55 tiene el promotor de *hly* que dirige la expresión de una fusión no hemolítica de LLO-E7 y el gen prfA para seleccionar respecto a la retención del plásmido. XFL-7 debe retener el plásmido para que sea viable.
- 15 Figura 2. Se expresaron construcciones de LLO-HMW-MAA. Se cosechó el sobrenadante de las cepas de LM transformadas con los plásmidos A, B y C de LLO-HMW-MAA. A. Las sondas anti-PEST revelaron que las tres cepas produjeron proteínas de fusión de los tamaños esperados (48 Kda para LLO, 75 Kda para HMW-MAA-A, 98 Kda para HMW-MAA-B, y 62 Kda para HMW-MAA-C). B. Las sondas anti-LLO revelaron bandas de LLO para HMW-MAA-A, HMW-MAA-B, HMW-MAA-C, y en controles de 10403S.
- 20 Figura 3. Las cepas de *Listeria* que expresan construcciones de LLO-HMW-MAA muestran crecimiento en los medios (A), virulencia, y crecimiento intracelular (B) similar a Lm de tipo silvestre.
- 25 Figura 4. La Lm que expresa HMW-MAA impide el crecimiento de tumores, incluso en células tumorales que no expresan HMW-MAA. 10<sup>8</sup> ufc de Lm-HMW-MAA-C impiden el crecimiento tumoral de B16F0-Ova según se midió por el tamaño (A) y el volumen (B) del tumor comparados significativamente con el grupo virgen. Se observaron efectos similares sobre el diámetro y el volumen del tumor con las tres cepas de Lm-LLO-HMW-MAA después de la inoculación de ratones C57BL/6 con células tumorales B16F0-Ova (C) y RENCA (D y E).
- 30 Figura 5. Selección de clones de células tumorales murinas B16F10 que expresan HMW-MAA.
- Figura 6. Las construcciones de Lm-HMW-MAA indujeron respuestas inmunitarias con especificidad antigénica que impidieron el crecimiento tumoral.
- 35 Figura 7. El agotamiento *in vivo* de células CD4<sup>+</sup> o CD8<sup>+</sup> anuló la eficacia de la vacuna de Lm-HMW-MAA-C.
- Figura 8. Las células T CD8<sup>+</sup> de ratones vacunados con Lm-HMW-MAA-C inhibieron el crecimiento de tumores de B16F10 HMW-MAA *in vivo*.
- 40 Figura 9. Los ratones vacunados con Lm-HMW-MAA-C que eliminaron el tumor de B16F10-HMW-MAA estuvieron protegidos contra un segundo reto con el mismo tumor.
- 45 Figura 10. La inmunización de ratones transgénicos para HLA-A2/Kb con Lm-HMW-MAA-B y Lm-HMW-MAA-C indujo respuestas inmunitarias detectables contra dos epítomos de HMW-MAA HLA-A2 caracterizados en los fragmentos B y C.
- Figura 11. Secreción de IFN- $\gamma$  por las células T estimuladas con un péptido restringido a HLA-A2 del fragmento C de HMW-MAA después de una inmunización con Lm-HMW-MAA-C en ratones C57B1/6 HLA-A2/Kb y de tipo silvestre.
- 50 Figura 12. Representación de construcciones del virus de vaccinia que expresan diferentes formas de la proteína E7 de HPV16.
- 55 Figura 13. Inducción y penetración de células T CD8<sup>+</sup> específicas para E7 en los bazo y tumores de ratones administrados con células TC-1 y posteriormente administrados con una vacuna de *Listeria* recombinante (virgen, Lm-LLO-E7, Lm-E7, Lm-ActA-E7).
- Figura 14. A. Construcciones de *Listeria* que contienen regiones PEST conducen a mayor regresión tumoral. B. tamaño tumoral promedio en ratones tratados con vacunas de *Listeria*.
- 60 Figura 15. Las construcciones de *Listeria* que contienen regiones PEST inducen un mayor porcentaje de linfocitos específicos para E7 en el bazo. A. datos de 1 experimento representativo. B. promedio y SE de los datos de 3 experimentos.
- 65

Figura 16. Las construcciones de *Listeria* que contienen regiones PEST inducen un mayor porcentaje de linfocitos específicos para E7 dentro del tumor. A. datos de 1 experimento representativo. B. promedio y SE de los datos de 3 experimentos.

5 Figura 17. Representación de construcciones del virus de vaccinia que expresan diferentes formas de la proteína E7 de HPV16.

10 Figura 18. VacLLOE7 induce una regresión a largo plazo de los tumores establecidos a partir de  $2 \times 10^5$  células TC-1 en ratones C57BL/6. Los ratones se inyectaron 11 y 18 días después del reto tumoral con  $10^7$  PFU de VacLLOE7, VacSigE7LAMP-1, o VacE7/ratón i.p. o se dejaron sin tratamiento (virgen). Se usaron 8 ratones por grupo de tratamiento, y se muestra la sección transversal para cada tumor (promedio de 2 mediciones) para los días indicados después de la inoculación del tumor.

15 Descripción detallada de la invención

Esta invención proporciona polipéptidos recombinantes que comprenden un fragmento de un Antígeno Asociado a Melanoma de Alto Peso Molecular (HMW-MAA), cepas de *Listeria* recombinante que comprenden el mismo, y métodos para inducir una respuesta inmunitaria y tratar e impedir el crecimiento de tumores, que comprende administrar los mismos.

20 En una modalidad, la presente invención proporciona una cepa de *Listeria* recombinante que comprende un polipéptido recombinante, el polipéptido recombinante comprende un fragmento de una proteína HMW-MAA ("fragmento de HMW-MAA"). En otra modalidad, una cepa de *Listeria* recombinante de la presente invención expresa un polipéptido recombinante de la presente invención. En otra modalidad, una cepa de *Listeria* recombinante de la presente invención comprende un ácido nucleico aislado que codifica un polipéptido recombinante de la presente invención.

25 En otra modalidad, la presente invención proporciona un polipéptido recombinante que comprende un fragmento de una proteína HMW-MAA unido operativamente a un oligopéptido que no es de HMW-MAA, seleccionado de un oligopéptido de listeriolisina (LLO), un oligopéptido de ActA, o un oligopéptido similar a PEST o un fragmento de estos. En una modalidad, el fragmento tiene las mismas o similares propiedades o función que el péptido o proteína de longitud completa, como puede demostrarse mediante el uso de ensayos y herramientas conocidos en la técnica. Las propiedades y funciones de los péptidos y proteínas de longitud completa de la presente invención se describen en detalle a continuación.

30 En otra modalidad, la presente invención proporciona un polipéptido recombinante que comprende un fragmento de una proteína HMW-MAA, en donde el fragmento consiste en aproximadamente los aminoácidos (AA) 360-554 de la proteína HMW-MAA a partir de la cual se deriva el fragmento. En otra modalidad, el fragmento consiste en aproximadamente los AA 701-1130. En otra modalidad, el fragmento tiene una secuencia seleccionada de la sec. con núm. de ident.: 21-23. En otra modalidad, el fragmento consiste en aproximadamente los AA 2160-2258.

35 En otra modalidad, la presente invención proporciona un polipéptido recombinante que comprende un fragmento de una proteína HMW-MAA con una secuencia de aminoácidos como se expone en la sec. con núm. de ident.: 21.

40 En otra modalidad, la presente invención proporciona un polipéptido recombinante que comprende un fragmento de una proteína HMW-MAA con una secuencia de aminoácidos como se expone en la sec. con núm. de ident.: 22.

45 En otra modalidad, la presente invención proporciona un polipéptido recombinante que comprende un fragmento de una proteína HMW-MAA con una secuencia de aminoácidos como se expone en la sec. con núm. de ident.: 23.

50 En otra modalidad, un polipéptido recombinante de la presente invención comprende además un péptido que no es de HMW-MAA. En otra modalidad, el péptido que no es de HMW-MAA aumenta la inmunogenicidad del fragmento.

55 El péptido que no es de HMW-MAA es, en otra modalidad, un oligopéptido de listeriolisina (LLO). En otra modalidad, el péptido que no es de HMW-MAA es un oligopéptido de ActA. En otra modalidad, el péptido que no es de HMW-MAA es un oligopéptido similar a PEST. Como se proporciona en la presente descripción, la fusión a LLO, ActA, secuencias similares a PEST y fragmentos de estas aumenta la inmunogenicidad mediada por células, de los antígenos. En una modalidad, la fusión a LLO, ActA, secuencias similares a PEST y fragmentos de estas aumenta la inmunogenicidad, mediada por células, de los antígenos en una variedad de sistemas de expresión. En una modalidad, el sistema de expresión es viral, mientras que en otra modalidad, el sistema de expresión es bacteriano. En otra modalidad, el péptido que no es de HMW-MAA es cualquier otro péptido inmunogénico que no es de HMW-MAA conocido en la técnica.

60 Un oligopéptido de LLO de los métodos y las composiciones de la presente invención es, en otra modalidad, un oligopéptido no hemolítico de LLO. En otra modalidad, el oligopéptido es un fragmento de LLO. En otra modalidad, el

oligopéptido es una proteína LLO completa. En otra modalidad, el oligopéptido es cualquier proteína LLO o fragmento de esta, conocida en la técnica.

5 En otra modalidad, el fragmento de LLO se vuelve no hemolítico mediante tratamiento químico. En otra modalidad, el tratamiento químico comprende glutaraldehído. En otra modalidad, el tratamiento químico comprende un compuesto que actúa de manera similar. En otra modalidad, el tratamiento químico comprende cualquier otro compuesto adecuado conocido en la técnica.

10 En otra modalidad, la proteína LLO utilizada para construir las vacunas de la presente invención tiene la siguiente secuencia:

MKKIMLVFITLILVSLPIAQQTEAKDASAFNKENSISSMAPPASPPASPKTPIEKKHADEIDKYIQ  
 GLDYNKNNVLVYHGDAVTNVPKRGYKDGNEYIVVEKKKKSINQNNADIQVVNAISSLTYPG  
 ALVKANSELVENQPDVLPVKRDSLTLSDLPGMTNQDNKIVVKNATKSNVNNAVNTLVERWN  
 EKYAQAYPNVSAKIDYDDEMAYSESLIAKFGTAFKAVNNSLNVNFGAISEGKMQEEVISFKQ  
 15 IYYNVNVNEPTRPSRFFGKAVTKEQLQALGVNAENPPAYISSVAYGRQVYLKLSTNSHSTKVK  
 AAFDAAVSGKSVSGDVELTNIKNSSFKAVIYGGSAKDEVQIIDGNLGDRLDILKKGATFNRETP  
 GVPIAYTTNFKDNEHAVIKNNSEYIETTSKAYTDGKINIDHSGGYVAQFNISWDEVNYDPEGN  
 EIVQHKNSWSENNKSLAHFTSSIYLPGNARNINVYAKECTGLAWEWVRTVIDDRNLPLVKNR  
 NISIWGTTLYPKYSNKVDNPIE (núm. de acceso del GenBank P13128; sec. con núm. de ident.: 1; la secuencia de  
 20 ácido nucleico se expone en el Núm. de acceso del GenBank X15127). En una modalidad, los primeros 25 AA de la  
 proproteína que corresponde a esta secuencia son la secuencia señal y se escinden de LLO cuando es secretada  
 por la bacteria. Por lo tanto, de acuerdo con esta modalidad, la proteína LLO activa de longitud completa es de 504  
 residuos de longitud. En otra modalidad, la secuencia anterior se usa como la fuente del fragmento de LLO  
 25 incorporado en una vacuna de la presente invención. En otra modalidad, una secuencia de AA de LLO de los  
 métodos y las composiciones de la presente invención es un homólogo de la sec. con núm. de ident.: 1. En otra  
 modalidad, la secuencia de AA de LLO es una variante de la sec. con núm. de ident.: 1. En otra modalidad, la  
 secuencia de AA de LLO es un fragmento de la sec. con núm. de ident.: 1. En otra modalidad, la secuencia de AA de  
 LLO es una isoforma de la sec. con núm. de ident.: 1.

30 En una modalidad, una isoforma es un péptido o proteína que tiene la misma función y una secuencia similar o idéntica a otro péptido o proteína, pero es el producto de un gen diferente. En una modalidad, una variante es un péptido o proteína que difiere de otro péptido o proteína en menor grado.

35 En otra modalidad, un fragmento de la proteína LLO se utiliza en las composiciones y los métodos de la presente invención. En otra modalidad, el fragmento de LLO es un fragmento N-terminal. En otra modalidad, el fragmento de LLO N-terminal tiene la secuencia:

MKKIMLVFITLILVSLPIAQQTEAKDASAFNKENSISVAPPASPPASPKTPIEKKHADEIDKYIQ  
 GLDYNKNNVLVYHGDAVTNVPKRGYKDGNEYIVVEKKKKSINQNNADIQVVNAISSLTYP  
 GALVKANSELVENQPDVLPVKRDSLTLSDLPGMTNQDNKIVVKNATKSNVNNAVNTLVER  
 40 WNEKYAQAYSNVSAKIDYDDEMAYSESLIAKFGTAFKAVNNSLNVNFGAISEGKMQEEVIS  
 FKQIYYNVNVNEPTRPSRFFGKAVTKEQLQALGVNAENPPAYISSVAYGRQVYLKLSTNSHST  
 KVKAFAVDAVSGKSVSGDVELTNIKNSSFKAVIYGGSAKDEVQIIDGNLGDRLDILKKGATFN  
 RETPGVPIAYTTNFKDNEHAVIKNNSEYIETTSKAYTDGKINIDHSGGYVAQFNISWDEVNYD (sec. con núm. de  
 45 ident.: 2). En otra modalidad, una secuencia de AA de LLO de los métodos y las composiciones de la presente  
 invención comprende la secuencia que se expone en la sec. con núm. de ident.: 2. En otra modalidad, la secuencia  
 de AA de LLO es un homólogo de la sec. con núm. de ident.: 2. En otra modalidad, la secuencia de AA de LLO es  
 una variante de la sec. con núm. de ident.: 2. En otra modalidad, la secuencia de AA de LLO es un fragmento de la  
 sec. con núm. de ident.: 2. En otra modalidad, la secuencia de AA de LLO es una isoforma de la sec. con núm. de  
 50 ident.: 2.

En otra modalidad, el fragmento de LLO tiene la secuencia:

MKKIMLVFITLILVSLPIAQQTEAKDASAFNKENSISVAPPASPPASPKTPIEKKHADEIDKYIQ  
 GLDYNKNNVLVYHGDAVTNVPKRGYKDGNEYIVVEKKKKSINQNNADIQVVNAISSLTYP  
 GALVKANSELVENQPDVLPVKRDSLTLSDLPGMTNQDNKIVVKNATKSNVNNAVNTLVER  
 55 WNEKYAQAYSNVSAKIDYDDEMAYSESLIAKFGTAFKAVNNSLNVNFGAISEGKMQEEVI  
 SFKQIYYNVNVNEPTRPSRFFGKAVTKEQLQALGVNAENPPAYISSVAYGRQVYLKLSTNSH  
 STKVKAFAVDAVSGKSVSGDVELTNIKNSSFKAVIYGGSAKDEVQIIDGNLGDRLDILKKGAT  
 FNRETPGVPIAYTTNFKDNEHAVIKNNSEYIETTSKAYTD (sec. con núm. de ident.: 3). En otra modalidad, una  
 60 secuencia de AA de LLO de los métodos y las composiciones de la presente invención comprende la secuencia que  
 se expone en la sec. con núm. de ident.: 3. En otra modalidad, la secuencia de AA de LLO es un homólogo de la  
 sec. con núm. de ident.: 3. En otra modalidad, la secuencia de AA de LLO es una variante de la sec. con núm. de  
 ident.: 3. En otra modalidad, la secuencia de AA de LLO es un fragmento de la sec. con núm. de ident.: 3. En otra  
 modalidad, la secuencia de AA de LLO es una isoforma de la sec. con núm. de ident.: 3.

En otra modalidad, el fragmento de LLO de los métodos y las composiciones de la presente invención comprende un dominio similar a PEST. En otra modalidad, un fragmento de LLO que comprende una secuencia PEST se utiliza como parte de una composición o en los métodos de la presente invención.

5 En otra modalidad, el fragmento de LLO no contiene el dominio de activación en el terminal carboxilo. En otra modalidad, el fragmento de LLO no incluye la cisteína 484. En otra modalidad, el fragmento de LLO es un fragmento no hemolítico. En otra modalidad, el fragmento de LLO se vuelve no hemolítico por delección o mutación del dominio de activación. En otra modalidad, el fragmento de LLO se vuelve no hemolítico por delección o mutación de la cisteína 484. En otra modalidad, una secuencia de LLO se vuelve no hemolítica por delección o mutación en otra  
10 ubicación.

En otra modalidad, el fragmento de LLO consiste en aproximadamente los primeros 441 AA de la proteína LLO. En otra modalidad, el fragmento de LLO consiste en aproximadamente los primeros 400-441 AA de la proteína LLO de longitud completa de 529 AA. En otra modalidad, el fragmento de LLO corresponde a los AA 1-441 de una proteína  
15 LLO descrita en la presente descripción. En otra modalidad, el fragmento de LLO consiste en aproximadamente los primeros 420 AA de LLO. En otra modalidad, el fragmento de LLO corresponde a los AA 1-420 de una proteína LLO descrita en la presente descripción. En otra modalidad, el fragmento de LLO consiste en aproximadamente los AA 20-442 de LLO. En otra modalidad, el fragmento de LLO corresponde a los AA 20-442 de una proteína LLO descrita en la presente descripción. En otra modalidad, cualquier ΔLLO sin el dominio de activación que comprende la cisteína 484, y en particular sin la cisteína 484, es adecuada para los métodos y las composiciones de la presente  
20 invención.

En otra modalidad, el fragmento de LLO corresponde a los primeros 400 AA de una proteína LLO. En otra modalidad, el fragmento de LLO corresponde a los primeros 300 AA de una proteína LLO. En otra modalidad, el fragmento de LLO  
25 corresponde a los primeros 200 AA de una proteína LLO. En otra modalidad, el fragmento de LLO corresponde a los primeros 100 AA de una proteína LLO. En otra modalidad, el fragmento de LLO corresponde a los primeros 50 AA de una proteína LLO, que en una modalidad, comprende una o más secuencias similares a PEST.

En otra modalidad, el fragmento de LLO contiene residuos de una proteína LLO homóloga que corresponde a uno de los intervalos de AA anteriores. Los números de los residuos no necesitan, en otra modalidad, corresponder exactamente con los números de los residuos enumerados anteriormente; por ejemplo, si la proteína LLO homóloga tiene una inserción o delección, con relación a una proteína LLO utilizada en la presente descripción.

35 Cada proteína LLO y fragmento de LLO representa una modalidad separada de la presente invención.

En otra modalidad, los homólogos de LLO de otras especies, que incluyen lisinas conocidas, o fragmentos de estas pueden usarse como el péptido que no es de HMW-MAA.

En otra modalidad de los métodos y las composiciones de la presente invención, un fragmento de una proteína ActA se fusiona al fragmento de HMW-MAA. En otra modalidad, el fragmento de una proteína ActA tiene la secuencia:  
40 MRAMMVVITANCITINPDIIFAATDSEDSSLNTDEWEEKTEEQPSEVNTGPRYETAR  
EVSSRDIKELEKSNKVRNTNKADLIAMLKEKAKEKGNINNNNSEQTENAAINEEASGADRP  
QVERRHPGLPSDSAEEIKRRKAIASSDSESLTYPDKPTKVNKKVAKESVADASESDLDS  
SMQSADESSPQPLKANQQPFFPKVFKKIKDAGKWVRDKIDENPEVKKAIVDKSAGLIDQLLTK  
45 KKSEEVNASDFPPPPTDEELRLALPETPMLLGFNAPATSEPSSFEPFPPTDEELRLALPETPML  
LGFNAPATSEPSSFEPFPPTDELEIIRRETASSLDSSFTRGDLASLRNAINRHSQNFSDFPPIPTEE ELNRRGGRP  
(sec. con núm. de ident.: 4). En otra modalidad, una secuencia de AA de ActA de los métodos y las composiciones de la presente invención comprende la secuencia que se expone en la sec. con núm. de ident.: 4. En otra modalidad, la secuencia de AA de ActA es un homólogo de la sec. con núm. de ident.: 4. En otra modalidad, la secuencia de AA de ActA es una variante de la sec. con núm. de ident.: 4. En otra modalidad, la secuencia de AA de ActA es un fragmento de la sec. con núm. de ident.: 4. En otra modalidad, la secuencia de AA de ActA es una isoforma de la sec. con núm. de ident.: 4.

55 En otra modalidad, el fragmento de ActA está codificado por un nucleótido recombinante que comprende la secuencia:

ATGCGTGCGATGATGGTGGTTTTTCACTACTGCCAATTGCATTACGATTAACCCCGACATAA  
TATTTGACGCGACAGATAGCGAAGATTCTAGTCTAAACACAGATGAATGGGAAGAAGAAA  
AAACAGAAGAGCAACCAAGCGAGGTAATACGGGACCAAGATACGAAACTGCACGTGAA  
60 GTAAGTTCACGTGATATTAAGAACTAGAAAAATCGAATAAAGTGAGAAATACGAACAAA  
GCAGACCTAATAGCAATGTTGAAAGAAAAAGCAGAAAAAGGTCCAAATATCAATAATAAC  
AACAGTGAACAACTGAGAATGCGGCTATAAATGAAGAGGCTTCAGGAGCCGACCGACCA  
GCTATACAAGTGGAGCGTGCATCCAGGATTGCCATCGGATAGCGCAGCGGAAATTAATAA  
AAAGAAGGAAAAGCCATAGCATCATCGGATAGTGAGCTTGAAAGCCTTACTTATCCGGATAA  
ACCAACAAAAGTAAATAAGAAAAAGTGGCGAAAGAGTCAGTTGCGGATGCTTCTGAAA  
65 GTGACTTAGATTCTAGCATGCAGTCAGCAGATGAGTCTTCAACCAACCTTTAAAAGCAAA  
CCAACAACCATTTTTCCCTAAAGTATTTAAAAAATAAAGATGCGGGGAAATGGGTACG

TGATAAAATCGACGAAAATCCTGAAGTAAAGAAAGCGATTGTTGATAAAAAGTGCAGGGTT  
 AATTGACCAATTATTAACCAAAAAGAAAAGTGAAGAGGTAATGCTTCGGACTTCCCGCC  
 ACCACCTACGGATGAAGAGTTAAGACTTGCTTTGCCAGAGACACCAATGCTTCTTGGTTTT  
 AATGCTCCTGCTACATCAGAACCGAGCTCATTGGAATTTCCACCACCACCTACGGATGAAG  
 5 AGTTAAGACTTGCTTTGCCAGAGACGCCAATGCTTCTTGGTTTTAATGCTCCTGCTACATC  
 GGAACCGAGCTCGTTTCCGATTTCCACCGCCTCCAACAGAAGATGAACTAGAAATCATCCG  
 GGAAACAGCATCCTCGCTAGATTCTAGTTTTACAAGAGGGGATTTAGCTAGTTTGAGAAAT  
 GCTATTAATCGCCATAGTCAAAATTTCTCTGATTTCCACCAATCCCAACAGAAGAAGAGT

10 TGAACGGGAGAGGCGGTAGACCA (sec. con núm. de ident.: 5). En otra modalidad, el nucleótido recombinante  
 tiene la secuencia que se expone en la sec. con núm. de ident.: 5. En otra modalidad, un nucleótido que codifica  
 ActA, de los métodos y las composiciones de la presente invención, comprende la secuencia que se expone en la  
 sec. con núm. de ident.: 5. En otra modalidad, el nucleótido que codifica ActA es un homólogo de la sec. con núm.  
 de ident.: 5. En otra modalidad, el nucleótido que codifica ActA es una variante de la sec. con núm. de ident.: 5. En  
 otra modalidad, el nucleótido que codifica ActA es un fragmento de la sec. con núm. de ident.: 5. En otra modalidad,  
 15 el nucleótido que codifica ActA es una isoforma de la sec. con núm. de ident.: 5.

En otra modalidad, el fragmento de ActA es cualquier otro fragmento de ActA conocido en la técnica. En otra  
 modalidad, un nucleótido recombinante de la presente invención comprende cualquier otra secuencia que codifique  
 un fragmento de una proteína ActA. En otra modalidad, el nucleótido recombinante comprende cualquier otra  
 20 secuencia que codifique una proteína ActA completa.

En otra modalidad de los métodos y las composiciones de la presente invención, una secuencia de AA similar a  
 PEST se fusiona al fragmento de HMW-MAA. En otra modalidad, la secuencia de AA SIMILAR A PEST es  
 25 KENSISMAPPASPAPKTPIEKKHADEIDK (sec. con núm. de ident.: 6). En otra modalidad, la secuencia similar a  
 PEST es KENSISMAPPASPAPK (sec. con núm. de ident.: 7). En otra modalidad, la fusión de un antígeno a  
 cualquier secuencia de LLO que incluye la 1 de las secuencias de AA similares a PEST enumeradas en la presente  
 descripción puede mejorar la inmunidad mediada por células contra HMW-MAA.

En otra modalidad, la secuencia de AA similar a PEST es una secuencia similar a PEST de una proteína ActA de  
 30 *Listeria*. En otra modalidad, la secuencia similar a PEST es KTEEQPSEVNTGPR (sec. con núm. de ident.: 8),  
 KASVTDTSEGLDSSMQSADESTPQPLK (sec. con núm. de ident.: 9), KNEEVNASDFPPPPTDEELR (sec. con  
 núm. de ident.: 10), o RGGIPTSEEFSSLNSGDFDENSETTEEEIDR (sec. con núm. de ident.: 11). En otra  
 modalidad, la secuencia similar a PEST es de la citolisina de *Listeria seeligeri*, codificada por el gen Iso. En otra  
 modalidad, la secuencia similar a PEST es RSEVTISPAETPESPATP (sec. con núm. de ident.: 12). En otra  
 35 modalidad, la secuencia similar a PEST es de la proteína estreptolisina O de *Streptococcus sp.* En otra modalidad, la  
 secuencia similar a PEST es de estreptolisina O de *Streptococcus pyogenes*, por ejemplo KQNTASTETTTTNEQPK  
 (sec. con núm. de ident.: 13) en los AA 35-51. En otra modalidad, la secuencia similar a PEST es de la Estreptolisina  
 O de *Streptococcus equisimilis*, por ejemplo, KQNTANTETTTTNEQPK (sec. con núm. de ident.: 14) en los AA 38-  
 40 54. En otra modalidad, la secuencia similar a PEST tiene una secuencia seleccionada de la sec. con núm. de ident.:  
 8-14. En otra modalidad, la secuencia similar a PEST tiene una secuencia seleccionada de la sec. con núm. de  
 ident.: 6-14. En otra modalidad, la secuencia similar a PEST es otra secuencia de AA similar a PEST derivada de un  
 organismo procariota.

La identificación de secuencias similares a PEST se conoce bien en la técnica, y se describe, por ejemplo en Rogers  
 45 S y otros (Amino acid sequences common to rapidly degraded proteins: the PEST hypothesis. Science 1986;  
 234(4774):364-8) y Rechsteiner M y otros (PEST sequences and regulation by proteolysis. Trends Biochem Sci  
 1996; 21(7):267-71)). Una "secuencia similar a PEST" se refiere, en otra modalidad, a una región rica en residuos de  
 prolina (P), ácido glutámico (E), serina (S), y treonina (T). En otra modalidad, la secuencia similar a PEST está  
 50 flanqueada por uno o más grupos que contienen varios aminoácidos cargados positivamente. En otra modalidad, la  
 secuencia similar a PEST media la degradación intracelular rápida de las proteínas que la contienen. En otra  
 modalidad, la secuencia similar a PEST se adapta a un algoritmo descrito en Rogers y otros. En otra modalidad, la  
 secuencia similar a PEST se adapta a un algoritmo descrito en Rechsteiner y otros. En otra modalidad, la secuencia  
 similar a PEST contiene uno o más sitios de fosforilación internos, y la fosforilación en estos sitios precede a la  
 55 degradación de proteínas.

En una modalidad, las secuencias similares a PEST de organismos procariotas se identifican de acuerdo con  
 métodos tales como los descritos en, por ejemplo, Rechsteiner y Rogers (1996, Trends Biochem. Sci. 21:267-271)  
 para LM y en Rogers S y otros (Science 1986; 234(4774):364-8). Alternativamente, pueden identificarse además  
 60 secuencias de AA similares a PEST a partir de otros organismos procariotas sobre la base de este método. Otros  
 organismos procariotas en donde se esperarían secuencias de AA similares a PEST incluyen, pero sin limitarse a,  
 otras especies de *Listeria*. En una modalidad, la secuencia similar a PEST se adapta a un algoritmo descrito en  
 Rogers y otros. En otra modalidad, la secuencia similar a PEST se adapta a un algoritmo descrito en Rechsteiner y  
 otros. En otra modalidad, la secuencia similar a PEST se identifica mediante el uso del programa de búsqueda de  
 65 PEST.

5 En otra modalidad, la identificación de motivos PEST se logra mediante una exploración inicial de los AA cargados positivamente R, H, y K dentro de la secuencia especificada de la proteína. Se cuentan todos los AA entre los flancos cargados positivamente y sólo se consideran además, los motivos que contienen un número de AA igual o mayor que el parámetro de tamaño de la ventana. En otra modalidad, una secuencia similar a PEST debe contener al menos 1 P, 1 D o E, y al menos 1 S o T.

10 En otra modalidad, la calidad de un motivo PEST se refina por medio de un parámetro de puntuación basado en el enriquecimiento local de AA críticos, así como en la hidrofobicidad del motivo. El enriquecimiento de D, E, P, S y T se expresa en porcentaje de masa (p/p) y se corrige para 1 equivalente de D o E, 1 de P y 1 de S o T. En otra modalidad, el cálculo de hidrofobicidad sigue en principio, el método de J. Kyte y R.F. Doolittle (Kyte, J y Doolittle, RF. J. Mol. Biol. 157, 105 (1982)). Para la simplificación de los cálculos, los índices de hidropatía de Kyte-Doolittle, que originalmente se encontraban en el intervalo de -4,5 para arginina a +4,5 para isoleucina, se convierten a números enteros positivos, mediante el uso de la siguiente transformación lineal, que produjo valores de 0 para arginina a 90 para isoleucina.

15 Índice de hidropatía = 10 \* índice de hidropatía de Kyte-Doolittle + 45

20 En otra modalidad, la hidrofobicidad de un motivo PEST potencial se calcula como la suma sobre los productos del por ciento en moles y el índice de hidrofobicidad para cada especie de AA. La puntuación de PEST deseada se obtiene como la combinación del término de enriquecimiento local y el término de hidrofobicidad como se expresa por la siguiente ecuación:

Puntuación de PEST = 0,55 \* DEPST - 0,5 \* índice de hidrofobicidad.

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

45 En otra modalidad, la secuencia similar a PEST se identifica mediante el uso de cualquier otro método o algoritmo conocido en la técnica, por ejemplo, el CaSPredictor (Garay-Malpartida HM, Occhiucci JM, Alves J, Belizario JE. Bioinformatics. Junio de 2005;21 Suplemento 1:i169-76). En otra modalidad, se usa el siguiente método:

Un índice de PEST se calcula para cada tramo de longitud adecuada (por ejemplo, un tramo de 30-35 AA) mediante la asignación de un valor de 1 a los AA Ser, Thr, Pro, Glu, Asp, Asn, o Gln. El valor del coeficiente (CV) para cada uno de los residuos PEST es 1 y para cada uno de los otros AA (no PEST) es 0.

50 "Fusión a una secuencia similar a PEST" se refiere, en otra modalidad, a la fusión a un fragmento proteico que comprende una secuencia similar a PEST. En otra modalidad, el término incluye casos en donde el fragmento proteico comprende una secuencia circundante distinta de la secuencia similar a PEST. En otra modalidad, el fragmento proteico consiste en la secuencia similar a PEST. Por lo tanto, en otra modalidad, "fusión" se refiere a dos péptidos o fragmentos proteicos unidos entre sí en sus extremos respectivos o embebidos uno dentro del otro.

55 En otra modalidad, el fragmento de HMW-MAA de los métodos y las composiciones de la presente invención se fusiona a la secuencia de AA que no es de HMW-MAA. En otra modalidad, el fragmento de HMW-MAA está embebido dentro de una secuencia de AA que no es de HMW-MAA. En otra modalidad, un péptido derivado de HMW-MAA se incorpora en un fragmento de LLO, proteína o fragmento de ActA, o secuencia similar a PEST.

60 En otra modalidad, las proteínas de fusión de la presente invención se preparan mediante un proceso que comprende subclonar secuencias adecuadas, seguido de la expresión del nucleótido resultante. En otra modalidad, las subsecuencias se clonan y las subsecuencias adecuadas se escinden mediante el uso de enzimas de restricción adecuadas. Los fragmentos se ligan después, en otra modalidad, para producir la secuencia de ADN deseada. En otra modalidad, el ADN que codifica la proteína de fusión se produce mediante el uso de métodos de amplificación del ADN, por ejemplo la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). En primer lugar, los segmentos del ADN nativo

en cada lado del nuevo extremo se amplifican por separado. El extremo 5' de la secuencia amplificada codifica al enlazador peptídico, mientras que el extremo 3' de la otra secuencia amplificada también codifica al enlazador peptídico. Dado que el extremo 5' del primer fragmento es complementario al extremo 3' del segundo fragmento, los dos fragmentos (después de una purificación parcial, por ejemplo en LMP agarosa) pueden usarse como una  
 5 plantilla de superposición en una tercera reacción de PCR. La secuencia amplificada contendrá codones, el segmento en el lado carboxilo del sitio de apertura (que ahora forma la secuencia del amino), el enlazador, y la secuencia en el lado amino del sitio de apertura (que ahora forma la secuencia del carboxilo). El inserto se liga después en un plásmido. En otra modalidad, se usa una estrategia similar para producir una proteína en donde un fragmento de HMW-MAA está embebido dentro de un péptido heterólogo.

10 En una modalidad, las secuencias de LLO fusionadas a un fragmento de HMW-MAA tal como A, B, o C o una *Listeria* que expresa un fragmento de HMW-MAA aumentaron la respuesta inmunitaria contra dicho péptido (Ejemplo 5), confirieron inmunidad antitumoral (Ejemplos 4 y 5), y generaron células CD8+ secretoras de IFN-gamma específicas para el péptido (Ejemplo 5). En una modalidad, ActA, LLO y/o secuencias similares a PEST fusionadas a un péptido tal como E7 de HPV aumentaron la respuesta inmunitaria contra dicho péptido, confirieron inmunidad antitumoral, y generaron células CD8+ secretoras de IFN-gamma específicas para el péptido (Ejemplos 6 y 7), incluso cuando el péptido de fusión se expresó en un vector diferente de *Listeria* (Ejemplo 8).

20 En otra modalidad, un polipéptido recombinante de la presente invención se produce mediante un proceso que comprende la etapa de conjugar químicamente un primer polipéptido que comprende un fragmento de HMW-MAA a un segundo polipéptido que comprende un péptido que no es de HMW-MAA. En otra modalidad, un fragmento de HMW-MAA se conjuga a un segundo polipéptido que comprende el péptido que no es de HMW-MAA. En otra modalidad, un péptido que comprende un fragmento de HMW-MAA se conjuga a un péptido que no es de HMW-MAA. En otra modalidad, un fragmento de HMW-MAA se conjuga a un péptido que no es de HMW-MAA.

25 La proteína HMW-MAA a partir de la cual se derivan los fragmentos de HMW-MAA de la presente invención es, en otra modalidad, una proteína HMW-MAA humana. En otra modalidad, la proteína HMW-MAA es una proteína de ratón. En otra modalidad, la proteína HMW-MAA es una proteína de rata. En otra modalidad, la proteína HMW-MAA es una proteína de primate. En otra modalidad, la proteína HMW-MAA es de cualquier otra especie conocida en la técnica. En otra modalidad, la proteína HMW-MAA es el proteoglicano sulfato de condroitina asociado a melanoma (MCSP). En otra modalidad, una proteína AN2 se usa en los métodos y las composiciones de la presente invención. En otra modalidad, una proteína NG2 se usa en los métodos y las composiciones de la presente invención.

35 En otra modalidad, la proteína HMW-MAA de los métodos y las composiciones de la presente invención tiene la secuencia:

MQSGRGPPLPAPGLALALTLMLARLASAASFFGENHLEVPVATALTDIDLQQLQFSTSQ  
 PEALLLLAAGPADHLLLQLYSGRLQVRLVLGQEEELRLQTPAETLLSDSIPHTVVLTVVEGWATL  
 SVDGFLNASSAVPGAPLEVPYGLFVGGTGTGLPYLRGTSRPLRGCLHAATLNGRSLRPLTPD  
 VHEGCAEEFSASDDVALGFSGPHSLAAFPAGWTQDEGTLEFTLTTQSRQAPLAFQAGRRGDF  
 40 IYVDIFEGHLRAVVEKGGQTVLLHNSVPVADGGPHEVSVHINAHRLAISVDQYPTHTSNRGVLS  
 YLEPRGSLLLGGLDAEASRHLQEHRLGLTPEATNASLLGCMEDLSVNGQRRGLREALLTRNMA  
 AGRLEEEYEDDAYGHYEFSTLAPEAWPAMELPEPCVPEPGLPPVFANFTQLLTISPLVVAE  
 GGTAWLEWRHVQPTLDLMEAE LRKSQVLFVTRGARHGELELDIPGAQARKMFTLLDVVNRK  
 ARFIHDGSEDTSQDLVLEVSVTARVPMPSCLRRGQTYLLPIQVNPVNDPPHIFPHGSLMVILEH  
 45 TQKPLGPEVFQAYDPDSACEGLTFQVLGTSSGLPVERRDQPGEPATEFSCRELEAGSLVYVHRG  
 GPAQDLTFRVSDGLQASPPATLKVVAIRPAIQIHRSTGLRLAQQSAMPILPANLSVETNAVGGD  
 VSVLFRVTGALQFGELKQKQAGGVEGAEWATQAFHQRDVEQGRVRYLSTDPQHAYDVT  
 ENLALVQVQGEILSNLSFPVTIQRATVWMLRLEPLHTQNTQQETLTTAHLAATLEEAGSPPT  
 FHVEVQAPRKGNLQQLGTRLSDGGQFTQDDIQAGRVTYGATARASEAVEDTFRFRVTAPPY  
 50 FSPLYTFPIHIGGDPDAPVLTNVLLVPEGGEGVLSADHLFVKSLNSASLYEVMERPRHGRLA  
 WRGTQDKTTMVTSTNEDLLRGRVYQHDDSETTEDDIPFVATRQGESSGDMAWEEVGRVF  
 RVAIQPVNDHAPVQTISRIFHVARGRRLLTTDDVAFSDADSGFADAQLVLRKDLLFGSIVAV  
 DEPTRPIYRFTQEDLRKRRVLFVHSGADRGWIQLQVSDGQHQATALLEVQASEPYLRVANGSS  
 LVVPQGGQGTIDTAVLHLDNTLDIRSGDEVHYHTAGPRWGQLVRAGQPATAFSQQDLLDGA  
 55 VLYSHNGSLSPRDTMAFSVEAGPVHTDATLQVTIALEGPLAPLKLVRHKKIYVFQGEAAEIRR  
 QLEAAQAEAVPPADIVFSVKSPPSAGYLVMSVRGALADEPPSLDPVQSFSQEAVDTRVLYLHRSR  
 PEAAWDAFSLDVASGLGAPLEGLVLEVLPAALPLEAQNFVPEGGSLTAPPLLRVSGPYFPT  
 LLGLSLQVLEPPQHAGALQKEDGQPARTLSAFSWRMVEEQLRVYVHDGSETLTDSEFVLMANASE  
 MDRQSHPVAFVTVLPVNDQPILTTNTGLQMWEGATAPIPAEALRSTDGDSGSEDLVYTIEQP  
 60 SNGRVVLRGAPGTEVRSFTAQLDGGVLVFSHRGTLDDGGFRFRLSDGEHTSPGHFFRVTAQKQ  
 VLLSLKGSQTLTVCPGSVQPLSSQTLRASSAGTDPQLLLYRVVVRGPQLGRLFHAQQDSTGEAL  
 VNFTQAEVYAGNILEHEMPEPFWEAHDLTLELQLSSPPARDVAATLAVAVSFEAACQPQRP  
 LWKNKGLVWPEGQRARITVAALDASNLLASVPSQRSEHDVLFQVTQFPVSRGQLLVSEELPH  
 65 GQPHFLQSLAAGQLVYAHGGGGTQDGFHFRHLQGPAGASVAGPQTSEAFITVRDVNER  
 PPQPQASVPLRLTRGSRAPISRAQLSVVDPDSAPGEIEYEVQRAPHNGFLSLVGGGLGPVTRFTQ  
 ADVDSGRLAFVANGSSVAGIFQLSMSDGASPLPMSLAVDILPSAIEVQLRAPLEVPQALGRSSL



gagggtctacgctgggaatattctgtatgagcatgagatgccccccgagccctttggaggcccatgataccctagagctccagctgtcctcgccgct  
 gcccgggacgtggccgccaccctgtgtggctgtgtctttgaggctgctgtccccagcgccccagccaccttggagaacaaggctctgggt  
 ccccgaggccagcgggccaggatcacctggctgcttggatgctccaatcttggccagcgttccatccccagcgtcagagcatgatgtg  
 5 tctccaggctcacacagtccccagcggggccagctgtgtggtgccaggagccccctcatgtggcagccccacttctcagctccagctggct  
 gcagggcagctagtgtatgccacggcgggtggggcaccagcagatggcttccatcttctgccccactccaggggccagcaggggctccgctg  
 gctggaccccaaacctcagaggccttggccatcacggtagggatgaaatgagcggccccctcagccacaggcctctgtcccactccggctcacc  
 gaggtctctgtccccatctcccgggccagctgagtggtggaccagactcagctctggggagattgagtacgaggtccagcggggcacc  
 acaacggtcctcagcctgggtgggtggcctggggcccgtagcccgcttacgcaagccgatgtggattcagggcggctggccttctggccaa  
 10 cgggagcagcgtggcagggcatctccagctgagcatgtctgatggggccagccaccctgccatgtccctggctgtggacatcctaccatccgcca  
 tcgaggtgacgtcgggccaccctggaggtccccaaacttggggcctcctcactgagccagcagcagctccgggtggttcagatcgggagg  
 agccagaggcagcataccgctcatccagggacccagatgtggcctctctgtggcggggcggccacctcgccctcagccaattccagatag  
 accagggcaggggtgttgcctcaccacttctcctctcatgaccactcagagtcctggcactggctagggtgtcaatgcatcagccgtagt  
 gaacgtcactgtgagggctctgtcagtggtggcaggtggccatggccccaggggtgccaccctgcgctggacccaccgtcctagatgtcg  
 cgagctggccaaccgcacaggcagtggtgctgctcctcctggagggacccggcagtgccgctggtccgctgccccgagccaggagc  
 15 gagccccggggcagcagcgtgtgagcagttcactcagcagggaccttggagggacccggcagtgccgctggtccgctgccccgagccaggagc  
 ggccccggccccgaggtgacagctcactctggagctgtgggcacagggcgtcccctgctgtggcctccctggacttggcactgagccttaca  
 atgtgccccggccctacagcgtggcctgctcagtgccccgagggccggcagcgaagcagggagccagagcagcagccccacagggc  
 agccagggccccatgcatccagcctgagcccgctgtggccaagggaggtctcctgagctccttggagccaacatgttcagcgtcatcctccatg  
 tgctgtgacttctgctcctggcgtcctcctgctccttaccctccgaaacgcaacaagacgggcaagcatgacgtccaggtcctgactgcca  
 20 agccccgcaacggcctggctgtgacaccgagaccttgcgaaggtggagccaggccagggccatcccgtcacagctgtgctggccagggggccc  
 cctccaggaggccagcctgaccagagctgctgacgttctgcccggacaccaaccctgcccctaagaatggccagctactgggtgtgagcctggct  
 gggccagatgctgatcgggcccaggacaggc (sec. con núm. de ident.: 16). En otra modalidad, el nucleótido recombinante  
 tiene la secuencia que se expone en la sec. con núm. de ident.: 16. En otra modalidad, un nucleótido que codifica  
 HMW-MAA de los métodos y las composiciones de la presente invención comprende la secuencia que se expone en  
 25 la sec. con núm. de ident.: 16. En otra modalidad, el nucleótido que codifica HMW-MAA es un homólogo de la sec.  
 con núm. de ident.: 16. En otra modalidad, el nucleótido que codifica HMW-MAA es una variante de la sec. con núm.  
 de ident.: 16. En otra modalidad, el nucleótido que codifica HMW-MAA es un fragmento de la sec. con núm. de  
 ident.: 16. En otra modalidad, el nucleótido que codifica HMW-MAA es una isoforma de la sec. con núm. de ident.:  
 16.

En otra modalidad, la proteína HMW-MAA de los métodos y las composiciones de la presente invención tiene una  
 secuencia de AA que se expone en una entrada del GenBank que tiene uno de los números de acceso seleccionado  
 de NM\_001897 y X96753. En otra modalidad, la proteína HMW-MAA está codificada por una secuencia de  
 35 nucleótidos que se expone en una de las entradas del GenBank anteriores. En otra modalidad, la proteína HMW-  
 MAA comprende una secuencia que se expone en una de las entradas del GenBank anteriores. En otra modalidad,  
 la proteína HMW-MAA es un homólogo de una secuencia que se expone en una de las entradas del GenBank  
 anteriores. En otra modalidad, la proteína HMW-MAA es una variante de una secuencia que se expone en una de  
 las entradas del GenBank anteriores. En otra modalidad, la proteína HMW-MAA es un fragmento de una secuencia  
 que se expone en una de las entradas del GenBank anteriores. En otra modalidad, la proteína HMW-MAA es una  
 40 isoforma de una secuencia que se expone en una de las entradas del GenBank anteriores.

El fragmento de HMW-MAA utilizado en la presente invención comprende, en otra modalidad, los AA 360-554. En  
 otra modalidad, el fragmento consiste esencialmente en los AA 360-554. En otra modalidad, el fragmento consiste  
 45 en los AA 360-554. En otra modalidad, el fragmento comprende los AA 701-1130. En otra modalidad, el fragmento  
 consiste esencialmente en los AA 701-1130. En otra modalidad, el fragmento consiste en los AA 701-1130. En otra  
 modalidad, el fragmento comprende los AA 2160-2258. En otra modalidad, el fragmento consiste esencialmente en  
 2160-2258. En otra modalidad, el fragmento consiste en 2160-2258.

En algunas modalidades, un polipéptido de la presente invención comprenderá un fragmento de una proteína HMW-  
 MAA, en cualquier forma o modalidad como se describe en la presente. En algunas modalidades, cualquiera de los  
 polipéptidos de la presente invención consistirá de un fragmento de una proteína HMW-MAA, en cualquier forma o  
 modalidad como se describe en la presente. En algunas modalidades, de las composiciones de esta invención  
 consistirá esencialmente de un fragmento de una proteína HMW-MAA, en cualquier forma o modalidad como se  
 describe en la presente. En algunas modalidades, el término "comprender" se refiere a la inclusión del agente activo  
 55 indicado, tal como el fragmento de una proteína HMW-MAA, o el fragmento de una proteína HMW-MAA y un  
 polipéptido que no es de HMW-MAA, así como la inclusión de otros agentes activos, y vehículos, excipientes,  
 emolientes, estabilizadores farmacéuticamente aceptables, etcétera, como se conocen en la industria farmacéutica.  
 En algunas modalidades, el término "que consiste esencialmente en" se refiere a una composición, cuyo único  
 ingrediente activo es el ingrediente activo indicado, sin embargo, pueden incluirse otros compuestos que son para  
 60 estabilizar, preservar, etcétera, la formulación, pero no están implicados directamente en el efecto terapéutico del  
 ingrediente activo indicado. En algunas modalidades, el término "que consiste esencialmente en" puede referirse a  
 componentes que facilitan la liberación del ingrediente activo. En algunas modalidades, el término "que consiste" se  
 refiere a una composición, que contiene el ingrediente activo y un vehículo o excipiente farmacéuticamente  
 65 aceptables.



aproximadamente 30-250 AA. En otra modalidad, la longitud es de aproximadamente 30-300 AA. En otra modalidad, la longitud es de aproximadamente 30-400 AA. En otra modalidad, la longitud es de aproximadamente 30-500 AA. En otra modalidad, la longitud es de aproximadamente 40-50 AA. En otra modalidad, la longitud es de aproximadamente 40-70 AA. En otra modalidad, la longitud es de aproximadamente 40-100 AA. En otra modalidad, la longitud es de aproximadamente 40-150 AA. En otra modalidad, la longitud es de aproximadamente 40-200 AA. En otra modalidad, la longitud es de aproximadamente 40-250 AA. En otra modalidad, la longitud es de aproximadamente 40-300 AA. En otra modalidad, la longitud es de aproximadamente 40-400 AA. En otra modalidad, la longitud es de aproximadamente 40-500 AA. En otra modalidad, la longitud es de aproximadamente 50-70 AA. En otra modalidad, la longitud es de aproximadamente 50-100 AA. En otra modalidad, la longitud es de aproximadamente 50-150 AA. En otra modalidad, la longitud es de aproximadamente 50-200 AA. En otra modalidad, la longitud es de aproximadamente 50-250 AA. En otra modalidad, la longitud es de aproximadamente 50-300 AA. En otra modalidad, la longitud es de aproximadamente 50-400 AA. En otra modalidad, la longitud es de aproximadamente 50-500 AA. En otra modalidad, la longitud es de aproximadamente 70-100 AA. En otra modalidad, la longitud es de aproximadamente 70-150 AA. En otra modalidad, la longitud es de aproximadamente 70-200 AA. En otra modalidad, la longitud es de aproximadamente 70-250 AA. En otra modalidad, la longitud es de aproximadamente 70-300 AA. En otra modalidad, la longitud es de aproximadamente 70-400 AA. En otra modalidad, la longitud es de aproximadamente 70-500 AA. En otra modalidad, la longitud es de aproximadamente 100-150 AA. En otra modalidad, la longitud es de aproximadamente 100-200 AA. En otra modalidad, la longitud es de aproximadamente 100-250 AA. En otra modalidad, la longitud es de aproximadamente 100-300 AA. En otra modalidad, la longitud es de aproximadamente 100-400 AA. En otra modalidad, la longitud es de aproximadamente 100-500 AA.

En otra modalidad, un polipéptido recombinante de los métodos y las composiciones de la presente invención comprende una secuencia señal. En otra modalidad, la secuencia señal es del organismo usado para la construcción del vector vacunal. En otra modalidad, la secuencia señal es una secuencia señal de LLO. En otra modalidad, la secuencia señal es una secuencia señal de ActA. En otra modalidad, la secuencia señal es una secuencia señal de Listeria. En otra modalidad, la secuencia señal es cualquier otra secuencia señal conocida en la técnica.

Los términos "péptido" y "péptido recombinante" se refieren, en otra modalidad, a un péptido o polipéptido de cualquier longitud. En otra modalidad, un péptido o péptido recombinante de la presente invención tiene una de las longitudes enumeradas anteriormente para un fragmento de HMW-MAA. Cada posibilidad representa una modalidad separada de la presente invención. En una modalidad, el término "péptido" se refiere a péptidos nativos (ya sean productos de degradación, péptidos sintetizados sintéticamente o péptidos recombinantes) y/o peptidomiméticos (típicamente, péptidos sintetizados sintéticamente), tales como peptoides y semipeptoides que son análogos de péptidos, que pueden tener, por ejemplo, modificaciones que le dan más estabilidad a los péptidos mientras están en un cuerpo, o más capacidad de penetrar en las células. Tales modificaciones incluyen, pero no se limitan a modificación del N terminal, modificación del C terminal, modificación de los enlaces peptídicos, que incluyen, pero no se limitan a, CH<sub>2</sub>-NH, CH<sub>2</sub>-S, CH<sub>2</sub>-S=O, O=C-NH, CH<sub>2</sub>-O, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>, S=C-NH, CH=CH o CF=CH, modificaciones de la cadena principal, y modificación de residuos. Los métodos para preparar compuestos peptidomiméticos se conocen bien en la técnica y se especifican, por ejemplo, en Quantitative Drug Design, C.A. Ramsden Gd., Capítulo 17.2, F. Choplin Pergamon Press (1992), que se incorpora como referencia como si se expusiera totalmente en la presente descripción. A continuación se proporcionan más detalles al respecto.

Los enlaces peptídicos (-CO-NH-) dentro del péptido pueden sustituirse, por ejemplo, por enlaces N-metilados (-N(CH<sub>3</sub>)-CO-), enlaces tipo éster (-C(R)H-C-O-O-C(R)-N-), enlaces cetometileno (-CO-CH<sub>2</sub>-), enlaces \*-aza (-NH-N(R)-CO-), en donde R es cualquier grupo alquilo, por ejemplo, metilo, enlaces carba (-CH<sub>2</sub>-NH-), enlaces hidroxietileno (-CH(OH)-CH<sub>2</sub>-), enlaces tioamida (-CS-NH-), doble enlaces olefínicos (-CH=CH-), enlaces retroamida (-NH-CO-), derivados de péptidos (-N(R)-CH<sub>2</sub>-CO-), en donde R es la cadena lateral "normal", que se presenta naturalmente en el átomo de carbono.

Estas modificaciones pueden producirse en cualquiera de los enlaces a lo largo de la cadena peptídica e incluso en varios (2-3) al mismo tiempo. Los aminoácidos aromáticos naturales, Trp, Tyr y Phe, pueden sustituirse por ácidos sintéticos no naturales tales como TIC, naftilelanina (Nol), derivados de Phe metilados en el anillo, derivados halogenados de Phe u o-metil-Tyr.

Además de lo anterior, los péptidos de la presente invención pueden incluir, además, uno o más aminoácidos modificados o uno o más monómeros que no son aminoácidos (por ejemplo ácidos grasos, carbohidratos complejos, etcétera).

En una modalidad, se comprende que el término "aminoácido(s)" incluye los 20 aminoácidos de origen natural; los aminoácidos frecuentemente modificados postraduccionalmente in vivo, que incluyen, por ejemplo, hidroxiprolina, fosfoserina y fosfotreonina; y otros aminoácidos inusuales que incluyen, pero no se limitan a, ácido 2-aminoadípico, hidroxilisina, isodesmosina, norvalina, norleucina y ornitina. Además, el término "aminoácido" puede incluir D- y L-aminoácidos.

Los péptidos o proteínas de esta invención pueden prepararse mediante diversas técnicas conocidas en la materia, que incluyen genotecas de presentación por fagos (Hoogenboom y Winter, J. Mol. Biol. 227:381 (1991); Marks y otros, J. Mol. Biol. 222:581 (1991)).

5 En una modalidad, el término "oligonucleótido" es intercambiable con el término "ácido nucleico", y puede referirse a una molécula, que puede incluir, pero no se limita a, secuencias procariotas, ARNm eucariótico, ADNc a partir de ARNm eucariótico, secuencias de ADN genómico de ADN eucariótico (por ejemplo, de mamíferos), e incluso secuencias de ADN sintético. El término se refiere, además, a secuencias que incluyen cualquiera de los análogos de las bases, conocidos para ADN y ARN.

10 En otra modalidad, la presente invención proporciona una vacuna que comprende una cepa de *Listeria* recombinante de la presente invención. En una modalidad, la vacuna comprende adicionalmente un adyuvante. En una modalidad, la vacuna comprende adicionalmente una citocina, quimiocina, o combinación de estas. En una modalidad, una vacuna es una composición que induce una respuesta inmunitaria contra un antígeno o polipéptido en la composición como resultado de la exposición a la composición. En otra modalidad, la vacuna o composición comprende adicionalmente APC, que en una modalidad son autólogas, mientras que en otra modalidad, son alogénicas respecto al sujeto.

20 En otra modalidad, la presente invención proporciona una vacuna que comprende un polipéptido recombinante de la presente invención y un adyuvante.

En otra modalidad, la presente invención proporciona una composición inmunogénica que comprende un polipéptido recombinante de la presente invención. En otra modalidad, la composición inmunogénica de los métodos y las composiciones de la presente invención comprende un vector vacunal recombinante que codifica un péptido recombinante de la presente invención. En otra modalidad, la composición inmunogénica comprende un plásmido que codifica un péptido recombinante de la presente invención. En otra modalidad, la composición inmunogénica comprende un adyuvante. En una modalidad, un vector de la presente invención puede administrarse como parte de una composición vacunal.

30 La composición inmunogénica utilizada en los métodos y las composiciones de la presente invención comprende, en otra modalidad, un vector vacunal recombinante. En otra modalidad, el vector vacunal recombinante comprende un péptido recombinante de la presente invención. En otra modalidad, el vector vacunal recombinante comprende un ácido nucleico aislado de la presente invención. En otra modalidad, el vector vacunal recombinante comprende un ácido nucleico aislado que codifica un péptido recombinante de la presente invención.

35 En otra modalidad, la presente invención proporciona un vector vacunal recombinante que codifica un polipéptido recombinante de la presente invención. En otra modalidad, la presente invención proporciona un vector vacunal recombinante que comprende un polipéptido recombinante de la presente invención. En otra modalidad el vector de expresión es un plásmido. Los métodos para construir y utilizar vectores recombinantes se conocen bien en la materia y se describen, por ejemplo, en Sambrook y otros (2001, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York), y en Brent y otros (2003, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Nueva York).

45 En otra modalidad, el vector es un patógeno intracelular. En otra modalidad, el vector se deriva de un patógeno citosólico. En otra modalidad, el vector se deriva de un patógeno intracelular. En otra modalidad, un patógeno intracelular induce una respuesta inmunitaria mediada por células predominantemente. En otra modalidad, el vector es una cepa de Salmonella. En otra modalidad, el vector es una cepa de BCG. En otra modalidad, el vector es un vector bacteriano. En otra modalidad, las células dendríticas transducidas con un vector de la presente invención pueden administrarse al sujeto para regular positivamente la respuesta inmunitaria del sujeto, que en una modalidad se lleva a cabo mediante la regulación positiva de la actividad de CTL.

50 En otra modalidad, un vector vacunal recombinante induce una respuesta inmunitaria de tipo Th1 predominantemente.

55 Una composición inmunogénica de los métodos y las composiciones de la presente invención comprende, en otra modalidad, un adyuvante que favorece una respuesta inmunitaria de tipo Th1 predominantemente. En otra modalidad, el adyuvante favorece una respuesta inmunitaria mediada por Th1 predominantemente. En otra modalidad, el adyuvante favorece una respuesta inmunitaria de tipo Th1. En otra modalidad, el adyuvante favorece una respuesta inmunitaria mediada por Th1. En otra modalidad, el adyuvante favorece una respuesta inmunitaria mediada por células sobre una respuesta mediada por anticuerpos. En otra modalidad, el adyuvante es cualquier otro tipo de adyuvante conocido en la técnica. En otra modalidad, la composición inmunogénica induce la formación de una respuesta inmunitaria de células T contra la proteína objetivo.

65 En otra modalidad, el adyuvante es MPL. En otra modalidad, el adyuvante es QS21. En otra modalidad, el adyuvante es un agonista de TLR. En otra modalidad, el adyuvante es un agonista de TLR4. En otra modalidad, el adyuvante es un agonista de TLR9. En otra modalidad, el adyuvante es Resiquimod®. En otra modalidad, el

- adyuvante es imiquimod. En otra modalidad, el adyuvante es un oligonucleótido con CpG. En otra modalidad, el adyuvante es una citocina o un ácido nucleico que codifica la misma. En otra modalidad, el adyuvante es una quimiocina o un ácido nucleico que codifica la misma. En otra modalidad, el adyuvante es IL-12 o un ácido nucleico que codifica la misma. En otra modalidad, el adyuvante es IL-6 o un ácido nucleico que codifica la misma. En otra modalidad, el adyuvante es un lipopolisacárido. En otra modalidad, el adyuvante es como se describe en Fundamental Immunology, 5ta ed (Agosto de 2003): William E. Paul (Editor); Lippincott Williams & Wilkins Publishers; Capítulo 43: Vaccines, GJV Nossal, que se incorpora de esta manera como referencia. En otra modalidad, el adyuvante es cualquier otro adyuvante conocido en la técnica.
- En una modalidad, una "respuesta inmunitaria de tipo Th1 predominantemente" se refiere a una respuesta inmunitaria en la que se secreta IFN-gamma. En otra modalidad, se refiere a una respuesta inmunitaria en la que se secreta el factor de necrosis tumoral- $\beta$ . En otra modalidad, se refiere a una respuesta inmunitaria en la que se secreta IL-2.
- En otra modalidad, el vector se selecciona de *Salmonella sp.*, *Shigella sp.*, BCG, *L. monocytogenes* (dicha modalidad se ejemplifica en el Ejemplo 2), *E. coli*, y *S. gordonii*. En otra modalidad, las proteínas de fusión se suministran mediante vectores bacterianos recombinantes modificados para escapar de la fusión fagolisosómica y vivir en el citoplasma de la célula. En otra modalidad, el vector es un vector viral. En otras modalidades, el vector se selecciona de Vaccinia (dicha modalidad se ejemplifica en el Ejemplo 8), Avipox, Adenovirus, AAV, virus Vaccinia NYVAC, cepa de vaccinia modificada Ankara (MVA), virus del bosque de Semliki, virus de la encefalitis equina venezolana, virus del herpes y retrovirus. En otra modalidad, el vector es un vector de ADN desnudo. En otra modalidad, el vector es cualquier otro vector conocido en la técnica.
- En otra modalidad, la presente invención proporciona un ácido nucleico aislado que codifica un polipéptido recombinante de la presente invención. En una modalidad, el ácido nucleico aislado comprende una secuencia que comparte al menos 85 % de homología con un ácido nucleico que codifica un polipéptido recombinante de la presente invención. En otra modalidad, el ácido nucleico aislado comprende una secuencia que comparte al menos 90 % de homología con un ácido nucleico que codifica un polipéptido recombinante de la presente invención. En otra modalidad, el ácido nucleico aislado comprende una secuencia que comparte al menos 95 % de homología con un ácido nucleico que codifica un polipéptido recombinante de la presente invención. En otra modalidad, el ácido nucleico aislado comprende una secuencia que comparte al menos 97 % de homología con un ácido nucleico que codifica un polipéptido recombinante de la presente invención. En otra modalidad, el ácido nucleico aislado comprende una secuencia que comparte al menos 99 % de homología con un ácido nucleico que codifica un polipéptido recombinante de la presente invención.
- En otra modalidad, la presente invención proporciona una vacuna que comprende una molécula de nucleótidos recombinante de la presente invención y un adyuvante. En otra modalidad, la presente invención proporciona un vector vacunal recombinante que comprende una molécula de nucleótidos recombinante de la presente invención. En otra modalidad, la presente invención proporciona un vector vacunal recombinante que codifica un polipéptido recombinante de la presente invención. En otra modalidad, la presente invención proporciona un vector vacunal recombinante que comprende un polipéptido recombinante de la presente invención. En otra modalidad el vector de expresión es un plásmido. Los métodos para construir y utilizar vectores recombinantes se conocen bien en la materia y se describen, por ejemplo, en Sambrook y otros (2001, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York), y en Brent y otros (2003, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Nueva York).
- Los métodos para preparar vacunas peptídicas se conocen bien en la técnica y se describen, por ejemplo, en el documento núm. EP1408048, la solicitud de patente de Estados Unidos núm. 20070154953, y OGASAWARA y otros (Proc. Natl. Acad. Sci. USA Vol. 89, pp. 8995-8999, Octubre de 1992). En una modalidad, las técnicas de evolución de péptidos se usan para crear un antígeno con mayor inmunogenicidad. Las técnicas para la evolución de péptidos se conocen bien en la materia y se describen, por ejemplo en la patente de Estados Unidos núm. 6773900.
- En una modalidad, una vacuna es una composición que induce una respuesta inmunitaria contra un antígeno o polipéptido en la composición como resultado de la exposición a la composición.
- En otra modalidad, la presente invención proporciona una cepa de *Listeria* recombinante que comprende una molécula de nucleótidos recombinante de la presente invención.
- La cepa de *Listeria* recombinante de los métodos y las composiciones de la presente invención es, en otra modalidad, una cepa de *Listeria monocytogenes* recombinante. En otra modalidad, la cepa de *Listeria* es una cepa de *Listeria seeligeri* recombinante. En otra modalidad, la cepa de *Listeria* es una cepa de *Listeria grayi* recombinante. En otra modalidad, la cepa de *Listeria* es una cepa de *Listeria ivanovii* recombinante. En otra modalidad, la cepa de *Listeria* es una cepa de *Listeria murrayi* recombinante. En otra modalidad, la cepa de *Listeria* es una cepa de *Listeria welshimeri* recombinante. En otra modalidad, la cepa de *Listeria* es una cepa recombinante de cualquier otra especie de *Listeria* conocida en la técnica. En una modalidad, la cepa de *Listeria* es una cepa de *Listeria* que comprende LLO, mientras que en otra modalidad, la cepa de *Listeria* es una cepa de *Listeria* que

comprende ActA, mientras en otra modalidad, la cepa de *Listeria* es una cepa de *Listeria* que comprende secuencias similares a PEST.

5 En otra modalidad la cepa de *Listeria* está atenuada por delección de un gen. En otra modalidad la cepa de *Listeria* está atenuada por delección de más de 1 gen. En otra modalidad la cepa de *Listeria* está atenuada por delección o inactivación de un gen. En otra modalidad la cepa de *Listeria* está atenuada por delección o inactivación de más de 1 gen.

10 En otra modalidad, el gen que está mutado es *hly*. En otra modalidad, el gen que está mutado es *actA*. En otra modalidad, el gen que está mutado es *plcA*. En otra modalidad, el gen que está mutado es *plcB*. En otra modalidad, el gen que está mutado es *mpl*. En otra modalidad, el gen que está mutado es *inlA*. En otra modalidad, el gen que está mutado es *inlB*. En otra modalidad, el gen que está mutado es *bsh*.

15 En otra modalidad, la cepa de *Listeria* es un mutante auxotrófico. En otra modalidad, la cepa de *Listeria* es deficiente de un gen que codifica un gen para la síntesis de vitaminas. En otra modalidad, la cepa de *Listeria* es deficiente de un gen que codifica una sintasa de ácido pantoténico.

20 En otra modalidad, la cepa de *Listeria* es deficiente de una enzima del metabolismo de AA. En otra modalidad, la cepa de *Listeria* es deficiente de un gen de la sintasa de ácido D-glutámico. En otra modalidad, la cepa de *Listeria* es deficiente del gen *dat*. En otra modalidad, la cepa de *Listeria* es deficiente del gen *dal*. En otra modalidad, la cepa de *Listeria* es deficiente del gen *dga*. En otra modalidad la cepa de *Listeria* es deficiente en un gen implicado en la síntesis del ácido diaminopimélico. *CysK*. En otra modalidad, el gen es de la metionina sintasa independiente de la vitamina B12. En otra modalidad, el gen es *trpA*. En otra modalidad, el gen es *trpB*. En otra modalidad, el gen es *trpE*. En otra modalidad, el gen es *asnB*. En otra modalidad, el gen es *gltD*. En otra modalidad, el gen es *gltB*. En otra modalidad, el gen es *leuA*. En otra modalidad, el gen es *argG*. En otra modalidad, el gen es *thrC*. En otra modalidad, la cepa de *Listeria* es deficiente en uno o más de los genes descritos anteriormente.

30 En otra modalidad, la cepa de *Listeria* es deficiente de un gen de sintasa. En otra modalidad, el gen es un gen para la síntesis de AA. En otra modalidad, el gen es *folP*. En otra modalidad, el gen es de una proteína de la familia de dihidrouridina sintasa. En otra modalidad, el gen es *ispD*. En otra modalidad, el gen es *ispF*. En otra modalidad, el gen es de la fosfoenolpiruvato sintasa. En otra modalidad, el gen es *hisF*. En otra modalidad, el gen es *hisH*. En otra modalidad, el gen es *fliI*. En otra modalidad, el gen es de la pseudouridina sintasa de la subunidad ribosomal grande. En otra modalidad, el gen es *ispD*. En otra modalidad, el gen es de la proteína bifuncional GMP sintasa/glutamina amidotransferasa. En otra modalidad, el gen es *cobS*. En otra modalidad, el gen es *cobB*. En otra modalidad, el gen es *cbiD*. En otra modalidad, el gen es de C-metiltransferasa de uroporfirina III/sintasa de uroporfirinógeno III. En otra modalidad, el gen es *cobQ*. En otra modalidad, el gen es *uppS*. En otra modalidad, el gen es *truB*. En otra modalidad, el gen es *dxs*. En otra modalidad, el gen es *mvaS*. En otra modalidad, el gen es *dapA*. En otra modalidad, el gen es *ispG*. En otra modalidad, el gen es *folC*. En otra modalidad, el gen es de la citrato sintasa. En otra modalidad, el gen es *argJ*. En otra modalidad, el gen es de la 3-desoxi-7-fosfoheptulonato sintasa. En otra modalidad, el gen es de la indol-3-glicerol-fosfato sintasa. En otra modalidad, el gen es un componente de antranilato sintasa/glutamina amidotransferasa. En otra modalidad, el gen es *menB*. En otra modalidad, el gen es de la isocorismato sintasa específica de menaquinona. En otra modalidad, el gen es de fosforibosilformilglicinamida sintasa I o II. En otra modalidad, el gen es de fosforibosilaminoimidazol-succinocarboxamida sintasa. En otra modalidad, el gen es *carB*. En otra modalidad, el gen es *carA*. En otra modalidad, el gen es *thyA*. En otra modalidad, el gen es *mgsA*. En otra modalidad, el gen es *aroB*. En otra modalidad, el gen es *hepB*. En otra modalidad, el gen es *rluB*. En otra modalidad, el gen es *ilvB*. En otra modalidad, el gen es *ilvN*. En otra modalidad, el gen es *alsS*. En otra modalidad, el gen es *fabF*. En otra modalidad, el gen es *fabH*. En otra modalidad, el gen es de pseudouridina sintasa. En otra modalidad, el gen es *pyrG*. En otra modalidad, el gen es *truA*. En otra modalidad, el gen es *pabB*. En otra modalidad, el gen es un gen de la ATP sintasa (por ejemplo, *atpC*, *atpD-2*, *aptG*, *atpA-2*, etcétera).

50 En otra modalidad, el gen es *phoP*. En otra modalidad, el gen es *aroA* *aroC*. En otra modalidad, el gen es *aroD*. En otra modalidad, el gen es *plcB*.

55 En otra modalidad, la cepa de *Listeria* es deficiente de un transportador de péptidos. En otra modalidad, el gen es una proteína transportadora ABC/de unión al ATP/permeasa. En otra modalidad, el gen es una proteína transportadora ABC de oligopéptidos/de unión a oligopéptidos. En otra modalidad, el gen es una proteína transportadora ABC de oligopéptidos/permeasa. En otra modalidad, el gen es de una proteína transportadora ABC de zinc/de unión al zinc. En otra modalidad, el gen es de un transportador ABC de azúcar. En otra modalidad, el gen es de un transportador de fosfato. En otra modalidad, el gen es de un ZIP transportador de zinc. En otra modalidad, el gen es de un transportador de resistencia a fármacos de la familia *EmrB/QacA*. En otra modalidad, el gen es de un transportador de sulfato. En otra modalidad, el gen es de un transportador de oligopéptidos dependiente de protones. En otra modalidad, el gen es de un transportador de magnesio. En otra modalidad, el gen es de un transportador de formiato/nitrito. En otra modalidad, el gen es de un transportador ABC de espermidina/putrescina. En otra modalidad, el gen es de un cotransportador de Na/Pi. En otra modalidad, el gen es de un transportador de azúcar fosfato. En otra modalidad, el gen es de un transportador ABC de glutamina. En otra modalidad, el gen es de un transportador de la familia de facilitadores principales. En otra modalidad, el gen es de un transportador ABC de

glicina betaína/L-prolina. En otra modalidad, el gen es de un transportador ABC de molibdeno. En otra modalidad, el gen es de un transportador ABC de ácido teicoico. En otra modalidad, el gen es de un transportador ABC de cobalto. En otra modalidad, el gen es de un transportador de amonio. En otra modalidad, el gen es de un transportador ABC de aminoácidos. En otra modalidad, el gen es de un transportador ABC en la división celular. En otra modalidad, el gen es de un transportador ABC de manganeso. En otra modalidad, el gen es de un transportador ABC de compuestos de hierro. En otra modalidad, el gen es de un transportador ABC de maltosa/maltodextrina. En otra modalidad, el gen es de un transportador de resistencia a fármacos de la familia Bcr/CflA.

En otra modalidad, el gen es de una subunidad de una de las proteínas anteriores.

En otra modalidad, una cepa de *Listeria* recombinante de la presente invención se ha sometido a pases a través de un huésped animal. En otra modalidad, los pases maximizan la eficacia de la cepa como un vector vacunal. En otra modalidad, los pases estabilizan la inmunogenicidad de la cepa de *Listeria*. En otra modalidad, los pases estabilizan la virulencia de la cepa de *Listeria*. En otra modalidad, los pases aumentan la virulencia de la cepa de *Listeria*. En otra modalidad, los pases eliminan subcepas inestables de la cepa de *Listeria*. En otra modalidad, los pases reducen la prevalencia de subcepas inestables de la cepa de *Listeria*. En otra modalidad, el proceso de pases atenúa la cepa, o en otra modalidad, hace a la cepa menos virulenta. Los métodos para los pases de una cepa de *Listeria* recombinante a través de un huésped animal se conocen bien en la técnica, y se describen, por ejemplo, en la solicitud de patente de Estados Unidos núm. de serie 10/541,614.

Cada cepa de *Listeria* y el tipo de esta representa una modalidad separada de la presente invención.

En otra modalidad, la *Listeria* recombinante de los métodos y las composiciones de la presente invención se transforma establemente con una construcción que codifica un antígeno o una fusión LLO-antígeno. En una modalidad, la construcción contiene un polienlazador para facilitar otros subclonajes. Se conocen varias técnicas para producir *Listeria* recombinante.

En otra modalidad, la construcción o gen heterólogo se integra en el cromosoma de *Listeria* mediante recombinación homóloga. Las técnicas para la recombinación homóloga se conocen bien en la técnica, y se describen, por ejemplo, en Frankel, FR, Hegde, S, Lieberman, J, y Y Paterson. Induction of a cell-mediated immune response to HIV gag using *Listeria monocytogenes* as a live vaccine vector. *J. Immunol.* 155: 4766 - 4774. 1995; Mata, M, Yao, Z, Zubair, A, Syres, K y Y Paterson, Evaluation of a recombinant *Listeria monocytogenes* expressing an HIV protein that protects mice against viral challenge. *Vaccine* 19:1435-45, 2001; Boyer, JD, Robinson, TM, Maciag, PC, Peng, X, Johnson, RS, Pavlakis, G, Lewis, MG, Shen, A, Siliciano, R, Brown, CR, Weiner, D, y Y Paterson. DNA prime *Listeria* boost induces a cellular immune response to SIV antigens in the Rhesus Macaque model that is capable of limited suppression of SIV239 viral replication. *Virology.* 333: 88-101, 2005. En otra modalidad, la recombinación homóloga se lleva a cabo como se describe en la patente de Estados Unidos núm. 6,855,320. En otra modalidad, un plásmido sensible a la temperatura se usa para seleccionar los recombinantes.

En otra modalidad, la construcción o gen heterólogo se integra en el cromosoma de *Listeria* mediante inserción de transposones. Las técnicas para la inserción de transposones se conocen bien en la técnica, y se describen, entre otros, por Sun y otros (*Infection and Immunity* 1990, 58: 3770-3778) en la construcción de DP-L967. La mutagénesis por transposones tiene la ventaja, en otra modalidad, que puede formarse un mutante estable por inserción genómica. En otra modalidad, se conoce la posición en el genoma donde el gen extraño se ha insertado mediante mutagénesis por transposones.

En otra modalidad, la construcción o gen heterólogo se integra en el cromosoma de *Listeria* mediante el uso de sitios de integración de fagos (Lauer P, Chow MY y otros, Construction, characterization, and use of two LM site-specific phage integration vectors. *J Bacteriol* 2002;184(15): 4177-86). En otra modalidad, se usa un gen de integrasa y un sitio de unión de un bacteriófago (por ejemplo, listeriófago U153 o PSA) para insertar el gen heterólogo en el sitio de unión correspondiente, que puede ser cualquier sitio adecuado en el genoma (por ejemplo, comK o el extremo 3' del gen del ARNt de Arg). En otra modalidad, los profagos endógenos se curan del sitio de unión utilizado antes de la integración del constructo o gen heterólogo. En otra modalidad, este método resulta en integrantes de una sola copia.

En otra modalidad, la cepa de *Listeria* porta la construcción en un plásmido. Los vectores de LM que expresan proteínas de fusión con antígenos se han construido por medio de esta técnica. Lm-GG/E7 se obtuvo mediante complementación de un mutante por delección de *prfA* con un plásmido que contiene una copia del gen de *prfA* y una copia del gen de E7 fusionado a una forma del gen de LLO (*hly*) truncado para eliminar la actividad hemolítica de la enzima, como se describe en la presente. El organismo mantuvo una LLO funcional por medio de la copia cromosómica endógena de *hly*. En otra modalidad, el plásmido contiene un gen para la resistencia a antibióticos. En otra modalidad, el plásmido contiene un gen que codifica un factor de virulencia que está ausente en el genoma de la cepa de *Listeria* transformada. En otra modalidad, el factor de virulencia es *prfA*. En otra modalidad, el factor de virulencia es LLO. En otra modalidad, el factor de virulencia es ActA. En otra modalidad, el factor de virulencia es

cualquiera de los genes enumerados anteriormente como objetivos para la atenuación. En otra modalidad, el factor de virulencia es cualquier otro factor de virulencia conocido en la técnica.

5 En otra modalidad, un péptido recombinante de la presente invención se fusiona a una proteína de *Listeria*, tal como PI-PLC, o una construcción que codifica la misma. En otra modalidad, una secuencia señal de una proteína de *Listeria* secretada tal como hemolisina, ActA, o fosfolipasas se fusiona al gen que codifica al antígeno. En otra modalidad, se usa una secuencia señal del vector vacunal recombinante. En otra modalidad, se usa una secuencia señal funcional en el vector vacunal recombinante.

10 En otra modalidad, la construcción está contenida en la cepa de *Listeria* de una manera episomal. En otra modalidad, el antígeno extraño se expresa a partir de un vector albergado en la cepa de *Listeria* recombinante.

15 En otra modalidad, la presente invención proporciona una composición inmunogénica que comprende una cepa de *Listeria* recombinante de la presente invención para usar en un método para inducir una respuesta inmunitaria anti-HMW-MAA en un sujeto.

20 En otra modalidad, un sujeto es administrado con sus propias células alogénicas, que en una modalidad, provocan una respuesta inmunitaria contra un antígeno. En otra modalidad, las composiciones y los métodos de la presente invención dan como resultado la expresión de citocinas estimuladoras, que en una modalidad, son citocinas de Th1, que en una modalidad, es IFN-gamma. En una modalidad, la expresión de citocinas estimuladoras contribuye al efecto antitumoral de las composiciones y los métodos. En otra modalidad, las composiciones y los métodos de la presente invención dan como resultado la expresión de células T gamma delta.

25 En otra modalidad, la presente invención proporciona composiciones para inducir respuestas antitumorales no específicas. En una modalidad, la inmunización con un antígeno de melanoma, tal como un péptido de HMW-MAA, protege contra un tipo de melanoma que no expresa el antígeno (Ejemplo 4).

30 En otra modalidad, la presente invención proporciona una composición que comprende una cepa de *Listeria* recombinante de la presente invención, para usar en un método para inducir una respuesta inmunitaria contra un tumor que expresa HMW-MAA. Como se proporciona en la presente, las vacunas de la presente invención inducen una respuesta inmunitaria con especificidad antigénica, como se muestra por múltiples líneas de evidencia -por ejemplo inhibición del crecimiento tumoral, tinción de tetrámeros, medición de las cantidades de células T CD8<sup>+</sup> infiltrantes del tumor, FACS, y ensayo de liberación de cromo.

35 En otra modalidad, la presente invención proporciona una composición que comprende una cepa de *Listeria* recombinante de la presente invención, para usar en un método para inducir una respuesta inmunitaria contra un pericito.

40 En otra modalidad, la presente invención proporciona una composición que comprende una cepa de *Listeria* recombinante de la presente invención, para usar en un método para impedir un crecimiento y/o retrasar la progresión de un tumor sólido en un sujeto. En otra modalidad, el sujeto produce una respuesta inmunitaria contra un pericito del tumor sólido. En otra modalidad, el pericito está en una vasculatura del tumor sólido.

45 En otra modalidad, la presente invención proporciona una composición que comprende una cepa de *Listeria* recombinante de la presente invención, para tratar un tumor sólido en un sujeto. En otra modalidad, el sujeto produce una respuesta inmunitaria contra un pericito del tumor sólido. En otra modalidad, el pericito está en una vasculatura del tumor sólido.

50 En otra modalidad, la presente invención proporciona un método para lisar una o más células tumorales en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una composición que comprende una cepa de *Listeria* recombinante de la presente invención, para lisar así una o más células tumorales en un sujeto. En una modalidad, la lisis del tumor se debe a linfocitos T citotóxicos, linfocitos infiltrantes del tumor, o una combinación de estos, que en una modalidad son específicos del tumor.

55 En una modalidad, los métodos de la presente descripción se usan para tratar, impedir, suprimir, inhibir, o prevenir cualquiera de las enfermedades, trastornos, síntomas, o efectos secundarios descritos anteriormente asociados con alergia o asma. En una modalidad, el término "tratar" se refiere tanto a un tratamiento terapéutico como a medidas profilácticas o preventivas, en donde el objetivo es prevenir o disminuir la afección patológica o los síntomas objetivo asociados con la enfermedad, trastorno o afección o una combinación de estos. Por lo tanto, "tratar" se refiere, *entre otros*, a retrasar la progresión, acelerar la remisión, inducir la remisión, aumentar la remisión, acelerar la recuperación, aumentar la eficacia de, o disminuir la resistencia a agentes terapéuticos alternativos, o una combinación de estos. En una modalidad, "prevenir" o "impedir" se refiere, *entre otros*, a retrasar la aparición de síntomas, prevenir la recaída de una enfermedad, disminuir la cantidad o frecuencia de los episodios de recaída, aumentar la latencia entre los episodios sintomáticos, o una combinación de estos. En una modalidad, "suprimir" o "inhibir", se refiere, *entre otros*, a reducir la gravedad de los síntomas, reducir la gravedad de un episodio agudo, reducir la cantidad de síntomas, reducir la incidencia de los síntomas relacionados con la enfermedad, reducir la

latencia de los síntomas, mejorar los síntomas, reducir los síntomas secundarios, reducir las infecciones secundarias, prolongar la supervivencia del paciente, o una combinación de estos.

5 En una modalidad, los síntomas son primarios, mientras que en otra modalidad, los síntomas son secundarios. En una modalidad, "primario" se refiere a un síntoma que es un resultado directo de una enfermedad o trastorno particular, mientras que en una modalidad, "secundario" se refiere a un síntoma que se deriva o es consecuencia de una causa primaria. En una modalidad, los compuestos para usar en la presente invención tratan los síntomas primarios o secundarios o las complicaciones secundarias relacionados con alergia o asma. En otra modalidad, los "síntomas" pueden ser cualquier manifestación de una enfermedad o afección patológica.

10 Como se proporciona en la presente, las cepas de *Listeria* que expresan HMW-MAA inhibieron el crecimiento de tumores que no expresaban HMW-MAA. Estos hallazgos muestran que las respuestas inmunitarias anti-HMW-MAA inhiben y revierten la vascularización de tumores sólidos, y por lo tanto inhiben el crecimiento de estos. Las vacunas anti-HMW-MAA de la presente invención fueron capaces de ejercer estos efectos a pesar de la identidad incompleta (80 %) entre HMW-MAA y su homólogo de ratón, específicamente el proteoglicano sulfato de condroitina de ratón ("AN2"). En esta modalidad, las vacunas anti-HMW-MAA de la presente invención son eficaces para la vacunación contra cualquier tumor sólido, independientemente de su expresión de HMW-MAA.

15 En otra modalidad, la presente invención proporciona una composición que comprende una cepa de *Listeria* recombinante de la presente invención, para usar en un método para impedir una vascularización de un tumor sólido en un sujeto. En otra modalidad, el sujeto produce una respuesta inmunitaria contra un pericito del tumor sólido. En otra modalidad, el pericito está en una vasculatura del tumor sólido

20 El tumor sólido que es el objetivo de las composiciones de la presente invención es, en otra modalidad, un melanoma. En otra modalidad, el tumor es un sarcoma. En otra modalidad, el tumor es un carcinoma. En otra modalidad, el tumor es un mesotelioma (por ejemplo mesotelioma maligno). En otra modalidad, el tumor es un glioma. En otra modalidad, el tumor es un tumor de células germinales. En otra modalidad, el tumor es un coriocarcinoma.

25 En otra modalidad, el tumor es cáncer pancreático. En otra modalidad, el tumor es cáncer de ovario. En otra modalidad, el tumor es cáncer gástrico. En otra modalidad, el tumor es una lesión carcinomatosa del páncreas. En otra modalidad, el tumor es adenocarcinoma pulmonar. En otra modalidad, el tumor es adenocarcinoma colorrectal. En otra modalidad, el tumor es adenocarcinoma escamoso pulmonar. En otra modalidad, el tumor es adenocarcinoma gástrico. En otra modalidad, el tumor es una neoplasia epitelial de la superficie del ovario (por ejemplo, una variedad benigna, proliferativa o maligna de esta). En otra modalidad, el tumor es un carcinoma de células escamosas orales. En otra modalidad, el tumor es carcinoma pulmonar no microcítico. En otra modalidad, el tumor es un carcinoma endometrial. En otra modalidad, el tumor es un cáncer de vejiga. En otra modalidad, el tumor es un cáncer de cabeza y cuello. En otra modalidad, el tumor es un carcinoma de próstata.

30 En otra modalidad, el tumor es un cáncer pulmonar no microcítico (NSCLC). En otra modalidad, el tumor es un tumor de Wilms. En otra modalidad, el tumor es un tumor desmoplástico de células redondas pequeñas. En otra modalidad, el tumor es un cáncer de colon. En otra modalidad, el tumor es un cáncer de pulmón. En otra modalidad, el tumor es un cáncer de ovario. En otra modalidad, el tumor es un cáncer uterino. En otra modalidad, el tumor es un cáncer de tiroides. En otra modalidad, el tumor es un carcinoma hepatocelular. En otra modalidad, el tumor es un cáncer de tiroides. En otra modalidad, el tumor es un cáncer de hígado. En otra modalidad, el tumor es un cáncer renal. En otra modalidad, el tumor es un tumor de Kaposi. En otra modalidad, el tumor es un sarcoma. En otra modalidad, el tumor es otro carcinoma o sarcoma.

35 En una modalidad, esta invención proporciona composiciones para prevenir el cáncer en poblaciones que están predispuestas al cáncer o en poblaciones que tienen alto riesgo de cáncer, que en una modalidad, puede ser una población de mujeres con mutaciones de brca1 o 2, dicha población en una modalidad es susceptible a cáncer de mama.

40 En otra modalidad, la presente invención proporciona una composición que comprende una cepa de *Listeria* recombinante de la presente invención para usar en un método para inducir una respuesta inmunitaria contra un tumor que expresa HMW-MAA. Como se proporciona en la presente, las cepas de *Listeria* que expresan HMW-MAA indujeron respuestas inmunitarias anti-HMW-MAA e inhibieron el crecimiento de tumores que expresan HMW-MAA.

45 El tumor que expresa HMW-MAA que es el objetivo de las composiciones de la presente invención es, en otra modalidad, un carcinoma de células basales. En otra modalidad, el tumor que expresa HMW-MAA es un tumor derivado de la cresta neural. En otra modalidad, el tumor que expresa HMW-MAA es un astrocitoma. En otra modalidad, el tumor que expresa HMW-MAA es un glioma. En otra modalidad, el tumor que expresa HMW-MAA es un neuroblastoma. En otra modalidad, el tumor que expresa HMW-MAA es un sarcoma. En otra modalidad, el tumor que expresa HMW-MAA es una leucemia de la infancia. En otra modalidad, el tumor que expresa HMW-MAA es una

lesión de carcinoma lobular de mama. En otra modalidad, el tumor que expresa HMW-MAA es un melanoma. En otra modalidad, el tumor que expresa HMW-MAA es cualquier otro tumor que exprese HMW-MAA.

En otra modalidad, la presente invención proporciona una composición que comprende una cepa de *Listeria* recombinante de la presente invención para un método para inducir una respuesta inmunitaria contra un pericito. Como se proporciona en la presente, las cepas de *Listeria* que expresan HMW-MAA inhibieron el crecimiento de tumores sólidos, incluso aquellos que no expresaban HMW-MAA. Estos hallazgos demuestran la inhibición de la vascularización por medio de la inducción de respuestas inmunitarias contra pericitos asociados a la vasculatura del tumor.

En otra modalidad, la presente invención proporciona una cepa de *Listeria* recombinante de la presente invención para usar en un método para impedir un crecimiento y/o retrasar la progresión de un tumor que expresa HMW-MAA en un sujeto. En otra modalidad, el sujeto produce una respuesta inmunitaria contra el tumor que expresa HMW-MAA.

En otra modalidad, la presente invención proporciona una composición que comprende una cepa de *Listeria* recombinante de la presente invención para usar en un método para el tratamiento de un tumor que expresa HMW-MAA en un sujeto. En otra modalidad, el sujeto produce una respuesta inmunitaria contra el tumor que expresa HMW-MAA.

La cepa de *Listeria* recombinante de la presente invención utilizada en los métodos de la presente invención comprende, en otra modalidad, un polipéptido recombinante de la presente invención. En otra modalidad, la cepa de *Listeria* recombinante comprende una molécula nucleotídica recombinante de la presente invención. En otra modalidad, la cepa de *Listeria* recombinante es cualquier cepa de *Listeria* recombinante descrita o mencionada anteriormente.

En otra modalidad, la presente invención proporciona una composición que comprende un polipéptido recombinante de la presente invención para usar en un método para inducir una respuesta inmunitaria anti-HMW-MAA en un sujeto.

En otra modalidad, la presente invención proporciona una composición que comprende un polipéptido recombinante de la presente invención para usar en un método para inducir una respuesta inmunitaria contra un tumor que expresa HMW-MAA.

En otra modalidad, la presente invención proporciona una composición que comprende un polipéptido recombinante de la presente invención para usar en un método para inducir una respuesta inmunitaria contra un pericito.

En otra modalidad, la presente invención proporciona una composición que comprende un polipéptido recombinante de la presente invención para usar en un método para impedir un crecimiento y/o retrasar la progresión de un tumor sólido en un sujeto. En otra modalidad, el sujeto produce una respuesta inmunitaria contra un pericito del tumor sólido. En otra modalidad, el pericito está en una vasculatura del tumor sólido.

En otra modalidad, la presente invención proporciona una composición que comprende un polipéptido recombinante de la presente invención para usar en un método para el tratamiento de un tumor sólido en un sujeto. En otra modalidad, el sujeto produce una respuesta inmunitaria contra un pericito del tumor sólido. En otra modalidad, el pericito está en una vasculatura del tumor sólido.

En otra modalidad, la presente invención proporciona una composición que comprende un polipéptido recombinante de la presente invención para usar en un método para impedir una vascularización de un tumor sólido en un sujeto. En otra modalidad, el sujeto produce una respuesta inmunitaria contra un pericito del sólido.

En otra modalidad, la presente invención proporciona un polipéptido recombinante de la presente invención para usar en un método para impedir un crecimiento y/o retrasar la progresión de un tumor que expresa HMW-MAA en un sujeto. En otra modalidad, el sujeto produce una respuesta inmunitaria contra el tumor que expresa HMW-MAA.

En otra modalidad, la presente invención proporciona una composición que comprende un polipéptido recombinante de la presente invención para usar en un método para el tratamiento de un tumor que expresa HMW-MAA en un sujeto. En otra modalidad, el sujeto produce una respuesta inmunitaria contra el tumor que expresa HMW-MAA.

En otra modalidad se administra una vacuna que comprende una cepa de *Listeria* recombinante de la presente invención. En otra modalidad, se administra una composición inmunogénica que comprende una cepa de *Listeria* recombinante de la presente invención. En otra modalidad, se administra una vacuna que comprende un polipéptido recombinante de la presente invención. En otra modalidad, se administra una composición inmunogénica que comprende un polipéptido recombinante de la presente invención.

En otra modalidad, el pericito objetivo de las composiciones de la presente invención es un pericito activado. En otra modalidad, el pericito objetivo es cualquier otro tipo de pericito conocido en la técnica.

5 En otra modalidad, una composición inmunogénica de la presente invención induce una respuesta inmunitaria mediada por células. En otra modalidad, una composición inmunogénica induce una respuesta inmunitaria mediada por células predominantemente. En otra modalidad, la composición inmunogénica induce una respuesta inmunitaria de tipo Th1 predominantemente.

10 En otra modalidad, la respuesta inmunitaria inducida por los métodos de la presente invención es una respuesta inmunitaria mediada por células. En otra modalidad, la respuesta inmunitaria es una respuesta inmunitaria mediada por células T.

15 La respuesta inmunitaria mediada por células T inducida por las composiciones de la presente invención comprende, en otra modalidad, un CTL. En otra modalidad, la célula T implicada en la respuesta inmunitaria mediada por células T es un CTL.

En otra modalidad, la respuesta inmunitaria mediada por células T comprende una célula cooperadora T. En otra modalidad, la célula T implicada en la respuesta inmunitaria mediada por células T es una célula cooperadora T.

20 En otra modalidad el sujeto se inmuniza con una composición inmunogénica, vector, o péptido recombinante de la presente invención. En otra modalidad, el sujeto se pone en contacto con la composición inmunogénica, vector, o péptido recombinante.

25 En otra modalidad, la presente descripción describe un método para inhibir la adhesión de una célula cancerosa a la matriz extracelular, que comprende inducir una respuesta inmunitaria anti-HMW-MAA mediante un método descrito en la presente que inhibe así la adhesión de una célula cancerosa a la matriz extracelular. En otra modalidad, la célula cancerosa es una célula de melanoma.

30 En otra modalidad, la presente descripción describe un método para inhibir la metástasis de un tumor, que comprende inducir una respuesta inmunitaria anti-HMW-MAA mediante un método descrito en la presente, que inhibe así la metástasis de un tumor. En otra modalidad, el tumor es un tumor de melanoma.

35 En otra modalidad, la presente descripción describe un método para inhibir la migración de una célula cancerosa, que comprende inducir una respuesta inmunitaria anti-HMW-MAA mediante un método descrito en la presente, para inhibir así la migración de una célula cancerosa. En otra modalidad, la célula cancerosa es una célula de melanoma.

40 En otra modalidad, la presente descripción describe un método para inhibir la proliferación de células en un tumor, que comprende inducir una respuesta inmunitaria anti-HMW-MAA mediante un método descrito en la presente, para inhibir así la proliferación de células en un tumor. En otra modalidad, el tumor es un tumor de melanoma.

45 En otra modalidad, la presente descripción describe un método para reducir la invasividad de un tumor, que comprende inducir una respuesta inmunitaria anti-HMW-MAA mediante un método descrito en la presente, para reducir así la invasividad de un tumor. En otra modalidad, el tumor es un tumor de melanoma. En otra modalidad, las respuestas inmunitarias anti-HMW-MAA inhiben la formación de complejos HMW-MAA-MT3-MMP (metaloproteinasas del tipo de membrana). En otra modalidad, la inhibición de la formación de estos complejos inhibe la degradación de colágeno tipo I por las células de melanoma.

50 En otra modalidad, la presente descripción describe un método para inhibir la conversión de plasminógeno en plasmina en la vecindad de un tumor, que comprende inducir una respuesta inmunitaria anti-HMW-MAA mediante un método descrito en la presente, para inhibir así la conversión de plasminógeno en plasmina en la vecindad de un tumor. En otra modalidad, el tumor es un tumor de melanoma. En otra modalidad, la inhibición de la liberación de plasmina inhibe, a su vez, la degradación de la matriz extracelular (ECM).

55 En otra modalidad, la presente descripción describe un método para inhibir el secuestro de angiostatina en la vecindad de un tumor, que comprende inducir una respuesta inmunitaria anti-HMW-MAA mediante un método descrito en la presente para inhibir así el secuestro de angiostatina en la vecindad de un tumor. En otra modalidad, el tumor es un tumor de melanoma.

60 En otra modalidad, un péptido de la presente invención es homólogo a un péptido mencionado en la presente. Los términos "homología", "homólogo", etcétera, cuando hacen referencia a cualquier proteína o péptido, se refieren, en una modalidad, a un porcentaje de residuos de aminoácidos en la secuencia candidata que son idénticos a los residuos de un polipéptido nativo correspondiente, después de alinear las secuencias e introducir huecos, en caso de ser necesario, para lograr el porcentaje máximo de homología, y sin considerar cualquier sustitución conservativa como parte de la identidad de secuencia. Los métodos y programas informáticos para la alineación se conocen bien en la técnica.

65

La homología, en otra modalidad, se determina por un algoritmo informático para el alineamiento de secuencias, por métodos bien descritos en la técnica. Por ejemplo, el análisis de la homología de secuencias de ácidos nucleicos mediante algoritmos informáticos puede incluir la utilización de cualquier cantidad de paquetes de programas informáticos disponibles, tales como, por ejemplo, los paquetes BLAST, DOMAIN, BEAUTY (utilidad de alineación mejorada de BLAST), GENPEPT y TREMBL.

En otra modalidad, "homología" u "homólogo" se refiere a una identidad con una secuencia que no es de HMW-MAA seleccionada de las sec. con núm. de ident.: 1-14 mayor que 70 %. En otra modalidad, "homología" se refiere a una identidad con una secuencia seleccionada de las secs. con núms. de ident.: 1-14 mayor que 72 %. En otra modalidad, "homología" se refiere a una identidad con una de las secs. con núms. de ident.: 1-14 mayor que 75 %. En otra modalidad, "homología" se refiere a una identidad con una secuencia seleccionada de las secs. con núms. de ident.: 1-14 mayor que 78 %. En otra modalidad, "homología" se refiere a una identidad con una de las secs. con núms. de ident.: 1-14 mayor que 80 %. En otra modalidad, "homología" se refiere a una identidad con una de las secs. con núms. de ident.: 1-14 mayor que 82 %. En otra modalidad, "homología" se refiere a una identidad con una secuencia seleccionada de las secs. con núms. de ident.: 1-14 mayor que 83 %. En otra modalidad, "homología" se refiere a una identidad con una de las secs. con núms. de ident.: 1-14 mayor que 85 %. En otra modalidad, "homología" se refiere a una identidad con una de las secs. con núms. de ident.: 1-14 mayor que 87 %. En otra modalidad, "homología" se refiere a una identidad con una secuencia seleccionada de las secs. con núms. de ident.: 1-14 mayor que 88 %. En otra modalidad, "homología" se refiere a una identidad con una de las secs. con núms. de ident.: 1-14 mayor que 90 %. En otra modalidad, "homología" se refiere a una identidad con una de las secs. con núms. de ident.: 1-14 mayor que 92 %. En otra modalidad, "homología" se refiere a una identidad con una secuencia seleccionada de las secs. con núms. de ident.: 1-14 mayor que 93 %. En otra modalidad, "homología" se refiere a una identidad con una de las secs. con núms. de ident.: 1-14 mayor que 95 %. En otra modalidad, "homología" se refiere a una identidad con una secuencia seleccionada de las secs. con núms. de ident.: 1-14 mayor que 96 %. En otra modalidad, "homología" se refiere a una identidad con una de las secs. con núms. de ident.: 1-14 mayor que 97 %. En otra modalidad, "homología" se refiere a una identidad con una de las secs. con núms. de ident.: 1-14 mayor que 98 %. En otra modalidad, "homología" se refiere a una identidad con una de las secs. con núms. de ident.: 1-14 mayor que 99 %. En otra modalidad, "homología" se refiere a una identidad con una de las secs. con núms. de ident.: 1-14 de 100 %.

En otra modalidad, "homología" u "homólogo" se refiere a una identidad con una secuencia de HMW-MAA seleccionada de las secs. con núms. de ident.: 15-16 mayor que 70 %. En otra modalidad, "homología" se refiere a una identidad con una secuencia seleccionada de las secs. con núms. de ident.: 15-16 mayor que 72 %. En otra modalidad, "homología" se refiere a una identidad con una de las secs. con núms. de ident.: 15-16 mayor que 75 %. En otra modalidad, "homología" se refiere a una identidad con una secuencia seleccionada de las secs. con núms. de ident.: 15-16 mayor que 78 %. En otra modalidad, "homología" se refiere a una identidad con una de las secs. con núms. de ident.: 15-16 mayor que 80 %. En otra modalidad, "homología" se refiere a una identidad con una de las secs. con núms. de ident.: 15-16 mayor que 82 %. En otra modalidad, "homología" se refiere a una identidad con una secuencia seleccionada de las secs. con núms. de ident.: 15-16 mayor que 83 %. En otra modalidad, "homología" se refiere a una identidad con una de las secs. con núms. de ident.: 15-16 mayor que 85 %. En otra modalidad, "homología" se refiere a una identidad con una de las secs. con núms. de ident.: 15-16 mayor que 87 %. En otra modalidad, "homología" se refiere a una identidad con una secuencia seleccionada de las secs. con núms. de ident.: 15-16 mayor que 88 %. En otra modalidad, "homología" se refiere a una identidad con una de las secs. con núms. de ident.: 15-16 mayor que 90 %. En otra modalidad, "homología" se refiere a una identidad con una de las secs. con núms. de ident.: 15-16 mayor que 92 %. En otra modalidad, "homología" se refiere a una identidad con una secuencia seleccionada de las secs. con núms. de ident.: 15-16 mayor que 93 %. En otra modalidad, "homología" se refiere a una identidad con una de las secs. con núms. de ident.: 15-16 mayor que 95 %. En otra modalidad, "homología" se refiere a una identidad con una secuencia seleccionada de las secs. con núms. de ident.: 15-16 mayor que 96 %. En otra modalidad, "homología" se refiere a una identidad con una de las secs. con núms. de ident.: 15-16 mayor que 97 %. En otra modalidad, "homología" se refiere a una identidad con una de las secs. con núms. de ident.: 15-16 mayor que 98 %. En otra modalidad, "homología" se refiere a una identidad con una de las secs. con núms. de ident.: 15-16 mayor que 99 %. En otra modalidad, "homología" se refiere a una identidad con una de las secs. con núms. de ident.: 15-16 de 100 %.

En otra modalidad, la homología se determina por medio de la determinación de la hibridación de las secuencias candidatas, cuyos métodos se describen bien en la técnica (Ver, por ejemplo, "Nucleic Acid Hybridization" Hames, B. D., e Higgins S. J., Eds. (1985); Sambrook et al., 2001, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, N.Y.; y Ausubel y otros, 1989, Current Protocols in Molecular Biology, Green Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y). En otras modalidades, los métodos de hibridación se llevan a cabo en condiciones de moderadas a rigurosas, con el complemento de un ADN que codifica un péptido nativo de caspasa. Las condiciones de hibridación son, por ejemplo, incubación durante la noche a 42 °C en una solución que comprende: formamida al 10-20 %, SSC 5 X (NaCl 150 mM, citrato trisódico 15 mM), fosfato sódico 50 mM (pH 7,6), solución de Denhardt 5 X, sulfato de dextrano al 10 %, y ADN de esperma de salmón desnaturalizado, fragmentado a 20 µg/ml.

La homología de proteínas y/o péptidos para cualquier secuencia de AA mencionada en la presente descripción se determina, en otra modalidad, por métodos bien descritos en la técnica, que incluyen análisis de

5 inmunotransferencia, o por medio de análisis basados en algoritmos informáticos de las secuencias de AA, mediante la utilización de cualquiera de una serie de paquetes de programas informáticos disponibles, a través de métodos establecidos. Algunos de estos paquetes incluyen los paquetes FASTA, BLAST, MPsrch o Scanps, y, en otra modalidad, emplean el uso de los algoritmos de Smith y Waterman, y/o alineaciones globales/locales o de bloques para el análisis.

10 En otra modalidad de la presente invención, los términos "ácidos nucleicos" o "nucleótido" se refieren a una cadena de al menos dos combinaciones de base-azúcar-fosfato. El término incluye, en una modalidad, ADN y ARN. El término "nucleótidos" se refiere, en una modalidad, a las unidades monoméricas de polímeros de ácidos nucleicos.

15 En una modalidad, el ARN está en la forma de un ARNt (ARN de transferencia), ARNnp (ARN nuclear pequeño), ARNr (ARN ribosomal), ARNm (ARN mensajero), ARN antisentido, ARN inhibidor pequeño (ARNip), micro ARN (miARN) y ribozimas. Se ha descrito el uso de ARNip y miARN (Caudy AA y otros, Genes & Devel 16: 2491-96 y las referencias citadas allí). El ADN puede estar, en otras modalidades, en forma de ADN plasmídico, ADN viral, ADN lineal, o ADN cromosómico o derivados de estos grupos. Adicionalmente, estas formas de ADN y ARN pueden tener cadenas simples, dobles, triples, o cuádruples. El término incluye, además, en otra modalidad, ácidos nucleicos artificiales que contienen otros tipos de cadenas principales, pero las mismas bases. En una modalidad, el ácido nucleico artificial es un PNA (ácido nucleico peptídico). Los PNA contienen cadenas principales peptídicas y bases de nucleótidos y son capaces de unirse, en una modalidad, tanto a moléculas de ADN como de ARN. En otra modalidad, el nucleótido se modifica con un grupo oxetano. En otra modalidad, el nucleótido se modifica por sustitución de uno o más enlaces fosfodiéster con un enlace fosforotioato. En otra modalidad, el ácido nucleico artificial contiene cualquier otra variante de la cadena principal de fosfato de los ácidos nucleicos nativos conocidos en la técnica. El uso de ácidos nucleicos con fosfotioato y PNA se conoce por los expertos en la técnica, y se describen en, por ejemplo, Neilsen PE, Curr Opin Struct Biol 9:353-57; y Raz NK y otros, Biochem Biophys Res Commun. 297:1075-84. La producción y el uso de ácidos nucleicos se conocen por los expertos en la técnica y se describen, por ejemplo, en Molecular Cloning, (2001), Sambrook y Russell, eds. y Methods in Enzymology: Methods for molecular cloning in eukaryotic cells (2003) Purchio y G. C. Fareed.

#### Composiciones farmacéuticas y métodos de administración

30 Una "composición farmacéutica" se refiere, en otra modalidad, a una cantidad con eficacia terapéutica del ingrediente activo, es decir el péptido recombinante o el vector que comprende o que codifica el mismo, junto con un portador o diluyente farmacéuticamente aceptables. Una "cantidad con eficacia terapéutica" se refiere, en otra modalidad, a esa cantidad que proporciona un efecto terapéutico para una afección determinada y al régimen de administración.

35 Las composiciones farmacéuticas que contienen el ingrediente activo, en otra modalidad, pueden administrarse a un sujeto mediante cualquier método conocido por un experto en la técnica, tal como por vía parenteral, transmucosal, transdérmica, intramuscular, intravenosa, intradérmica, subcutánea, intraperitoneal, intraventricular, intracraneal, intravaginal o intratumoral.

40 En otra modalidad de los métodos y las composiciones de la presente invención, las composiciones farmacéuticas se administran por vía oral, y por lo tanto se formulan en una forma adecuada para la administración oral, es decir como una preparación sólida o líquida. Las formulaciones orales sólidas adecuadas incluyen tabletas, cápsulas, píldoras, gránulos, comprimidos y similares. Las formulaciones orales líquidas adecuadas incluyen soluciones, suspensiones, dispersiones, emulsiones, aceites y similares. En otra modalidad de la presente invención, el ingrediente activo se formula en una cápsula. De acuerdo con esta modalidad, las composiciones de la presente invención comprenden, en adición al compuesto activo y el portador o diluyente inertes, una cápsula de gelatina dura.

45 En otra modalidad, las composiciones farmacéuticas se administran por inyección intravenosa, intraarterial, o intramuscular de una preparación líquida. Las formulaciones líquidas adecuadas incluyen soluciones, suspensiones, dispersiones, emulsiones, aceites y similares. En otra modalidad, las composiciones farmacéuticas se administran por vía intravenosa y por lo tanto se formulan en una forma adecuada para la administración intravenosa. En otra modalidad, las composiciones farmacéuticas se administran por vía intraarterial y por lo tanto se formulan en una forma adecuada para la administración intraarterial. En otra modalidad, las composiciones farmacéuticas se administran por vía intramuscular y por lo tanto se formulan en una forma adecuada para la administración intramuscular.

50 En otra modalidad, las composiciones farmacéuticas se administran por vía tópica a las superficies corporales y por lo tanto se formulan en una forma adecuada para la administración tópica. Las formulaciones tópicas adecuadas incluyen geles, ungüentos, cremas, lociones, gotas y similares. Para la administración tópica, el péptido recombinante o vector se prepara y aplica como una solución, suspensión, o emulsión en un diluyente fisiológicamente aceptable con o sin un portador farmacéutico.

65 En otra modalidad, el ingrediente activo se suministra en una vesícula, por ejemplo un liposoma.

En otras modalidades, los portadores o diluyentes usados en los métodos de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, una goma, un almidón (por ejemplo, almidón de maíz, almidón pregelatinizado), un azúcar (por ejemplo, lactosa, manitol, sacarosa, dextrosa), un material celulósico (por ejemplo, celulosa microcristalina), un acrilato (por ejemplo, polimetilacrilato), carbonato de calcio, óxido de magnesio, talco, o mezclas de estos.

En otra modalidad, los portadores farmacéuticamente aceptables para las formulaciones líquidas son soluciones acuosas o no acuosas, suspensiones, emulsiones o aceites. Ejemplos de disolventes no acuosos son propilenglicol, polietilenglicol, y ésteres orgánicos inyectables tales como oleato de etilo. Los vehículos acuosos incluyen agua, soluciones alcohólicas/acuosas, emulsiones o suspensiones, que incluyen solución salina y medios tamponados. Los ejemplos de aceites son los de origen animal, vegetal, o sintético, por ejemplo, aceite de cacahuete, aceite de soya, aceite de oliva, aceite de girasol, aceite de hígado de pescado, otro aceite marino, o un lípido de la leche o de huevos.

En otra modalidad, los vehículos parenterales (para la inyección subcutánea, intravenosa, intraarterial, o intramuscular) incluyen solución de cloruro de sodio, dextrosa de Ringer, dextrosa y cloruro de sodio, solución láctica de Ringer y aceites fijos. Los vehículos para administración intravenosa incluyen reabastecedores de fluido y nutrientes, reabastecedores de electrolitos tales como los basados en dextrosa de Ringer, y similares. Los ejemplos son líquidos estériles tales como agua y aceites, con o sin la adición de un tensoactivo y otros adyuvantes farmacéuticamente aceptables. En general, agua, solución salina, dextrosa acuosa y soluciones de azúcar relacionadas, y glicoles tales como propilenglicoles o polietilenglicol son portadores líquidos preferidos, particularmente para soluciones inyectables. Los ejemplos de aceites son los de origen animal, vegetal, o sintético, por ejemplo, aceite de cacahuete, aceite de soya, aceite de oliva, aceite de girasol, aceite de hígado de pescado, otro aceite marino, o un lípido de la leche o de huevos.

En otra modalidad, las composiciones farmacéuticas proporcionadas en la presente son composiciones de liberación controlada, es decir composiciones en las cuales el ingrediente activo se libera durante un periodo de tiempo después de la administración. Las composiciones de liberación controlada o sostenida incluyen formulación en depósitos lipofílicos (por ejemplo ácidos grasos, ceras, aceites). En otra modalidad, la composición es una composición de liberación inmediata, es decir una composición en la que todo el ingrediente activo se libera inmediatamente después de la administración.

#### Sección de detalles experimentales

Ejemplo 1: Construcción de constructos de LLO-HMW-MAA y cepas de *Listeria* que expresan los mismos

Las construcciones de LLO-HMW-MAA se crearon de la siguiente manera: pGG-55, el precursor de las construcciones de LLO-HMW-MAA, se creó a partir de pAM401, un vector lanzadera capaz de replicarse en bacterias Gram-negativas y Gram-positivas (Wirth R y otros, *J Bacteriol*, 165: 831, 1986). pAM401 contiene un gen de resistencia al cloramfenicol para las Gram-positivas y un determinante de resistencia a la tetraciclina para Gram-negativas. En pGG-55, el promotor de *hly* conduce la expresión de los primeros 441 AA del producto génico *hly*, (que carece del extremo C terminal hemolítico, que tiene la secuencia que se expone en la sec. con núm. de ident.: 3), que se une por el sitio de *Xho* al gen de E7, lo que produce un gen de la fusión *hly*-E7 que se transcribe y secreta como LLO-E7.

Generación de pGG-55: Una fusión de un fragmento de listeriolisina con E7 ("LLO-E7") y el factor de transcripción pluripotencial *prfA* se clonaron en pAM401 de la siguiente manera: El fragmento de ADN que codifica los primeros 420 AA de LLO y su promotor y las secuencias reguladoras hacia el extremo 5' se amplificó por PCR con ADN genómico de LM usado como molde y se ligó a pUC19. Los cebadores de PCR usados fueron 5'-GGCCCGGGCCCCCTCCTTTGAT-3' (sec. con núm. de ident.: 17) y 5'-GGTCTAGATCATAATTTACTTCATCC-3' (sec. con núm. de ident.: 18). E7 se amplificó por PCR mediante el uso de los cebadores 5'-GGCTCGAGCATGGAGATACACC-3' (sec. con núm. de ident.: 19; el sitio de *Xho* está subrayado) y 5'-GGGGACTAGTTTATGGTTTCTGAGAACA-3' (sec. con núm. de ident.: 20; el sitio de *SpeI* está subrayado) y se ligó en pCR2.1 (Invitrogen, San Diego, CA). E7 se escindió de pCR2.1 mediante digestión con *Xho*/*SpeI* y posteriormente se ligó como una fusión de traducción en marco a pUC19-*hly* hacia el extremo 3' del fragmento del gen de hemolisina. La fusión se subclonó después en el multienlazador de pAM401. El gen de *prfA* se subclonó después en el sitio de *Sall* del plásmido resultante, produciendo pGG-55 (Figura 1).

pGG34A, B y C se crearon a partir de pGG-55 de la siguiente manera: Los fragmentos de HMW-MAA A, B, y C (que codifican los AA 360-554, 701-1130, y 2160-2258, respectivamente, Figura 1) tienen las siguientes secuencias:

HMW-MAA-A:

Ttcaatggccagaggcggggctgcgggaagctttgctgacgcgaacatggcagccggctgcaggctggaggaggaggatgatgag  
 gacgatgcctatggacattatgaagctttctccacctggccccctgaggtctggccagccatggagctgcctgagccatgcgctgagccaggct  
 gctctctgtctttgcaaatccaccagctgctgactatcagcccaactgggtggtggccgaggggggcacagcctggctgagtgaggcatgfcagcc  
 cacgctggacctgatggagctgagctgcgcaateccaggtgctgtcagcgtgacctgaggggcacgccatggcgagctcgagctggacatcc  
 cgggagcccaggcacgaaaaatgtccacctctggacgtggtgaaccgaaggcccgttcaaccagatggctctgaggacacctccgaccagct  
 ggtgctggagggtgacggctcgggtgcccctgcccctcatgctctcggaggggccaaacatacctctgcccctccaggfcaacctgtcaatg  
 acccaccacac (sec. con núm. de ident.: 21).

5 HMW-MAA-B:

Gtccgcgctactggggccctgcagtttggggagctcagaaaacacggggcaggtggggctggaggctgagtggtggccacacagg  
 cgtccaccagcgggatggagcagggccgctgaggtacctgagcactgaccacagcaccacgcttacgacaccgtggagaacctggccctg  
 gagggtcaggtggccaggagatcctgagcaatctgctctccagtgacctccagagagccactgtgtggatgctcggctggagccactgcaca  
 ctcagaacaccagcaggagacctcaccacagcccactggagggccacctggaggaggcagggcccaagcccccaacctccattatgaggtg  
 gttcaggctcccaggaaaggcaacctcaactacagggcacaaggctgcagatggccagggtcaccagggatgacatacaggctggccgggtg  
 acctatggggccacagcagctgctccagaggcagtcgaggacacctccggttccgtgacagctccacctatctccccactctataccttccccat  
 ccacattggtggtagccagatgcgctgctcaccatgtcctcctcgtggtgctgaggggtggtaggggtgctctctgctgaccacctttgtca  
 agagtctcaacagtgccagctacctatgaggtcatggagcggccccgcccagggagggtgctgctggggacacaggacaagaccactatggt  
 gacatccttccaatgaaacctgttgcgtggccgctggtctaccagcctgactccgagaccacagaagatgataccattgtgtctaccggc  
 cagggcgagagcagtggtgacatggcctgggaggaggtacgggggtcttccgagtgccatccagcccgtgaatgaccacggccctgtgcagac  
 catcagccggatcttccatggtggccgggggtggcggcggctgctgactacagacgacgtggcctcagcgatgctgactcgggcttctgctgacgcc  
 cagctggtgcttaccgcaaggacctcctcttggcagatcgtggccgtagatgagcccacggcccctaccgcttaccacaggaggacctcag  
 gaagaggcgagtactgtctgctcactcaggggctgacctggctggatccagctgcaggtgtccgacgggcaacaccaggccactgcgctgctgga  
 ggtgcaggcctcggaaacctacctcctggtggcc (sec. con núm. de ident.: 22).

10 HMW-MAA-C:

Gccactgagccttacaatgctgcccggccctacagcgtggccctgctcaggttccccgagggcccccggacggaaagcagggaaagccag  
 agagcagcacccccacagggcagccaggccccatggcctcagccctgagcccgtgtggccaagggaggcttctgagcttcttggccaac  
 atgttcagcgtcatcctccatgctgctgacttctgctcctggcgtcactcctgcccctgctcttctacccgaaaacgcaacaagacgggcaagca  
 tgactccag (sec. con núm. de ident.: 23).

- 15 Los fragmentos se amplificaron mediante el uso de los siguientes cebadores. Los sitios de XhoI en los cebadores directos y los sitios de XmaI (A y C) o sitio de SpeI (B) en los cebadores inversos están subrayados:  
Fragmento A: - cebador directo TCCTCGAGGTCAATGGCCAGAGGCGGGG (sec. con núm. de ident.: 24).  
 Inverso: CCCGGTTACTACTTATCGTCGTCATCCTTGTAAATCGTGGGGTGGGTCATTGAC (sec. con núm. de ident.: 25).  
Fragmento B: directo: GCCTCGAGTCCGCGTCACTGGGGCCCTG (sec. con núm. de ident.: 26).  
 20 Inverso: ACTAGTTTACTACTTATCGTCGTCATCCTTGTAAATCGGCCACACGGAGGTAGGGTTC (sec. con núm. de ident.: 27).  
Fragmento C: Directo: TGCTCGAGGCCACTGAGCCTTACAATGCTGCC (sec. con núm. de ident.: 28).  
 Inverso: CCCGGTTACTACTTATCGTCGTCATCCTTGTAAATCCTGGACGTCATGCTTGGCCG (sec. con núm. de ident.: 29).

25 Los fragmentos A-C se subclonaron después en pGG-55, mediante el uso del sitio de XhoI al final de la secuencia de hly y el sitio de XmaI o SpeI después del gen.

Una cepa de *Listeria* prfA negativa, XFL-7 (proporcionada por el Dr. Hao Shen, Universidad de Pensilvania), se transformó después con pGG34A, B y C para seleccionar respecto a la retención de los plásmidos in vivo.

Ejemplo 2: Las construcciones de LLO-HMW-MAA se expresan en *Listeria*

5  
 Materiales y métodos experimentales

*Cultivo de bacterias y cosecha*

10 *Listeria monocytogenes* (LM) recombinante que expresa los fragmentos de HMW-MAA A, B y C fusionados a LLO se cultivaron durante la noche en medio BHI suplementado con estreptomicina (250 ug/ml) y cloramfenicol (25 ug/ml). Para la inducción de LLO endógena, las bacterias se cultivaron en presencia de carbón al 0,2 %. Los sobrenadantes del cultivo se limpiaron mediante centrifugación a 14000 rpm durante 5 minutos, y 1,35 mililitros (ml) de sobrenadante se mezcló con 0,15 ml de TCA al 100 % para la precipitación de proteínas. Después de la incubación en hielo durante 1 hora, la solución se centrifugó durante 10 minutos, 14000 rpm. El sedimento se resuspendió en 45 microlitros (mL) de tampón de carga de gel de SDS-PAGE 1x, se añadieron 5 mL de DTT 1 M, y la muestra se calentó a 75 °C durante 5 minutos. Se cargaron 5-10 mL de proteína en cada pocillo y se corrió durante 50 minutos a 200V mediante el uso de tampón MOPS.

15

20 Después de transferir a membranas PVDF, las membranas se incubaron con un anticuerpo policlonal de conejo anti-PEST (1:3000), que reconoce la secuencia PEST en la proteína LLO, o con el anticuerpo monoclonal B3-19, que reconoce la LLO endógena solamente, después se incubó con anticuerpo anti-conejo conjugado con HRP. Las señales se detectaron con el sustrato quimioluminiscente SuperSignal® West Pico (Pierce, Rockford, IL).

25 Resultados

Para determinar si las construcciones de LLO-HMW-MAA pueden expresarse en *Listeria*, el sobrenadante se cosechó a partir de cepas de LM transformadas con los plásmidos A, B y C de LLO-HMW-MAA, y se analizaron para determinar la presencia de las proteínas de fusión. Las tres cepas produjeron proteínas de fusión de los tamaños esperados cuando se analizaron con el anticuerpo anti-PEST (48 Kda para LLO, 75 Kda para HMW-MAA-A, 98 Kda para HMW-MAA-B, y 62 Kda para HMW-MAA-C; Figura 2A). El anticuerpo anti-LLO reveló una banda de 58 Kda para LLO en las tres cepas y los controles (Figura 2B).

30

Por lo tanto, las construcciones de LLO-HMW-MAA se expresan en *Listeria*.

35 Ejemplo 3: Cepas de *Listeria* que expresan construcciones de LLO-HMW-MAA infectan y crecen dentro de las células

Materiales y métodos experimentales

40 *Ensayo de infección de células*

Las células J774 similares a macrófagos murinas se infectaron a una MOI (multiplicidad de infección) de 1. Después de una incubación de 1 hora, se añadió gentamicina para destruir la *Listeria* extracelular, la *Listeria* intracelular se recuperó cada 2 horas mediante lisis de las células J774 con agua y siembra de diluciones en serie del lisado en placas de BHI suplementado con estreptomicina (250 microgramos (mcg)/ml) y cloramfenicol (25 mcg/ml). Las colonias recuperadas se contaron y usaron para determinar la cantidad de *Listeria* dentro de las células J774.

45

Resultados

50 Para determinar las características del crecimiento y la virulencia de las cepas de *Listeria* que expresan las construcciones de LLO-HMW-MAA, se midió la tasa de crecimiento de las cepas de *Listeria* del Ejemplo anterior en medio BHI. Cada una de las cepas creció con cinéticas muy similares a la *Listeria* de tipo silvestre (1043 S) (Figura 3A). A continuación, las células J774 se incubaron con las cepas de *Listeria*, y se midió el crecimiento intracelular. El crecimiento intracelular fue muy similar al tipo silvestre para cada cepa (Figura 3B).

55

Por lo tanto, las cepas de *Listeria* que expresan las construcciones de LLO-HMW-MAA mantienen su capacidad de crecer en medios, de infectar células, y de crecer intracelularmente.

60 Ejemplo 4: Vacunación con Lm que expresa HMW-MAA impide el crecimiento tumoral de B16F0-OVA

Materiales y métodos experimentales

*Mediciones del crecimiento tumoral*

65

Los tumores se midieron en días alternos con calibres que abarcan los diámetros superficiales más corto y más largo. La media de estas dos mediciones se representó como la media del diámetro del tumor en milímetros frente a varios puntos de tiempo. Los ratones se sacrificaron cuando el diámetro del tumor alcanzó 20 mm. Las mediciones de los tumores para cada punto de tiempo se muestran solo para los ratones supervivientes.

5 Resultados

Se inocularon 32 ratones C57BL/6 (n=8 por grupo) con  $5 \times 10^5$  B16F0-Ova. En los días 3, 10 y 17 los ratones se inmunizaron con una de las 3 construcciones, Lm-OVA ( $10^6$  ufc), Lm-LLO-OVA ( $10^8$  ufc; control positivo), y Lm-LLO-HMW-MAA-C ( $10^8$  ufc). A pesar de la falta de expresión de HMW-MAA por las células tumorales, la vacunación con Lm-LLO-HMW-MAA-C impidió el crecimiento tumoral, significativamente, pero en menor medida que Lm-LLO-OVA (Figuras 4A-B). En un experimento adicional, se observaron resultados similares con las 3 cepas de Lm-LLO-HMW-MAA ( $2,5 \times 10^7$  ufc de cada una de A y C;  $1 \times 10^8$  ufc de B; Figura 4C).

15 Un experimento similar se realizó con células RENCA. Se inocularon 40 ratones BALB/c (n=8 por grupo) con  $2 \times 10^5$  células tumorales RENCA. En los días 3, 10, y 17, los ratones se inmunizaron con una de las cuatro construcciones, Lm-HMW-MAA-A, B, o C ( $2,5 \times 10^7$  ufc de cada una de A y C;  $1 \times 10^8$  ufc de B), o GGE7 (Lm-LLO-E7;  $1,0 \times 10^8$  ufc), o se dejaron sin vacunar (virgen). Las tres cepas de Lm-LLO-HMW-MAA impidieron el crecimiento tumoral, y Lm-HMW-MAA-C ejerció el efecto más fuerte (Figuras 4D-4E).

20 Por lo tanto, la vacunación con Lm que expresa HMW-MAA impide el crecimiento de tumores, incluso en la ausencia de expresión de HMW-MAA por las células tumorales.

25 Ejemplo 5: Vacunación con Lm que expresa HMW-MAA impide el crecimiento tumoral de B16F10-HMW-MAA por medio de células CD4+ y CD8+

#### Materiales y métodos experimentales

##### *Modificación genética de las líneas celulares tumorales murinas B16 y B16F10 para expresar HOW MAY*

30 Las células B16F10 se transfectaron con el plásmido pcDNA3.1-HMW-MAA, que contiene el ADNc de HMW-MAA de longitud completa expresado bajo el control del promotor de CMV. Las células transfectadas establemente se seleccionaron por la resistencia al antibiótico G418, y posteriormente se cultivaron clones a partir de células individuales mediante dilución limitante. Los clones seleccionados se analizaron mediante citometría de flujo para la expresión de HMW-MAA mediante el uso del anticuerpo monoclonal específico para HMW-MAA VT80.12. Basado en los resultados de la citometría de flujo, se seleccionó el clon 7 de B16F10-HMW-MAA para experimentos futuros (Figura 5).

##### *Agotamiento de CD4+ y CD8+*

40 Se inocularon 32 ratones C57BL/6 con  $2 \times 10^5$  B16F10-HMW-MAA/CMV7. En los días 3, 10 y 17 los ratones se inmunizaron con Lm-HMW-MAA-C ( $2,5 \times 10^7$  ufc), excepto el grupo virgen control. Para el agotamiento de CD4 y CD8, 500  $\mu$ g de GK1.5 y 2.43 se administraron por vía i.p. en los días 1, 2, 6 y 9, así como el anticuerpo control G1. Para el agotamiento de CD25, se administraron 500  $\mu$ g de CP61 por vía i.p. en los días 0 y 2.

##### *Inmunización de ratones transgénicos para HLA A2/K<sup>b</sup> con Lm-HMW-MAA-B o Lm-HMW-MAA-C*

50 Los ratones transgénicos para HLA A2/K<sup>b</sup> expresan una molécula clase I quimérica compuesta de los dominios  $\alpha 1$  y  $\alpha 2$  del alelo A\*0201 humano y los dominios  $\alpha 3$  de las moléculas clase I de H-2K<sup>b</sup> de ratón. Los ratones transgénicos para hLA-A2/K<sup>b</sup> se inmunizaron una vez con  $1,0 \times 10^8$  ufc de Lm-HMW-MAA-B o  $2,5 \times 10^7$  ufc de Lm-HMW-MAA-C. Nueve días más tarde, los esplenocitos se estimularon *in vitro* con péptido B<sub>1</sub> (ILSNLSFPV; sec. con núm. de ident.: 43; corresponde a HMW-MAA<sub>769-777</sub>), péptido B<sub>2</sub> (LLFGSIVAV; sec. con núm. de ident.: 44; corresponde a HMW-MAA<sub>1063-1071</sub>), o péptido C (LILPLLFYL; sec. con núm. de ident.: 45; corresponde a HMW-MAA<sub>2238-2246</sub>) durante 5 horas en presencia de monensina. Las células se clasificaron como CD8+CD62L<sup>bajo</sup> y se midió la tinción intracelular para IFN- $\gamma$ .

60 En un experimento separado, los ratones se inmunizaron dos veces (día 0 y día 7) con Lm-HMW-MAA-B o Lm-HMW-MAA-C y los esplenocitos se cosecharon en el día 14 para la estimulación *in vitro* con el fragmento B1 o C de Lm-HMW-MAA. Los niveles de IFN- $\gamma$  se midieron mediante el uso de Elispot para IFN- $\gamma$ .

#### Resultados

65 Los ratones C57BL/6 (n=8 por grupo) se inocularon con  $2 \times 10^5$  B16F10-HMW-MAA/CMV7. En los días 3, 10 y 17, los ratones se inmunizaron con una de tres construcciones, Lm-HMW-MAA-A ( $2,5 \times 10^7$  ufc), Lm-HMW-MAA-B ( $1 \times 10^8$  ufc), Lm-HMW-MAA-C ( $2,5 \times 10^7$  ufc). El grupo control se vacunó con Lm-GGE7 ( $1 \times 10^8$  ufc). Las tres construcciones de Lm-HMW-MAA ejercieron efectos antitumorales significativos (Figura 6).

Para determinar el papel de las células CD4+ y CD8+ en el efecto antitumoral de Lm-HMW-MAA, las células CD4+ o CD8+ se agotaron en ratones C57BL/6 que se habían inoculado con B16F10-HMW-MAA/CMV7B y se inmunizaron en los días 3, 10, y 17 con Lm-HMW-MAA-C ( $2,5 \times 10^7$  ufc). El agotamiento de CD4+ o CD8+ anuló la eficacia de la vacuna de LM-HMW-MAA-C (Figura 7).

Las células T CD8+ ( $2 \times 10^6$  células por ratón) se purificaron a partir de los bazos de ratones de cada grupo de tratamiento, se mezclaron con células tumorales B16F10-HMW-MAA ( $2 \times 10^5$  por ratón), y después se inyectaron por vía subcutánea en los ratones (8 por grupo). Los ratones se observaron durante 28 días y se examinaron cada 2 días para determinar el crecimiento tumoral. Las células T CD8+ de los ratones vacunados con Lm-HMW-MAA-C inhibieron el crecimiento de tumores B16F10 HMW-MAA *in vivo* (Figura 8).

Los ratones que se habían inoculado con  $2 \times 10^5$  B16F10-HMW-MAA/CMV7 y vacunado con Lm-HMW-MAA-C como se describió anteriormente y permanecieron libres de tumor después de 7 semanas se volvieron a retar con  $2 \times 10^5$  células B16F10-HMW-MAA 7 semanas después de la primera inyección del tumor. Los ratones vacunados estuvieron protegidos contra un segundo reto con células tumorales B16F10-HMW-MAA/CMV7 (Figura 9).

La inmunización de ratones transgénicos para HLA-A2/K<sup>b</sup> con Lm-HMW-MAA-B y Lm-HMW-MAA-C induce respuestas inmunitarias detectables contra dos epítomos caracterizados de HMW-MAA HLA-A2 en los fragmentos B y C ambos después de una (Figura 10A) o dos inmunizaciones (Figura 10B).

Los ratones C57Bl/6 HLA-A2/K<sup>b</sup> y de tipo silvestre se inmunizaron una vez con Lm-HMW-MAA-B o Lm-HMW-MAA-C, y la secreción de IFN- $\gamma$  por células T estimuladas con un péptido restringido a HLA-A2 a partir del fragmento C se midió con Elispot para IFN- $\gamma$ . La secreción de IFN- $\gamma$  se incrementó en ratones transgénicos para HLA-A2/K<sup>b</sup> inmunizados con Lm-HMW-MAA-C, estimulados con Péptido C en comparación con los ratones transgénicos no estimulados, en comparación con ratones no transgénicos estimulados con Péptido C y en comparación con ratones control y transgénicos no inmunizados (Figuras 11A y 11B).

Por lo tanto, las construcciones de Lm-HMW-MAA inducen respuestas inmunitarias con especificidad antigénica que impiden el crecimiento tumoral. Además, las construcciones de Lm-HMW-MAA muestran actividad antitumoral incluso contra tumores que no expresan HMW-MAA.

Ejemplo 6: La fusión de E7 a LLO o ActA mejora la inmunidad específica para E7 y genera células CD8<sup>+</sup> infiltrantes de tumores específicas para E7

## Materiales y métodos experimentales

### *Construcción de Lm-actA-E7*

Lm-actA-E7 se generó mediante la introducción de un vector plasmídico pDD-1, construido por modificación de pDP-2028, en *Listeria*. pDD-1 comprende un casete de expresión que expresa una copia del promotor de hly de 310 pb y la secuencia señal (ss) de hly, que conduce la expresión y secreción de ActA-E7; 1170 pb del gen de actA que comprende 4 secuencias PEST (sec. con núm. de ident.: 5) (el polipéptido de ActA truncado consiste en los primeros 390 AA de la molécula, sec. con núm. de ident.: 4); el gen de E7 de HPV de 300 pb; el gen de prfA de 1019 pb (controla la expresión de los genes de virulencia); y el gen de CAT (gen de resistencia al cloranfenicol) para la selección de los clones de bacterias transformadas.

pDD-1 se creó a partir de pDP2028 (que codifica  $\Delta$ LLO-NP), que a su vez se creó a partir de pDP1659 de la siguiente manera:

Construcción de pDP1659: El fragmento de ADN que codifica los primeros 420 AA de LLO y su promotor y las secuencias reguladoras hacia el extremo 5' se amplificó por PCR con ADN genómico de LM usado como molde y se ligó a pUC19. Los cebadores de PCR usados fueron 5'-GGCCCGGGCCCCCTCCTTTGAT-3' (sec. con núm. de ident.: 30) y 5'-GGTCTAGATCATAATTTACTTCATCC-3' (sec. con núm. de ident.: 31). El fragmento de ADN que codifica NP se amplificó de manera similar por PCR a partir del plásmido linealizado pAPR501 (obtenido del Dr. Peter Palese, Mt. Sinai Medical School, Nueva York) y posteriormente se ligó como una fusión de traducción en marco a pUC19 hacia el extremo 3' del fragmento del gen de hemolisina. Los cebadores de PCR usados fueron 5'-GGTCTAGAGAATTCCAGCAAAGCAG-3' (sec. con núm. de ident.: 32) y 5'-GGGTCGACAAGGGTATTTTCTTTAAT-3' (sec. con núm. de ident.: 33). La fusión se subclonó después en los sitios de EcoRV y Sall de pAM401. El plásmido pDP2028 se construyó mediante subclonaje del gen de prfA en el sitio de Sall de pDP1659.

pDD-1 se creó a partir de pDP-2028 (Lm-LLO-NP) de la siguiente manera:

El promotor de hly (pHly) y el fragmento génico (441 AA) se amplificaron por PCR a partir de pGG55 mediante el uso del cebador 5'-GGGGTCTAGACCTCCTTTGATTAGTATATTC-3' (el sitio de XbaI está subrayado; sec. con núm. de ident.: 34) y el cebador 5'-ATCTTCGCTATCTGTGCGCGGCGCTGCTTTCAGTTTGTTCGCGC-3' (el sitio de Not I está subrayado). Los primeros 18 nucleótidos son la superposición del gen ActA; sec. con núm. de ident.: 35). El gen de actA se amplificó por PCR a partir del genoma de tipo silvestre de LM 10403s mediante el uso del cebador 5'-

GCGCAACAACTGAAGCAGCGGCCGCGGCGACAGATAGCGAAGAT-3' (el sitio de NotI está subrayado; sec. con núm. de ident.: 36) y el cebador 5'-TGTAGGTGTATCTCCATGCTCGAGAGCTAGGCGATCAATTC-3' (el sitio de XhoI está subrayado; sec. con núm. de ident.: 37). El gen E7 se amplificó por PCR a partir de pGG55 mediante el uso del cebador 5'-GGAATTGATCGCCTAGCTCTCGAGCATGGAGATACACTACA-3' (el sitio de XhoI está subrayado; sec. con núm. de ident.: 38) y el cebador 5'-AAACGGATTTATTAGATCCCGGGTTATGGTTTCTGAGAACA-3' (el sitio de XmaI está subrayado; sec. con núm. de ident.: 39). El gen prfA se amplificó por PCR a partir del genoma de tipo silvestre de LM 10403s mediante el uso del cebador 5'-TGTTCTCAGAAACCATAACCCGGGATCTAAATAAATCCGTTT-3' (el sitio de XmaI está subrayado; sec. con núm. de ident.: 40) y el cebador 5'-GGGGTTCGACCAGCTCTTCTTGGTGAAG-3' (el sitio de Sall está subrayado; sec. con núm. de ident.: 41). La fusión del promotor de hly-gen actA (pHly-actA) se generó por PCR y se amplificó a partir del ADN purificado de pHly y actA mediante el uso del cebador de pHly hacia el extremo 5' (sec. con núm. de ident.: 34) y el cebador de actA hacia el extremo 3' (sec. con núm. de ident.: 37).

El gen E7 fusionado al gen prfA (E7-prfA) se generó por PCR y se amplificó a partir del ADN purificado de E7 y prfA mediante el uso del cebador de E7 hacia el extremo 5' (sec. con núm. de ident.: 38) y el cebador del gen prfA hacia el extremo 3' (sec. con núm. de ident.: 41).

El producto de fusión pHly-actA fusionado con el producto de fusión E7-prfA se generó por PCR y se amplificó a partir de los productos de ADN pHly-actA y E7-prfA fusionados y purificados mediante el uso del cebador de pHly hacia el extremo 5' (sec. con núm. de ident.: 34) y el cebador del gen prfA hacia el extremo 3' (sec. con núm. de ident.: 41) y se ligó a pCRII (Invitrogen, La Jolla, Calif.). Se transformaron células competentes de *E. coli* (TOP10<sup>F</sup>, Invitrogen, La Jolla, Calif.) con pCRII-ActAE7. Después de la lisis y el aislamiento, el plásmido se seleccionó mediante análisis de restricción con el uso de BamHI (tamaños esperados de los fragmentos 770 y 6400 pb) y BstXI (tamaños esperados de los fragmentos 2800 y 3900 pb) y además se seleccionó por PCR mediante el uso del cebador de pHly hacia el extremo 5' y el cebador del gen prfA hacia el extremo 3'.

El inserto de ADN pHly-ActA-E7-PrfA se escindió de pCRII mediante digestión con XbaI/Sall y se ligó a pDP-2028 digerido con Xba I/Sal I. Después de transformar *E. coli* competente TOP 10<sup>F</sup> (Invitrogen, La Jolla, Calif.) con el sistema de expresión pHly-ActA-E7, los clones resistentes al cloramfenicol se tamizaron mediante análisis de PCR con el uso del cebador de pHly hacia el extremo 5' y el cebador del gen de prfA hacia el extremo 3' descritos anteriormente. Un clon que contiene pHly-ActA-E7 se amplificó, y se aisló el ADN midiprep (Promega, Madison, Wis). XFL-7 se transformó con pHly-ActA-E7, y los clones se seleccionaron respecto a la retención del plásmido *in vivo*. Los clones se cultivaron en medio de infusión de corazón y cerebro (Difco, Detroit, Mich) con cloramfenicol 20 mcg (microgramo)/ml (mililitro) a 37 °C. Las bacterias se congelaron en alícuotas a -80 °C.

#### Experimentos *in vivo*

500 µl de MATRIGEL®, que contenía 100 µl de solución salina tamponada con fosfato (PBS) con  $2 \times 10^5$  células tumorales TC-1 más 400 µl de MATRIGEL® (BD Biosciences, Franklin Lakes, N.J.) se implantaron por vía subcutánea en el flanco izquierdo de 12 ratones C57BL/6 (n=3). Los ratones se inmunizaron por vía intraperitoneal en los días 7, 14 y 21, y los bazo y tumores se cosecharon en el día 28. El Matrigel de los tumores se retiró de los ratones y se incubó a 4 °C durante la noche en tubos que contenían 2 ml de medio RP 10 en hielo. Los tumores Los tumores se trituraron con fórceps, se cortaron en bloques de 2 mm, y se incubaron a 37 °C durante 1 hora con 3 ml de una mezcla enzimática (colagenasa-P 0,2 mg/ml, ADNasa-1, a 1 mg/ml en PBS). La suspensión tisular se filtró a través de malla de nylon y se lavó con suero bovino fetal al 5 % + NaN<sub>3</sub> al 0,05 % en PBS para la tinción de tetrámeros e IFN-gamma.

Los esplenocitos y las células tumorales se incubaron con péptido de E7 1 micromol (mcm) durante 5 horas en presencia de Brefeldina A a  $10^7$  células/ml. Las células se lavaron dos veces y se incubaron en 50 µl de sobrenadante anti-receptor de Fc de ratón (2.4 G2) durante 1 hora o durante la noche a 4 °C. Las células se tiñeron para las moléculas de la superficie CD8 y CD62L, se permeabilizaron, se fijaron mediante el uso del kit de permeabilización Golgi-stop® o Golgi-Plug® (Pharmingen, San Diego, Calif.), y se tiñeron para IFN-gamma. Se adquirieron 500,000 eventos con el uso del citómetro de flujo de dos láser FACSCalibur y se analizaron mediante el uso del programa informático Cellquest (Becton Dickinson, Franklin Lakes, N.J.). Se calcularon los porcentajes de células secretoras de IFN-gamma dentro de las células T (CD62L<sup>bajo</sup> CD8<sup>+</sup> activadas).

Para la tinción de tetrámeros, el tetrámero H-2D<sup>b</sup> se cargó con un péptido de E7 conjugado con ficoeritrina (PE) (RAHYNIVTF, sec. con núm. de ident.: 42), se tiñó a TA durante 1 hora, y se tiñó con MEL-14 conjugado con anti-alofocianina (APC) (CD62L) y CD8 β conjugado con FITC a 4 °C durante 30 min. Las células se analizaron mediante la comparación de las células tetrámero<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> CD62L<sup>bajo</sup> en el bazo y en el tumor.

#### Resultados

Para analizar la capacidad de las fusiones de LLO y ActA para mejorar la inmunidad específica para un antígeno, los ratones se implantaron con células tumorales TC-1 y se inmunizaron con Lm-LLO-E7 ( $1 \times 10^7$  UFC), Lm-E7 ( $1 \times 10^6$  UFC), o Lm-ActA-E7 ( $2 \times 10^8$  UFC), o se dejaron sin tratamiento (virgen). Los tumores de los ratones de los grupos

de Lm-LLO-E7 y Lm-ActA-E7 contenían un mayor porcentaje de células T CD8<sup>+</sup> secretoras de IFN-gamma (Figura 12) y células CD8<sup>+</sup> específicas de tetrámeros (Figura 13) que en los ratones administrados con Lm-E7 o vírgenes.

5 Por lo tanto, Lm-LLO-E7 y Lm-ActA-E7 son eficaces en la inducción de células T CD8<sup>+</sup> infiltrantes del tumor y en la regresión del tumor. En consecuencia, las fusiones de LLO y ActA son eficaces en los métodos y las composiciones de la presente invención.

Ejemplo 7: La fusión a una secuencia similar a PEST aumenta la inmunidad específica a E7

10 Materiales y métodos experimentales

*Construcciones*

15 Lm-PEST-E7, una cepa de *Listeria* idéntica a Lm-LLO-E7, excepto porque contiene solo el promotor y los primeros 50 AA de LLO, se construyó de la siguiente manera:

20 El promotor de *hly* y las regiones PEST se fusionaron con el gen E7 de longitud completa mediante corte y empalme por PCR de extensión del solapamiento (SOE). El gen de E7 y el fragmento de *hly*-PEST del gen se amplificaron a partir del plásmido pGG-55, que contenía los primeros 441 aminoácidos de LLO, y se realizó el corte y empalme entre sí mediante técnicas de PCR convencionales. pVS16.5, el fragmento *hly*-PEST-E7 y el factor de transcripción de LM *prfA* se clonaron en el plásmido pAM401. El plásmido resultante se usó para transformar a XFL-7.

25 Lm-E7<sub>epi</sub> es una cepa recombinante que secreta E7 sin la región PEST o un fragmento de LLO. El plásmido usado para transformar esta cepa contiene un fragmento génico del promotor de *hly* y la secuencia señal fusionados al gen de E7. Este constructo difiere del Lm-E7 original, que expresa una sola copia del gen E7 integrado en el cromosoma. Lm-E7<sub>epi</sub> es totalmente isogénica para Lm-LLO-E7 y Lm-PEST-E7 excepto por la forma del antígeno E7 expresado.

30 Las cepas recombinantes se cultivaron en medio de infusión de corazón y cerebro (BHI) con cloramfenicol (20 mcg/ml). Las bacterias se congelaron en alícuotas a -80 °C.

Resultados

35 Para analizar el efecto sobre la antigenicidad de la fusión a una secuencia similar a PEST, la secuencia similar a PEST de LLO se fusionó a E7. Se realizaron estudios de regresión tumoral, como se describe para el Ejemplo 1, en paralelo con la cepa de *Listeria* que expresa LLO-E7 y E7 solos. Lm-LLO-E7 y Lm-PEST-E7 provocaron la regresión de 5/8 y 3/8 tumores establecidos, respectivamente (Figura 14). Por el contrario, Lm-E7<sub>epi</sub> solo provocó regresión tumoral en 1/8 ratones. Una diferencia estadísticamente significativa en los tamaños tumorales se observó entre los tumores tratados con construcciones que contienen PEST (Lm-LLO-E7 o Lm-PEST-E7) y los tratados con Lm-E7<sub>epi</sub> (prueba t de Student).

45 Para comparar los niveles de linfocitos específicos para E7 generados por las vacunas en el bazo, los bazos se extrajeron en el día 21 y se tiñeron con anticuerpos para CD62L, CD8, y el tetrámero E7/Db. Lm-E7<sub>epi</sub> indujo niveles bajos de células T CD8<sup>+</sup> activadas positivas para tetrámero E7 en el bazo, mientras que Lm-PEST-E7 y Lm-LLO-E7 indujeron 5 y 15 veces más células, respectivamente (Figura 15A), un resultado que fue reproducible en 3 experimentos separados. Por lo tanto, la fusión a las secuencias similares a PEST incrementó la inducción de esplenocitos positivos para tetrámeros. La media y SE de los datos obtenidos a partir de los 3 experimentos (Figura 15B) demuestran el aumento significativo en células CD8<sup>+</sup> positivas para tetrámeros por Lm-LLO-E7 y Lm-PEST-E7 sobre Lm-E7<sub>epi</sub> (P < 0,05 mediante prueba t de Student). Similarmente, la cantidad de células T CD8<sup>+</sup> con especificidad antigénica, infiltrantes del tumor, fue mayor en los ratones vacunados con Lm-LLO-E7 y Lm-PEST-E7, de manera reproducible en 3 experimentos (Figura 16A-B). Los valores promedio de TIL CD8<sup>+</sup> positivos para tetrámeros fueron significativamente mayores para Lm-LLO-E7 que para Lm-E7<sub>epi</sub> (P < 0,05; prueba t de Student).

55 Por lo tanto, las secuencias similares a PEST confieren aumento de la inmunogenicidad a los antígenos.

Ejemplo 8: El aumento de la inmunogenicidad por fusión de un antígeno a LLO no requiere un vector de *Listeria*

Materiales y métodos experimentales

60 *Construcción de Vac-SigE7Lamp*

65 La cepa WR de vaccinia se usó como el recipiente, y el gen de fusión se escindió del plásmido de *Listeria* y se insertó en pSC11 bajo el control del promotor de p75. Se escogió este vector porque es el vector de transferencia usado para las construcciones de vaccinia Vac-SigE7Lamp y Vac-E7 y por lo tanto permite la comparación directa con Vac-LLO-E7. De esta manera los 3 recombinantes de vaccinia se expresaron bajo el control del mismo promotor de compuesto temprano/tardío p7.5. Además, SC11 permite la selección de las placas virales recombinantes para la

selección por TK y tamizaje de beta-galactosidasa. La Figura 17 representa las diversas construcciones de vaccinia usadas en estos experimentos. Vac-SigE7Lamp es un virus de vaccinia recombinante que expresó la proteína E7 fusionada entre la secuencia señal de la proteína de membrana asociada al lisosoma (LAMP-1) y la secuencia de la cola citoplásmica de LAMP-1.

5 Se produjeron las siguientes modificaciones para permitir la expresión del producto génico por vaccinia: (a) la secuencia TEXT que evita la transcripción temprana por vaccinia se eliminó de la porción 5' de la secuencia de LLO-E7 mediante PCR; y (b) un sitio de restricción Xmal adicional se introdujo mediante PCR para permitir la inserción final de LLO-E7 en SC11. La introducción con éxito de estos cambios (sin pérdida de la secuencia original que codifica LLO-E7) se verificó mediante secuenciación. La construcción pSC11-E7 resultante se usó para transfectar la línea celular TK-vas CV1 que se había infectado con la cepa de vaccinia de tipo silvestre, WR. Los lisados celulares obtenidos a partir de esta etapa de co-infección/transfección contienen recombinantes de vaccinia que se purificaron de las placas 3 veces. La expresión del producto de la fusión LLO-E7 por vaccinia que se purificó de las placas se verificó mediante transferencia Western con el uso de un anticuerpo dirigido contra la secuencia de la proteína LLO. 10 La capacidad de Vac-LLO-E7 para producir células T CD8<sup>+</sup> específicas para LLO y E7 se determinó mediante el uso de los epítomos de LLO (91-99) y E7 (49-57) de ratones Balb/c y C57/BL6, respectivamente. Los resultados se confirmaron en un ensayo de liberación de cromo. 15

#### Resultados

20 Para determinar si el aumento de la inmunogenicidad por la fusión de un antígeno a LLO requiere un vector de *Listeria*, se construyó un vector de vaccinia que expresa E7 como una proteína de fusión con una forma truncada no hemolítica de LLO. Los estudios de rechazo de tumores se realizaron con TC-1 como se describió en Ejemplos anteriores, pero con inicio del tratamiento cuando los tumores tuvieron 3 mm de diámetro (Figura 18). Hacia el día 25 76, el 50 % de los ratones tratados con Vac-LLO-E7 estaban libres de tumor, mientras que solo el 25 % de los ratones Vac-SigE7Lamp estaban libres de tumor. En otros experimentos, se demostró que las fusiones LLO-antígeno son más inmunogénicas que el péptido E7 mezclado con SBAS2 u oligonucleótidos CpG no metilados en una comparación lado a lado.

30 Estos resultados muestran que (a) las fusiones LLO-antígeno son inmunogénicas no solo en el contexto de *Listeria*, sino además en otros contextos; y (b) la inmunogenicidad de las fusiones LLO-antígeno se compara favorablemente con otros enfoques de vacunas conocidos por su eficacia.

#### Listado de secuencias

35 <110> THE TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF PENNSYLVANIA; FERRONE, Soldano  
 <120> COMPOSICIONES QUE COMPRENDEN HMW-MAA Y FRAGMENTOS DE ESTE, PARA EL TRATAMIENTO DEL CÁNCER  
 40 <130> P-8986-EP1  
 <150> EP 07872167.7  
 <151> 2007-08-15  
 45 <150> PCT/US2007/018091  
 <151> 2007-08-15  
 <150> US 60/837,608  
 50 <151> 2006-08-15  
 <160> 45  
 <170> PatentIn versión 3.4  
 55 <210> 1  
 <211> 529  
 <212> PRT  
 <213> *Listeria monocytogenes*  
 60 <400> 1

ES 2 657 168 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

Ala Leu Val Lys Ala Asn Ser Glu Leu Val Glu Asn Gln Pro Asp Val



ES 2 657 168 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Glu

<210> 2

<211> 441

5 <212> PRT

<213> Listeria monocytogenes

<400> 2

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

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

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

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

10

ES 2 657 168 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 657 168 T3

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

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

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

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

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

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

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

Ile Ser Trp Asp Glu Val Asn Tyr Asp  
 435 440

<210> 3

<211> 416

5 <212> PRT

<213> Listeria monocytogenes

<400> 3

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

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

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

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

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

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

10

ES 2 657 168 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 657 168 T3

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

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

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

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

<210> 4

<211> 390

<212> PRT

<213> Listeria monocytogenes

5

<400> 4

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

10

ES 2 657 168 T3

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

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

Ser Ser Pro Gln Pro Leu Lys Ala Asn Gln Gln Pro Phe Phe Pro Lys  
 195 200 205

Val Phe Lys Lys Ile Lys Asp Ala Gly Lys Trp Val Arg Asp Lys Ile  
 210 215 220

Asp Glu Asn Pro Glu Val Lys Lys Ala Ile Val Asp Lys Ser Ala Gly  
 225 230 235 240

Leu Ile Asp Gln Leu Leu Thr Lys Lys Lys Ser Glu Glu Val Asn Ala  
 245 250 255

Ser Asp Phe Pro Pro Pro Pro Thr Asp Glu Glu Leu Arg Leu Ala Leu  
 260 265 270

Pro Glu Thr Pro Met Leu Leu Gly Phe Asn Ala Pro Ala Thr Ser Glu  
 275 280 285

Pro Ser Ser Phe Glu Phe Pro Pro Pro Pro Thr Asp Glu Glu Leu Arg  
 290 295 300

Leu Ala Leu Pro Glu Thr Pro Met Leu Leu Gly Phe Asn Ala Pro Ala  
 305 310 315 320

Thr Ser Glu Pro Ser Ser Phe Glu Phe Pro Pro Pro Thr Glu Asp  
 325 330 335

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

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

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

Gly Arg Gly Gly Arg Pro  
 385 390

<210> 5

<211> 1170

5 <212> ADN

<213> Listeria monocytogenes

<400> 5

ES 2 657 168 T3

atgCGTgCGa tgatGGtGGt tttcattact gccaattgca ttacgattaa ccccgacata 60  
atatttgCag cGacagatag cgaagattct agtctaaaca cagatgaatg ggaagaagaa 120  
aaaacagaag agcaaccaag cGaggtaaat acgggacca gatacgaaac tgcacgtgaa 180  
gtaagtTcaC gtgatattaa agaactagaa aaatcgaata aagtGagaaa tacgaacaaa 240  
gcagaccta tagcaatgtt gaaagaaaa gcagaaaaag gtccaaatat caataataac 300  
aacagtgaac aaactgagaa tgcggctata aatgaagagg cttcaggagc cgaccgacca 360  
gctatacaag tggagcgtcg tcatccagga ttgccatcgg atagcgcagc ggaaattaa 420  
aaaagaagga aagccatagc atcatcggat agtgagcttg aaagccttac ttatccggat 480  
aaaccaacaa aagtaaataa gaaaaaagtG gcgaaagagt cagttgcgga tgcttctgaa 540  
agtgacttag attctagcat gcagtcagca gatgagtctt caccacaacc tttaaaagca 600  
aaccaacaac catttttccc taaagtattt aaaaaataa aagatgcggg gaaatgggta 660  
cgtgataaaa tcgacgaaaa tcctgaagta aagaaagcga ttgttgataa aagtgcaggg 720  
ttaattgacc aattattaac caaaaagaaa agtgaagagg taaatgcttc ggacttcccG 780  
ccaccaccta cggatgaaga gttaagactt gctttgccag agacaccaat gcttcttggT 840  
tttaatgctc ctgctacatc agaaccgagc tcattogaat ttccaccacc acctacggat 900  
gaagagttaa gacttgcttt gccagagagc ccaatgcttc ttggttttaa tgctcctgct 960  
acatcggaac cGagctcgtt cgaatttcca ccgcctcaa cagaagatga actagaaatc 1020  
atccgggaaa cagcatcctc gctagattct agttttacaa gaggggattt agctagtttg 1080  
agaaatgcta ttaatcgcca tagtcaaaat ttctctgatt tcccaccaat cccaacagaa 1140  
gaagagttga acgggagagg cggtagacca 1170

<210> 6  
<211> 32  
5 <212> PRT  
<213> Listeria monocytogenes

<400> 6  
Lys Glu Asn Ser Ile Ser Ser Met Ala Pro Pro Ala Ser Pro Pro Ala  
1 5 10 15

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

10 <210> 7  
<211> 19  
<212> PRT  
<213> Listeria monocytogenes

15 <400> 7  
Lys Glu Asn Ser Ile Ser Ser Met Ala Pro Pro Ala Ser Pro Pro Ala  
1 5 10 15

Ser Pro Lys

20 <210> 8  
<211> 14  
<212> PRT  
<213> Listeria monocytogenes

ES 2 657 168 T3

<400> 8  
 Lys Thr Glu Glu Gln Pro Ser Glu Val Asn Thr Gly Pro Arg  
 1 5 10

5 <210> 9  
 <211> 28  
 <212> PRT  
 <213> Listeria monocytogenes

<400> 9  
 Lys Ala Ser Val Thr Asp Thr Ser Glu Gly Asp Leu Asp Ser Ser Met  
 1 5 10 15

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

<210> 10  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 15 <213> Listeria monocytogenes

<400> 10  
 Lys Asn Glu Glu Val Asn Ala Ser Asp Phe Pro Pro Pro Pro Thr Asp  
 1 5 10 15

Glu Glu Leu Arg  
 20

20 <210> 11  
 <211> 33  
 <212> PRT  
 <213> Listeria monocytogenes

25 <400> 11  
 Arg Gly Gly Ile Pro Thr Ser Glu Glu Phe Ser Ser Leu Asn Ser Gly  
 1 5 10 15

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

Arg

30 <210> 12  
 <211> 19  
 <212> PRT  
 <213> Listeria seeligeri

35 <400> 12  
 Arg Ser Glu Val Thr Ile Ser Pro Ala Glu Thr Pro Glu Ser Pro Pro  
 1 5 10 15

Ala Thr Pro

<210> 13  
 <211> 17  
 40 <212> PRT  
 <213> Streptococcus pyogenes

<400> 13  
 Lys Gln Asn Thr Ala Ser Thr Glu Thr Thr Thr Thr Asn Glu Gln Pro  
 1 5 10 15

Lys

ES 2 657 168 T3

<210> 14  
<211> 17  
<212> PRT

5 <213> Streptococcus equisimilis

<400> 14  
Lys Gln Asn Thr Ala Asn Thr Glu Thr Thr Thr Thr Asn Glu Gln Pro  
1 5 10 15

Lys

10 <210> 15  
<211> 2322  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

15 <400> 15  
Met Gln Ser Gly Arg Gly Pro Pro Leu Pro Ala Pro Gly Leu Ala Leu



ES 2 657 168 T3

Glu Gly His Leu Arg Ala Val Val Glu Lys Gly Gln Gly Thr Val Leu  
 260 265 270

Leu His Asn Ser Val Pro Val Ala Asp Gly Gln Pro His Glu Val Ser  
 275 280 285

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 657 168 T3

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

Pro Met Pro Ser Cys Leu Arg Arg Gly Gln Thr Tyr Leu Leu Pro Ile  
 530 535 540

Gln Val Asn Pro Val Asn Asp Pro Pro His Ile Ile Phe Pro His Gly  
 545 550 555 560

Ser Leu Met Val Ile Leu Glu His Thr Gln Lys Pro Leu Gly Pro Glu  
 565 570 575

Val Phe Gln Ala Tyr Asp Pro Asp Ser Ala Cys Glu Gly Leu Thr Phe  
 580 585 590

Gln Val Leu Gly Thr Ser Ser Gly Leu Pro Val Glu Arg Arg Asp Gln  
 595 600 605

Pro Gly Glu Pro Ala Thr Glu Phe Ser Cys Arg Glu Leu Glu Ala Gly  
 610 615 620

Ser Leu Val Tyr Val His Arg Gly Gly Pro Ala Gln Asp Leu Thr Phe  
 625 630 635 640

Arg Val Ser Asp Gly Leu Gln Ala Ser Pro Pro Ala Thr Leu Lys Val  
 645 650 655

Val Ala Ile Arg Pro Ala Ile Gln Ile His Arg Ser Thr Gly Leu Arg  
 660 665 670

Leu Ala Gln Gly Ser Ala Met Pro Ile Leu Pro Ala Asn Leu Ser Val  
 675 680 685

Glu Thr Asn Ala Val Gly Gln Asp Val Ser Val Leu Phe Arg Val Thr  
 690 695 700

Gly Ala Leu Gln Phe Gly Glu Leu Gln Lys Gln Gly Ala Gly Gly Val  
 705 710 715 720

Glu Gly Ala Glu Trp Trp Ala Thr Gln Ala Phe His Gln Arg Asp Val  
 725 730 735

Glu Gln Gly Arg Val Arg Tyr Leu Ser Thr Asp Pro Gln His His Ala  
 740 745 750

Tyr Asp Thr Val Glu Asn Leu Ala Leu Glu Val Gln Val Gly Gln Glu  
 755 760 765

ES 2 657 168 T3

Ile Leu Ser Asn Leu Ser Phe Pro Val Thr Ile Gln Arg Ala Thr Val  
770 775 780

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Val Ala Ile Gln Pro Val Asn Asp His Ala Pro Val Gln Thr Ile

ES 2 657 168 T3

1010		1015		1020
Ser Arg	Ile Phe His Val	Ala Arg Gly Gly Arg Arg	Leu Leu Thr	
1025		1030		1035
Thr Asp	Asp Val Ala Phe Ser	Asp Ala Asp Ser Gly	Phe Ala Asp	
1040		1045		1050
Ala Gln	Leu Val Leu Thr Arg	Lys Asp Leu Leu Phe	Gly Ser Ile	
1055		1060		1065
Val Ala	Val Asp Glu Pro Thr	Arg Pro Ile Tyr Arg	Phe Thr Gln	
1070		1075		1080
Glu Asp	Leu Arg Lys Arg Arg	Val Leu Phe Val His	Ser Gly Ala	
1085		1090		1095
Asp Arg	Gly Trp Ile Gln Leu	Gln Val Ser Asp Gly	Gln His Gln	
1100		1105		1110
Ala Thr	Ala Leu Leu Glu Val	Gln Ala Ser Glu Pro	Tyr Leu Arg	
1115		1120		1125
Val Ala	Asn Gly Ser Ser Leu	Val Val Pro Gln Gly	Gly Gln Gly	
1130		1135		1140
Thr Ile	Asp Thr Ala Val Leu	His Leu Asp Thr Asn	Leu Asp Ile	
1145		1150		1155
Arg Ser	Gly Asp Glu Val His	Tyr His Val Thr Ala	Gly Pro Arg	
1160		1165		1170
Trp Gly	Gln Leu Val Arg Ala	Gly Gln Pro Ala Thr	Ala Phe Ser	
1175		1180		1185
Gln Gln	Asp Leu Leu Asp Gly	Ala Val Leu Tyr Ser	His Asn Gly	
1190		1195		1200
Ser Leu	Ser Pro Arg Asp Thr	Met Ala Phe Ser Val	Glu Ala Gly	
1205		1210		1215
Pro Val	His Thr Asp Ala Thr	Leu Gln Val Thr Ile	Ala Leu Glu	
1220		1225		1230
Gly Pro	Leu Ala Pro Leu Lys	Leu Val Arg His Lys	Lys Ile Tyr	
1235		1240		1245

ES 2 657 168 T3

Val Phe Gln Gly Glu Ala Ala Glu Ile Arg Arg Asp Gln Leu Glu  
 1250 1255 1260

Ala Ala Gln Glu Ala Val Pro Pro Ala Asp Ile Val Phe Ser Val  
 1265 1270 1275

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 657 168 T3

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

Ser Gly Ser Glu Asp Leu Val Tyr Thr Ile Glu Gln Pro Ser Asn  
1505 1510 1515

Gly Arg Val Val Leu Arg Gly Ala Pro Gly Thr Glu Val Arg Ser  
1520 1525 1530

Phe Thr Gln Ala Gln Leu Asp Gly Gly Leu Val Leu Phe Ser His  
1535 1540 1545

Arg Gly Thr Leu Asp Gly Gly Phe Arg Phe Arg Leu Ser Asp Gly  
1550 1555 1560

Glu His Thr Ser Pro Gly His Phe Phe Arg Val Thr Ala Gln Lys  
1565 1570 1575

Gln Val Leu Leu Ser Leu Lys Gly Ser Gln Thr Leu Thr Val Cys  
1580 1585 1590

Pro Gly Ser Val Gln Pro Leu Ser Ser Gln Thr Leu Arg Ala Ser  
1595 1600 1605

Ser Ser Ala Gly Thr Asp Pro Gln Leu Leu Leu Tyr Arg Val Val  
1610 1615 1620

Arg Gly Pro Gln Leu Gly Arg Leu Phe His Ala Gln Gln Asp Ser  
1625 1630 1635

Thr Gly Glu Ala Leu Val Asn Phe Thr Gln Ala Glu Val Tyr Ala  
1640 1645 1650

Gly Asn Ile Leu Tyr Glu His Glu Met Pro Pro Glu Pro Phe Trp  
1655 1660 1665

Glu Ala His Asp Thr Leu Glu Leu Gln Leu Ser Ser Pro Pro Ala  
1670 1675 1680

Arg Asp Val Ala Ala Thr Leu Ala Val Ala Val Ser Phe Glu Ala  
1685 1690 1695

Ala Cys Pro Gln Arg Pro Ser His Leu Trp Lys Asn Lys Gly Leu  
1700 1705 1710

Trp Val Pro Glu Gly Gln Arg Ala Arg Ile Thr Val Ala Ala Leu  
1715 1720 1725

ES 2 657 168 T3

Asp Ala Ser Asn Leu Leu Ala Ser Val Pro Ser Pro Gln Arg Ser  
 1730 1735 1740

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gln Ala Leu Gly Arg Ser Ser Leu Ser Gln Gln Gln Leu Arg Val

ES 2 657 168 T3

1955	1960	1965
Val Ser 1970	Asp Arg Glu Glu Pro 1975	Glu Ala Ala Tyr Arg Leu Ile Gln 1980
Gly Pro 1985	Gln Tyr Gly His Leu 1990	Leu Val Gly Gly Arg Pro Thr Ser 1995
Ala Phe 2000	Ser Gln Phe Gln Ile 2005	Asp Gln Gly Glu Val Val Phe Ala 2010
Phe Thr 2015	Asn Phe Ser Ser Ser 2020	His Asp His Phe Arg Val Leu Ala 2025
Leu Ala 2030	Arg Gly Val Asn Ala 2035	Ser Ala Val Val Asn Val Thr Val 2040
Arg Ala 2045	Leu Leu His Val Trp 2050	Ala Gly Gly Pro Trp Pro Gln Gly 2055
Ala Thr 2060	Leu Arg Leu Asp Pro 2065	Thr Val Leu Asp Ala Gly Glu Leu 2070
Ala Asn 2075	Arg Thr Gly Ser Val 2080	Pro Arg Phe Arg Leu Leu Glu Gly 2085
Pro Arg 2090	His Gly Arg Val Val 2095	Arg Val Pro Arg Ala Arg Thr Glu 2100
Pro Gly 2105	Gly Ser Gln Leu Val 2110	Glu Gln Phe Thr Gln Gln Asp Leu 2115
Glu Asp 2120	Gly Arg Leu Gly Leu 2125	Glu Val Gly Arg Pro Glu Gly Arg 2130
Ala Pro 2135	Gly Pro Ala Gly Asp 2140	Ser Leu Thr Leu Glu Leu Trp Ala 2145
Gln Gly 2150	Val Pro Pro Ala Val 2155	Ala Ser Leu Asp Phe Ala Thr Glu 2160
Pro Tyr 2165	Asn Ala Ala Arg Pro 2170	Tyr Ser Val Ala Leu Leu Ser Val 2175
Pro Glu 2180	Ala Ala Arg Thr Glu 2185	Ala Gly Lys Pro Glu Ser Ser Thr 2190

ES 2 657 168 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

Ala Leu Lys Asn Gly Gln Tyr Trp Val  
 2315 2320

<210> 16  
 <211> 7011  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

<400> 16  
 atgcagtcgc gccgcggccc ccacttcca gccccggcc tggccttggc tttgaccctg 60  
 actatgttgg ccagacttgc atccgcggct tccttcttcg gtgagaacca cctggaggtg 120  
 cctgtggcca cggctctgac cgacatagac ctgcagctgc agttctccac gtcccagccc 180  
 gaagccctcc ttctcctggc agcaggcca gctgaccacc tcctgctgca gctctactct 240  
 ggacgcctgc aggtcagact tgttctgggc caggaggagc tgaggctgca gactccagca 300  
 gagacgctgc tgagtgactc catccccac actgtggtgc tgactgtcgt agagggttg 360  
 gccacgttgt cagtogatgg gtttctgaac gcctcctcag cagtcccagg agcccccta 420  
 gaggtcccct atgggctctt tgttgggggc actgggaccc ttggcctgcc ctacctgagg 480  
 ggaaccagcc gaccctgag gggttgcctc catgcagcca cctcaatgg cgcagcctc 540  
 ctccggcctc tgacccccga tgtgcatgag ggctgtgctg aagagtttct tgccagtgat 600  
 gatgtggccc tgggcttctc tgggccccac tctctggctg ccttcctgca ctggggcact 660

10

ES 2 657 168 T3

caggacgaag gaaccctaga gtttactctc accacacaga gccggcaggc acccttggcc 720  
 ttccaggcag ggggccggcg tggggacttc atctatgtgg acatatttga gggccacctg 780  
 cgggcccgtgg tggagaaggg ccagggtacc gtattgctcc acaacagtgt gcctgtggcc 840  
 gatgggcagc cccatgaggt cagtgtccac atcaatgctc accggctgga aatctccgtg 900  
 gaccagtacc ctacgcatac ttcgaaccga ggagtcctca gctacctgga gccacggggc 960  
 agtctccttc tccgggggct ggatgcagag gcctctcgtc acctccagga acaccgcctg 1020  
 ggctgacac cagaggccac caatgcctcc ctgctgggct gcatggaaga cctcagtgtc 1080  
 aatggccaga ggggggggct gcgggaagct ttgctgacgc gcaacatggc agccggctgc 1140  
 aggctggagg aggaggagta tgaggacgat gcctatggac attatgaagc tttctccacc 1200  
 ctggcccctg aggccttggcc agccatggag ctgcctgagc catgcgtgcc tgagccaggg 1260  
 ctgcctcctg tctttgcaa tttcaccag ctgctgacta tcagcccact ggtggtggcc 1320  
 gagggggca cagcctggct tgagtggagg catgtgcagc ccacgctgga cctgatggag 1380  
 gctgagctgc gcaaatccca ggtgctgttc agcgtgacct gaggggcacg ccatggcgag 1440  
 ctcgagctgg acatcccggg agcccaggca cgaaaaatgt tcaccctcct ggacgtggtg 1500  
 aaccgcaagg cccgcttcat ccacgatggc tctgaggaca cctccgacca gctggtgctg 1560  
 gaggtgtcgg tgacggctcg ggtgcccatg ccctcatgcc ttcggagggg ccaaacatac 1620  
 ctctgccc tccaggtcaa ccctgtcaat gaccacccc acatcatctt cccacatggc 1680  
 agcctcatgg tgatcctgga acacacgcag aagccgctgg ggctgaggt tttccaggcc 1740  
 tatgaccgg actctgcctg tgagggcctc acctccagg tccttggcac ctctctggc 1800  
 ctcccctgg agcggcgaga ccagcctggg gagccggcga ccgagttctc ctgccgggag 1860  
 ttggaggccg gcagcctagt ctatgtccac cgcgggtggtc ctgcacagga ettgacgttc 1920  
 cgggtcagcg atggactgca ggccagcccc ccggccacgc tgaaggtggt ggccatccgg 1980  
 ccggccatac agatccaccg cagcacaggg ttgcgactgg cccaaggctc tgccatgccc 2040  
 atcttgcctg ccaacctgtc ggtggagacc aatgccgtgg ggcaggatgt gagcgtgctg 2100  
 ttccgcgtca ctggggccct gcagtttggg gagctgcaga agcagggggc aggtggggtg 2160  
 gaggtgctg agtgggtggc cacacaggcg ttccaccagc gggatgtgga gcagggccgc 2220  
 gtgaggtacc tgagcactga cccacagcac cacgcttacg acaccgtgga gaacctggcc 2280  
 ctggaggtgc aggtgggcca ggagatcctg agcaatctgt ccttcccagt gaccatccag 2340  
 agagccactg tgtggatgct gcggctggag ccactgcaca ctcagaacac ccagcaggag 2400  
 acctcacca cagcccacct ggaggccacc ctggaggagg caggcccaag ccccccaacc 2460  
 ttccattatg aggtggttca ggctcccagg aaaggcaacc ttcaactaca gggcacaagg 2520

ES 2 657 168 T3

ctgtcagatg gccagggtct caccagatg gacatacagg ctggccgggt gacctatggg 2580  
gccacagcac gtgcctcaga ggcagtcgag gacacettcc gtttccgtgt cacagctcca 2640  
ccatatttct ccccactcta taccttcccc atccacattg gtggtgaccc agatgcccct 2700  
gtectacca atgtcctcct cgtggtgcct gagggtgggt aggggtgctct ctctgctgac 2760  
cacctctttg tcaagagtct caacagtgcc agctacctct atgaggatcat ggagcggccc 2820  
cgccatggga ggttggcttg gcgtgggaca caggacaaga ccaactatggt gacatccttc 2880  
accaatgaag acctgttgcg tggccggctg gtotaccagc atgatgactc cgagaccaca 2940  
gaagatgata tcccatttgt tgctaccgcg cagggcgaga gcagtggatga catggcctgg 3000  
gaggaggtag ggggtgtcct ccgagtggcc atccagcccg tgaatgacca cggccctgtg 3060  
cagaccatca gccggatctt ccatgtggcc cggggtgggc ggcggctgct gactacagac 3120  
gacgtggcct tcagcagatgc tgactcgggc tttgctgacg cccagctggt gcttaccgcg 3180  
aaggacctcc tctttggcag tatcgtggcc gtagatgagc ccaocggcc catctaccgc 3240  
ttcaccagcagg aggacctcag gaagaggcga gtactgttcg tgcaactcagg ggcctgaccgt 3300  
ggctggatcc agctgcagggt gtccgacggg caacaccagg ccaactgcgt gctggagggtg 3360  
caggcctcgg aacctacct ccgtgtggcc aacggctcca gccttgtggt ccctcaaggg 3420  
ggccagggca ccatcgacac ggccgtgctc cacctggaca ccaacctcga catccgcagt 3480  
ggggatgagg tccactacca cgtcacagct ggccctcgtt ggggacagct agtccggct 3540  
ggtcagccag ccacagcctt ctcccagcag gacctgctgg atggggccgt tctctatagc 3600  
cacaatggca gcctcagccc ccgcgacacc atggccttct ccgtggaagc agggccagtg 3660  
cacacggatg ccacctaca agtgaccatt gccctagagg gcccaactggc cccactgaag 3720  
ctggtccggc acaagaagat ctacgtcttc cagggagagg cagctgagat cagaagggac 3780  
cagctggagg cagcccagga ggcagtgcc cctgcagaca tcgtattctc agtgaagagc 3840  
ccaccgagtg ccggctacct ggtgatgggt tcgctggcgg ccttggcaga tgagccacc 3900  
agcctggacc ctgtgcagag ctctcccag gaggcagtgg acacaggcag ggtcctgtac 3960  
ctgcaactccc gccctgaggc ctggagcgtat gccttctcgc tggatgtggc ctcaggcctg 4020  
ggtgctcccc tcgaggggct ccttgtggag ctggagggtgc tgcccgtgc catcccacta 4080  
gaggcgcaaa acttcagcgt ccctgagggg ggcagcctca ccctggcccc tccactgctc 4140  
cgtgtctccg ggccctactt ccccactctc ctgggcctca gcctgcaggt gctggagcca 4200  
ccccagcatg gagccctgca gaaggaggac ggcacctcaag ccaggaccct cagcgccttc 4260  
tcctggagaa tgggtgaaga gcagctgac cgctacgtgc atgacgggag cgagacactg 4320  
acagacagtt ttgtcctgat ggctaagcc tccgagatgg atcggcagag ccatacctgtg 4380  
gccttcaactg tcaactgtcct gcctgtcaat gaccaacccc ccatacctcac taaaaacaca 4440

ES 2 657 168 T3

ggcctgcaga tgtgggaggg ggcactgcg cccatccctg cggaggtctt gaggagcacg 4500  
 gacggcgact ctgggtctga ggatctggtc tacaccatcg agcagcccag caacggggcg 4560  
 gtagtgctgc ggggggcgcc gggcactgag gtgcgcagct tcacgcaggc ccagctggac 4620  
 ggcgggctcg tgctgttctc acacagagga accctggatg gaggcttccg cttccgcctc 4680  
 tctgacggcg agcacacttc ccccgacac ttcttccgag tgacggccca gaagcaagtg 4740  
 ctctctcgc tgaagggcag ccagacactg actgtctgcc caggttccgt ccagccactc 4800  
 agcagtcaga ccctcagggc cagctccagc gcaggcactg acccccagct cctgctctac 4860  
 cgtgtggtgc ggggccccca gctaggcccg ctgttccacg cccagcagga cagcacaggg 4920  
 gaggccctgg tgaacttcac tcaggcagag gtctacgctg ggaatattct gtatgagcat 4980  
 gagatgcccc ccgagccctt ttgggaggcc catgataccc tagagctcca gctgtcctcg 5040  
 ccgctgccc gggacgtggc cgccaccctt gctgtggctg tgtcttttga ggctgcctgt 5100  
 ccccagcgc ccagccacct ctggaagaac aaaggtctct gggtccccga gggccagcgg 5160  
 gccaggatca ccgtggctgc tctggatgcc tccaatctct tggccagcgt tccatcacc 5220  
 cagcgtcag agcatgatgt gctcttccag gtcacacagt tccccagccg gggccagctg 5280  
 ttggtgtccg aggagcccct ccatgctggg cagccccact tcctgcagtc ccagctggct 5340  
 gcagggcagc tagtgtatgc ccacggcggg gggggcacc agcaggatgg cttccacttt 5400  
 cgtgcccacc tccaggggcc agcaggggcc tccgtggctg gacccccaac ctcagaggcc 5460  
 tttgccatca cggtgagga tgtaaatgag cggccccctc agccacaggc ctctgtccca 5520  
 ctccgctca cccgaggtc tctgtcccc atctcccggg cccagctgag tgtggtggac 5580  
 ccagactcag ctctgggga gattgagtac gaggtccagc gggcacccca caacggcttc 5640  
 ctcagcctgg tgggtggtgg cctggggccc gtgaccgct tcacgcaagc cgatgtggat 5700  
 tcaggcggc tggccttctg ggccaacggg agcagcgtgg caggcatctt ccagctgagc 5760  
 atgtctgatg gggccagccc acccctgccc atgtccctgg ctgtggacat cctaccatcc 5820  
 gccatcgagg tgcagctcgc ggcaccctg gaggtgcccc aagctttggg gcgctcctca 5880  
 ctgagccagc agcagctccg ggtggtttca gatcgggagg agccagaggc agcataccgc 5940  
 ctcatccagg gaccccagta tgggcatctc ctggtggcg ggcggccac ctcggccttc 6000  
 agccaattcc agatagacca gggcgaggtg gtctttgcct tcaccaactt ctctcctct 6060  
 catgaccact tcagagctct ggcaactggct aggggtgtca atgcatcagc cgtagtgaac 6120  
 gtcactgtga gggctctgct gcatgtgtgg gcaggtgggc catggcccca gggtgccacc 6180  
 ctgcgcctgg accccaccgt cctagatgct ggcgagctgg ccaaccgcac aggcagtggt 6240  
 ccgcgttcc gctcctgga gggaccccgg catggcccg tggtccgct gccccgagcc 6300

ES 2 657 168 T3

aggacggagc ccgggggcag ccagctggtg gacagttca ctacagcagga ccttgaggac 6360  
 gggaggctgg ggctggaggt gggcaggcca gaggggaggg cccccggccc cgcaggtgac 6420  
 agtctcactc tggagctgtg ggcacagggc gtcccgcctg ctgtggcctc cctggacttt 6480  
 gccactgagc cttacaatgc tgcccggccc tacacgctgg ccctgctcag tgtccccgag 6540  
 gccgcccgga cggaaacagc gaagccagag agcagcacc cccacaggcga gccaggcccc 6600  
 atggcatcca gccctgagcc cgctgtggcc aaggaggct tcctgagctt ccttgaggcc 6660  
 aacatgttca gcgtcatcat ccccatgtgc ctggtacttc tgctcctggc gctcatcctg 6720  
 cccctgctct tctacctccg aaaacgcaac aagacgggca agcatgacgt ccaggtoctg 6780  
 actgccaagc cccgcaacgg cctggctggt gacaccgaga cctttcgcaa ggtggagcca 6840  
 ggccaggcca tcccgtcac agctgtgcct ggccaggggc ccctccagg aggccagcct 6900  
 gaccagagc tgctgcagtt ctgccggaca cccaacctg ccottaagaa tggccagtac 6960  
 tgggtgtgag gcctggcctg ggcccagatg ctgatcgggc cagggacagc c 7011

- 5 <210> 17  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Cebador
- 10 <400> 17  
 ggcccgggcc ccctccttg at 22  
 <210> 18  
 <211> 26
- 15 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Cebador
- 20 <400> 18  
 ggtctagatc ataattact tcatcc 26  
 <210> 19  
 <211> 22
- 25 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Cebador
- 30 <400> 19  
 ggctcgagca tggagataca cc 22  
 <210> 20  
 <211> 28
- 35 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Cebador
- 40 <400> 20  
 ggggactagt ttatggttc tgagaaca 28  
 <210> 21  
 <211> 585
- 45 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

ES 2 657 168 T3

<400> 21  
 ttcaatggcc agagggcggg gctgcgggaa gctttgctga cgcgcaacat ggcagccggc 60  
 tgcaggctgg aggaggagga gtatgaggac gatgcctatg gacattatga agctttctcc 120  
 accctggccc ctgaggcttg gccagccatg gagctgcctg agccatgcgt gcctgagcca 180  
 gggctgcctc ctgtctttgc caatttcacc cagctgctga ctatcagccc actggtggtg 240  
 gccgaggggg gcacagcctg gcttgagtgg aggcattgtc agcccacgct ggacctgatg 300  
 gaggctgagc tgcgcaaadc ccagggtctg ttcagcgtga cccgaggggc acgccatggc 360  
 gagctcgagc tggacatccc gggagcccag gcacgaaaaa tgttcaccct cctggacgtg 420  
 gtgaaccgca aggcccgtt catccacgat ggctctgagg acacctccga ccagctggtg 480  
 ctggaggtgt cggtgacggc tcgggtgccc atgccctcat gccttcggag gggccaaaca 540  
 tacctcctgc ccattccagg caaccctgtc aatgaccac cccac 585

5 <210> 22  
 <211> 1290  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

10 <400> 22  
 gtccgcgtca ctggggccct gcagtttggg gagctgcaga aacacggggc aggtggggtg 60  
 gagggtgctg agtgggtggc cacacaggcg ttccaccagc gggatgtgga gcagggccgc 120  
 gtgaggtacc tgagcactga cccacagcac cacgcttacg acaccgtgga gaacctggcc 180  
 ctggaggtgc aggtgggcca ggagatcctg agcaatctgt ccttcccagt gaccatccag 240  
 agagccactg tgtggatgct gcggctggag cactgcaca ctcagaacac ccagcaggag 300  
 accctcacca cagcccacct ggaggccacc ctggaggagg caggcccaag ccccccaacc 360  
 ttccattatg agtggttca ggctcccagg aaaggcaacc ttcaactaca gggcacaagg 420  
 ctgtcagatg gccagggcct caccaggat gacatacagg ctggccgggt gacctatggg 480  
 gccacagcac gtgcctcaga ggcagtcgag gacaccttc gtttccgtgt cacagctcca 540  
 ccatatttct cccacteta taccttccc atccacattg gtggtgacct agatgcgctt 600  
 gtcctcacca atgtcctcct cgtggtgcct gagggtggtg aggggtgcct ctctgctgac 660  
 cacctctttg tcaagagtct caacagtgcc agctacctct atgaggtcat ggagcggccc 720  
 cgccatggga ggttggcttg gcgtgggaca caggacaaga ccactatggt gacatccttc 780  
 accaatgaag acctggtgcg tggccggctg gtctaccagc atgatgactc cgagaccaca 840  
 gaagatgata tcccatttgt tgctaccgc caggcgaga gcagtgtgga catggcctgg 900  
 gaggaggtac ggggtgtcct ccgagtggcc atccagccc tgaatgacca cgcccctgtg 960  
 cagaccatca gccgatcct ccatgtggcc cggggtgggc ggccgctgct gactacagac 1020  
 gacgtggcct tcagcagatg tgactcgggc tttgctgacg cccagctggt gcttaccgc 1080  
 aaggacctcc tctttggcag tatcgtggcc gtagatgagc ccacggggc catctaccgc 1140  
 ttccccagg aggacctcag gaagagcga gtactgttcg tgactcagg ggctgaccgt 1200  
 ggctggatcc agctgcaggt gtccgacggg caacaccagg ccactgcgct gctggaggtg 1260  
 caggcctogg aacctacct ccgtgtggcc 1290

ES 2 657 168 T3

<210> 23  
 <211> 294  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
 5  
 <400> 23  
 gccactgagc cttacaatgc tgcccggccc tacagcgtgg ccctgctcag tgtccccgag 60  
 gccgcccgga cgaagcagg gaagccagag agcagcacc ccacaggcga gccaggcccc 120  
 atggcatcca gccctgagcc cgctgtggcc aagggaggct tcctgagctt ccttgaggcc 180  
 aacatgttca gcgtcatcat ccccatgtgc ctggtacttc tgcctcctgga gctcatcctg 240  
 ccctgctct tctacctcg aaaacgcaac aagacgggca agcatgacgt ccag 294  
 <210> 24  
 10 <211> 29  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 15 <223> Cebador  
 <400> 24  
 tcctcgaggt caatggccag aggcggggg 29  
 <210> 25  
 20 <211> 54  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 25 <223> Cebador  
 <400> 25  
 30 cccgggttac tactatcgt cgtcatcctt gtaatcgtgg ggtgggtcat tgac 54  
 <210> 26  
 <211> 29  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 35 <220>  
 <223> Cebador  
 <400> 26  
 40 gcctcgagtt ccgctcact ggggccctg 29  
 <210> 27  
 <211> 54  
 <212> ADN  
 45 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Cebador  
 <400> 27  
 50 actagtttac tactatcgt cgtcatcctt gtaatcggcc acacggaggt aggg 54  
 <210> 28  
 <211> 32  
 55 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Cebador

ES 2 657 168 T3

<400> 28  
tgctcgaggc cactgagcct tacaatgctg cc 32

5 <210> 29  
<211> 55  
<212> ADN  
<213> Artificial

10 <220>  
<223> Cebador

<400> 29  
cccgggttac tacttatcgt cgtcacctt gtaatcctgg acgcatgct tgccc 55

15 <210> 30  
<211> 22  
<212> ADN  
<213> Artificial

20 <220>  
<223> Cebador

<400> 30  
ggccccgggcc ccctccttg at 22

25 <210> 31  
<211> 26  
<212> ADN  
<213> Artificial

30 <220>  
<223> Cebador

35 <400> 31  
ggtctagatc ataattact tcatcc 26

40 <210> 32  
<211> 26  
<212> ADN  
<213> Artificial

45 <220>  
<223> Cebador

<400> 32  
ggtctagaga attccagcaa aagcag 26

50 <210> 33  
<211> 27  
<212> ADN  
<213> Artificial

55 <220>  
<223> Cebador

<400> 33  
gggtcgacaa gggatTTTT cttaat 27

60 <210> 34  
<211> 31  
<212> ADN  
<213> Artificial

65 <220>  
<223> Cebador

ES 2 657 168 T3

<400> 34  
 ggggtctaga cctccttga ttagtatatt c 31

5 <210> 35  
 <211> 45  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

10 <220>  
 <223> Cebador

<400> 35  
 atcttcgcta tctgtcgccg cggcgcgtgc ttcagttgt tgcgc 45

15 <210> 36  
 <211> 45  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

20 <220>  
 <223> Cebador

<400> 36  
 25 gcgcaacaaa ctgaagcagc ggccgcggcg acagatagcg aagat 45

<210> 37  
 <211> 42  
 <212> ADN  
 30 <213> Artificial

<220>  
 <223> Cebador

35 <400> 37  
 tgtaggtgta tctcatgct cgagagctag gcgatcaatt tc 42

<210> 38  
 <211> 42  
 40 <212> ADN  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> Cebador

45 <400> 38  
 ggaattgatc gcctagctct cgagcatgga gatacaccta ca 42

<210> 39  
 <211> 42  
 50 <212> ADN  
 <213> Artificial

<220>  
 55 <223> Cebador

<400> 39  
 aaacggattt attagatcc cgggttatgg ttctgagaa ca 42

60 <210> 40  
 <211> 42  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

65 <220>  
 <223> Cebador

ES 2 657 168 T3

<400> 40  
 tgttctcaga aaccataacc cgggatctaa ataaatccgt tt 42

5 <210> 41  
 <211> 28  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

10 <220>  
 <223> Cebador

<400> 41  
 gggggtcgac cagctctct tgggaag 28

15 <210> 42  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

20 <220>  
 <223> péptido E7 conjugado con ficoeritrina (PE)

<400> 42

25 **Arg Ala His Tyr Asn Ile Val Thr Phe**  
 1 5

<210> 43  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

30 <400> 43

**Ile Leu Ser Asn Leu Ser Phe Pro Val**  
 1 5

35 <210> 44  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

40 <400> 44

**Leu Leu Phe Gly Ser Ile Val Ala Val**  
 1 5

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

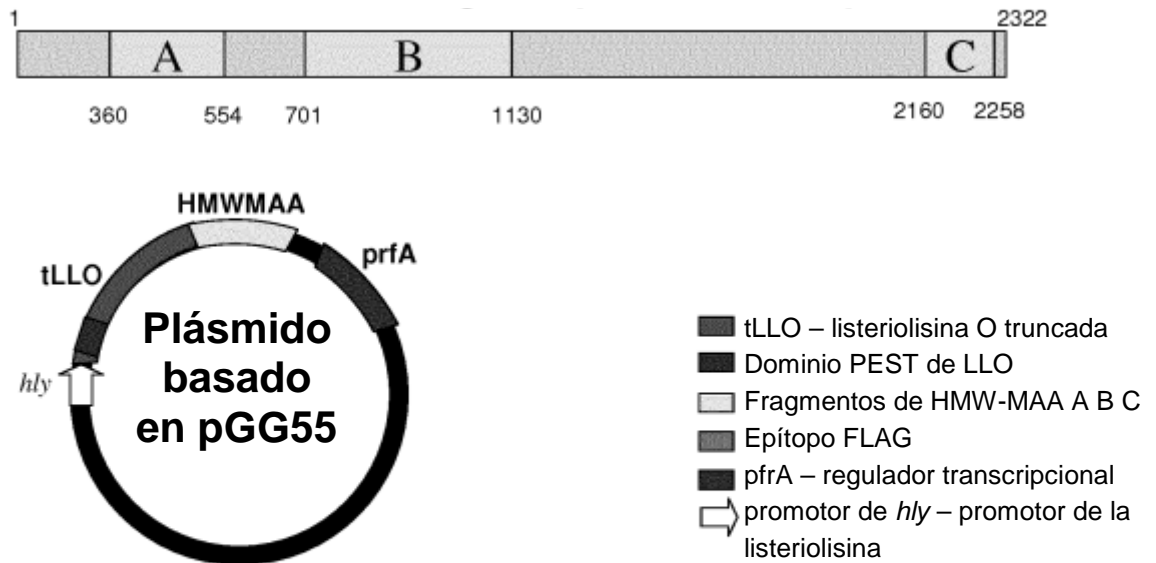
50 <400> 45  
**Leu Ile Leu Pro Leu Leu Phe Tyr Leu**  
 1 5

55

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Uso de un polipéptido recombinante que comprende (i) un fragmento de una proteína del Antígeno Asociado a Melanoma de Alto Peso Molecular (HMW-MAA) codificado por una secuencia de nucleótidos seleccionada de las secs. con núms. de ident.: 21, 22, o 23, y (ii) una secuencia PEST de *Listeria*, o una *Listeria* recombinante que comprende dicho polipéptido recombinante, para la preparación de una composición para inducir una respuesta inmunitaria contra un cáncer o tumor que no expresa HMW-MAA o para retrasar la progresión de un cáncer o tumor que no expresa HMW-MAA.
- 10 2. El uso de acuerdo con la reivindicación 1 en donde el cáncer o tumor es un cáncer o tumor renal o de la piel.
- 15 3. Uso de un polipéptido recombinante que comprende (i) un fragmento de una proteína del Antígeno Asociado a Melanoma de Alto Peso Molecular (HMW-MAA) codificado por una secuencia de nucleótidos seleccionada de las secs. con núms. de ident.: 21, 22, o 23, y (ii) una secuencia PEST de *Listeria*, o una *Listeria* recombinante que comprende dicho polipéptido recombinante, para la preparación de una composición para inducir una respuesta inmunitaria contra un cáncer o tumor renal o de la piel o para retrasar la progresión de un cáncer o tumor renal o de la piel.
- 20 4. El uso de acuerdo con la reivindicación 3, en donde el cáncer o tumor renal o de la piel no expresan HMW-MAA.
- 25 5. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-4 en donde el cáncer o tumor es un cáncer o tumor sólido, y la composición induce una respuesta inmunitaria contra un pericito de la vasculatura de dicho cáncer o tumor.
- 30 6. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde el cáncer o tumor de la piel es un melanoma.
- 35 7. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde la secuencia PEST está comprendida en un oligopéptido de Listeriolisina (LLO) o un fragmento de esta, o en un oligopéptido de ActA o un fragmento de esta.
- 40 8. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde HMW-MAA es una proteína HMW-MAA humana.
- 45 9. Una composición que comprende un polipéptido recombinante que comprende (i) un fragmento de una proteína del Antígeno Asociado a Melanoma de Alto Peso Molecular (HMW-MAA) codificado por una secuencia de nucleótidos seleccionada de las secs. con núms. de ident.: 21, 22, o 23, y (ii) una secuencia PEST de *Listeria*, o una *Listeria* recombinante que comprende dicho polipéptido recombinante, para usar en la inducción de una respuesta inmunitaria contra un cáncer o tumor que no expresa HMW-MAA o para usar en el retraso de la progresión de un cáncer o tumor que no expresa HMW-MAA.
- 50 10. La composición para usar de acuerdo con la reivindicación 9, en donde el cáncer o tumor es un cáncer o tumor renal o de la piel.
- 55 11. Una composición que comprende un polipéptido recombinante que comprende (i) un fragmento de una proteína del Antígeno Asociado a Melanoma de Alto Peso Molecular (HMW-MAA) codificado por una secuencia de nucleótidos seleccionada de las secs. con núms. de ident.: 21, 22, o 23, y (ii) una secuencia PEST de *Listeria*, o una *Listeria* recombinante que comprende dicho polipéptido recombinante, para usar en la inducción de una respuesta inmunitaria contra un cáncer o tumor renal o de la piel o para usar en el retraso de la progresión de un cáncer o tumor renal o de la piel.
- 60 12. La composición para usar de acuerdo con la reivindicación 11, en donde el cáncer o tumor renal o de la piel no expresan HMW-MAA.
- 65 13. La composición para usar de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 9-12 en donde el cáncer o tumor es un cáncer o tumor sólido, y la composición induce una respuesta inmunitaria contra un pericito de la vasculatura de dicho cáncer o tumor.
14. La composición para usar de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 9-12, en donde el cáncer o tumor de la piel es un melanoma.
15. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-8, o la composición para usar de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 9-14, en donde la composición es una vacuna que comprende, además, un adyuvante, una citocina, una quimiocina, o combinación de estos.

### Clonación de HMW-MAA en un plásmido basado en pGG55



Transformación de *L. monocytogenes*  
 (la cepa *prfA*<sup>-</sup> XFL-7 debe retener  
*pGG55* para ser patogénica)

Figura 1

### Anti-PEST

Sobrenadantes de *L. monocytogenes*

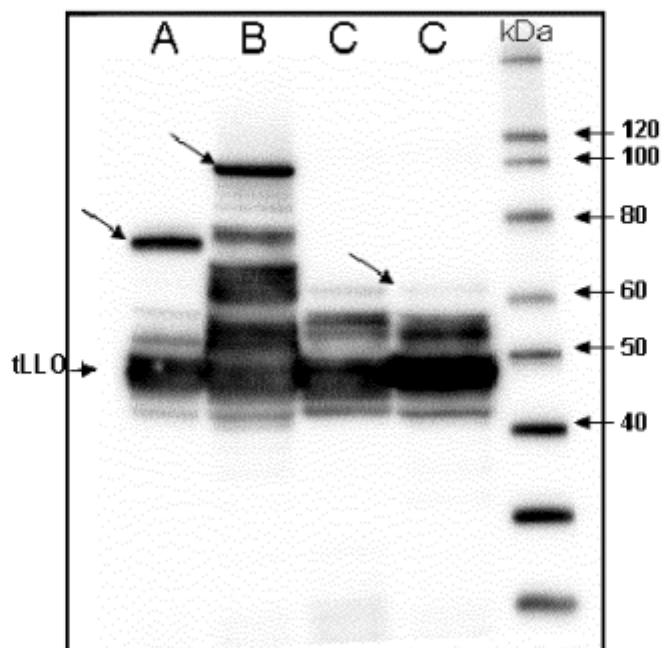


Figura 2A

## Anti-LLO

Sobrenadantes de *L. monocytogenes*

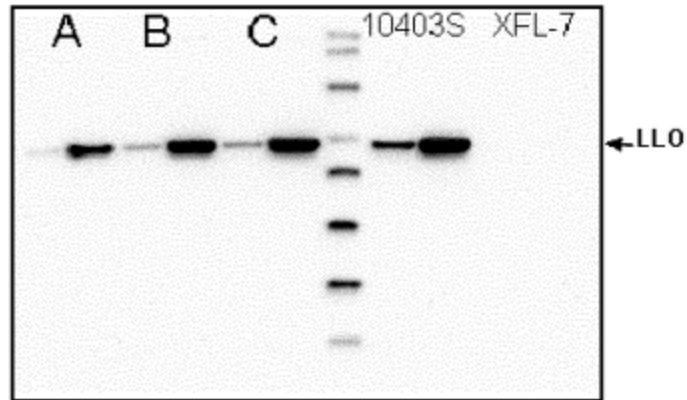


Figura 2B

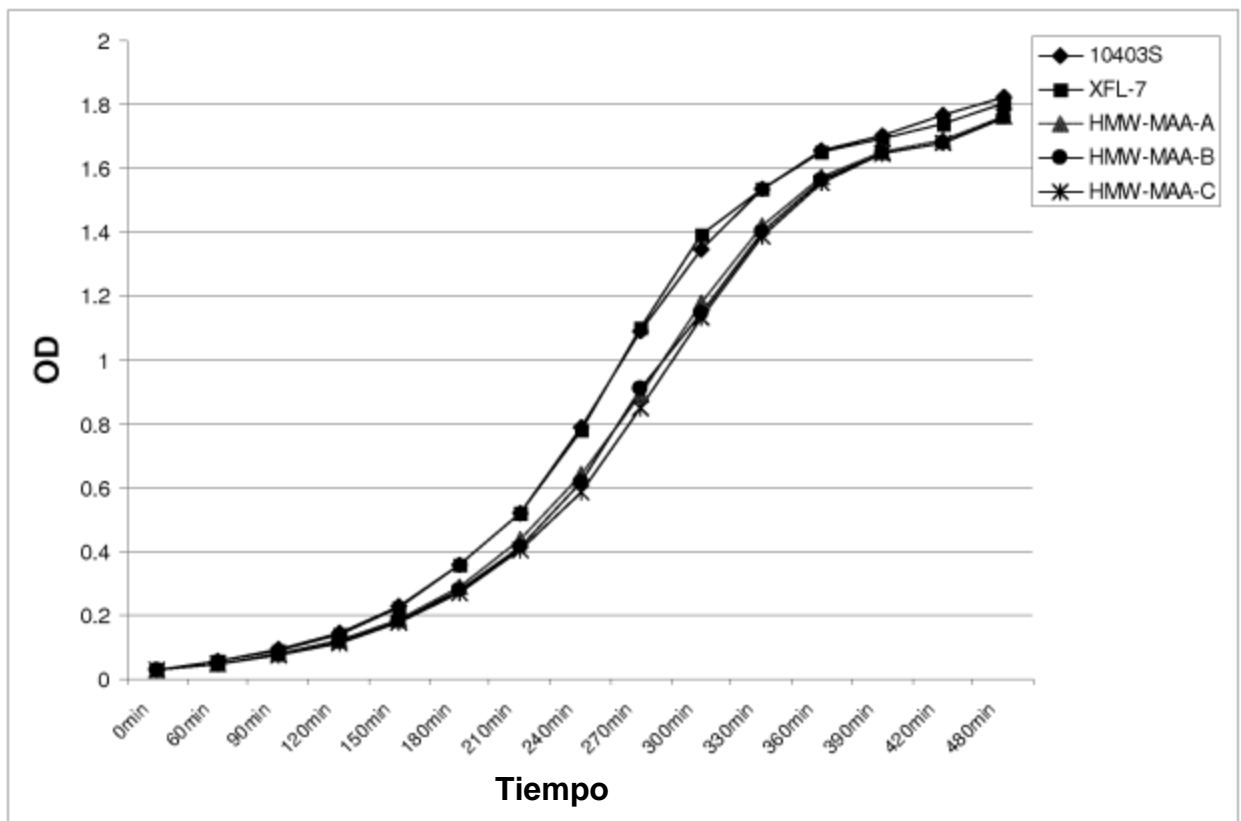


Figura 3A

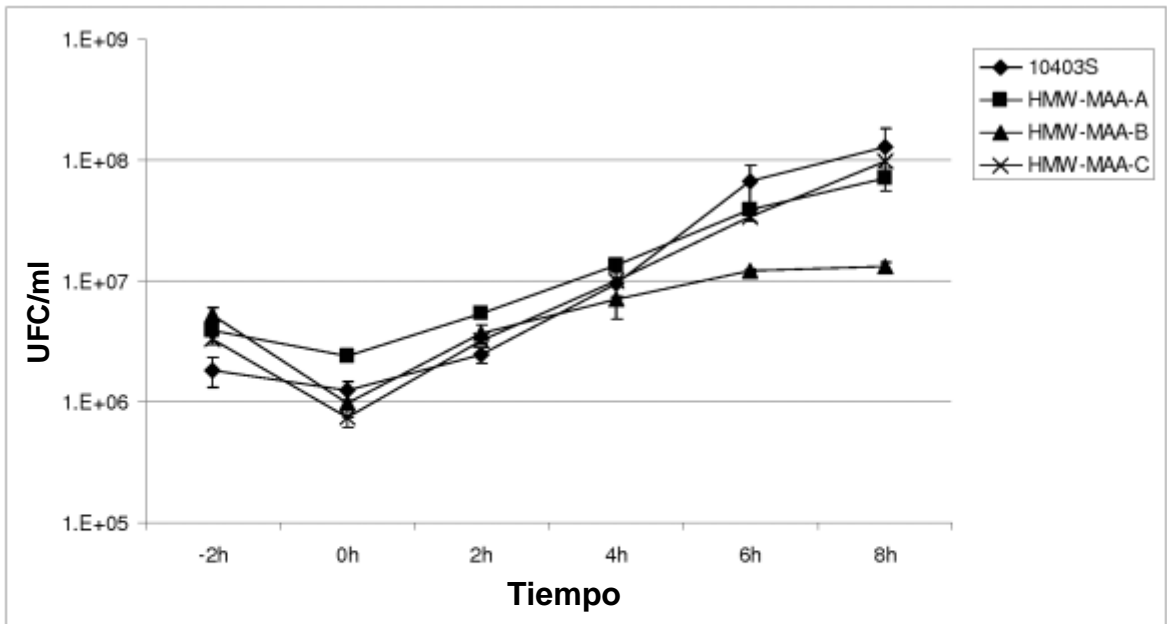


Figura 3B

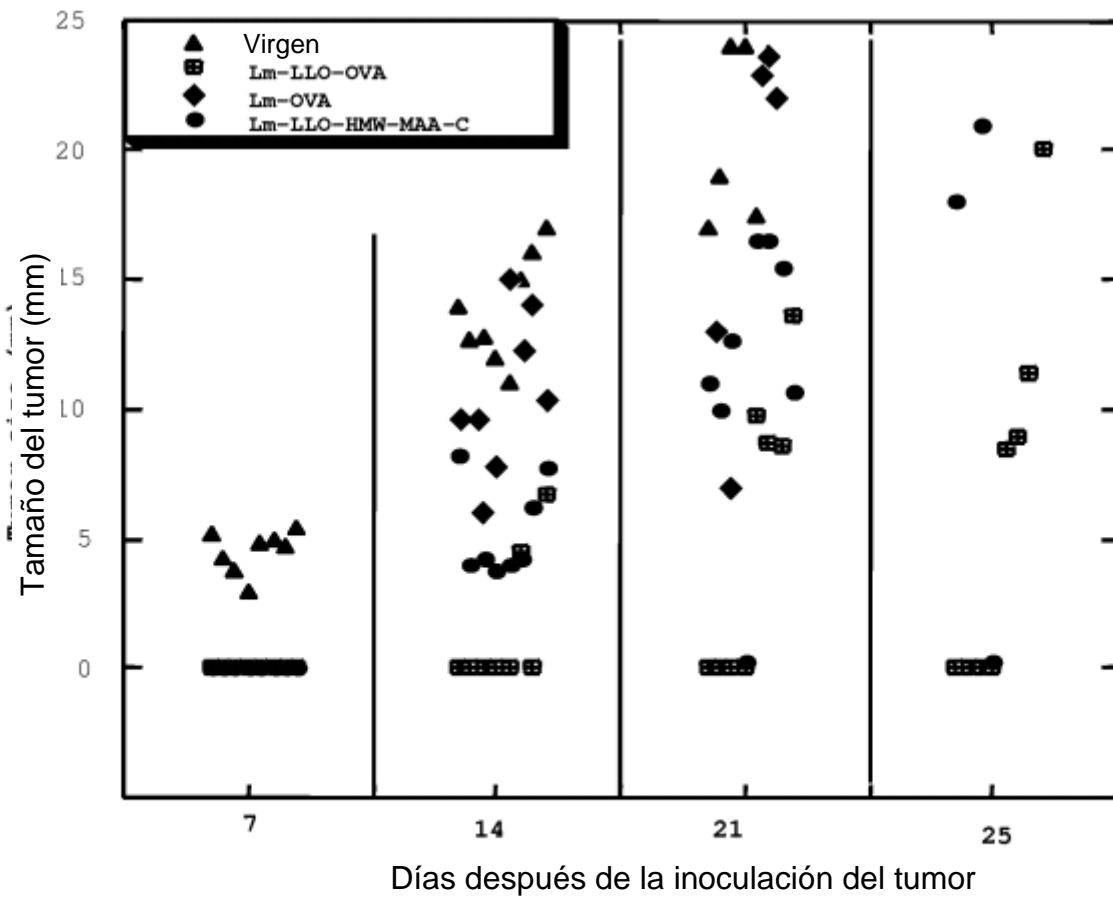


Figura 4A

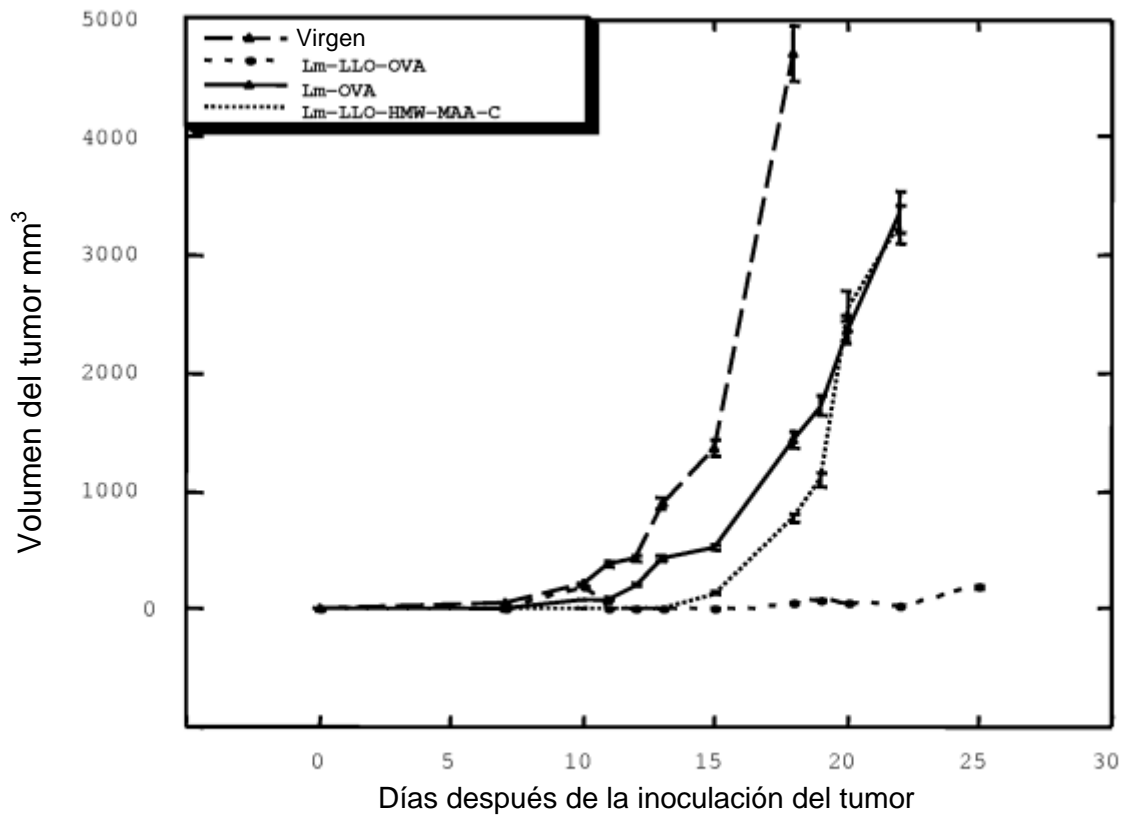


Figura 4B

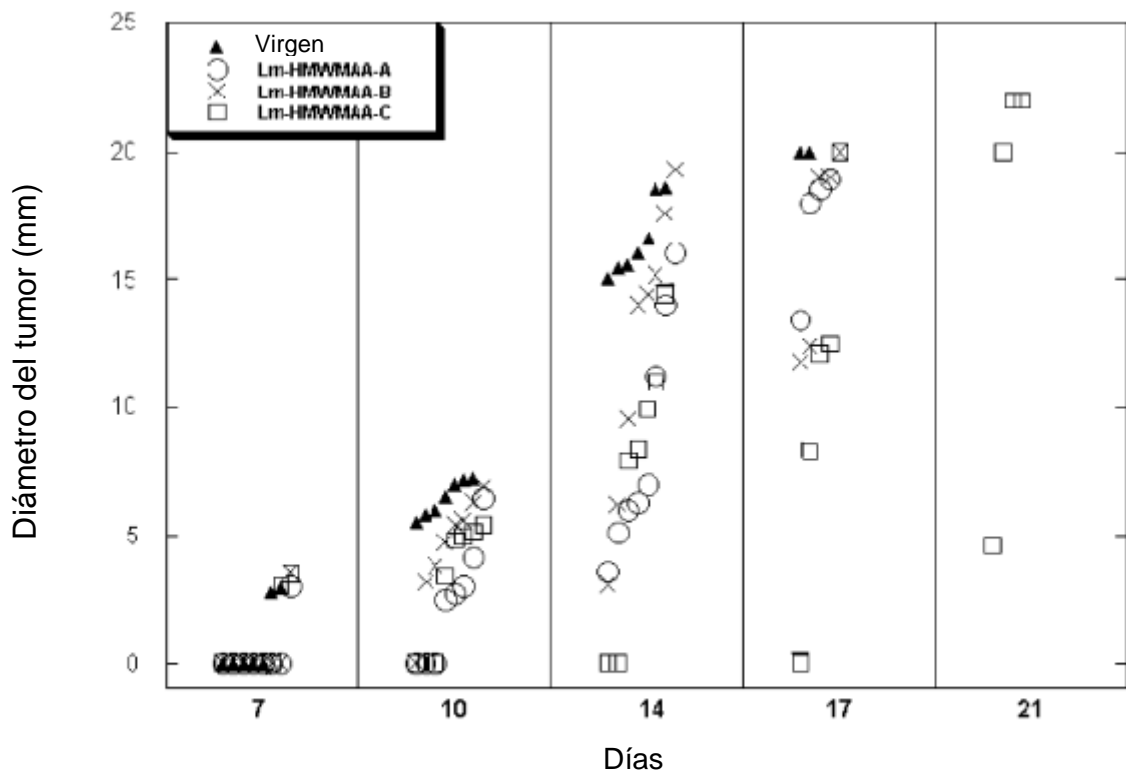


Figura 4C

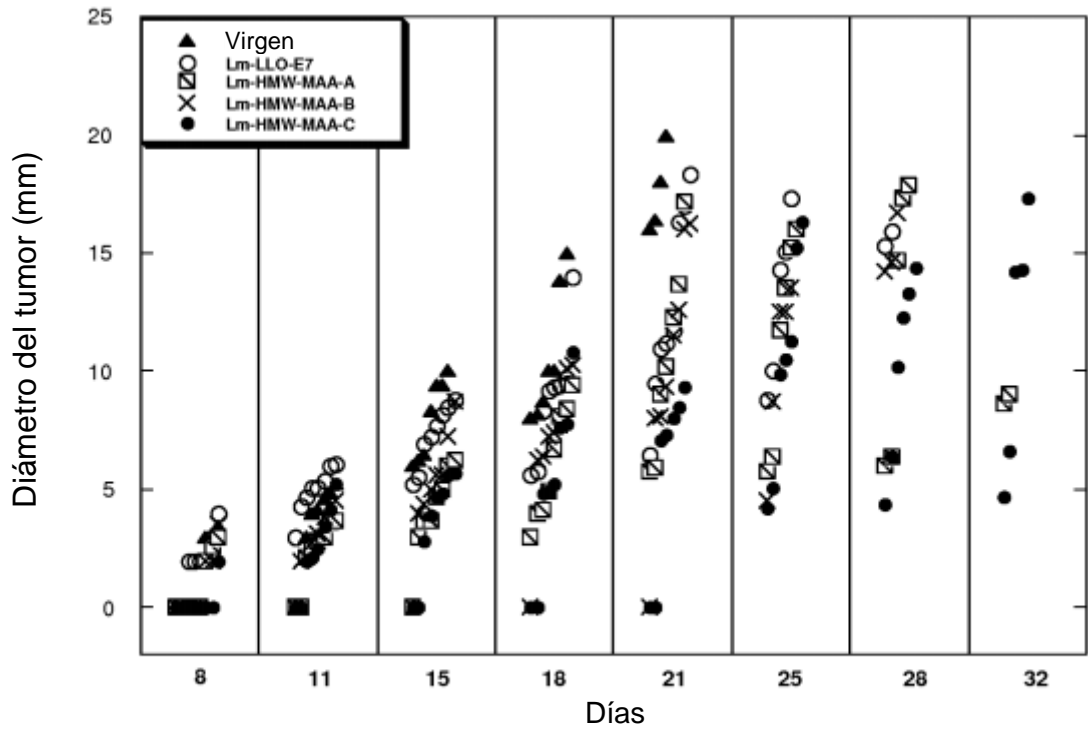


Figura 4D

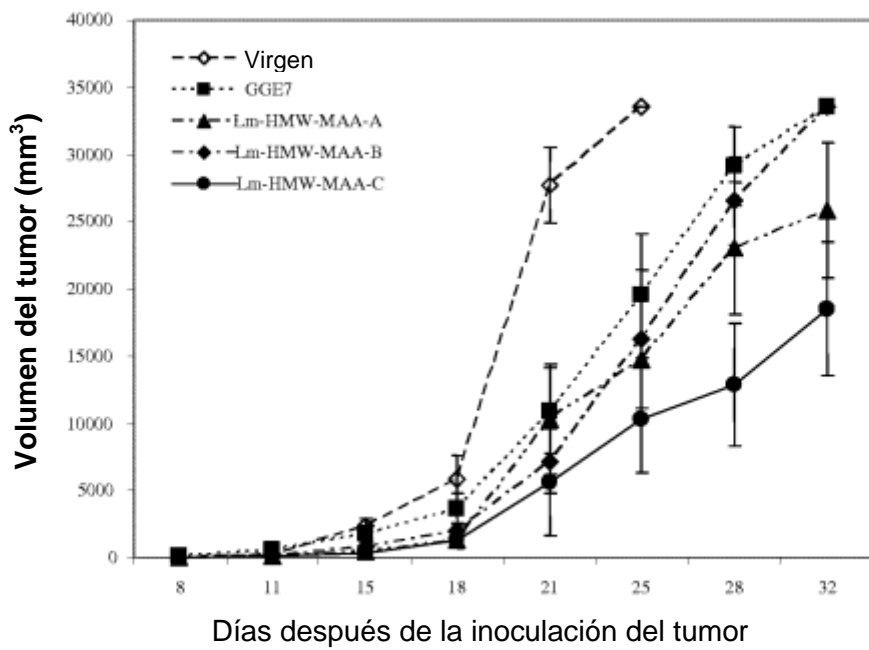


Figura 4E

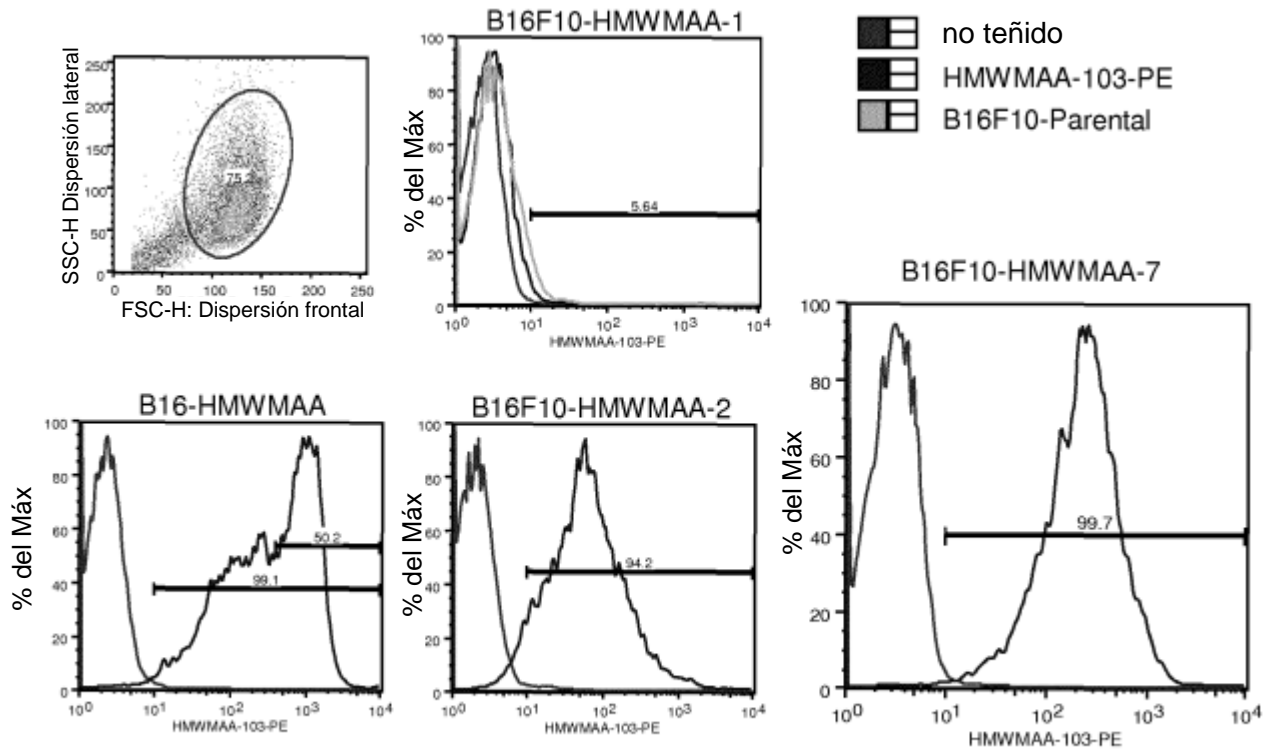


Figura 5

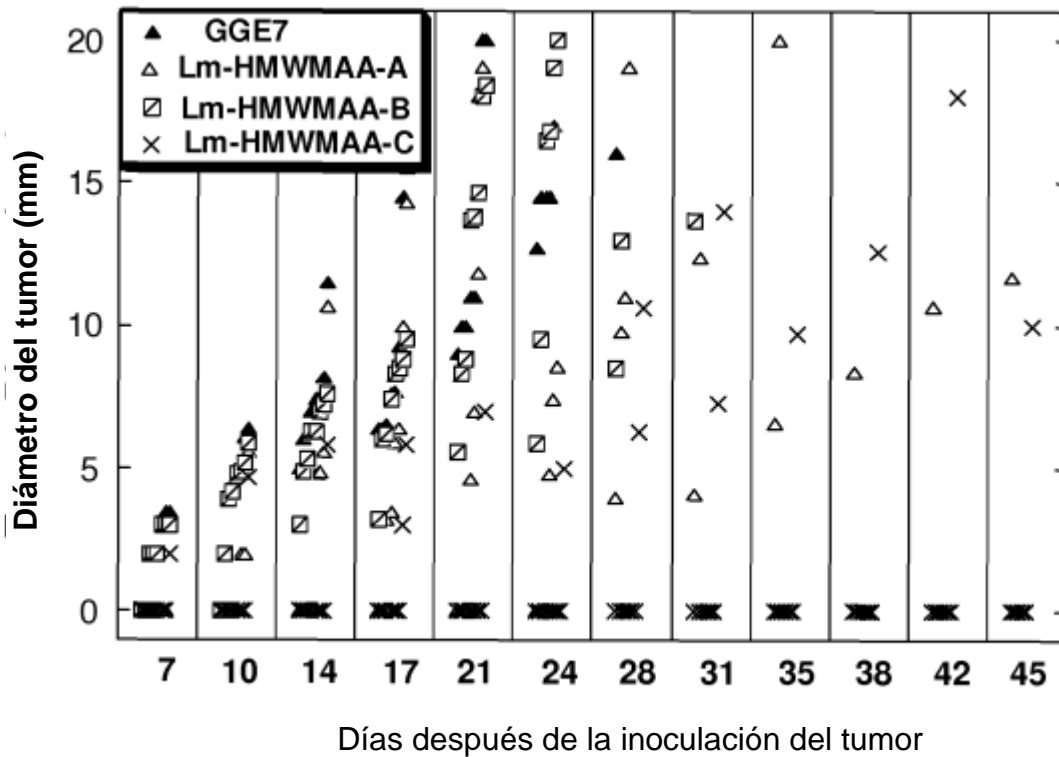


Figura 6

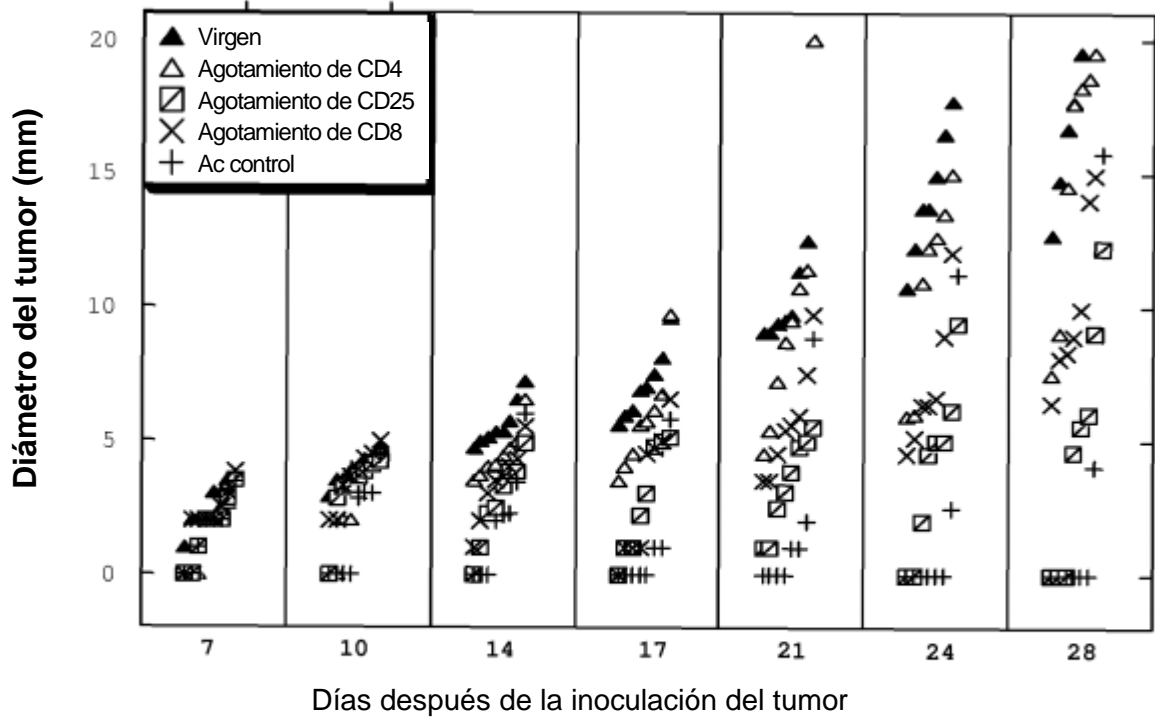


Figura 7

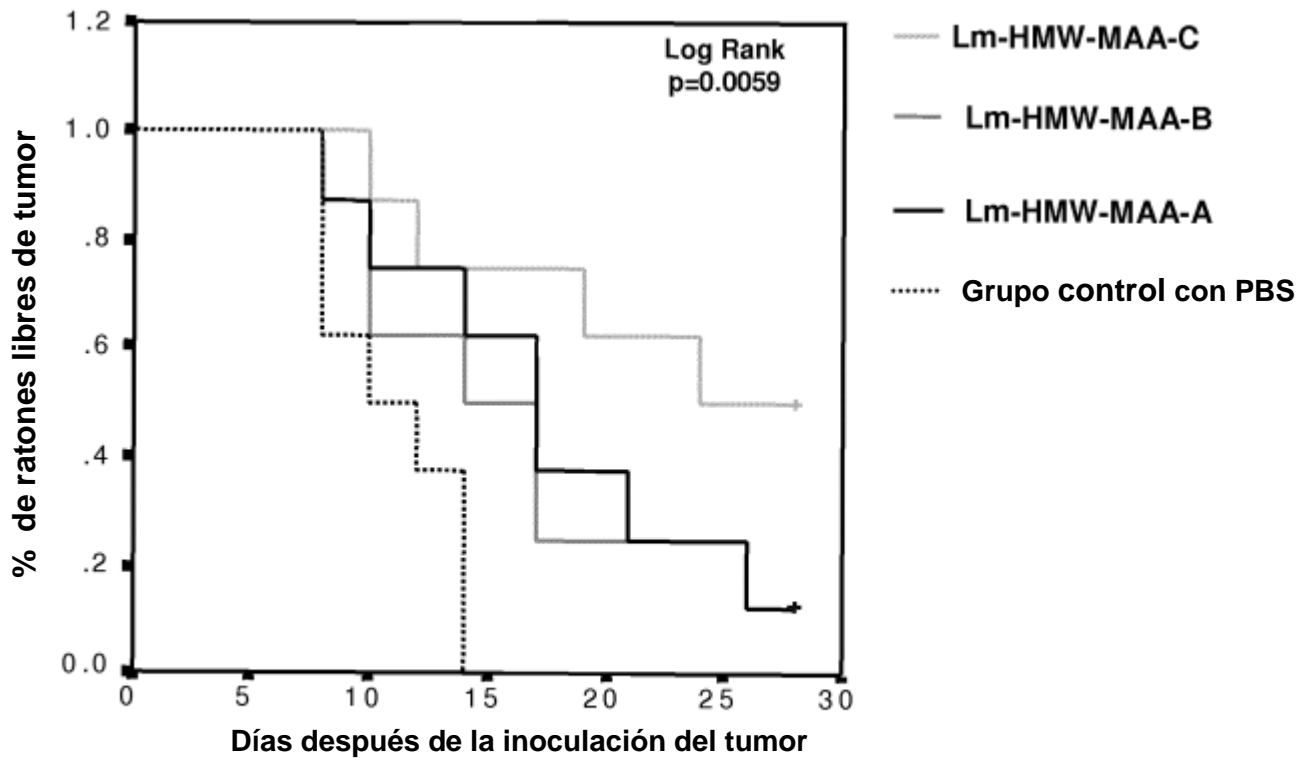


Figura 8

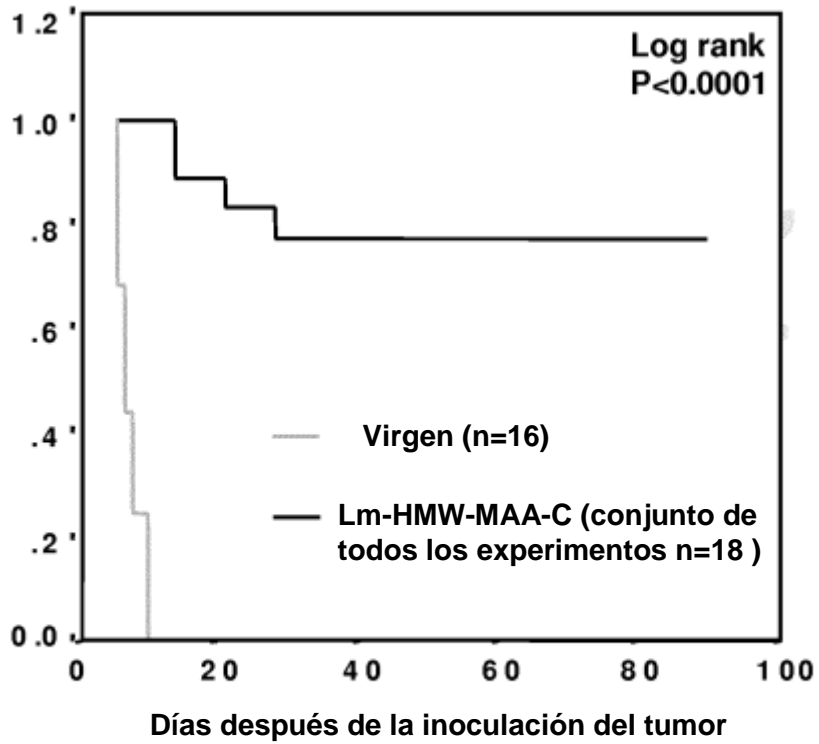


Figura 9

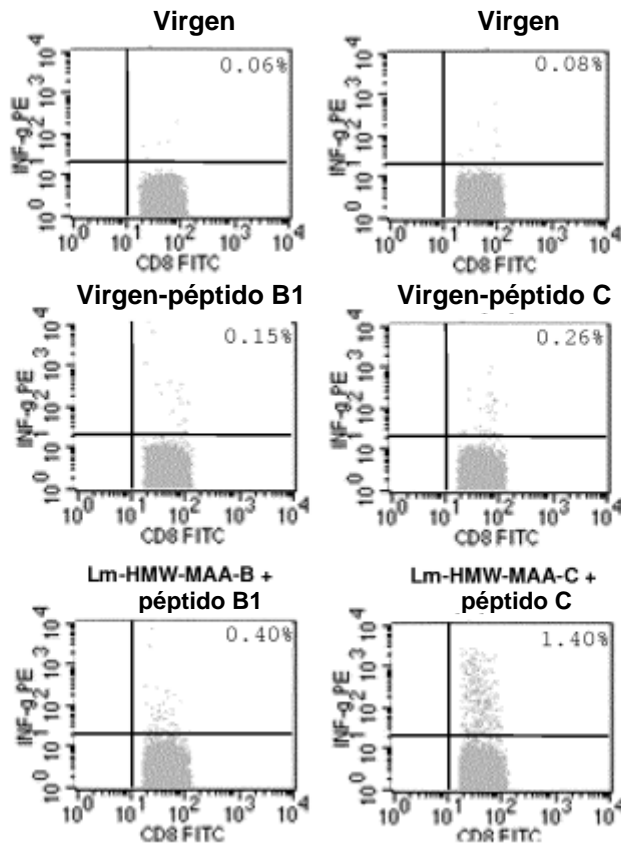


Figura 10A

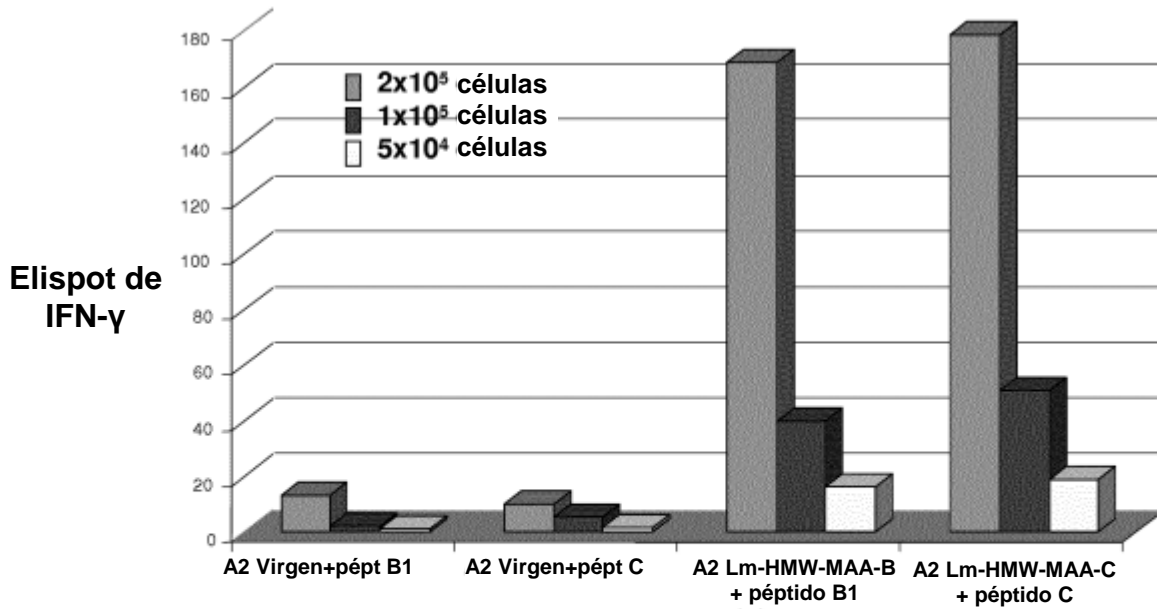


Figura 10B

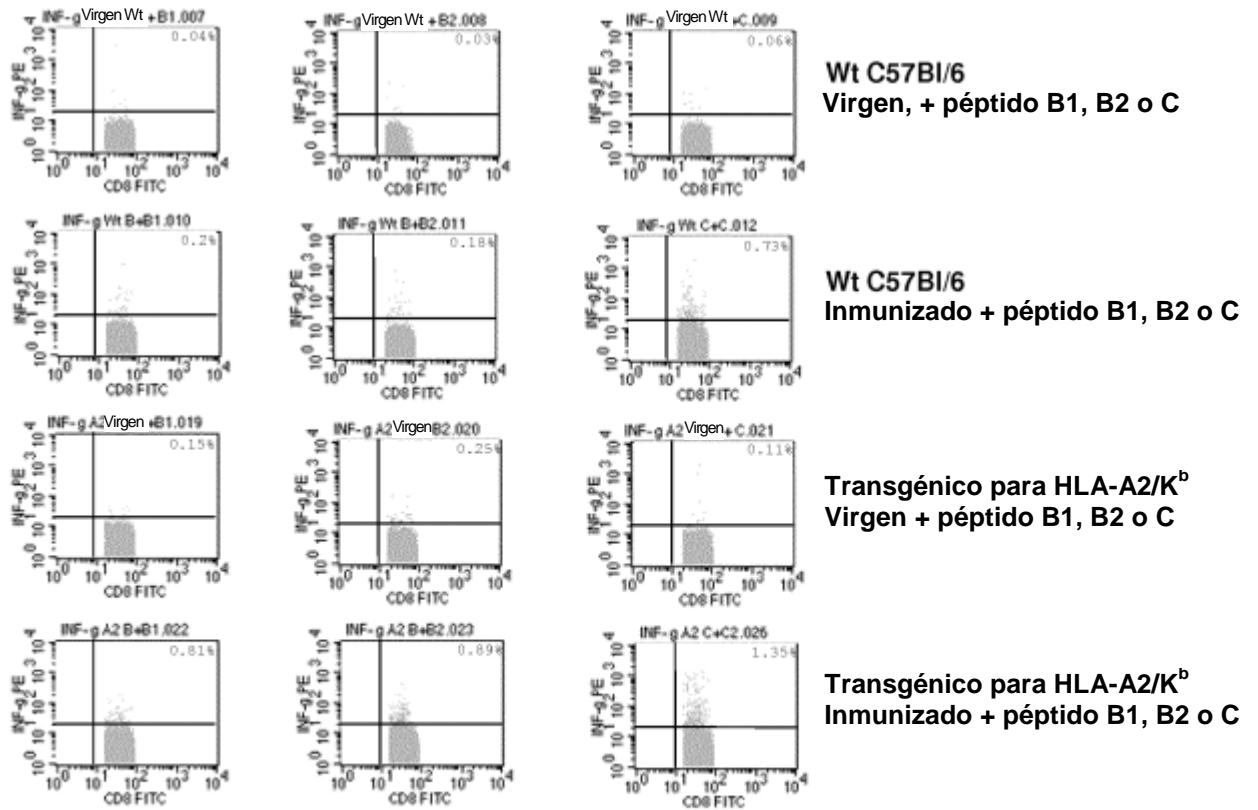


Figura 11A

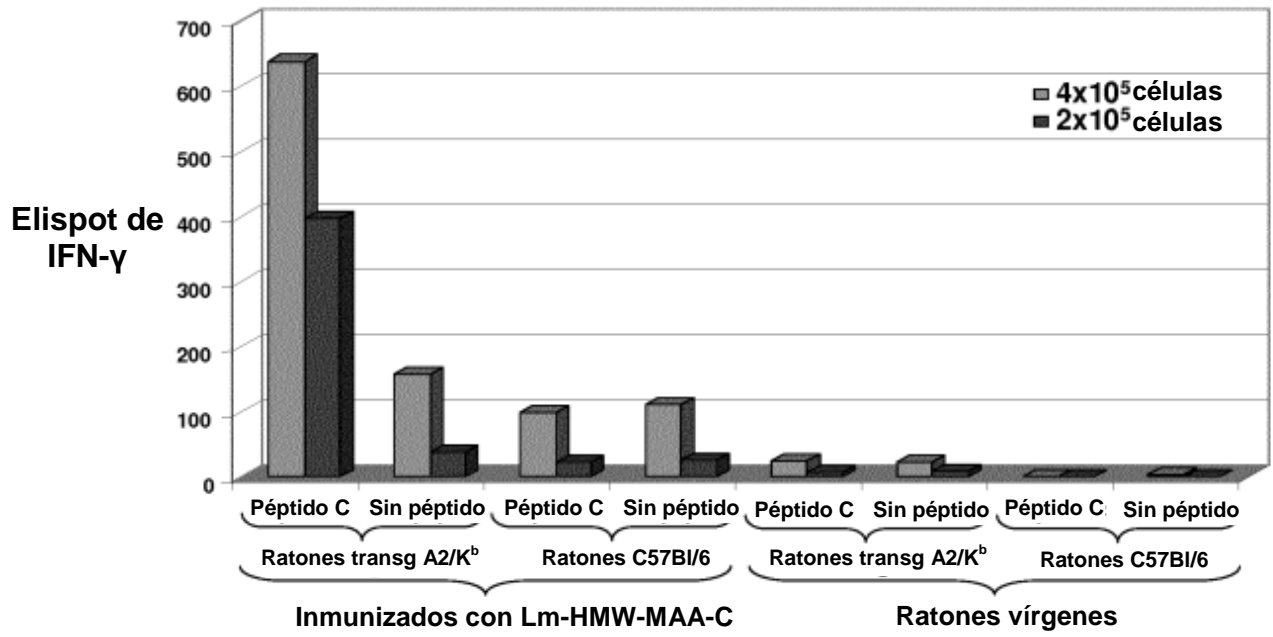


Figura 11B

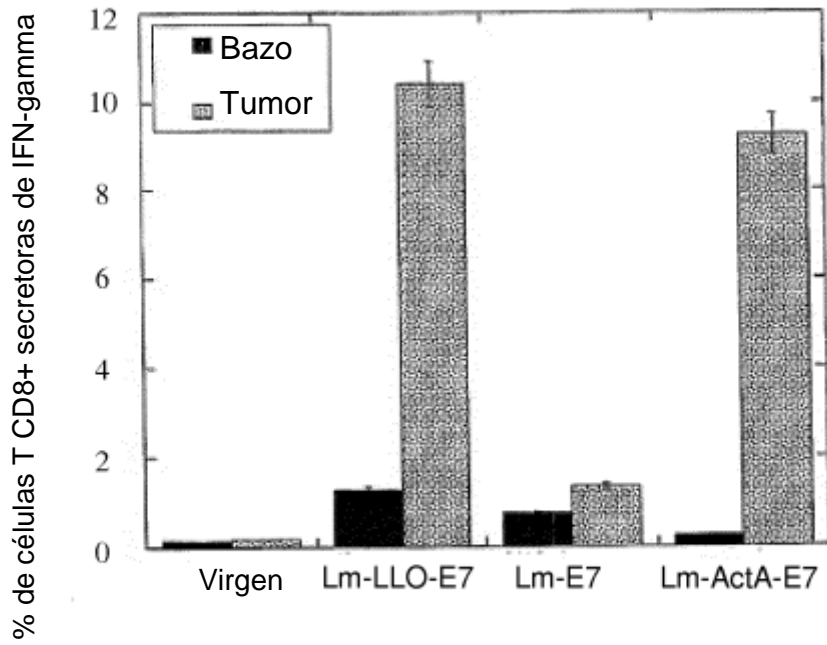


Figura 12

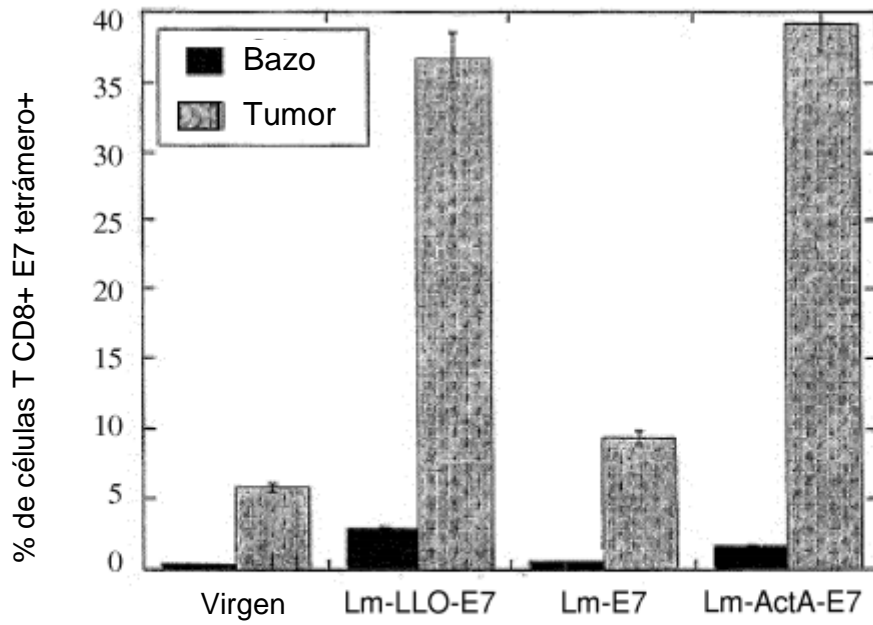


Figura 13

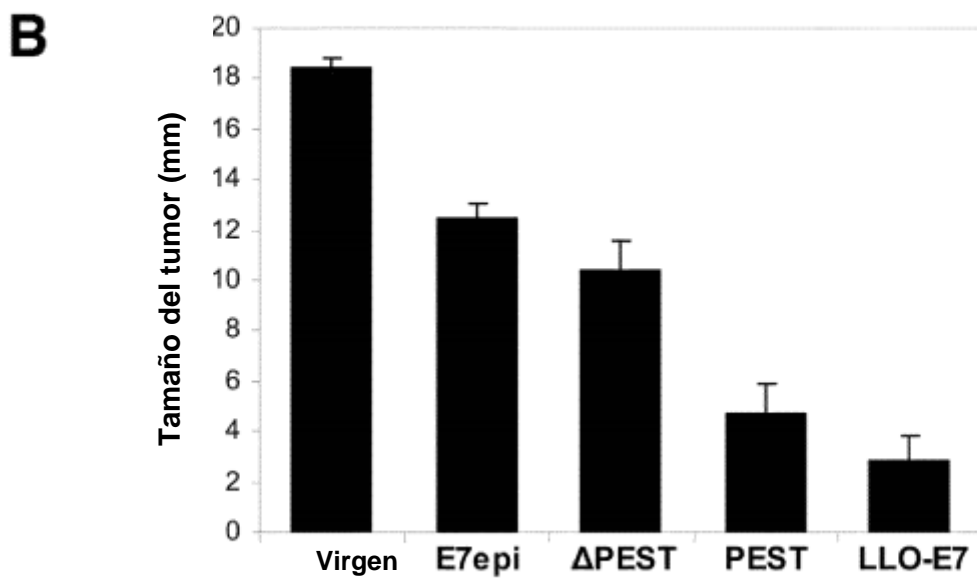
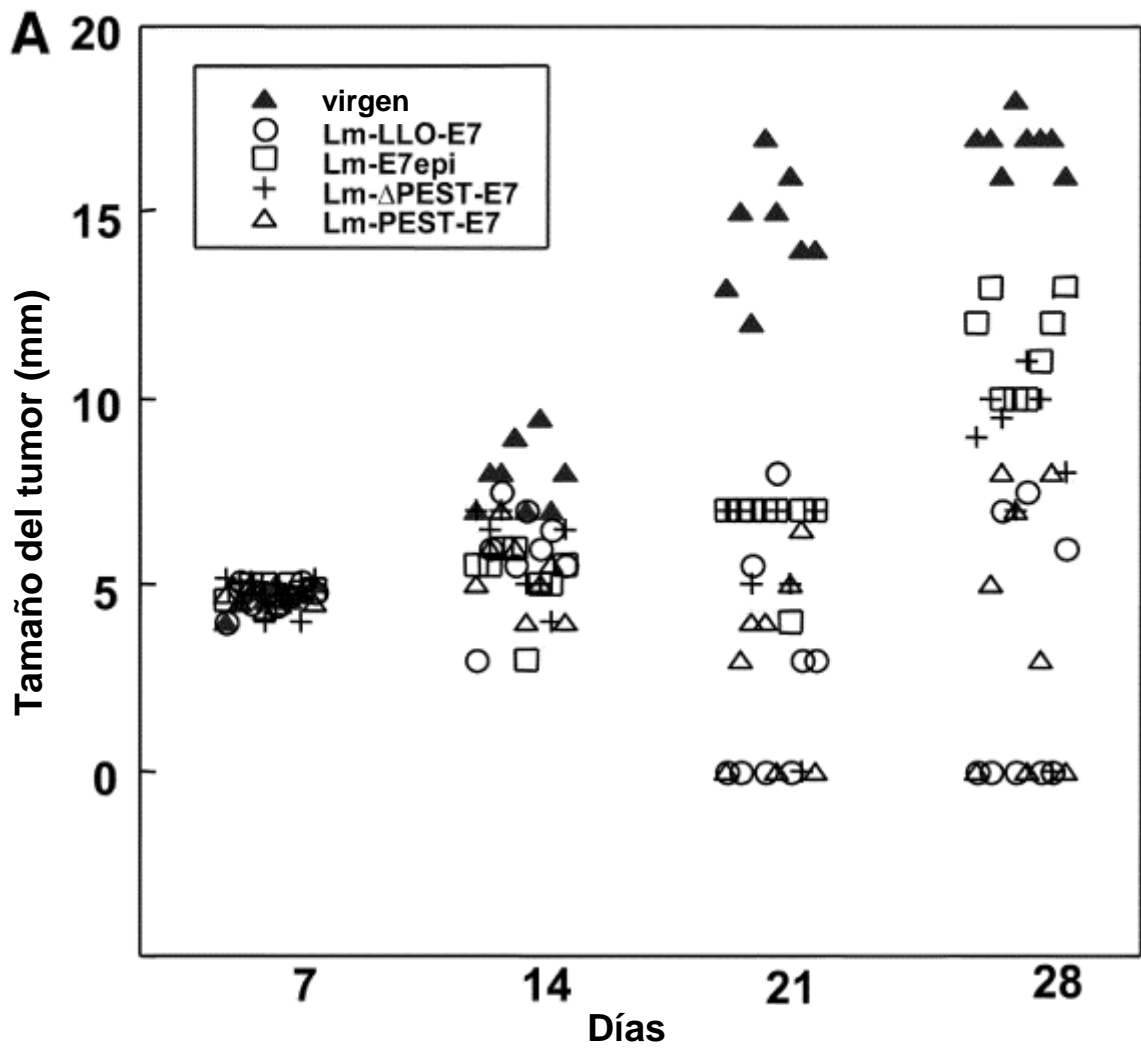


Figura 14

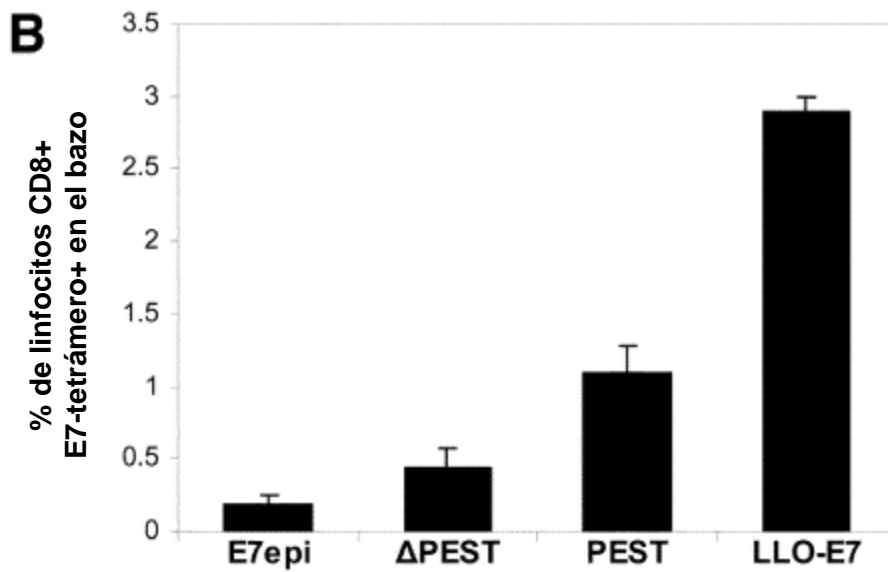
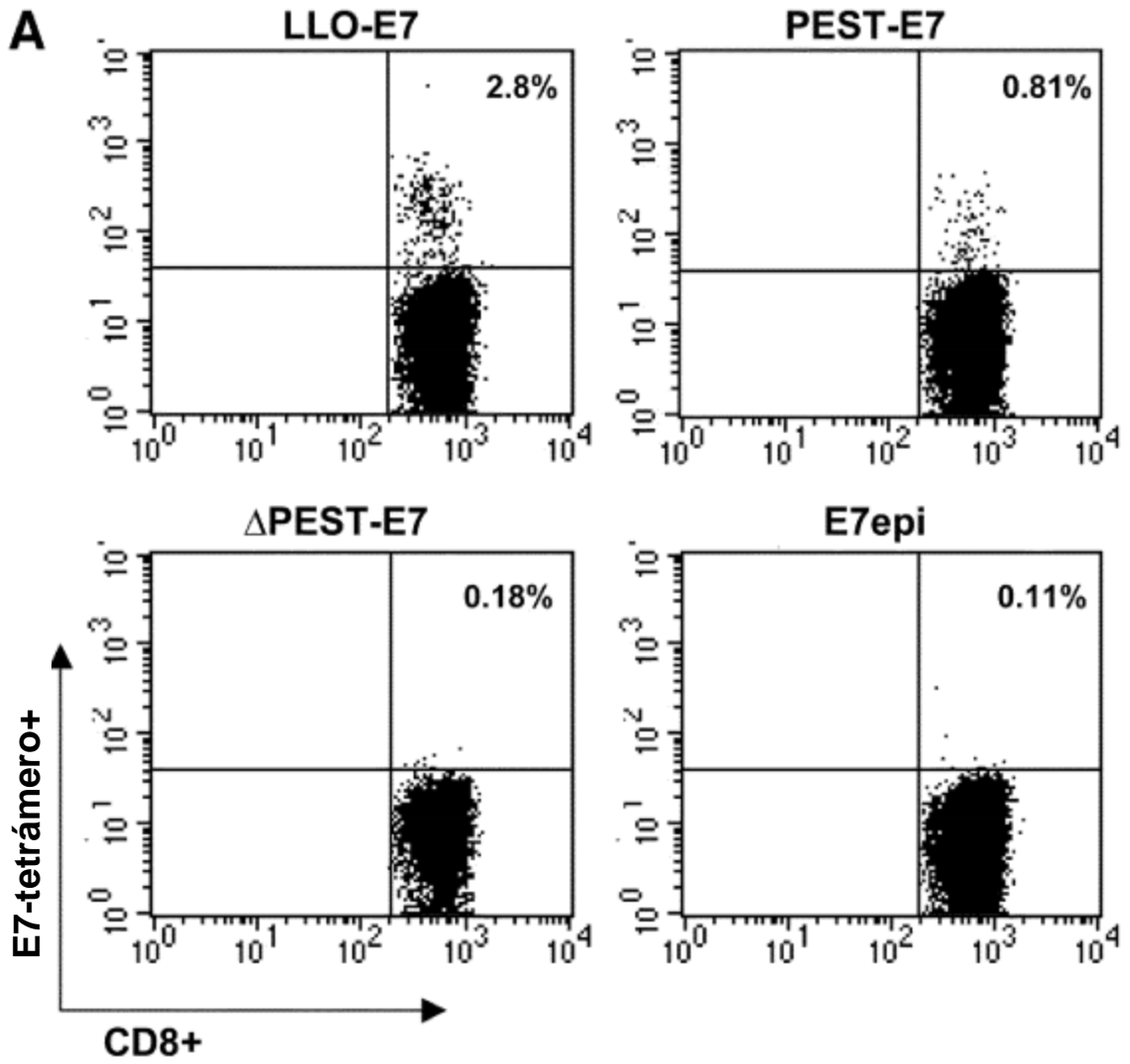


Figura 15

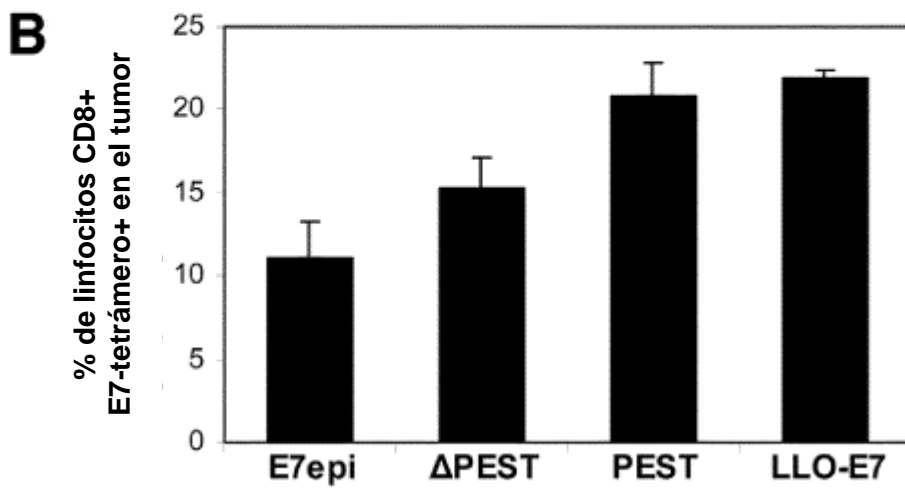
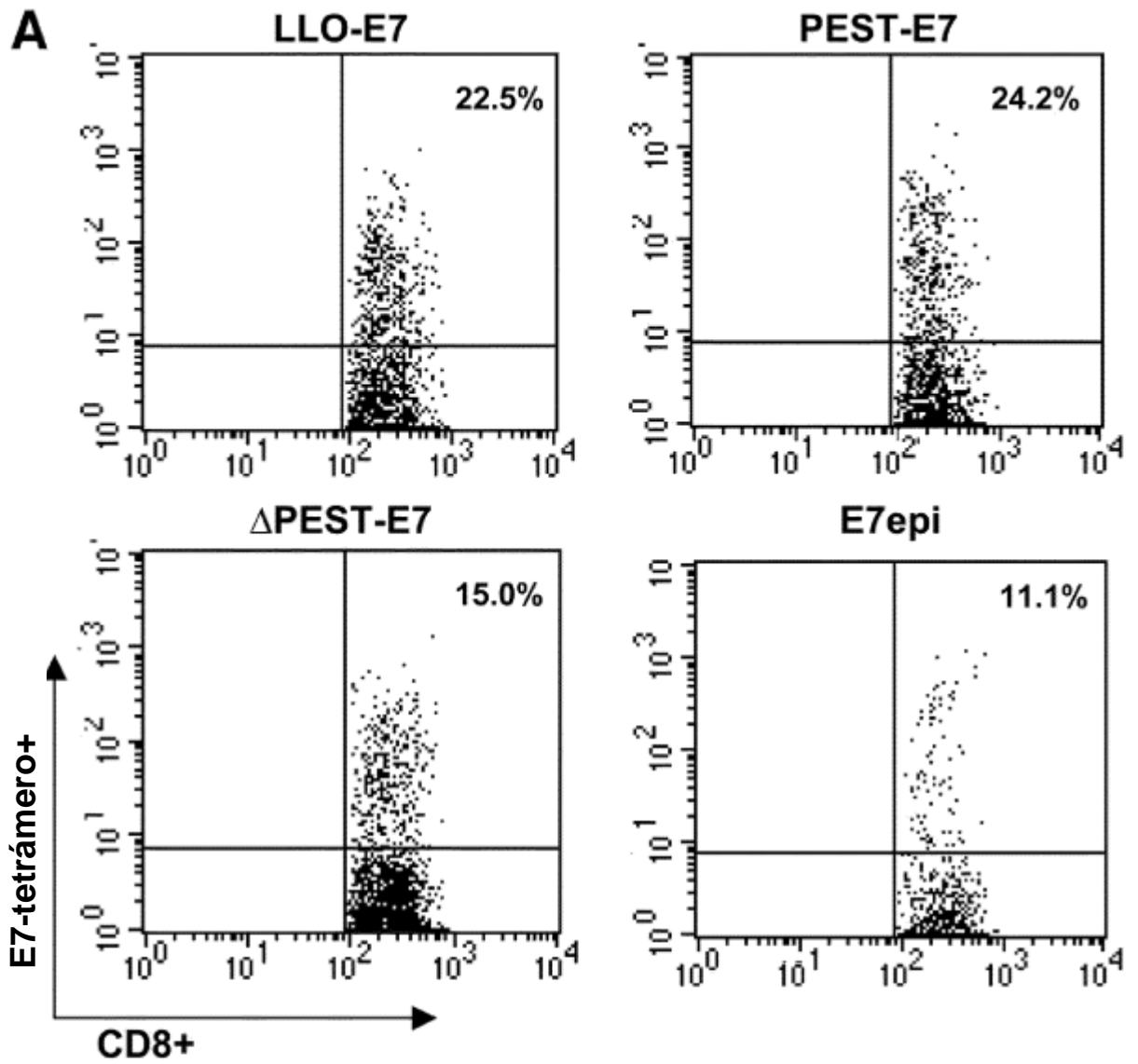


Figura 16

**CONSTRUCCIONES DEL VIRUS DE VACCINIA QUE EXPRESAN  
DIFERENTES FORMAS DE LA PROTEÍNA E7 DE HPV16**

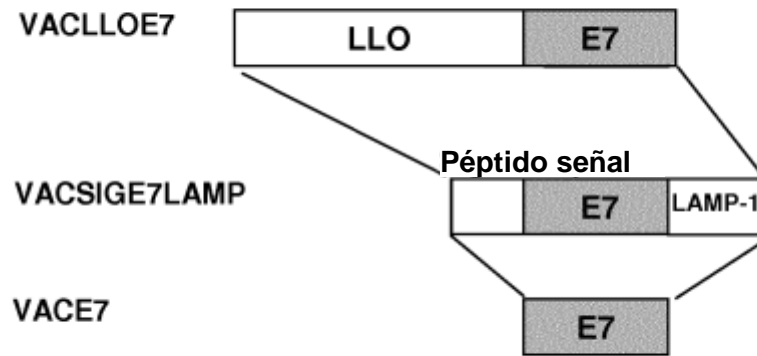


Figura 17

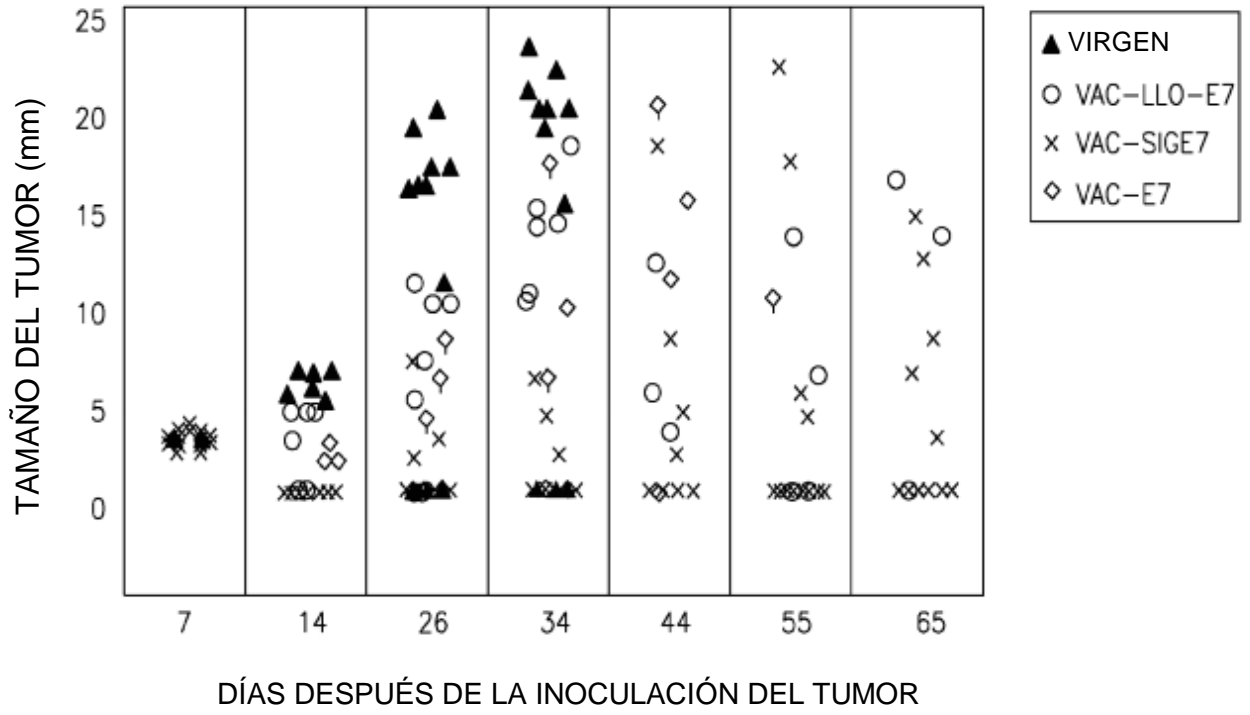


Figura 18