

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 382 332**

51 Int. Cl.:
A61K 39/02 (2006.01)
C12N 1/21 (2006.01)
C12N 15/00 (2006.01)
A61P 31/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **04749316 .8**
96 Fecha de presentación: **06.02.2004**
97 Número de publicación de la solicitud: **1592441**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **09.11.2005**

54 Título: **Listeria atenuada para entrar en células no fagocíticas, vacunas que comprenden esta listeria y métodos de uso de las mismas**

30 Prioridad:
06.02.2003 US 446051 P
21.02.2003 US 449153 P
24.07.2003 US 490089 P
15.10.2003 US 511719 P
15.10.2003 US 511919 P
15.10.2003 US 511869 P
02.02.2004 US 541515 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
07.06.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
07.06.2012

73 Titular/es:
ADURO BIOTECH
626 BANKCROFT WAY, SUITE 3C
BERKELEY, CALIFORNIA 94710-2225, US

72 Inventor/es:
DUBENSKY, Thomas, W., Jr.;
BROCKSTEDT, Dirk, G. y
COOK, David

74 Agente/Representante:
de Elzaburu Márquez, Alberto

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).

ES 2 382 332 T3

DESCRIPCIÓN

Listeria atenuada para entrar en células no fagocíticas, vacunas que comprenden esta listeria y métodos de uso de las mismas.

CAMPO DE LA INVENCIÓN

- 5 El campo de esta invención se refiere de forma general a las bacterias atenuadas para uso en vacunas. En particular, esta invención se refiere a *Listeria monocytogenes* atenuada útil para las composiciones de vacuna y para los métodos en los que se utilizan estas vacunas para tratamiento.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

- Se han desarrollado microbios para uso como vacunas que suministran antígenos heterólogos. El suministro de antígenos heterólogos se consigue mediante microorganismos que se han modificado para que contengan secuencias de ácido nucleico que codifican una proteína o antígeno que procede de una especie diferente. La administración de los antígenos heterólogos es especialmente ventajosa para tratar o prevenir enfermedades o afecciones que son resultado de fuentes especialmente virulentas o letales, tal como cáncer y microorganismos patógenos (por ejemplo, VIH o la hepatitis B). La inyección de un agente infeccioso nativo o virulento es posiblemente perjudicial para el organismo receptor. Así mismo, una célula cancerosa que aparece esporádicamente en un individuo afectado puede posteriormente propagarse y así mismo puede ser posiblemente perjudicial para el organismo receptor. La administración de los antígenos heterólogos es también especialmente ventajosa cuando la administración de un agente o célula atenuado o muerto se ha comprobado que no resulta exitosa a la hora de desencadenar una respuesta inmunitaria eficaz o cuando no se puede garantizar con una certeza aceptable la atenuación suficiente del agente infeccioso ni de la célula cancerosa. Recientemente se han desarrollado determinadas cepas bacterianas que sirven de vacunas recombinantes. Por ejemplo, se ha demostrado que una vacuna por vía oral de *Salmonella* atenuada modificada para que exprese el antígeno del circuesporozoito de *Plasmodium berghei* protege a los ratones contra la malaria (Aggarwal et al., 1990. *J. Exp. Med.* 172: 1083).

- Una clase de bacterias que se podría utilizar como vacunas heterólogas son las bacterias intracelulares facultativas. La respuesta inmunitaria a estas bacterias puede ser una respuesta humoral, una respuesta celular, o ambas. Sin embargo, las bacterias intracelulares muertas o los componentes de las bacterias intracelulares podrían no desencadenar una respuesta inmunitaria celular completa (Lauvau et al., 2001, *Science*, 294: 1735-9). Estas bacterias pueden pasar parte de su ciclo de vida libre en el aparato circulatorio o el sistema linfático de su hospedador, donde se someten a las respuestas innatas y de anticuerpos (a saber, humoral) del sistema inmunitario del hospedador.

- Las bacterias intracelulares facultativas también pueden pasar parte de su ciclo de vida aisladas dentro de las células del hospedador, donde pueden protegerse de los aspectos innato y humoral del sistema inmunitario del huésped y pueden ser susceptibles a las respuestas mediadas por la célula del sistema inmunitario del hospedador. Una respuesta inmunitaria mediada por células es una respuesta inmunitaria que estimula los linfocitos T efectores, que a su vez se pueden convertir en linfocitos T de memoria (efectores o centrales). Una respuesta inmunitaria mediada por células es resultado de la presentación de los antígenos sobre la superficie de las células hospedadoras. Las células fagocíticas del sistema inmunitario del hospedador son capaces de engullir bacterias vivas, bacterias muertas o componentes de las bacterias en los lisosomas, que se maduran a fagolisosomas y degradan los antígenos proteicos a péptidos. Los péptidos de los antígenos contenidos dentro de los fagolisosomas de las células fagocíticas pueden presentarse sobre la superficie de estas células fagocíticas mediante las moléculas del CMH de clase II para el reconocimiento por los linfocitos T CD4+ y la activación de una respuesta de linfocitos T cooperadores. Los péptidos de los antígenos expresados en el citosol de cualquier célula en el cuerpo de un mamífero pueden presentarse en la superficie de esa célula mediante las moléculas del CMH de clase I para el reconocimiento por los linfocitos T CD8+ y la activación de una respuesta de linfocitos T citotóxicos (LTC). No obstante, las bacterias intracelulares muertas o los componentes de las bacterias intracelulares pueden no invadir las células no fagocíticas o pueden no escapar del fagolisosoma de una célula fagocítica en el citosol, lo que da lugar a la activación y a la maduración de las células fagocíticas, por ejemplo, macrófagos y células dendríticas. Por lo tanto, los antígenos de las bacterias intracelulares muertas o los componentes de las bacterias intracelulares pueden no estar disponibles para la presentación directa con el CMH I y podrían no activar una respuesta de LTC. La capacidad de las bacterias intracelulares para producir proteínas dentro de los fagolisosomas y/o citosol del hospedador puede ser necesaria para desencadenar una respuesta inmunitaria celular completamente eficaz.

- Recientemente se han desarrollado cepas de *Listeria monocytogenes* a modo de vehículos de suministro intracelular de proteínas heterólogas que permiten suministrar antígenos al sistema inmunitario para inducir una respuesta inmunitaria a condiciones clínicas que no permiten la inyección del agente que provoca la enfermedad, tal como el cáncer (patente de los EE.UU. n.º 6 051 237 de Paterson; patente internacional WO 99/29884; patente de los EE.UU. n.º 6 565 852) y el VIH (patente de los EE.UU. n.º 5 830 702 de Portnoy y Paterson). Como bacteria

intracelular facultativa, *L. monocytogenes* desencadena respuestas inmunitarias celulares y humores específicas de antígenos bacterianos. Después de que la bacteria *Listeria* entre en una célula del organismo hospedador, la bacteria *Listeria* produce proteínas específicas de *Listeria* que le permiten escapar del fagolisosoma de la célula hospedadora engullidora y quedarse en el citosol de esa célula. En la célula, *L. monocytogenes* prolifera y expresa las proteínas necesarias para la supervivencia, pero también expresa los genes heterólogos unidos operativamente a los promotores de *Listeria*. La presentación de péptidos de estas proteínas heterólogas sobre la superficie de la célula engullidora junto a las proteínas del CMH permite la generación de una respuesta de linfocitos T. Dado que *L. monocytogenes* es un microorganismo patógeno grampositivo de animales y de humanos que se transmite por los alimentos y que es responsable de infecciones graves en los individuos inmunocomprometidos y en las mujeres embarazadas, las cepas de estas bacterias se deben atenuar de manera que se reduzca la toxicidad para el hospedador, al mismo tiempo que se mantiene la inmunogenia de la vacuna. Esta toxicidad se debe a la invasión bacteriana de diferentes órganos y tejidos del hospedador, tal como los de hígado, bazo y sistema nervioso central. Sería beneficioso reducir los riesgos asociados al uso de *Listeria monocytogenes* a modo de vacuna sin afectar su capacidad para inducir la inmunidad celular adaptativa que sea específica del antígeno heterólogo del que porte su código y que está relacionado con determinadas enfermedades malignas e infecciosas.

BREVE RESUMEN DE LA INVENCION

La presente invención definida por las reivindicaciones da a conocer de manera general la bacteria *Listeria monocytogenes* atenuada, en particular, así como métodos para utilizar las bacterias *Listeria* en vacunas. Las vacunas son útiles para inducir respuestas inmunitarias y para el tratamiento y/o prevención de un amplio abanico de enfermedades, que incluyen el cáncer.

En un aspecto, la descripción da a conocer un aislado bacteriano de *Listeria* que tiene atenuada la entrada en las células no fagocíticas (p. ej., contiene una internalina defectuosa, tal como la internalina B) y que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica un antígeno que no es de *Listeria*. En algunas realizaciones, la bacteria tiene atenuada adicionalmente la diseminación de una célula a otra (p. ej., es defectuosa con respecto a ActA). La bacteria *Listeria* atenuada pertenece a la especie *Listeria monocytogenes*. La bacteria *Listeria* atenuada es una cepa mutante de *Listeria*. También se da a conocer una composición inmunógena que comprende la bacteria *Listeria*, que es una vacuna que comprende la bacteria y un vehículo farmacéuticamente aceptable y/o un adyuvante. Además, también se dan a conocer métodos para inducir en un hospedador una respuesta inmunitaria contra un antígeno que no es de *Listeria* que comprende administrar al hospedador una cantidad eficaz de una composición que comprende la bacteria *Listeria* atenuada y métodos para prevenir o tratar una enfermedad en un hospedador (tal como cáncer o una enfermedad infecciosa), que comprende administrar al hospedador una cantidad eficaz de una composición que comprende la bacteria *Listeria* atenuada. También se da a conocer un aislado de célula presentadora de antígeno profesional que comprende la bacteria *Listeria* atenuada.

En otro aspecto, la descripción da a conocer un aislado bacteriano de *Listeria* que tiene atenuada tanto la entrada en las células no fagocíticas (p. ej., contiene una internalina defectuosa, tal como la internalina B) como la diseminación de una célula a otra (p. ej., contiene una ActA defectuosa). La bacteria *Listeria* atenuada es una cepa mutante de *Listeria*. En algunas realizaciones, el ácido nucleico de la bacteria *Listeria* se ha modificado con un compuesto que actúa selectivamente sobre el ácido nucleico, por lo que la bacteria tiene atenuada la diseminación de una célula a otra. La bacteria *Listeria* atenuada comprende al menos una mutación de delección tanto en el gen *inlB* como en el gen *actA*. La bacteria *Listeria* atenuada es la cepa de *Listeria monocytogenes* $\Delta actA \Delta inlB$ (que alternativamente se denomina cepa de *Listeria monocytogenes* $actA^- inlB^-$) depositada en la American Type Culture Collection (ATCC) e identificada con el número de acceso PTA-5562, o un mutante de la cepa depositada que es defectuosa con respecto a la internalina B y a la ActA. La bacteria *Listeria* atenuada comprende una molécula de ácido nucleico que codifica un antígeno que no es de *Listeria*. La bacteria *Listeria* atenuada pertenece a la especie *Listeria monocytogenes*. También se da a conocer una composición inmunógena que comprende la bacteria *Listeria* atenuada, que es una vacuna que comprende la bacteria *Listeria* atenuada y un vehículo farmacéuticamente aceptable y/o un adyuvante. Además, se dan a conocer métodos para inducir en un hospedador una respuesta inmunitaria contra un antígeno que no es de *Listeria*, que comprenden administrar al hospedador una cantidad eficaz de una composición que comprende la bacteria *Listeria* atenuada. También se dan a conocer métodos para prevenir o tratar una enfermedad en un hospedador (tal como cáncer, listeriosis, o una enfermedad ocasionada por un microorganismo patógeno que no es *Listeria*), que comprenden administrar al hospedador una cantidad eficaz de una composición que comprende la bacteria *Listeria* atenuada. Se da a conocer adicionalmente una célula presentadora de antígeno profesional que comprende la bacteria *Listeria* atenuada.

En un aspecto adicional, la descripción da a conocer una vacuna que comprende (a) una bacteria *Listeria*, en la que la bacteria *Listeria* tiene atenuada la entrada en las células no fagocíticas, y (b) un vehículo farmacéuticamente aceptable y/o un adyuvante. La bacteria *Listeria* atenuada es defectuosa con respecto a la internalina B. La bacteria *Listeria* atenuada en la vacuna pertenece a la especie *Listeria monocytogenes*. La bacteria *Listeria* atenuada es una cepa mutante de *Listeria*. Se dan a conocer métodos para inducir en un hospedador una respuesta inmunitaria

contra un antígeno que no es de *Listeria* que comprenden administrar al hospedador una cantidad eficaz de la vacuna. También se dan a conocer métodos para prevenir o tratar una enfermedad en un hospedador, que comprenden administrar al hospedador una cantidad eficaz de la vacuna.

- En un aspecto más, la descripción da a conocer un aislado de célula presentadora de antígeno profesional que comprende una bacteria *Listeria*, en el que la bacteria *Listeria* tiene atenuada la entrada en las células no fagocíticas (p. ej., es defectuosa con respecto a la internalina, tal como la internalina B). En algunas realizaciones, la bacteria tiene atenuada además la diseminación de una célula a otra (p. ej., es defectuosa con respecto a ActA). En algunas realizaciones, la bacteria *Listeria* atenuada en la célula presentadora de antígeno profesional es una cepa mutante de *Listeria*. En algunas realizaciones, la bacteria *Listeria* pertenece a la especie *Listeria monocytogenes*.
- 10 invención también da a conocer un método para inducir en un hospedador una respuesta inmunitaria contra un antígeno, que comprende administrar al hospedador una cantidad eficaz de la célula presentadora de antígeno profesional, en donde la bacteria *Listeria* atenuada comprende un ácido nucleico que codifica un antígeno. Aún en otro aspecto, la descripción da a conocer un método para prevenir o tratar una enfermedad en un hospedador, que comprende administrar al hospedador una cantidad eficaz de la célula presentadora de antígeno profesional.
- 15 En otro aspecto, la descripción da a conocer un método para inducir la presentación del antígeno con el CMH de clase I o la presentación del antígeno con el CMH de clase II sobre una célula presentadora de antígeno (*in vivo* o *in vitro*), que comprende poner en contacto una bacteria *Listeria* atenuada con una célula presentadora de antígeno, en donde la bacteria *Listeria* atenuada tiene atenuada la entrada en las células no fagocíticas y comprende una molécula de ácido nucleico que codifica un antígeno que no es de *Listeria* que comprende un epítipo del CMH de
- 20 clase I o un epítipo del CMH de clase II.

Se describe un método para inducir en un hospedador una respuesta inmunitaria contra un antígeno, que comprende las etapas siguientes: (a) poner en contacto una bacteria *Listeria* atenuada con una célula presentadora de antígeno (p. ej., una célula presentadora de antígeno del hospedador), en el que la bacteria *Listeria* atenuada tiene atenuada la entrada en las células no fagocíticas y comprende una molécula de ácido nucleico que codifica el

25 antígeno; y (b) administrar la célula presentadora de antígeno al hospedador.

En otro aspecto, la presente descripción da a conocer un método para prevenir o tratar una enfermedad (tal como cáncer) en un hospedador, que comprende administrar al hospedador una vacuna que comprende una cepa mutante de *Listeria*, en donde la cepa mutante de *Listeria* tiene atenuada la entrada en las células no fagocíticas con respecto a una cepa no mutante de *Listeria*, pero conserva la capacidad de entrar en las células fagocíticas.

- 30 En otro aspecto, la descripción da a conocer un método para inducir en un hospedador una respuesta inmunitaria contra un antígeno, que comprende administrar al hospedador una cantidad eficaz de una composición que comprende una cepa mutante de *Listeria*, en donde la cepa mutante de *Listeria* tiene atenuada la entrada en las células no fagocíticas con respecto a una cepa no mutante de *Listeria*, pero conserva la capacidad de entrar en las células fagocíticas, y comprende una molécula de ácido nucleico que codifica el antígeno.
- 35 Aún en otro aspecto, la descripción da a conocer un método para inducir la presentación del antígeno con el CMH de clase I o la presentación del antígeno con el CMH de clase II sobre una célula presentadora de antígeno, que comprende poner en contacto una cepa mutante de *Listeria* con una célula presentadora de antígeno, en donde la cepa mutante de *Listeria* tiene atenuada la entrada en las células no fagocíticas con respecto a la cepa no mutante de *Listeria*, pero conserva la capacidad de entrar en las células fagocíticas, y comprende una molécula del ácido
- 40 nucleico heterólogo que codifica un antígeno que comprende un epítipo del CMH de clase I o un epítipo del CMH de clase II, respectivamente.

En otro aspecto, la descripción da a conocer un método para inducir en un hospedador una respuesta inmunitaria contra un antígeno, que comprende las etapas siguientes: (a) poner en contacto una cepa mutante de *Listeria* con una célula presentadora de antígeno del hospedador en las condiciones adecuadas y durante un tiempo suficiente

45 para que se carguen las células presentadoras de antígeno, en donde la cepa mutante de *Listeria* tiene atenuada la entrada en las células no fagocíticas con respecto a una cepa no mutante de *Listeria*, pero conserva la capacidad de entrar en las células no fagocíticas, y comprende una molécula de ácido nucleico que codifica un antígeno; y (b) administrar la célula presentadora de antígeno al hospedador. En una realización, el antígeno es un antígeno tumoral o procede de un antígeno tumoral.

- 50 Aún en otro aspecto, la descripción da a conocer métodos para hacer disminuir la patogenia de una cepa de *Listeria* usada en una vacuna, que comprende modificar la cepa de modo que se disminuye la capacidad de la cepa para entrar en las células no fagocíticas, pero se conserva sustancialmente la capacidad de la cepa para entrar en las células fagocíticas. Estos métodos pueden incluir mutaciones de delección en los genes que codifican proteínas que dirigen el tropismo bacteriano (invasinas) para determinadas células no fagocíticas o, alternativamente, pueden
- 55 incluir el tratamiento de las bacterias con anticuerpos policlonales o monoclonales que enmascaran dichas invasinas, y como resultado inhiben la infección de las células no fagocíticas.

- En otro aspecto más, la descripción da a conocer un método para suministrar selectivamente una proteína a las células fagocíticas (en oposición a las no fagocíticas) en un hospedador, que comprende administrar al hospedador una composición que comprende una cepa mutante de *Listeria* que tiene atenuada la entrada en las células no fagocíticas con respecto a una cepa no mutante de *Listeria*, pero que conserva sustancialmente la capacidad de entrar en las células fagocíticas, en donde el genoma de la cepa mutante de *Listeria* que expresa la proteína comprende al menos una mutación en al menos un gen que codifica una invasina (alternativamente denominada una «proteína de invasión»), tal como una internalina.
- En otros aspectos, la descripción da a conocer métodos para fabricar vacunas. Por ejemplo, la invención da a conocer un método para fabricar una vacuna que comprende poner en contacto *in vitro* o *ex vivo* una cepa mutante de *Listeria* con una célula presentadora de antígeno en las condiciones adecuadas, y durante un tiempo suficiente, para que se carguen las células presentadoras de antígeno, en donde la cepa mutante de *Listeria* tiene atenuada la entrada en las células no fagocíticas con respecto a una cepa no mutante de *Listeria*, pero conserva la capacidad de entrar en las células fagocíticas, y comprende una molécula de ácido nucleico que codifica un antígeno.
- En algunas realizaciones de cada uno de los aspectos antes mencionados, la cepa mutante de *Listeria* es una cepa mutante de *Listeria monocytogenes* que es defectuosa con respecto a la internalina B y/o comprende al menos una mutación en el gen que codifica la internalina B (*inlB*) y/o en un elemento que regula su expresión. Aún en otras realizaciones de cada uno de los aspectos antes mencionados, la cepa mutante es defectuosa con respecto a la internalina B y a *actA*, y/o comprende al menos una mutación tanto en el gen *inlB* como en el gen *actA*, y/o en un elemento que regula su expresión.
- Además, la presente descripción da a conocer una serie de composiciones y cepas útiles para los métodos antes mencionados, así como otros usos. Por ejemplo, aún en otro aspecto, la descripción da a conocer una composición farmacéutica que comprende una cepa mutante de *Listeria* y un vehículo farmacéuticamente aceptable, en donde la cepa mutante de *Listeria* tiene atenuada la entrada en las células no fagocíticas con respecto a una cepa no mutante de *Listeria*, pero conserva la capacidad de entrar en las células fagocíticas. En una realización, el genoma de la cepa mutante comprende al menos una mutación en al menos un gen que codifica una invasina (a saber, una proteína de invasión), tal como una internalina, y/o en un elemento que regula su expresión.
- En otro aspecto, la descripción da a conocer una composición inmunógena que comprende una cepa mutante de *Listeria*, en la que la cepa mutante de *Listeria* tiene atenuada la entrada en las células no fagocíticas con respecto a una cepa no mutante de *Listeria*, pero conserva la capacidad de entrar en las células no fagocíticas, y comprende una molécula de ácido nucleico heterólogo que codifica un antígeno.
- En otro aspecto, la descripción da a conocer una vacuna que comprende una cepa mutante de *Listeria*, en la que la cepa mutante de *Listeria* tiene atenuada la entrada en las células no fagocíticas con respecto a una cepa no mutante de *Listeria*, pero conserva la capacidad de entrar en las células fagocíticas.
- En otro aspecto más, la descripción da a conocer una célula presentadora de antígeno profesional, tal como un dendrocito, que comprende una cepa mutante de *Listeria*, en donde la cepa mutante de *Listeria* tiene atenuada la entrada en las células no fagocíticas con respecto a una cepa no mutante de *Listeria*, pero conserva la capacidad de entrar en las células fagocíticas.
- En algunas realizaciones de cada uno de los aspectos antes mencionados, la cepa mutante de *Listeria* es una cepa mutante de *Listeria monocytogenes*.
- En algunas realizaciones de cada uno de los aspectos antes mencionados, la cepa mutante de *Listeria* es defectuosa con respecto a la internalina B. En algunas realizaciones de cada uno de los aspectos antes mencionados, el genoma de la cepa mutante de *Listeria* que es defectuosa con respecto a la internalina B comprende al menos una mutación en el gen que codifica la internalina B (*inlB*), y/o en un elemento que regula su expresión. En otras realizaciones, se elimina *inlB* del genoma de la cepa mutante de *Listeria*.
- Aún en otras realizaciones de cada uno de los aspectos antes mencionados, la cepa mutante es defectuosa con respecto a la internalina B y a *ActA*. En algunas realizaciones, las cepas mutantes comprenden al menos una mutación en el gen *inlB* (y/o un elemento que regula la expresión del gen *inlB*) y en el gen *actA* (y/o en un elemento que regula la expresión del gen *actA*).
- En un aspecto adicional, la presente descripción da a conocer un método para prevenir o tratar una enfermedad (tal como el cáncer) en un hospedador, que comprende administrar al hospedador una vacuna que comprende una cepa mutante de *Listeria*, en donde la cepa mutante de *Listeria* es defectuosa con respecto a la internalina B.
- En otro aspecto, la descripción da a conocer un método para inducir en un hospedador una respuesta inmunitaria contra un antígeno, que comprende administrar al hospedador una cantidad eficaz de una composición que

comprende una cepa mutante de *Listeria*, en donde la cepa mutante de *Listeria* es defectuosa con respecto a la internalina B y comprende una molécula de ácido nucleico que codifica el antígeno.

En otro aspecto, la descripción da a conocer un método para inducir la presentación del antígeno con el CMH de clase I o la presentación del antígeno con el CMH de clase II sobre una célula presentadora de antígeno (*in vitro* o *in vivo*), que comprende poner en contacto una cepa mutante de *Listeria* con una célula presentadora de antígeno, en donde la cepa mutante de *Listeria* es defectuosa con respecto a la internalina B y comprende una molécula de ácido nucleico heterólogo que codifica un antígeno que comprende un epítipo del CMH de clase I o un epítipo del CMH de clase II, respectivamente.

Aún en otro aspecto, la descripción da a conocer un método para inducir en un hospedador una respuesta inmunitaria contra un antígeno, que comprende las etapas siguientes: (a) poner en contacto una cepa mutante de *Listeria* con una célula presentadora de antígeno del hospedador en las condiciones adecuadas, y durante un tiempo suficiente, para que se carguen las células presentadoras de antígeno, en donde la cepa mutante de *Listeria* es defectuosa con respecto a la internalina B, y comprende una molécula de ácido nucleico que codifica un antígeno; y (b) administrar la célula presentadora de antígeno al hospedador. En una realización, el antígeno es un antígeno tumoral o procede de un antígeno tumoral.

Aún en otro aspecto, la descripción da a conocer un método para disminuir la patogenia de una cepa de *Listeria* utilizada en una vacuna, que comprende modificar la cepa de *Listeria* de modo que sea defectuosa con respecto a la internalina B.

En otros aspectos, la descripción da a conocer métodos para fabricar vacunas. Por ejemplo, la invención da a conocer un método para fabricar una vacuna, que comprende poner en contacto una cepa mutante de *Listeria* con una célula presentadora de antígeno en las condiciones adecuadas, y durante un tiempo suficiente, para que se carguen las células presentadoras de antígeno, en donde la cepa mutante de *Listeria* es defectuosa con respecto a la internalina B.

Además, la presente descripción da a conocer una serie de composiciones y cepas útiles para los métodos antes mencionados, así como otros usos. Por ejemplo, aún en otro aspecto, la descripción da a conocer una composición farmacéutica que comprende una cepa mutante de *Listeria* y un vehículo farmacéuticamente aceptable, en donde la cepa mutante de *Listeria* es defectuosa con respecto a la internalina B. En una realización, el genoma de la cepa mutante comprende al menos una mutación en *inlB*, o en un elemento que regula su expresión.

En otro aspecto, la descripción da a conocer una composición inmunógena que comprende una cepa mutante de *Listeria*, en donde la cepa mutante de *Listeria* es defectuosa con respecto a la internalina B, y comprende una molécula de ácido nucleico heterólogo que codifica un antígeno.

En otro aspecto, la descripción da a conocer una vacuna que comprende una cepa mutante de *Listeria*, en la que la cepa mutante de *Listeria* es defectuosa con respecto a la internalina B.

Aún en otro aspecto, la descripción da a conocer una célula presentadora de antígeno profesional, tal como una célula dendrítica, que comprende una cepa mutante de *Listeria*, en donde la cepa mutante de *Listeria* es defectuosa con respecto a la internalina B.

En algunas realizaciones de cada uno de los aspectos antes mencionados, la cepa mutante de *Listeria* es una cepa mutante de *Listeria monocytogenes*.

En algunas realizaciones de cada uno de los aspectos antes mencionados, el genoma de la cepa mutante de *Listeria* que es defectuosa con respecto a la internalina B comprende al menos una mutación en el gen que codifica la internalina B (*inlB*), y/o en un elemento que regula su expresión. En otras realizaciones, se elimina *inlB* del genoma de la cepa mutante de *Listeria*.

En aún otras realizaciones de cada uno de los aspectos antes mencionados, la cepa mutante es defectuosa con respecto a la internalina B y a ActA. En algunas realizaciones, las cepas mutantes comprenden al menos una mutación en el gen *inlB* (y/o en un elemento que regula la expresión del gen *inlB*) y en el gen *actA* (y/o en un elemento que regula la expresión del gen *actA*).

En un aspecto adicional, la descripción da a conocer una cepa de *Listeria monocytogenes* que es defectuosa con respecto a tanto una internalina, tal como la internalina B, como a ActA. En un aspecto, la invención da a conocer una cepa de *Listeria monocytogenes* que es defectuosa con respecto tanto a la internalina B como a ActA. Se ha eliminado tanto el gen *inlB* como el *actA*. La cepa es el mutante doble de *Listeria monocytogenes* $\Delta actA \Delta inlB$ (alternativamente denominado un mutante doble de *Listeria monocytogenes* $actA^- inlB^-$) depositado en la American Type Culture Collection (ATCC) el 3 de octubre de 2003, y designada con el número de acceso PTA-5562. En otra

realización, la cepa es un mutante de la cepa denominada PTA-5562, en donde el mutante tiene atenuada la entrada en las células no fagocíticas con respecto a la bacteria *Listeria monocytogenes* de tipo silvestre.

- También se dan a conocer cultivos, composiciones inmunógenas y composiciones farmacéuticas, entre ellas vacunas, que comprenden una cualquiera de las cepas antes mencionadas. También se da a conocer el uso de estas cepas particulares en todos y cada uno de los métodos antes mencionados.

DIBUJOS

- La figura 1 muestra las poblaciones de células diana después de la inyección en los ratones vacunados con las cepas indicadas de *Listeria* o con el control de vehículo. La reducción de los niveles de antígeno en las células diana específicas con respecto a las células diana inespecíficas indica la citotoxicidad *in vivo* de los linfocitos T en respuesta a la vacunación. La figura 1A muestra la citotoxicidad *in vivo* de los ratones vacunados por vía i.v. o i.m. con el mutante $\Delta actA$ o con el mutante doble $\Delta actA\Delta inlB$. La figura 1B muestra la citotoxicidad *in vivo* de los ratones vacunados por vía i.v. con el mutante $\Delta actA$ o con el mutante doble $\Delta actA\Delta inlB$. La figura 1C muestra la citotoxicidad *in vivo* de los ratones vacunados por vía i.v. con el mutante doble $\Delta actA\Delta inlB$.

- La figura 2 muestra los pulmones de ratones con tumores de pulmón establecidos CT26 a los que se les dio una vacunación terapéutica con las cepas mutantes de *Listeria* o con un control (figura 2A). Las metástasis en el pulmón son visibles como manchas en el pulmón. La supervivencia de ratones de dos estudios adicionales se representa en las figuras 2B-C.

- La figura 3 muestra los resultados de ensayos de tinción de las citocinas intracelulares (TCI) IFN- γ y TNF- α para los linfocitos T CD8+ esplénicos de ratones vacunados con *Listeria* mutante, estimulados con el péptido SL8 OVA₂₅₇₋₂₆₄ (figuras 3A-B), el péptido LLO₁₉₀ (figuras 3C-D) o el péptido LLO₂₉₆ (figuras 3E-F).

- La figura 4 muestra los resultados de ensayos de TCI para el IFN- γ con esplenocitos de ratones vacunados (por vía intravenosa) con la bacteria *Listeria* mutante, estimulados con el péptido SL8 OVA₂₅₇₋₂₆₄, células EL-4 vivas o inactivadas con S-59/UVA, o células EG7 que expresan OVA vivas o inactivadas con S-59/UVA («PCT» señala los datos para las células inactivadas con S-59/UVA).

- La figura 5 muestra los resultados de los ensayos de TCI para el IFN- γ con esplenocitos de ratones vacunados (por vía intravenosa) con dosis diferentes del mutante de *Listeria*, estimulados con el péptido SL8 OVA₂₅₇₋₂₆₄.

La figura 6 muestra los resultados de los ensayos de TCI para el IFN- γ con esplenocitos de ratones vacunados por diferentes vías con el mutante de *Listeria*, estimulados con el péptido SL8 OVA₂₅₇₋₂₆₄.

- Las figuras 7A y 7B muestran la eliminación acelerada *in vivo* de la cepa $\Delta actA\Delta inlB$ de *Listeria monocytogenes*. En la figura se muestra la cinética temporal de la cantidad de bacterias en el hígado.

Las figuras 8A y 8B muestran la eliminación acelerada *in vivo* de la cepa $\Delta actA\Delta inlB$ de *Listeria monocytogenes*. En la figura se muestra la cinética temporal de la cantidad de bacterias en el bazo.

La figura 9 muestra que la cepa de *Listeria monocytogenes* $\Delta inlB$ y la cepa de *Listeria monocytogenes* $\Delta actA\Delta inlB$ tienen atenuada *in vitro* la entrada en las células no fagocíticas, pero no en las células fagocíticas.

- La figura 10 muestra que el suero anti-*Listeria* de alta titulación inhibe la captación por las células no fagocíticas, pero no por las células fagocíticas.

- La figura 11A muestra la atenuación de la cepa de *Listeria* DP-L4029 ($\Delta actA$) que contiene el antígeno OVA en función de la concentración de psoraleno S-59 junto con la medición de la presentación del antígeno OVA a una línea de células dendríticas. Se representan los logs de titulación bacteriana y el porcentaje de presentación del antígeno con respecto a la no tratada (escala lineal, 1 *Listeria* por célula DC 2.4) frente a los nanomoles por litro de S-59 (se dosificó con UVA a 0,5 J/cm², se lavó *Listeria* una vez, y se dosificó de nuevo con UVA a 5,5 J/cm²).

- La figura 11B muestra la atenuación de la cepa de *Listeria* DP-L4029 $\Delta uvrAB$ que contiene el antígeno OVA en función de la concentración de psoraleno S-59 junto con la medición de la presentación del antígeno OVA a una línea de células dendríticas. Se representan los logs de titulación bacteriana y el porcentaje de presentación del antígeno con respecto a la no tratada (escala lineal, 1 *Listeria* por célula DC 2.4) frente a los nanomoles por litro de S-59 (se dosificó con UVA a 0,5 J/cm², se lavó *Listeria* una vez, y se dosificó de nuevo con UVA a 5,5 J/cm²).

La figura 11C muestra la atenuación de la cepa de *Listeria* DP-L4029 ($\Delta actA$) que contiene el antígeno OVA en función de la concentración de psoraleno S-59 junto con la medición de la presentación del antígeno OVA a una línea de células dendríticas.

La figura 11D muestra la atenuación de la cepa de *Listeria* DP-L4029 $\Delta uvrAB$ ($\Delta actA\Delta uvrAB$) que contiene el antígeno OVA en función de la concentración de psoraleno S-59 junto con la medición de la presentación del antígeno OVA a una línea de células dendríticas.

La figura 12A muestra la inducción de la respuesta de linfocitos T específicos contra OVA en presencia de inmunidad anti-*Listeria*.

La figura 12B muestra que la respuesta inmunitaria antitumoral eficaz se estimula en presencia de inmunidad específica contra *Listeria*.

La figura 12C muestra que la transferencia del suero inmunitario contra *Listeria* no impide la sensibilización de los linfocitos CD8+ específicos contra OVA.

10 DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

I. Introducción

La presente descripción da a conocer una bacteria *Listeria* que tiene atenuada la entrada en las células no fagocíticas (por ejemplo, cepas mutantes de *Listeria* que son defectuosas con respecto a las internalinas, tal como la internalina B). En algunas realizaciones, las bacterias *Listeria* atenuadas tienen también atenuada la diseminación de una célula a otra. En algunas realizaciones, la toxicidad de la bacteria *Listeria* recombinante ha disminuido enormemente con las modificaciones realizadas a la cepa, y además se ha conservado suficientemente la inmunogenia de la cepa. Así pues, por primera vez, la inmunogenia de la bacteria *Listeria* atenuada se ha segregado con éxito de la toxicidad de la bacteria *Listeria*. La presente descripción da a conocer composiciones farmacéuticas, composiciones inmunógenas y vacunas que comprenden la bacteria *Listeria* atenuada, y el uso de estas composiciones que contienen *Listeria* y *Listeria* atenuada para inducir en un hospedador respuestas inmunitarias, entre ellas, respuestas inmunitarias terapéuticamente eficaces. Las vacunas y los métodos se pueden utilizar bien para la prevención de la enfermedad infecciosa ocasionada por *Listeria* o bien para administrar un antígeno heterólogo, tal como un antígeno tumoral o un antígeno procedente de un microorganismo patógeno que no es *Listeria*.

Se describen cepas atenuadas de *Listeria monocytogenes* en las que se ha eliminado el gen *inlB* (a saber, una cepa que tiene atenuada la entrada en las células no fagocíticas, por ejemplo hepatocitos, a través del receptor de c-met) o se han eliminado los dos genes *actA* e *inlB* (a saber, una cepa que tiene atenuada la entrada en las células no fagocíticas y la diseminación de una célula a otra). Se ha determinado que la cepa $\Delta actA\Delta inlB$ es aproximadamente 1000 veces menos virulenta que *Listeria monocytogenes* de tipo silvestre (véase el ejemplo 2 y la tabla 1, a continuación). Se ha confirmado la atenuación de la cepa de *Listeria* $\Delta actA\Delta inlB$ y la cepa de *Listeria* $\Delta inlB$ con respecto a la entrada en las células humanas no fagocíticas (ejemplo 9, a continuación, y figura 9). Se ha demostrado que la vacunación con las cepas $\Delta inlB$ y $\Delta actA\Delta inlB$ de *Listeria* que expresan antígenos heterólogos da lugar a la producción de linfocitos T específicos de antígeno (véanse los ejemplos 5-7, a continuación, y las figuras 3A, 3B y 4-6). Además, en la actualidad se ha demostrado también que la vacunación con la cepa de *Listeria* $\Delta actA\Delta inlB$ que expresa un antígeno heterólogo induce una respuesta citotóxica robusta y eficaz *in vivo* contra las células diana específicas de antígeno (véase el ejemplo 3, a continuación, y la figura 1). Es más, se ha demostrado que la vacunación terapéutica con la cepa de *Listeria* $\Delta actA\Delta inlB$ que expresa un antígeno heterólogo es eficaz para reducir el número de metástasis en el pulmón y para incrementar la tasa de supervivencia en un modelo de cáncer colorrectal en ratones (véase el ejemplo 4, a continuación, y las figuras 2A-C). Adicionalmente, se ha demostrado que la desaparición de una cepa $\Delta actA\Delta inlB$ de *Listeria* del hígado y del bazo es mucho más rápida que la de *Listeria* de tipo silvestre, la de la cepa de *Listeria* $\Delta actA$ o la de la cepa de *Listeria* $\Delta inlB$ (véase el ejemplo 8, a continuación, y las figuras 7-8). Es decir, la combinación de las mutaciones de delección concomitante de *actA* y de *inlB* es sinérgica, lo que da lugar a que desaparezca con rapidez del hígado de los animales a los que se les administraron dosis altas de bacterias por vía intravenosa.

Por consiguiente, la descripción da a conocer una bacteria *Listeria* que tiene atenuada la entrada en las células no fagocíticas (por ejemplo, es defectuosa con respecto a una internalina, tal como la internalina B) y que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica un antígeno que no es de *Listeria*. En algunas realizaciones, la bacteria tiene también atenuada la diseminación de una célula a otra (p. ej., es defectuosa con respecto a *ActA*). En algunas realizaciones, la bacteria *Listeria* atenuada pertenece a la especie *Listeria monocytogenes*. En algunas realizaciones, la bacteria *Listeria* atenuada es una cepa mutante de *Listeria*. También se da a conocer una composición inmunógena que comprende la bacteria *Listeria*, tal como una vacuna que comprende tanto la bacteria como un vehículo farmacéuticamente aceptable y/o un adyuvante. Además, también se dan a conocer métodos de inducción de una respuesta inmunitaria en un hospedador contra un antígeno que no es de *Listeria*, que comprenden administrar al hospedador una cantidad eficaz de una composición que comprende la bacteria *Listeria* atenuada, y métodos para prevenir o tratar una enfermedad en un hospedador (tal como un cáncer o una enfermedad infecciosa), que comprenden administrar al hospedador una cantidad eficaz de una composición que

comprende la bacteria *Listeria* atenuada. También se da a conocer una célula presentadora de antígeno profesional que comprende la bacteria *Listeria* atenuada.

- Se da a conocer una bacteria *Listeria* que tiene atenuada la entrada en las células no fagocíticas (p. ej., es defectuosa con respecto a una internalina, tal como la internalina B) y la diseminación de una célula a otra (p. ej., es defectuosa con respecto a ActA). En algunas realizaciones, la bacteria *Listeria* atenuada es una cepa mutante de *Listeria*. En algunas realizaciones, la bacteria de *Listeria* atenuada comprende al menos una mutación (tal como una mutación de delección) que afecta a los dos genes *inlB* y *actA*. En algunas realizaciones, la bacteria *Listeria* atenuada es la cepa $\Delta actA \Delta inlB$ de *Listeria monocytogenes* depositada en la American Type Culture Collection (ATCC) e identificada con el número de acceso PTA-5562, o un mutante de la cepa depositada que es defectuosa con respecto tanto a la internalina B como a ActA. En algunas realizaciones, la bacteria *Listeria* atenuada comprende una molécula de ácido nucleico que codifica un antígeno que no es de *Listeria*. En algunas realizaciones, la bacteria *Listeria* atenuada pertenece a la especie *Listeria monocytogenes*. También se da a conocer una composición inmunógena que comprende la bacteria *Listeria* atenuada, como lo es una vacuna que comprende la bacteria *Listeria* atenuada y un vehículo farmacéuticamente aceptable y/o un adyuvante. Además, se dan a conocer métodos para inducir en un hospedador una respuesta inmunitaria contra un antígeno que no es de *Listeria* que comprenden administrar al hospedador una cantidad eficaz de una composición que comprende la bacteria *Listeria* atenuada. También se dan a conocer métodos para prevenir o tratar una enfermedad en un hospedador (tal como cáncer, listeriosis o una enfermedad ocasionada por un microorganismo patógeno que no es *Listeria*), que comprenden administrar al hospedador una cantidad eficaz de una composición que comprende la bacteria *Listeria* atenuada. Además se da a conocer una célula presentadora de antígeno profesional que comprende la bacteria *Listeria* atenuada.

- La descripción además a da conocer una vacuna que comprende (a) una bacteria *Listeria* atenuada, en la que la bacteria *Listeria* atenuada tiene atenuada la entrada en las células no fagocíticas, y (b) un vehículo farmacéuticamente aceptable y/o un adyuvante. En algunas realizaciones, la bacteria *Listeria* atenuada es defectuosa con respecto a la internalina B. En algunas realizaciones, la bacteria *Listeria* atenuada de la vacuna pertenece a la especie *Listeria monocytogenes*. En algunas realizaciones, la bacteria *Listeria* atenuada es una cepa mutante de *Listeria*. Se dan a conocer métodos para inducir en un hospedador una respuesta inmunitaria contra un antígeno que no es de *Listeria* que comprenden administrar al hospedador una cantidad eficaz de la vacuna. También se dan a conocer métodos para prevenir o tratar una enfermedad en un hospedador, que comprende la administración al hospedador de una cantidad eficaz de la vacuna.

- Además, la descripción da a conocer una célula presentadora de antígeno profesional que comprende una bacteria *Listeria* atenuada, en la que la bacteria *Listeria* atenuada tiene atenuada la entrada en las células no fagocíticas (p. ej., es defectuosa con respecto a la internalina, tal como la internalina B). En algunas realizaciones, la bacteria tiene además atenuada la diseminación de una célula a otra (p. ej., es defectuosa con respecto a ActA). En algunas realizaciones, la bacteria *Listeria* atenuada en la célula presentadora de antígeno profesional es una cepa mutante de *Listeria*. En algunas realizaciones, la bacteria *Listeria* pertenece a la especie *Listeria monocytogenes*. La descripción también da a conocer un método para inducir en un hospedador una respuesta inmunitaria contra un antígeno, que comprende administrar al hospedador una cantidad eficaz de la célula presentadora de antígeno profesional, en donde la bacteria *Listeria* atenuada comprende un ácido nucleico que codifica un antígeno. Aún en otro aspecto, la descripción da a conocer un método para prevenir o tratar una enfermedad en un hospedador, que comprende administrar al hospedador una cantidad eficaz de la célula presentadora de antígeno profesional.

- La descripción también da a conocer un método para inducir la presentación del antígeno con el CMH de clase I o la presentación del antígeno con el CMH de clase II sobre una célula presentadora de antígeno (*in vitro* o *in vivo*), que comprende poner en contacto una bacteria *Listeria* atenuada con una célula presentadora de antígeno, en donde la bacteria *Listeria* atenuada tiene atenuada la entrada en las células no fagocíticas y comprende una molécula de ácido nucleico que codifica un antígeno que no es de *Listeria* que comprende un epítipo del CMH de clase I o un epítipo del CMH de clase II.

- Adicionalmente, la descripción da a conocer un método para inducir en un hospedador una respuesta inmunitaria contra un antígeno, que comprende las etapas siguientes. (a) poner en contacto una bacteria *Listeria* atenuada con una célula presentadora de antígeno del hospedador, en donde la bacteria *Listeria* atenuada tiene atenuada la entrada en las células no fagocíticas y comprende una molécula de ácido nucleico que codifica el antígeno; y (b) administrar la célula presentadora de antígeno al hospedador.

- La descripción también da a conocer un método para inducir en un hospedador una respuesta inmunitaria contra un antígeno, que comprende administrar al hospedador una cantidad eficaz de una composición que comprende una cepa mutante de *Listeria*, en donde la cepa mutante de *Listeria* tiene atenuada la entrada en las células no fagocíticas con respecto a una cepa no mutante de *Listeria*, pero conserva la capacidad de entrar en las células fagocíticas, y comprende una molécula de ácido nucleico que codifica el antígeno. Dentro del hospedador, el

antígeno es expresado por la bacteria *Listeria* mutante de una manera que induce una respuesta inmunitaria.

La presente descripción da a conocer un método para prevenir o tratar una enfermedad (tal como el cáncer) en un hospedador, que comprende administrar al hospedador una vacuna que comprende una cepa mutante de *Listeria*, en donde la cepa mutante de *Listeria* tiene atenuada la entrada en las células no fagocíticas con respecto a una cepa de *Listeria* no mutante, pero conserva la capacidad de entrar en las células fagocíticas.

- 5 La descripción también da a conocer un método para inducir la presentación del antígeno con el CMH de clase I o la presentación del antígeno con el CMH de clase II sobre una célula presentadora de antígeno que comprende poner en contacto una cepa mutante de *Listeria* con una célula presentadora de antígeno, en donde la cepa mutante de *Listeria* tiene atenuada la entrada en las células no fagocíticas con respecto a una cepa de *Listeria* que no es mutante, pero conserva la capacidad de entrar en las células fagocíticas, y comprende una molécula de ácido nucleico heterólogo que codifica un antígeno que comprende un epítipo del CMH de clase I o un epítipo del CMH de clase II, respectivamente.

- Además, la descripción da a conocer un método para inducir en un hospedador una respuesta inmunitaria contra un antígeno, que comprende las etapas siguientes: (a) poner en contacto una cepa mutante de *Listeria* con una célula presentadora de antígeno del hospedador, en las condiciones adecuadas y durante un tiempo suficiente para que se carguen las células presentadoras de antígeno, en donde la cepa mutante de *Listeria* tiene atenuada la entrada en las células no fagocíticas con respecto a una cepa de *Listeria* que no es mutante, pero conserva la capacidad de entrar en las células fagocíticas, y comprende una molécula de ácido nucleico que codifica un antígeno; y (b) administrar la célula presentadora de antígeno al hospedador. En una realización, el antígeno es un antígeno tumoral o procede de un antígeno tumoral.

- La descripción también da a conocer un método para inducir una respuesta inmunitaria contra un antígeno en un hospedador, que comprende administrar al hospedador una cantidad eficaz de una composición que comprende una cepa mutante de *Listeria*, en donde la cepa mutante de *Listeria* es defectuosa con respecto a la internalina B y comprende una molécula de ácido nucleico que codifica el antígeno. Dentro del hospedador, el antígeno es expresado por la bacteria *Listeria* mutante de una manera que induce una respuesta inmunitaria.

La presente descripción también da a conocer un método para prevenir o tratar una enfermedad (tal como cáncer) en un hospedador, que comprende administrar al hospedador una vacuna que comprende una cepa mutante de *Listeria*, en donde la cepa mutante de *Listeria* es defectuosa con respecto a la internalina B.

- La descripción además da a conocer un método para inducir la presentación del antígeno con el CMH de clase I o la presentación del antígeno con el CMH de clase II sobre una célula presentadora de antígeno, que comprende poner en contacto una cepa mutante de *Listeria* con una célula presentadora de antígeno, en donde la cepa mutante de *Listeria* es defectuosa con respecto a la internalina B y comprende una molécula de ácido nucleico heterólogo que codifica un antígeno que comprende un epítipo del CMH de clase I o un epítipo del CMH de clase II, respectivamente.

- Además, la descripción da a conocer un método para inducir en un hospedador una respuesta inmunitaria contra un antígeno, que comprende las etapas siguientes: (a) poner en contacto una cepa mutante de *Listeria* con una célula presentadora de antígeno del hospedador, en las condiciones adecuadas y durante un tiempo suficiente para que se carguen las células presentadoras de antígeno, en donde la cepa mutante de *Listeria* es defectuosa con respecto a la internalina B, y comprende una molécula de ácido nucleico que codifica un antígeno; y (b) administrar la célula presentadora de antígeno al hospedador.

- La presente descripción también da a conocer composiciones farmacéuticas, composiciones inmunógenas y vacunas que comprenden una cepa mutante de *Listeria* que tiene atenuada la entrada en las células no fagocíticas con respecto a una cepa que no es mutante, pero conserva la capacidad de entrar en las células fagocíticas. En algunas realizaciones, las cepas mutantes de *Listeria* son defectuosas con respecto a una o más invasinas, tales como la internalina B. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la cepa mutante de *Listeria* es una cepa mutante de *Listeria monocytogenes* que comprende una mutación en uno o más genes que codifican una proteína internalina (tal como la internalina B), y/o en un elemento que regula la expresión de un gen de la proteína internalina (tal como el gen *inlB*). En algunas realizaciones, las cepas defectuosas con respecto a una proteína internalina, tal como internalina B, también son defectuosas con respecto a una segunda proteína de *Listeria*, tal como ActA.

- La descripción además da a conocer cepas nuevas de *Listeria monocytogenes* que son defectuosas con respecto tanto a la internalina B como a ActA. Por ejemplo, en algunas realizaciones se han eliminado los dos genes *inlB* y *actA*. En una realización, la cepa es el mutante doble de *Listeria monocytogenes* $\Delta actA \Delta inlB$ depositada en la American Type Culture Collection (ATCC) el 3 de octubre de 2003, y designada con el número de acceso PTA-5562.

II. *Listeria* atenuada

La bacteria *Listeria* atenuada de la presente invención se ha desarrollado para permitir la expresión y la administración de uno o más antígenos a los fagolisosomas y/o al citosol de las células presentadoras de antígeno (CPA) profesionales, tales como macrófagos, neutrófilos y células dendríticas, al mismo tiempo que se reduce la entrada de la bacteria en las células que no son CPA, tales como las células de órganos y aparatos diferentes al inmunitario. En consecuencia, la bacteria *Listeria* utilizada en las composiciones, vacunas y métodos de la descripción tiene atenuada la entrada en las células no fagocíticas con respecto a *Listeria* sin las modificaciones de atenuación relevantes, tal como *Listeria* de tipo silvestre.

Tal y como se utiliza en la presente memoria, la terminología «bacteria *Listeria* atenuada» y «bacteria *Listeria* modificada» (o «*Listeria* atenuada» y «*Listeria* modificada») se utilizan indistintamente en la presente memoria para referirse a una bacteria *Listeria* (o *Listeria*) que tiene atenuada la entrada en las células no fagocíticas con respecto a la bacteria *Listeria* de tipo silvestre. Se entiende que las bacterias *Listeria* atenuadas (a saber, *Listeria* modificadas) descritas en la presente memoria son, o bien *Listeria* que no aparecen en la naturaleza, o bien *Listeria* que aparecen de forma natural, pero que en la actualidad se han aislado y/o encontrado en una forma en la que no existen en la naturaleza. Tal y como se utiliza en la presente memoria, la terminología «bacteria *Listeria* sin atenuar» y «bacteria *Listeria* sin modificar» (o «*Listeria* sin atenuar» y «*Listeria* sin modificar») es terminología relativa utilizada indistintamente en la presente memoria para referirse a la bacteria *Listeria* (o *Listeria*) que no comprende una modificación determinada que provoca atenuación en otra bacteria *Listeria* o *Listeria* para la entrada en las células no fagocíticas con respecto a la bacteria *Listeria* de tipo silvestre. Por consiguiente, un ejemplo de una *Listeria* sin modificar es la bacteria *Listeria* de tipo silvestre.

En algunas realizaciones, la bacteria *Listeria* atenuada es un miembro de una cepa mutante de *Listeria*, en donde las mutaciones del genoma de la cepa mutante de *Listeria* convierten a la bacteria *Listeria* en atenuada para la entrada en las células no fagocíticas. En algunas realizaciones, la bacteria *Listeria* se ha modificado a través de medios diferentes de, o además de, la mutación, por lo que la bacteria *Listeria* tiene atenuada la entrada en las células no fagocíticas (p. ej., a través de la unión de anticuerpos a la bacteria *Listeria*).

En algunas realizaciones, la bacteria *Listeria* atenuada no sólo tiene atenuada la entrada en las células no fagocíticas, con respecto a la bacteria *Listeria* sin modificar, tal como la bacteria *Listeria* de tipo silvestre, sino que la bacteria *Listeria* atenuada también tiene atenuada la diseminación de una célula a otra, con respecto a la bacteria *Listeria* sin modificar. En algunas realizaciones, la bacteria *Listeria* atenuada pertenece a una cepa mutante de *Listeria* que comprende una o más mutaciones genómicas que convierten a la bacteria *Listeria* en atenuada para la diseminación de una célula a otra. En algunas realizaciones se ha modificado la bacteria *Listeria* atenuada a través de medios diferentes de, o además de, la mutación, por lo que la bacteria *Listeria* tiene atenuada la diseminación de una célula a otra (p. ej., a través del tratamiento con S-59/UVA).

La bacteria atenuada pertenece al género *Listeria*. En algunas realizaciones, la bacteria *Listeria* atenuada pertenece a una especie seleccionada entre el grupo que consiste en *Listeria monocytogenes*, *Listeria ivanovii*, *Listeria seeligeri* o *Listeria innocua*. Además, la invención contempla la mutación de cepas de una serie de especies de *Listeria* (p. ej., una cepa que normalmente expresa la internalina B, o su equivalente), especialmente donde las bacterias son normalmente patógenas y/o utilizan las invasinas para invadir las células eucariotas no fagocíticas. En una realización, la cepa de *Listeria* que está mutada es una cepa patógena de *Listeria*. En otra realización, la cepa de *Listeria* que está mutada produce al menos una invasina. En otra realización, la cepa es *Listeria monocytogenes*, *Listeria ivanovii*, *Listeria seeligeri* o *Listeria innocua*. En otra realización, la cepa mutante de *Listeria* es una cepa mutante de *Listeria monocytogenes*.

La presente descripción da a conocer adicionalmente cultivos de la bacteria *Listeria* atenuada descrita en la presente memoria, tales como cultivos de las cepas mutantes.

A. Atenuación de la entrada en las células no fagocíticas

Por lo general, la bacteria *Listeria* atenuada de la presente descripción es una bacteria *Listeria* que comprende una o más modificaciones para atenuar la entrada en las células no fagocíticas («bacteria *Listeria* modificada» o «bacteria *Listeria* atenuada») con respecto a la misma bacteria *Listeria* sin la o las modificaciones que convierten a la bacteria en atenuada para la entrada en las células no fagocíticas («bacteria *Listeria* sin modificar» o «bacteria *Listeria* sin atenuar»). Una bacteria *Listeria* que tiene atenuada la entrada en las células no fagocíticas es menos capaz de infectar que la bacteria *Listeria* de tipo silvestre de la misma especie al menos un tipo de célula no fagocítica del medio extracelular de la célula no fagocítica. En algunas realizaciones, la capacidad de la bacteria *Listeria* atenuada para entrar en las células no fagocíticas se reduce al menos aproximadamente el 10%, al menos aproximadamente el 25%, al menos aproximadamente el 50%, al menos aproximadamente el 75% o al menos aproximadamente el 90%, con respecto a la bacteria *Listeria* de tipo silvestre. En otras realizaciones, la capacidad de la bacteria *Listeria* atenuada para entrar en las células no fagocíticas se reduce al menos aproximadamente el 50% con respecto a la

bacteria *Listeria* de tipo silvestre de la misma especie. En otras realizaciones, la capacidad de la bacteria *Listeria* atenuada para entrar en las células no fagocíticas se reduce al menos aproximadamente el 75%.

En algunas realizaciones, la bacteria *Listeria* atenuada pertenece a una cepa mutante de *Listeria* que comprende una o más mutaciones en su genoma que provoca que la cepa tenga atenuada la entrada en las células no fagocíticas (cepa «mutante» de *Listeria*) con respecto a la misma cepa de *Listeria* sin una o más modificaciones (cepa «no mutante» de *Listeria*). La capacidad de la cepa de *Listeria* atenuada para entrar en las células no fagocíticas se puede reducir al menos aproximadamente el 10%, al menos aproximadamente el 25%, al menos aproximadamente el 50%, al menos aproximadamente el 75% o al menos aproximadamente el 90%, con respecto a la cepa de *Listeria* sin modificar (no mutante).

- 10 Se entiende que la bacteria *Listeria* atenuada, tal como una cepa mutante de *Listeria*, no necesita tener necesariamente atenuada la entrada en más de un tipo de célula no fagocítica. Por ejemplo, la cepa atenuada puede tener atenuada la entrada en los hepatocitos, pero no tener atenuada la entrada en las células epiteliales. Como otro ejemplo, la cepa atenuada puede tener atenuada la entrada en las células epiteliales, pero no en los hepatocitos. También se entiende que la atenuación de la entrada en una célula no fagocítica de una *Listeria* modificada
- 15 determinada es el resultado de mutar un gen determinado, por ejemplo, una mutación de delección, que codifica una proteína invasina que interacciona con un receptor celular particular, y como resultado facilita la infección de una célula no fagocítica. Por ejemplo, las cepas mutantes de *Listeria* Δ *inlB* tienen atenuada la entrada en células no fagocíticas que expresan el receptor del factor de crecimiento de hepatocitos (c-met), que incluyen las líneas celulares de hepatocitos (p. ej., HepG2) y los hepatocitos humanos primarios.
- 20 En algunas realizaciones, incluso aunque las bacterias *Listeria* (p. ej., la bacteria *Listeria* mutante) tengan atenuada la entrada en las células no fagocíticas, las bacterias *Listeria* todavía son capaces de ser captadas por las células fagocíticas, tal como al menos las células dendríticas y/o los macrófagos. En una realización, la capacidad de la bacteria *Listeria* atenuada para entrar en las células fagocíticas no disminuye por la modificación hecha a la cepa, tal como la mutación de una invasina (a saber, después de la modificación se mantiene aproximadamente el 95% o
- 25 más de la capacidad medida de la cepa para ser tomada por las células fagocíticas). En otras realizaciones, la capacidad de la bacteria *Listeria* atenuada para entrar en las células fagocíticas disminuye no más de aproximadamente el 10%, no más de aproximadamente el 25%, no más de aproximadamente el 50% o no más de aproximadamente el 75%.

- Los expertos en la técnica conocen los ensayos *in vitro* para determinar si una bacteria *Listeria* (p. ej., una cepa mutante de *Listeria*) tiene o no atenuada la entrada en las células no fagocíticas. Por ejemplo, tanto Dramsi et al., *Molecular Microbiology* 16: 251-261 (1995) como Gaillard et al., *Cell* 65: 1127-1141 (1991) describen ensayos para detectar la capacidad de las cepas mutantes de *L. monocytogenes* para entrar en determinadas líneas celulares. Por ejemplo, para determinar si una bacteria *Listeria* con una modificación determinada tiene atenuada la entrada en un tipo determinado de células no fagocíticas, se determina la capacidad que tiene la bacteria *Listeria* atenuada para
- 30 entrar en un tipo particular de célula no fagocítica y se compara con la capacidad que la bacteria *Listeria* idéntica sin la modificación tiene para entrar en las células no fagocíticas. Asimismo, para determinar si una cepa de *Listeria* con una mutación determinada tiene atenuada la entrada en un tipo determinado de células no fagocíticas, se determina la capacidad que la cepa mutante de *Listeria* tiene para entrar en un tipo determinado de célula no fagocítica y se compara con la capacidad que la cepa de *Listeria* sin la mutación tiene para entrar en las células no fagocíticas.
- 35
- 40 En algunas realizaciones de la descripción, la cantidad de atenuación de la capacidad de la bacteria *Listeria* para entrar en las células no fagocíticas oscila entre una reducción de dos veces y un nivel mucho mayor de atenuación. En algunas realizaciones, la atenuación de la capacidad de la bacteria *Listeria* para entrar en las células no fagocíticas es al menos de unos 0,3 log, unos 1 log, unos 2 log, unos 3 log, unos 4 log, unos 5 log o al menos unos 6 log. En algunas realizaciones, la atenuación está en el intervalo de unos 0,3 a > 8 log, unos 2 a > 8 log, unos 4 a > 8
- 45 log, unos 6 a > 8 log, unos 0,3-8 log, también unos 0,3-7 log, también unos 0,3-6 log, también unos 0,3-5 log, también unos 0,3-4 log, también unos 0,3-3 log, también unos 0,3-2 log, también unos 0,3-1 log. En algunas realizaciones, la atenuación está en el intervalo de unos 1 a > 8 log, 1-7 log, 1-6 log, también unos 2-6 log, también unos 2-5 log, también unos 3-5 log.

- En algunas realizaciones, la atenuación de la bacteria *Listeria* de la presente invención se puede medir en términos de los efectos biológicos de la bacteria *Listeria* en un hospedador. La patogenia de una cepa de *Listeria* se puede evaluar midiendo la DL₅₀ en los ratones y en otros vertebrados (ejemplo 2, tabla 1). La DL₅₀ es la cantidad, o dosis, de *Listeria* que hay que inyectar en los vertebrados para provocar la muerte del 50% de los vertebrados. Los valores de la DL₅₀ se pueden comparar para la bacteria *Listeria* que tiene una modificación determinada (p. ej., mutación) frente a la bacteria *Listeria* sin la modificación determinada como una medida del nivel de atenuación. Por ejemplo,
- 50 si la cepa de *Listeria* sin una mutación determinada tiene una DL₅₀ de 10³ bacterias y la cepa de *Listeria* que tiene la mutación particular tiene una DL₅₀ de 10⁵ bacterias, la cepa ha sido atenuada, por lo que su DL₅₀ se ha incrementado 100 veces o 2 log.
- 55

Alternativamente, el grado de atenuación de la capacidad de una bacteria *Listeria* para infectar las células no fagocíticas se puede evaluar mucho más directamente *in vitro*. La capacidad de una bacteria *Listeria* modificada para infectar las células no fagocíticas, tales como los hepatocitos, se puede comparar con la capacidad de la bacteria *Listeria* no modificada o de la bacteria *Listeria* de tipo silvestre para infectar las células fagocíticas. En tal

- 5 ensayo, las bacterias *Listeria* modificadas y sin modificar se añaden típicamente a las células no fagocíticas *in vitro* durante un tiempo limitado (por ejemplo, una hora), a continuación se lavan las células con una solución que contiene gentamicina para matar cualquier bacteria extracelular, se lisan las células y luego se siembran en placas para valorar la titulación. Ejemplos de tal ensayo se dan a conocer en el ejemplo 9 y en el ejemplo 10 que vienen a continuación.
- 10 El grado de atenuación también se puede medir cualitativamente mediante otros efectos biológicos, tal como el alcance de la histopatología o la cantidad de enzimas hepáticas en el suero. La concentración de alanina aminotransferasa (ALT), aspartato aminotransferasa (AST), albúmina y bilirrubina en el suero de ratones a los que se les ha inyectado la bacteria *Listeria* de la presente invención se determinan en un laboratorio clínico. Las comparaciones de estos efectos en los ratones y en otros vertebrados se pueden realizar para la bacteria *Listeria*
- 15 con y sin modificaciones/mutaciones determinadas como un modo de valorar la atenuación de la bacteria *Listeria*. La atenuación de la bacteria *Listeria* con respecto a la presente invención también se puede medir según la histopatología. La cantidad de *Listeria* que se puede recuperar de diferentes tejidos de un vertebrado infectado, tal como hígado, bazo y sistema nervioso, también se puede utilizar como una medida del nivel de atenuación al comparar estos valores en los vertebrados en los que se inyectó la bacteria *Listeria* mutante frente a *Listeria* no mutante.
- 20 Por ejemplo, la cantidad de *Listeria* que se puede recuperar de los tejidos infectados, tales como el hígado o el bazo, en función del tiempo se puede utilizar como una medida de la atenuación al comparar estos valores en los ratones inyectados con la bacteria *Listeria* mutante frente a la bacteria *Listeria* no mutante.

Por consiguiente, la atenuación de la bacteria *Listeria* de la presente invención se puede medir en términos de carga bacteriana en determinados órganos en los ratones que se sabe que son diana de la bacteria *Listeria* de tipo silvestre. Por ejemplo, la atenuación de la bacteria *Listeria* de la presente invención se puede medir al contar las colonias (unidades formadoras de colonias; UFC) que aparecen al sembrar en placa las diluciones de

- 25 homogéneos del hígado o del bazo (homogéneos en H₂O + NP40 al 0,2%) en medio BHI con agar. Las UFC del hígado o del bazo se pueden medir, por ejemplo, durante el transcurso de tiempo después de la administración de la bacteria *Listeria* modificada de la presente invención a través de una serie de vías, entre ellas, intravenosa,
- 30 intraperitoneal, intramuscular y subcutánea (véase, p. ej., el ejemplo 8 que viene a continuación). Adicionalmente, la bacteria *Listeria* de la presente invención se puede medir y comparar con una *Listeria* de tipo silvestre resistente a fármacos (o cualquier otra cepa de *Listeria* seleccionada) en el hígado y en el bazo (o cualquier otro órgano seleccionado) durante una cinética temporal después de la administración mediante el ensayo del índice competitivo, como está descrito.
- 35 El grado de atenuación de la captación de la bacteria de las vacunas por las células no fagocíticas no necesita ser una atenuación absoluta para proporcionar una vacuna inocua y eficaz. En algunas realizaciones, el grado de atenuación es el que proporciona una reducción suficiente de la toxicidad que previene o reduce los síntomas de la toxicidad a unos niveles que no suponen un riesgo para la vida.

***Listeria* que comprende mutaciones que atenúan la entrada de *Listeria* en las células no fagocíticas**

- 40 En algunas realizaciones, la bacteria *Listeria* atenuada comprende una o más mutaciones que convierten la bacteria *Listeria* en defectuosa con respecto a una o más invasinas (alternativamente denominada una proteína de invasión) normalmente producidas por *Listeria*, tal como una internalina. En algunas realizaciones de la invención, la atenuación de la capacidad de la bacteria *Listeria* atenuada para entrar en las células no fagocíticas se consigue utilizando mutaciones que afectan a una o más invasinas expresadas por la bacteria. En algunas realizaciones, la
- 45 bacteria *Listeria* atenuada es un miembro de una cepa mutante de *Listeria* que tiene atenuada la entrada en las células no fagocíticas.

En una realización, las bacterias *Listeria* atenuadas son defectuosas en la producción de una o más invasinas. Una bacteria *Listeria* atenuada es defectuosa con respecto a la producción de una invasina si la bacteria produce menos cantidad de una versión funcional de la invasina o expresa una versión de la invasina que es parcial o totalmente

- 50 afuncional, o ambas. Así mismo, una cepa de *Listeria* es defectuosa con respecto a la producción de una invasina si la bacteria de la cepa o bien produce menos cantidad de una versión funcional de la invasina, o bien expresa una versión de la invasina que es parcial o totalmente afuncional, o bien ambas.

En algunas realizaciones, el genoma de la bacteria *Listeria* atenuada comprende una o más mutaciones en un gen que codifica una invasina, tal como una internalina. La mutación es opcionalmente una mutación puntual, una

- 55 mutación de inserción, una mutación de terminación, una mutación de cambio de fase o una delección de parte o todo el gen que codifica la invasina. En algunas realizaciones se elimina el gen que codifica la invasina (por ejemplo,

inlB).

En algunas realizaciones, la mutación del gen que codifica la invasina se encuentra en la secuencia codificante. En estas realizaciones, la mutación del gen que codifica la invasina convierte a la proteína en una invasina menos funcional que la secuencia sin mutar. En algunas realizaciones, la mutación del gen que codifica la invasina convierte a la proteína en totalmente afuncional.

En realizaciones alternativas, la expresión de al menos un gen que codifica una invasina en la cepa mutante está inhibida con respecto a una cepa no mutante. Por ejemplo, el genoma de la bacteria *Listeria* mutante puede comprender al menos una mutación en un gen que codifica una invasina, en donde la mutación dificulta la expresión. Por ejemplo, la mutación puede estar en una o más de las secuencias de control (tales como el promotor o la región de fijación del ribosoma) de los genes, por lo que se disminuye o desaparece la expresión del gen de la invasina. Alternativamente, la bacteria *Listeria* mutante puede comprender al menos una mutación en un gen diferente del que codifica una invasina, pero que sin embargo da lugar a la disminución del nivel de expresión de una o más invasinas.

Las invasinas son proteínas expresadas por *Listeria* que interaccionan con receptores que expresan determinadas células hospedadoras y, como resultado, facilitan la penetración de *Listeria* en las células hospedadoras. Algunas invasinas se encuentran en la pared celular de *Listeria*. Otras invasinas son secretadas por *Listeria*. Las invasinas de *Listeria* incluyen, pero sin limitarse a ellas, los miembros de la familia de proteínas relacionada con las internalinas («internalinas»). Las internalinas dirigen típicamente la captación de la bacteria *Listeria* por las células no fagocíticas, tal como las células de hígado, bazo o cerebro.

Se han identificado una serie de internalinas en *L. monocytogenes* (Boland et al., *Clinical Microbiology Reviews*, 2001, 14, 584-640). Estas internalinas incluyen, pero sin limitarse a ellas, *InlA*, *InlB*, *InlC*, *InlC2*, *InlD*, *InlE*, *InlF*, *InlG* e *InlH* (Dramsi et al., *Infection and Immunity*, 65: 1615-1625 (1997); Raffelsbauer et al., *Mol. Gen. Genet.* 260: 144-158 (1988)). Las secuencias génicas que codifican estas proteínas se han descrito con anterioridad. Por ejemplo, las secuencias de *inlA* y de *inlB* se han descrito en Gaillard et al., *Cell*, 65: 1127-1141 (1991) y tienen el número de acceso de GenBank M67471. Los genes que codifican otros miembros de la familia de proteínas relacionada con las internalinas se identifican en la tabla 2 de la web del material complementario en la web de Glaser et al., *Science*, 294: 849-852 (2001), (www.sciencemag.org/cgi/content/full/294/5543/849/DC1), que incluye *Imo0327*, *Imo0331*, *Imo0514*, *Imo0610*, *Imo0732*, *Imo1136*, *Imo1289*, *Imo2396*, *Imo0171*, *Imo0333*, *Imo0801*, *Imo1290*, *Imo2026* y *Imo2821* (las secuencias de cada miembro de la familia de proteínas relacionada con las internalinas se encuentran en el genoma de la cepa EGD de *L. monocytogenes*, con n.º de acceso de GenBank AL591824, y/o en el genoma de la cepa EGD-e de *L. monocytogenes*, con n.º de acceso de GenBank NC_003210. La localización de los diferentes genes relacionados con la internalina se indican en Glaser et al.).

En algunas realizaciones, las bacterias *Listeria* atenuadas son defectuosas con respecto a una internalina, tal como una o más de las proteínas de internalina enumeradas anteriormente o codificadas por un gen de internalina recogido anteriormente. En algunas realizaciones, la bacteria *Listeria* atenuada es defectuosa con respecto a la internalina B, o su equivalente (según la especie de *Listeria* utilizada). En otras realizaciones, la bacteria *Listeria* atenuada es defectuosa con respecto a la internalina A, o su equivalente (según la especie de *Listeria* utilizada). En otras realizaciones, la bacteria *Listeria* atenuada es defectuosa con respecto a una o más internalinas diferentes a la internalina A, o su equivalente (según la especie de *Listeria* utilizada).

Por ejemplo, la cepa mutante de *Listeria* es opcionalmente una cepa de *L. monocytogenes* que se ha modificado para ser defectuosa en la producción de la internalina B funcional. Aún en otra realización, se ha modificado *L. monocytogenes* para que sea defectuosa en la producción de una internalina diferente a la internalina A (*InlA*) (se entiende que las proteínas que son los equivalentes funcionales de las internalinas recogidas anteriormente, entre ellas la internalina B, pueden estar presentes en las especies de *Listeria* diferentes de *Listeria monocytogenes*. Por consiguiente, en algunas realizaciones, la cepa mutante de *Listeria* está modificada para que sea defectuosa con respecto a la producción de una proteína que es funcionalmente equivalente a la internalina B).

Las cepas mutantes de *Listeria* pueden expresar menos cantidad de la secuencia de la internalina de tipo silvestre que las cepas de *Listeria* que no son mutantes. Alternativamente, la bacteria *Listeria* mutante puede expresar una forma mutada de internalina que no es funcional o que es menos funcional que la expresada por la bacteria *Listeria* que no es mutante. Aún en otra realización, la bacteria *Listeria* mutante no expresa en absoluto una internalina determinada, tal como la internalina B, porque se ha eliminado la mayor parte o todo el gen o secuencia que codifica la internalina.

En una realización, el genoma del mutante de *Listeria* comprende una mutación atenuadora en uno o más genes de internalinas (entre ellos, pero no necesariamente limitados a ellos, los recogidos más arriba). En una realización, el genoma del mutante de *Listeria* que tiene atenuada la entrada en las células no fagocíticas comprende al menos una mutación en un gen seleccionado entre el grupo que consiste en los genes *inlA*, *inlB*, *inlC*, *inlC2*, *inlD*, *inlE*, *inlF*, *inlG* e *inlH*. En otra realización, el genoma del mutante de *Listeria* comprende al menos una mutación en un gen

seleccionado entre el grupo que consiste en los genes *inlB*, *inlC*, *inlC2*, *inlD*, *inlE*, *inlF*, *inlG* e *inlH*. En una realización, el mutante de *Listeria* es un mutante de *Listeria monocytogenes* que es defectuoso con respecto a la internalina B. En otra realización más, el mutante de *Listeria* es un mutante de *Listeria monocytogenes* y su genoma comprende al menos una mutación en el gen *inlB*. En otra realización, el mutante de *Listeria* comprende al menos una mutación en un gen de internalina diferente al gen *inlA*. En otra realización, el mutante de *Listeria* comprende al menos una mutación en el gen *inlA*.

A lo largo de estas descripciones (incluidas las figuras) se utiliza terminología alternativa para referirse a las mutaciones genéticas, bien si son mutaciones que atenúan la entrada de *Listeria* en las células no fagocíticas o si son otras mutaciones (tales como las mutaciones de diseminación de una célula a otra). La terminología «xyz», «Δxyz», «mutación de delección de xyz» y «mutación por eliminación de xyz» se utilizan indistintamente en la presente memoria para referirse a los mutantes de delección en los que al menos falta la mayor parte o toda de la secuencia codificante del gen xyz (en muchos casos se ha eliminado todo el gen xyz de estos mutantes). Por ejemplo, la terminología «*inlB*» y «Δ*inlB*», «mutante de delección de *inlB*» y «mutante por eliminación de *inlB*» se utilizan por lo general indistintamente en la presente memoria.

- 15 La InlA (internalina A) [Gaillard et al., *Cell*, 65: 1127-1141 (1991); n.º de acceso de GenBank NC_003210] dirige la captación de *Listeria* por las células epiteliales tales como las del intestino. La atenuación de la bacteria *Listeria* al convertir la cepa en defectuosa con respecto a la internalina A puede mejorar la inocuidad del uso de las vacunas en las composiciones farmacéuticas y de vacunas. La invasión de las células epiteliales intestinales por la bacteria *Listeria* puede dar lugar a una infección digestiva de *Listeria* caracterizada por fiebre, cefaleas, diarrea o náuseas.
- 20 La InlB (internalina B) [Gaillard et al., *Cell*, 65: 1127-1141 (1991); número de acceso de GenBank AL591975 (cepa EGD de *Listeria monocytogenes*, genoma completo, segmento 3/12, región del gen *inlB*: nts. 97008-98963); y número de acceso de GenBank NC_003210 (cepa EGD de *Listeria monocytogenes*, genoma completo, región del gen *inlB*: nts. 457008-458963), cada uno de los cuales se incorpora por referencia en la presente memoria en su totalidad] dirige la captación de *Listeria* por los hepatocitos o por las células endoteliales tales como las células del endotelio vascular de la microvasculatura encefálica que comprende la barrera hematoencefálica [para más descripciones de la internalina B, véase Ireton et al., *J. of Biological Chemistry*, 274: 17025-17032 (1999); Dramsi et al., *Molecular Microbiology* 16: 251-261 (1995); Mansell et al., *J. of Biological Chemistry*, 276: 43597-43603 (2001); y Bierne et al., *J. of Cell Science* 115: 3357-3367 (2002), todas las cuales se incorporan por referencia en la presente memoria en su totalidad]. La atenuación de *Listeria* que convierte la cepa en defectuosa con respecto a la internalina B puede mejorar la inocuidad del uso de las cepas en las composiciones farmacéuticas y de vacunas. La infección de los hepatocitos por *Listeria* puede dar lugar a inflamación hepática debido a la lisis de los hepatocitos. La infección de las células del endotelio microvascular del cerebro puede dar lugar a meningoencefalitis, que se caracteriza por cefaleas, tortícolis, pérdida del equilibrio, confusión, embotamiento, convulsiones o muerte. La meningitis es la causa principal de muerte por *Listeria* entre los adultos.
- 35 En algunas realizaciones, la cepa mutante de *Listeria* es una cepa de *Listeria* que comprende una o más mutaciones en su genoma que ocasionan que la cepa sea defectuosa con respecto a la internalina B en relación con la cepa de *Listeria* sin una o más mutaciones. Una cepa de *Listeria* es defectuosa con respecto a la producción de internalina B si la bacteria de la cepa produce, o bien menos cantidad de una versión funcional de la internalina B, o bien expresa una versión de internalina B que es parcial o totalmente afuncional, o bien ambas (se entiende que la terminología «internalina B» tal y como se utiliza en la presente memoria se refiere no sólo a la internalina B de *Listeria monocytogenes*, sino también a los equivalentes de la misma en otras especies de *Listeria*).

En algunas realizaciones, el genoma de *Listeria* comprende una o más mutaciones en un gen que codifica la internalina B (*inlB*). La mutación es opcionalmente una mutación puntual, una mutación de inserción, una mutación de terminación, una mutación de cambio de fase o una delección de parte o todo el gen que codifica la internalina B.

- 45 En algunas realizaciones, todo o al menos la mayoría de la secuencia que codifica la internalina B se elimina del genoma de *Listeria*. En algunas realizaciones, se elimina la mayor parte o todo el gen *inlB*. En algunas realizaciones, la bacteria *Listeria* atenuada no sintetiza ninguna internalina B funcional.

En algunas realizaciones, la mutación del *inlB* se encuentra en la secuencia codificante. En estas realizaciones, la mutación del *inlB* convierte a la internalina B en menos funcional que la proteína sintetizada a partir de la secuencia del *inlB* sin mutar. En algunas realizaciones, la mutación del *inlB* convierte a la internalina B en totalmente afuncional (aproximadamente el 100% menos funcional que la bacteria *Listeria* que no es mutante). En algunas realizaciones, la internalina B expresada por el mutante de *Listeria* es al menos aproximadamente el 90% menos funcional, al menos aproximadamente el 75% menos funcional, al menos aproximadamente el 50% menos funcional o al menos aproximadamente el 25% menos funcional, que la internalina B de la bacteria *Listeria* que no es mutante.

- 55 En realizaciones alternativas, la expresión del *inlB* en la cepa mutante está inhibida con respecto a una cepa no mutante. Por ejemplo, el genoma de la bacteria *Listeria* mutante puede comprender al menos una mutación en *inlB*,

en donde la mutación dificulta la expresión. Por ejemplo, la mutación puede estar en una o más de las secuencias de control (tales como el promotor o la región de fijación del ribosoma) del *inlB*, por lo que se disminuye o desaparece la expresión del *inlB*. Alternativamente, el mutante de *Listeria* puede comprender al menos una mutación en un gen diferente de *inlB*, pero que sin embargo da lugar a una disminución del nivel de expresión de la internalina B. En algunas realizaciones, la expresión de la internalina B se puede reducir en aproximadamente el 100%, en al menos aproximadamente el 90%, en al menos aproximadamente el 75%, en al menos aproximadamente el 50%, o en al menos aproximadamente el 25%.

Se debe entender que las invasinas son proteínas bacterianas que facilitan la infección de las células no fagocíticas, pues como tales se pueden seleccionar a partir de genes de internalinas o de cualquier otro gen bacteriano cuyo producto codificado facilite la fijación y la captación por las células no fagocíticas.

Las mutaciones bacterianas se pueden conseguir mediante métodos mutagénicos tradicionales, tales como sustancias químicas mutagénicas o radiación, seguidos por la selección de los mutantes. El experto en la técnica también puede conseguir las mutaciones bacterianas mediante la tecnología del ADN recombinante. Por ejemplo, en Camilli et al., *Molecular Micro*, 8: 143-147 (1993) se describe un método de intercambio alélico que es adecuado para el uso en la generación de mutantes tales como mutantes de delección (Camilli et al., se incorpora por referencia en la presente memoria en su totalidad) (véase también el ejemplo 1, a continuación, para una descripción de una aplicación de ejemplo de intercambio alélico). Alternativamente, se puede utilizar el protocolo de reemplazo génico descrito en Biswas et al., *J. Bacteriol.* 175: 3628-3635 (1993). Los expertos en la técnica conocen otros métodos similares.

La confirmación de que una mutación determinada, tal como una mutación determinada de *inlB*, está presente en una cepa de *Listeria* y/o que la cepa es defectuosa con respecto a la producción de una internalina determinada, tal como internalina B, se puede obtener mediante una serie de métodos conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, se puede clonar y secuenciar la porción pertinente del genoma de la cepa. Alternativamente se pueden identificar mutaciones específicas por PCR con parejas de cebadores que codifican regiones adyacentes a una delección u otra mutación. De igual forma se pueden utilizar transferencias de tipo Southern para detectar cambios en el genoma bacteriano. De igual forma se puede analizar si una proteína determinada se expresa en la cepa mediante técnicas estándares en la técnica, tal como análisis de inmunotransferencia. La confirmación de que la cepa contiene una mutación en el gen deseado también se puede obtener por la comparación del fenotipo de la cepa con un fenotipo previamente descrito. Por ejemplo, la confirmación de que la cepa es defectuosa con respecto a la internalina B también se puede obtener por comparación del fenotipo de la cepa con los fenotipos previamente descritos para los mutantes de la internalina B.

A una cepa mutante se le puede evaluar opcionalmente la utilidad en la presente invención al evaluar si la cepa tiene atenuada o no la entrada en al menos un tipo de célula no fagocítica (véase el apartado II.A, más arriba). Para determinar la idoneidad para el uso en los métodos y las composiciones de la presente invención, también se le puede evaluar a la cepa mutante su capacidad para ser captada por las células fagocíticas.

La idoneidad de un mutante determinado de *Listeria*, tal como la bacteria *Listeria* que comprende una delección en un gen de una internalina determinada (p. ej., *inlB*), para uso en una vacuna se puede valorar midiendo la DL₅₀ de la cepa, la protección proporcionada por la cepa contra la exposición a una *Listeria* de tipo silvestre, la capacidad de la cepa para inducir una respuesta de linfocitos T específica contra un antígeno, la capacidad de la cepa para inducir una respuesta citotóxica *in vivo* contra las células que expresan un antígeno, y/o la eficacia terapéutica *in vivo* de la cepa contra una enfermedad diana (p. ej., en un modelo de ratón), así como otros tipos de ensayos conocidos por los expertos en la técnica. Los ejemplos específicos de algunos de estos ensayos se muestran en los ejemplos 2-7 que vienen a continuación. La medición de la DL₅₀ del mutante de *Listeria* se ejemplifica en el ejemplo 2 que viene a continuación. La inmunogenia de diferentes cepas mutantes de *Listeria* se analiza mediante ensayos de TCI en los ejemplos 5-7 que vienen a continuación. El ejemplo 3 que viene a continuación presenta un ejemplo de un posible ensayo para valorar la citotoxicidad *in vivo* de las cepas mutantes de *Listeria*. El ejemplo 4 que viene a continuación da a conocer un ejemplo de un ensayo para analizar la eficacia terapéutica de una cepa mutante de *Listeria*.

Tal y como se recoge más arriba, se describe un método para disminuir la capacidad que una cepa de *Listeria* tiene para entrar en una célula no fagocítica, al mismo tiempo que conserva sustancialmente la capacidad de entrar en las células fagocíticas, que comprende introducir al menos una mutación en al menos un gen de la cepa que codifica una invasina de modo que disminuyan los niveles de la invasina activa producida por la cepa. En una realización, la invasina es una internalina diferente de *InlA*.

Listeria que comprende otras modificaciones que afectan a la entrada en las células no fagocíticas

En algunas realizaciones se hace reaccionar *Listeria* con anticuerpos monoclonales o policlonales (o fragmentos de los mismos) que son específicos de determinadas proteínas invasinas (p. ej., internalina B) o, alternativamente, son específicos de varios antígenos o patrones moleculares repetidos que se expresan sobre la superficie de la bacteria.

Los anticuerpos (Ac) específicos contra una proteína invasina seleccionada o contra varias proteínas y/o macromoléculas hacen que la bacteria *Listeria* tenga atenuada la entrada en las células no fagocíticas (cepa de *Listeria* «opsonizada con Ac») con respecto a la misma cepa de *Listeria* sin el tratamiento con Ac (cepa de *Listeria* «sin opsonizar») (véase, por ejemplo, el ejemplo 10 que viene a continuación). La capacidad para entrar en las células no fagocíticas que tiene la cepa de *Listeria* que lleva fijada los anticuerpos puede reducirse al menos aproximadamente el 10%, al menos aproximadamente el 25%, al menos aproximadamente el 50%, al menos aproximadamente el 75%, o al menos aproximadamente el 90%, con respecto a la cepa de *Listeria* que no lleva fijados los anticuerpos.

En algunas realizaciones alternativas de la invención, la capacidad de *Listeria* para entrar en las células no fagocíticas se atenúa mediante el bloqueo de uno o más restos clave de la superficie de *Listeria*. Por ejemplo, una proteína implicada en la entrada de *Listeria* en las células fagocíticas puede bloquearse por una entidad que une la proteína de la superficie celular y la bloquea y la incapacita para fijarse a sus receptores sobre una célula no fagocítica. En algunas realizaciones, se bloquea una internalina sobre la superficie de *Listeria*. En algunas realizaciones, la proteína de la superficie celular es la internalina B. En algunas realizaciones, el resto clave de la superficie de *Listeria* se bloquea con un anticuerpo o con un fragmento de anticuerpo, tal como un fragmento Fab. En algunas realizaciones, la superficie de *Listeria* está recubierta con anticuerpos o fragmentos de anticuerpo anti-*Listeria*.

En algunas realizaciones, la capacidad de *Listeria* para entrar en las células no fagocíticas se efectúa mediante la opsonización de la bacteria *Listeria*. En algunas realizaciones, la bacteria *Listeria* atenuada se ha opsonizado con suero anti-*Listeria* de alta titulación. En algunas realizaciones, la bacteria *Listeria* atenuada se ha opsonizado con anticuerpos policlonales. En otras realizaciones, la bacteria *Listeria* atenuada se ha opsonizado con anticuerpos monoclonales. En algunas realizaciones, los anticuerpos utilizados para modificar la bacteria *Listeria* mediante opsonización son anticuerpos anti-*Listeria* policlonales. En algunas realizaciones, los anticuerpos utilizados para opsonizar la bacteria *Listeria* son anticuerpos antiinternalina, tales como anticuerpos monoclonales o policlonales específicos de la internalina B, o fragmentos de los mismos.

Se pueden producir anticuerpos específicos contra *Listeria* mediante técnicas bien conocidas por los expertos en la técnica, tales como mediante infección de ratones con *Listeria* por vía i.v. para producir suero de ratón específico de *Listeria* de alta titulación. Luego se puede generar la bacteria *Listeria* opsonizada mediante la incubación de la bacteria *Listeria* a atenuar con el suero anti-*Listeria* de ratón. Los inventores han demostrado que tal *Listeria* opsonizada resultante tiene atenuada la entrada en las células no fagocíticas, pero no en las células fagocíticas (véase, p. ej., el ejemplo 10 que viene a continuación).

Por consiguiente, en algunas realizaciones, la bacteria *Listeria* atenuada está opsonizada. En algunas realizaciones, la bacteria *Listeria* opsonizada también tiene atenuada la diseminación de una célula a otra. Por ejemplo, la bacteria *Listeria* atenuada puede ser una bacteria *Listeria* opsonizada que es defectuosa con respecto a ActA (p. ej., un mutante de delección de *actA*).

B. Atenuación de *Listeria* para la diseminación de una célula a otra

En algunas realizaciones, las bacterias *Listeria* atenuadas utilizadas en las composiciones, vacunas y métodos descritos en la presente memoria no sólo tienen atenuada la entrada en las células no fagocíticas, sino que también tienen atenuada la diseminación de una célula a otra. Una bacteria *Listeria* tiene atenuada la diseminación de una célula a otra si la bacteria *Listeria* es menos capaz de diseminarse a otras células desde una célula infectada (una célula que comprende la bacteria *Listeria* dentro de su citoplasma) a una célula vecina. En otras palabras, la capacidad de la bacteria *Listeria* atenuada para crecer y diseminarse disminuye con respecto a la bacteria *Listeria* de tipo silvestre de la misma especie. En algunas realizaciones, la atenuación de *Listeria* para la diseminación de una célula a otra está directamente afectada. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la bacteria *Listeria* tiene atenuada la diseminación de una célula a otra porque la capacidad de la bacteria *Listeria* para formar protuberancias desde la célula infectada que entran en una célula vecina está alterada con respecto al tipo silvestre. En otras realizaciones, la atenuación de la bacteria *Listeria* para la diseminación de una célula a otra se debe a una alteración menos directa que sin embargo atenúa la diseminación de *Listeria* de una célula a otra. Por ejemplo, en algunas realizaciones alternativas, se altera la capacidad de *Listeria* para abandonar la vacuola de una célula fagocítica.

En algunas realizaciones, la capacidad de la bacteria *Listeria* atenuada para diseminarse de una célula a otra se reduce al menos aproximadamente el 10%, al menos aproximadamente el 25%, al menos aproximadamente el 50%, al menos aproximadamente el 75%, o al menos aproximadamente el 90%, con respecto a la bacteria *Listeria* de tipo silvestre. En algunas realizaciones, la capacidad de la bacteria *Listeria* atenuada para diseminarse de una célula a otra se ve reducida al menos aproximadamente el 50%, al menos aproximadamente el 75% o al menos aproximadamente el 90%, con respecto a la bacteria *Listeria* de tipo silvestre. En algunas realizaciones, la capacidad de la bacteria *Listeria* atenuada para diseminarse de una célula a otra se ve reducida al menos aproximadamente el

50% respecto a la bacteria *Listeria* de tipo silvestre.

En algunas realizaciones, las bacterias *Listeria* atenuadas comprenden mutaciones en sus genomas que atenúan la diseminación de *Listeria* de una célula a otra. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la bacteria *Listeria* atenuada pertenece a una cepa mutante de *Listeria*. En algunas realizaciones de la presente invención, el genoma de la cepa mutante de *Listeria* comprende una o más mutaciones en un gen diferente a cualquier gen de invasina. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el genoma de la cepa mutante de *Listeria* comprende una o más mutaciones en un gen diferente de *inlB*. Por ejemplo, la cepa mutante también puede ser deficiente en uno o más factores de virulencia que afectan a la diseminación de una célula a otra. En otras realizaciones, las bacterias *Listeria* tienen atenuada la diseminación de una célula a otra de distinta manera.

- 10 Incluso en aquellas realizaciones en donde las bacterias *Listeria* atenuadas tienen atenuada la diseminación de una célula a otra, las bacterias *Listeria* atenuadas todavía son preferentemente capaces de entrar en las células fagocíticas, tales como las células dendríticas y/o macrófagos. En una realización, la capacidad de la cepa atenuada de *Listeria* para entrar en las células fagocíticas no disminuye por la modificación realizada en la bacteria *Listeria* (a saber, aproximadamente el 95% o más de la capacidad medida de la cepa para entrar en las células fagocíticas se mantiene después de la modificación). En otras realizaciones, la capacidad de la bacteria *Listeria* atenuada para entrar en las células fagocíticas disminuye no más de aproximadamente el 10%, no más de aproximadamente el 25%, no más de aproximadamente el 50%, o no más de aproximadamente el 75%, con respecto al tipo silvestre.

- Los ensayos *in vitro* para determinar si la bacteria *Listeria* tiene o no atenuada la diseminación de una célula a otra los conocen los expertos en la técnica. Por ejemplo, se puede medir el diámetro de las calvas formadas durante un intervalo de tiempo después de la infección de monocapas de determinadas células en cultivo. Los ensayos de calvas dentro de monocapas de células L2 se pueden realizar como se describió anteriormente (Sun, A., A. Camilli y D. A. Portnoy. 1990, «Isolation of *Listeria monocytogenes* small-plaque mutants defective for intracellular growth and cell-to-cell spread». *Infect. Immun.* 58: 3770-3778), con modificaciones en los métodos de medida, como está descrito (Skoble, J., D. A. Portnoy y M. D. Welch. 2000, «Three regions within ActA promote Arp2/3 complex-mediated actin nucleation and *Listeria monocytogenes* motility». *J. Cell Biol.* 150: 527-538). En pocas palabras, las células L2 se dejan crecer hasta alcanzar la confluencia en placas de cultivo de tejido de seis pocillos y luego se infectan con bacterias durante 1 hora. Después de la infección, las células se cubren con medio calentado a 40 °C que comprende DME con agarosa al 0,8%, suero bovino fetal (p. ej., al 2 %) y una concentración deseada de gentamicina. La concentración de la gentamicina en el medio altera considerablemente el tamaño de las calvas, y es una medida de la alteración de la capacidad que tiene una determinada cepa de *Listeria* para diseminarse de una célula a otra (Glomski, I. J., M. M. Gedde, A. W. Tsang, J. A. Swanson y D. A. Portnoy. 2002. *J. Cell Biol.* 156: 1029-1038). Por ejemplo, a los 3 días de la infección de la monocapa, el tamaño de las calvas de las cepas de *Listeria* que tienen un fenotipo defectuoso de diseminación de una célula a otra se reduce al menos el 50% en comparación con la bacteria *Listeria* de tipo silvestre, cuando se cubren con el medio que contiene gentamicina a una concentración de 50 µg/ml. Por otra parte, el tamaño de las calvas de las cepas de *Listeria* que tienen un fenotipo defectuoso de diseminación de una célula a otra es similar al de la bacteria *Listeria* de tipo silvestre, cuando las monocapas infectadas se cubren con medio con agarosa que contiene sólo gentamicina a 5 µg/ml. Así pues, la capacidad relativa de una determinada cepa para alterar la diseminación de una célula a otra en una monocapa de células infectadas con respecto a la bacteria *Listeria* de tipo silvestre se puede determinar variando la concentración de la gentamicina en el medio que contiene agarosa. Opcionalmente, la visualización y la medición del diámetro de las calvas puede facilitarse añadiendo el medio que contiene rojo neutro (GIBCO BRL; dilución de 1:250 en un medio DME con agarosa) al recubrimiento 48 horas después de la infección. Adicionalmente, el ensayo de calvas se puede realizar en monocapas procedentes de otras células primarias o de células continuas. Por ejemplo, se pueden usar las células HepG2, una línea celular obtenida de hepatocitos, o hepatocitos humanos primarios para evaluar la capacidad de determinados mutantes para alterar la diseminación de una célula a otra, en comparación con la bacteria *Listeria* de tipo silvestre. En algunas realizaciones, las bacterias *Listeria* que comprenden mutaciones u otras modificaciones que atenúan la diseminación de las bacterias *Listeria* de una célula a otra producen calvas «nítidas» a altas concentraciones de gentamicina (unos 50 µg/ml).

- La atenuación de la bacteria *Listeria* atenuada de la presente invención también se puede medir menos directamente en términos de los efectos biológicos de la bacteria *Listeria* sobre un hospedador. La patogenia de la bacteria *Listeria* atenuada se puede valorar midiendo la DL₅₀ en los ratones o en otros vertebrados (véase el ejemplo 2, tabla 1). La DL₅₀ es la cantidad, o dosis, de *Listeria* inyectada en los vertebrados necesaria para provocar la muerte del 50% de los vertebrados. Los valores de la DL₅₀ se pueden comparar para la bacteria *Listeria* que tiene una mutación o modificación determinada frente a la bacteria *Listeria* sin la mutación o modificación determinada como una medida del nivel de atenuación. Por ejemplo, si la cepa de *Listeria* sin una mutación o modificación determinada tiene una DL₅₀ de 10³ bacterias y la cepa de *Listeria* que tiene la mutación o modificación determinada tiene una DL₅₀ de 10⁵ bacterias, se ha atenuado la cepa por lo que su DL₅₀ se incrementa 100 veces o 2 log.

También se puede medir cualitativamente el grado de atenuación mediante otros efectos biológicos, tales como la

extensión de la histopatología o la concentración de las enzimas hepáticas en el suero. Se determina en un laboratorio clínico la concentración de alanina aminotransferasa (ALT), aspartato aminotransferasa (AST), albúmina y bilirrubina en el suero de los ratones a los que se les inyectó la bacteria *Listeria* de la presente invención. Se pueden efectuar comparaciones de estos efectos en los ratones o en otros vertebrados para la bacteria *Listeria* con y sin mutaciones determinadas como modo de valorar la atenuación de la bacteria *Listeria*. La atenuación de la bacteria *Listeria* con respecto a la presente invención también se puede medir mediante histopatología. La cantidad de la bacteria *Listeria* que se puede recuperar de varios tejidos de un vertebrado infectado, tal como hígado, bazo o sistema nervioso, también se puede utilizar como una medida del nivel de atenuación al comparar estos valores en los vertebrados a los que se les inyectó la bacteria *Listeria* atenuada frente a la bacteria *Listeria* sin atenuar. Por ejemplo, la cantidad de *Listeria* que se puede recuperar de los tejidos infectados, tales como el hígado o el bazo, en función del tiempo se puede utilizar a modo de medida de la atenuación comparando estos valores en los ratones a los que se les inyectó la bacteria *Listeria* atenuada frente a la bacteria *Listeria* sin atenuar.

El grado de atenuación para la diseminación de una célula a otra de las bacterias de las vacunas de la presente invención no necesita ser una atenuación absoluta para proporcionar una vacuna inocua y eficaz. En algunas realizaciones, el grado de atenuación es el que proporciona una reducción en la toxicidad suficiente que previene o reduce los síntomas de la intoxicación a un nivel que no amenaza la vida.

Listeria que comprende mutaciones que afectan a la diseminación de una célula a otra

En algunas realizaciones, la bacteria *Listeria* atenuada comprende una o más mutaciones que además atenúan la diseminación de la bacteria de una célula a otra. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la bacteria *Listeria* atenuada es una cepa mutante de *Listeria* que es defectuosa con respecto a una o más proteínas de *Listeria* implicadas en la diseminación de una célula a otra, tales como las seleccionadas entre el grupo que consiste en ActA, lipoato proteína ligasa, PI-PLC, PC-PLC, metaloproteasa dependiente de cinc y LLO (o equivalentes de estas proteínas, según las especies de *Listeria* utilizadas). En algunas realizaciones, la bacteria *Listeria* atenuada es una cepa mutante de *Listeria* que comprende una o más mutaciones en un gen seleccionado entre el grupo que consiste en *actA*, *lplA*, *plcA*, *plcB*, *mpl* y *hly* (o equivalentes de estos genes, según las especies de *Listeria* utilizadas), en donde la mutación del gen atenúa la diseminación de la bacteria de una célula a otra.

En algunas realizaciones, la bacteria *Listeria* tiene atenuada la entrada en las células fagocíticas (p. ej., deficiente en una o más internalinas, tales como la internalina B) y también es defectuosa con respecto a una o más proteínas de polimerización de la actina. Una de tales proteínas de polimerización de la actina es la actina polimerasa codificada por el gen *actA* (Kocks et al., *Cell*, 68: 521-531 (1992); n.º de acceso de GenBank AL591974, nts 9456-11389). La proteína actina polimerasa interviene en el reclutamiento y la polimerización de la F-actina del hospedador en un polo de la bacteria *Listeria*. La posterior polimerización y disolución de la actina da lugar a la propulsión de *Listeria* por el citosol y al interior de las células vecinas. Esta movilidad permite que la bacteria se disemine directamente de una célula a otra sin volver a exponerse al entorno extracelular, escapando así de las defensas del hospedador tales como el desarrollo de anticuerpos. En algunas realizaciones, la bacteria *Listeria* atenuada comprende opcionalmente tanto una mutación en un gen de internalina, tal como *inlB*, como en *actA*. La cepa de *Listeria* de esta realización de la presente invención tiene atenuada la entrada en las células no fagocíticas, así como la diseminación de una célula a otra. La terminología «*actA*⁻», « $\Delta actA$ », «mutante de delección de *actA*» y «mutante por eliminación de *actA*» se utilizan indistintamente en la presente memoria.

En algunas realizaciones, la bacteria *Listeria* atenuada es una cepa mutante de *Listeria monocytogenes* que es defectuosa con respecto a la internalina B y a la actina polimerasa codificada por *actA*. En otra realización, el genoma de la cepa mutante de *Listeria* es un genoma de una cepa mutante de *Listeria monocytogenes* que comprende una mutación en *inlB* y en *actA* (por ejemplo, la delección de la mayor parte o de toda la secuencia codificada de la internalina B y de *actA*). En una realización, la cepa es el mutante doble $\Delta actA \Delta inlB$ de *Listeria monocytogenes* depositado en la American Type Culture Collection (ATCC) el 3 de octubre de 2003, y designado con el número de acceso PTA-5562. En otra realización, la cepa es un mutante de la cepa denominada PTA-5562, en donde el mutante es defectuoso con respecto a la internalina B y a *actA* en relación con la bacteria *Listeria monocytogenes* de tipo silvestre. De nuevo, como se indicó anteriormente, la terminología «*actA*⁻» y « $\Delta actA \Delta inlB$ » se utiliza indistintamente en la presente memoria para referirse al doble mutante de delección.

En algunas realizaciones, el genoma de la bacteria *Listeria* atenuada es defectuoso para la lipoato proteína ligasa codificada por el gen *lplA* (O'Riordan et al., *Science*, 302: 462-4 (2003); n.º de acceso de GenBank NC_003210). En algunas realizaciones, la bacteria *Listeria* atenuada es defectuosa con respecto a la internalina B y una lipoato proteína ligasa. En algunas realizaciones, la bacteria *Listeria* atenuada es un mutante que comprende una mutación en el gen *lplA*. En algunas realizaciones, la bacteria *Listeria* atenuada comprende una mutación en *inlB* y en *lplA*. Algunos mutantes de *lplA* de ejemplo se describen en la solicitud publicada de patente de los EE.UU. 2004/0013690, incorporada por referencia en su totalidad en la presente memoria.

En algunas realizaciones, la bacteria *Listeria* que tiene atenuada la entrada en las células no fagocíticas también es defectuosa con respecto a una o más fosfolipasas. En algunas realizaciones, la bacteria *Listeria* atenuada es una cepa mutante de *Listeria* defectuosa con respecto a una o más internalinas (tales como la internalina B) y también es defectuosa con respecto a una o más fosfolipasas y/o está mutada en las mismas. Las fosfolipasas son una clase de enzimas que catalizan la hidrólisis de los fosfoglicéridos. La fosfolipasa C es una fosfodiesterasa que libera diacilglicerol, un segundo mensajero en otras vías bacterianas. En *Listeria*, éstas contribuyen a la formación de poros en la membrana fagolisosómica. En algunas realizaciones, los genes de las fosfolipasas que están mutados en la bacteria *Listeria* de la presente invención se seleccionan entre el grupo que consiste en *plcA*, *plcB* y *smcL*. En algunas realizaciones, la bacteria *Listeria* atenuada es defectuosa con respecto a PC-PLC y/o PI-PLC. En algunas realizaciones, la bacteria *Listeria* atenuada comprende una o más mutaciones en los genes *plcA* y/o *plcB* (n.º de acceso de GenBank NC_003210; Angelakopoulos H et al., 2002, *Infect. Immun.* 70: 3592-3601). En algunas realizaciones, la bacteria *Listeria* atenuada comprende una mutación en el gen *smcL*. En algunas realizaciones, la bacteria *Listeria* atenuada comprende mutaciones atenuadoras en *inlB* y en *plcA* y/o *plcB*. La cepa de *Listeria* de estas realizaciones de la presente invención tiene atenuada la entrada en las células no fagocíticas, y también para el escape del fagolisosoma hacia el citosol de la célula hospedadora y, como resultado, de la diseminación de una célula a otra.

En algunas realizaciones, el genoma de la bacteria *Listeria* atenuada es defectuoso para la metaloproteasa dependiente de cinc codificada por el gen *mpl* (Marquis et al., *J. Cell. Biol.* 137: 1381-92 (1997); n.º de acceso de GenBank NC_003210). En algunas realizaciones, la bacteria *Listeria* atenuada es defectuosa con respecto a la internalina B y una metaloproteasa dependiente de cinc. En algunas realizaciones, la bacteria *Listeria* atenuada es un mutante que comprende una mutación en el gen *mpl*. En algunas realizaciones, la bacteria *Listeria* atenuada comprende una mutación atenuadora tanto en *inlB* como en *mpl*.

En algunas realizaciones, la bacteria *Listeria* que tiene atenuada la entrada en las células no fagocíticas es también defectuosa con respecto a LLO. En algunas realizaciones, las cepas mutantes de *Listeria* que son defectuosas con respecto a una o más invasinas (p. ej., internalina B) son también defectuosas con respecto a una o más proteínas de *Listeria* eficaces en mediar el escape y la diseminación de la bacteria *Listeria* del sitio inicial de la invasión, y/o están mutadas en ellas. Tales proteínas de escape pueden comprender listeriolisina O (LLO; n.º de acceso de GenBank M24199, incorporada en la presente memoria por referencia en su totalidad) nativa, así como formas mutantes de LLO. En algunas realizaciones, el genoma de la bacteria *Listeria* atenuada comprende una mutación en el gen *hly* que codifica LLO. LLO es la citolisina, una proteína responsable de la formación de poros en la membrana de los fagolisosomas que encapsulan la bacteria *Listeria* invasora. Estos poros permiten que *Listeria* se escape del entorno letal del fagolisosoma hacia el citosol de la célula hospedadora, en donde la bacteria *Listeria* crece y se disemina hacia las células vecinas. Una posible proteína LLO mutante de *Listeria* comprende sustituciones de aminoácidos. Tales sustituciones de aminoácidos pueden implicar a uno o más aminoácidos de la proteína LLO y pueden afectar a la citotoxicidad de LLO al alterar el pH óptimo o la estabilidad de la proteína resultante. Otra proteína LLO mutante de *Listeria* de la presente invención comprende la delección de uno o más aminoácidos de LLO. Tales delecciones de aminoácidos también pueden afectar a la citotoxicidad al alterar la estabilidad de la proteína LLO resultante. Las cepas de *Listeria* de la presente invención que son deficientes en una o más internalinas y que también son deficientes, o están mutadas, en la proteína LLO tienen atenuada la entrada en las células no fagocíticas y también tienen atenuado el escape del fagolisosoma y el crecimiento y diseminación resultantes directamente de una célula a otra. Algunos mutantes *hly* de ejemplo se describen en la solicitud publicada de patente de los EE.UU. 2004/00136690, incorporada por referencia en la presente memoria en su totalidad.

Por consiguiente, en algunas realizaciones, el genoma de la bacteria *Listeria* que tiene atenuada la entrada en las células no fagocíticas tiene además atenuada la diseminación de una célula a otra y comprende al menos una mutación en uno o más genes seleccionados entre el grupo que consiste en *actA*, *hly*, *lplA*, *plcA*, *mpl* y *plcB*. En una realización alternativa, el genoma de la cepa mutante además comprende al menos una mutación en *actA*. Por ejemplo, el genoma de la bacteria *Listeria* modificada puede comprender al menos una mutación tanto en *inlB* como en un gen seleccionado entre el grupo que consiste en *actA*, *hly*, *lplA*, *plcA*, *mpl* y *plcB*. Alternativamente, el genoma de la bacteria *Listeria* atenuada comprende al menos una mutación tanto en *inlB* como en *actA*.

Se pueden introducir otras mutaciones en las cepas de *Listeria* y detectarlas selectivamente del mismo modo que se describe en el apartado II.A, más arriba, o en los ejemplos que vienen a continuación. Típicamente se introducirán varias mutaciones secuencialmente. Por ejemplo, comenzando con la bacteria *Listeria* de tipo silvestre, se puede eliminar el gen *actA* mediante intercambio alélico. Por último se puede eliminar el gen *inlB* del mutante *actA* o del mutante *actA/uvrAB* mediante intercambio alélico para generar el mutante *actA/inlB*.

En realizaciones alternativas, las cepas mutantes de *Listeria* existentes que conocen los expertos en la técnica se modifican adicionalmente para introducir mutaciones que atenuarán su capacidad para entrar en las células no fagocíticas y/o convertir las cepas en defectuosas con respecto a la internalina B. Por ejemplo, se han descrito

anteriormente una serie de cepas mutantes de *Listeria*. La cepa mutante LLO L461T (DP-L4017) se describió en Glomski et al., *J. Cell. Biol.* 156: 1029 (2002), y se incorpora por referencia en la presente memoria. El mutante Δ actA (DP-L4029) es la cepa DP-L3078 descrita en Skoble et al., *J. of Cell Biology*, 150: 527-537 (2000), incorporada por referencia en la presente memoria en su totalidad, que se ha curado de su profago (la curación del profago se describe en [Lauer et al., *J. Bacteriol.* 184: 4177 (2002); publicación de patente de los EE.UU. n.º 2003/0203472]). También se describieron anteriormente el mutante de LLO⁻ (DP-L4027) (Lauer et al., *J. of Bacteriology*, 184: 4177-4186 (2002)) y LLO Δ 26 (DP-L4042) (Decatur et al, *Science* 290: 992 (2000)). Cualquiera de estas cepas podría comprender un punto de partida para producir una cepa mutante de *Listeria* de la presente invención. Alternativamente, se puede generar primero cualquiera de una amplia gama de cepas mutantes de *Listeria* a partir de la bacteria *Listeria* de tipo silvestre mediante los métodos de intercambio alélico descritos más arriba u otros métodos conocidos por los expertos en la técnica y entonces, por último, se puede introducir en la cepa la mutación que atenúa la entrada de la bacteria en las células no fagocíticas (tal como *inlB*).

La idoneidad de una cepa de *Listeria* determinada que tiene atenuada la entrada en las células no fagocíticas (p. ej., una cepa defectuosa con respecto a la internalina B) que también tiene atenuada la diseminación de una célula a otra para uso en una vacuna se puede valorar utilizando los mismos tipos de ensayos que se han descrito para evaluar mutaciones adecuadas que afectan a las invasinas en el apartado II.A. de más arriba.

Se entiende que los genomas de las bacterias *Listeria* atenuadas de la presente invención también pueden comprender otras mutaciones que ni atenúan la entrada de *Listeria* en las células no fagocíticas, ni atenúan la diseminación de una célula a otra.

Listeria que comprende otras modificaciones que afectan a la diseminación de una célula a otra

En algunas realizaciones, la bacteria *Listeria* que tiene atenuada tanto la entrada en las células no fagocíticas como la diseminación de una célula a otra le han sido introducidas mediante medios alternativos (o mediante medios adicionales) las mutaciones esbozadas más arriba. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el ácido nucleico de la bacteria *Listeria* se ha modificado de modo que la proliferación de la bacteria está atenuada, por lo que se atenúa la diseminación de la bacteria de una célula a otra.

En algunas realizaciones, la atenuación de la proliferación de *Listeria* se controla de una manera dependiente de la dosis. En algunas realizaciones, la expresión de los genes de *Listeria* en la bacteria *Listeria* no queda sustancialmente afectada por la atenuación de la proliferación del microorganismo. En algunas realizaciones, la bacteria *Listeria* expresa un antígeno a un nivel suficiente para inducir una respuesta inmunitaria contra el antígeno en un individuo tras la administración de la vacuna al individuo.

En algunas realizaciones, el ácido nucleico de la bacteria ha sido modificado mediante reacción con un compuesto que actúa selectivamente sobre el ácido nucleico, por lo que se atenúa la proliferación de la bacteria. En algunas realizaciones, el ácido nucleico de la bacteria *Listeria* ha sido modificado mediante reacción con un compuesto que actúa selectivamente sobre el ácido nucleico y que reacciona directamente con el ácido nucleico. En algunas realizaciones, el compuesto que actúa selectivamente sobre el ácido nucleico es un alquilante de ácidos nucleicos. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el alquilante de ácidos nucleicos es el éster de β -alanina y N-(acridin-9-il),2-[bis(2-cloroetil)amino]etil. En algunas realizaciones, el compuesto que actúa selectivamente sobre el ácido nucleico se activa mediante irradiación. En algunas realizaciones, el compuesto que actúa selectivamente sobre el ácido nucleico es un compuesto de psoraleno activado mediante irradiación con rayos UVA, y el ácido nucleico de la bacteria *Listeria* atenuada se modifica al entrar en contacto con el compuesto psoraleno activado mediante irradiación con rayos UVA. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el compuesto que actúa selectivamente sobre el ácido nucleico es 4'-(4-amino-2-oxa)butil-4,5',8-trimetilpsoraleno (también denominado «S-59» en la presente memoria). El protocolo de ejemplo para la inactivación de *Listeria* con S-59/UVA se da a conocer en el ejemplo 11 que viene a continuación. Más descripciones del uso de los compuestos de acción selectiva, tales como compuestos entrecruzadores, se dan a conocer en las solicitudes relacionadas de los EE.UU. n.º de serie 60/446 051, 60/449 153 y 60/511 869, incorporadas por referencia en la presente memoria en su totalidad. Así mismo, la solicitud de patente de los EE.UU. relacionada cuyo título es «Modified free-living microbes, vaccine compositions and methods of use thereof», registrada el 6 de febrero de 2004, también se incorpora por referencia en la presente memoria en su totalidad.

En algunas realizaciones, la bacteria *Listeria* atenuada no sólo tiene atenuada la entrada en las células no fagocíticas y se ha modificado su ácido nucleico de modo que tenga atenuada la proliferación (como se describe más arriba), sino que también es defectuosa con respecto a una proteína que funciona reparando modificaciones en el ácido nucleico de *Listeria*. En algunas realizaciones, la bacteria *Listeria* atenuada es defectuosa con respecto a una enzima reparadora de ADN. En algunas realizaciones, la cepa mutante de *Listeria* es deficiente con respecto a la internalina B y a una proteína que funciona reparando modificaciones de su ácido nucleico. Por ejemplo, una cepa mutante de *Listeria* que comprende una mutación en *inlB* también podría comprender una mutación en uno

cualquiera de una serie de genes que están implicados en los mecanismos de reparación del ADN de los microorganismos [Aravind et al., *Nucleic Acids Research* 27 (5): 1223-1242 (1999)]. En una realización, el mutante deficiente en la reparación carece de la capacidad para fabricar PhrB (una fotoliasa), que repara los dímeros de pirimidina. Por ejemplo, la mutación adicional puede estar en el gen de PhrB, o en un gen funcionalmente equivalente según la especie de *Listeria*. Tal mutante se podría utilizar junto con la irradiación ultravioleta (p. ej., UVB, UVC) del microorganismo para producir dímeros de pirimidina en el ácido nucleico microbiano. En otra realización, el mutante de la internalina B también es incapaz de reparar los entrecruzamientos entre las hebras. Tales mutantes incluyen, pero sin limitarse a ellos, mutaciones en uno o todos los genes *uvr*, a saber, en los genes *uvrA*, *uvrB*, *uvrC* y *uvrD*, así como en los genes *recA*, o en los genes funcionalmente equivalentes, según el género y la especie del microorganismo. Estas mutaciones dan lugar a la atenuación de la actividad de las correspondientes enzimas UvrA (una ATPasa), UvrB (una helicasa), UvrC (una nucleasa), UvrD (una helicasa II) y RecA (una recombinasa). Estos mutantes típicamente se utilizarían junto con un compuesto de entrecruzamiento, tal como un psoraleno. En una realización, hay mutaciones atenuantes tanto en *uvrA* como en *uvrB* (*uvrAB*).

En consecuencia, en una realización, el genoma de la cepa mutante que tiene atenuada la entrada en las células no fagocíticas además comprende al menos una mutación en al menos un gen seleccionado entre el grupo que consiste en *phrB*, *uvrA*, *uvrB*, *uvrC*, *uvrD* y *recA*. Por ejemplo, el genoma de la bacteria *Listeria* mutante puede comprender una mutación tanto en *inlB* como en un gen seleccionado entre el grupo que consiste en *phrB*, *uvrA*, *uvrB*, *uvrC*, *uvrD* y *recA*. Alternativamente, la bacteria *Listeria* atenuada es una *Listeria monocytogenes* mutante que comprende al menos una mutación en *inlB*, *actA* y *uvrAB*.

Se pueden introducir otras mutaciones en las cepas de *Listeria* y detectarlas selectivamente del mismo modo que se describe en el apartado II.A, más arriba, o en los ejemplos que vienen a continuación. Típicamente, se introducirán secuencialmente varias mutaciones. Por ejemplo, comenzando con la bacteria *Listeria* de tipo silvestre, se puede eliminar el gen *actA* mediante intercambio alélico. A continuación se pueden eliminar opcionalmente los genes *uvrA* y *uvrB* del mutante $\Delta actA$ mediante intercambio alélico (el mutante $\Delta actA \Delta uvrAB$ de *Listeria monocytogenes* se depositó en la ATCC el 3 de octubre de 2003 y se denominó PTA-5563). Por último, el gen *inlB* se puede eliminar del mutante $\Delta actA$ o del mutante $\Delta actA \Delta uvrAB$ (también conocido como $actA^-/uvrAB^-$) mediante intercambio alélico para generar el mutante $\Delta actA \Delta inlB \Delta uvrAB$ (también conocido como $actA^-/inlB^-/uvrAB^-$).

En realizaciones alternativas, las cepas mutantes de *Listeria* existentes que conocen los expertos en la técnica se modifican adicionalmente para introducir mutaciones que atenuarán su capacidad para entrar en las células no fagocíticas y/o convertir las cepas en defectuosas con respecto a la internalina B. Por ejemplo, la construcción de la cepa $\Delta actA \Delta uvrAB$ se describe en la solicitud provisional de los EE.UU. en tramitación con la presente 60/446 051, presentada el 6 de febrero de 2003, como L4029/*uvrAB*⁻ (véase, p. ej., el ejemplo 7 de esa solicitud). Esta cepa podría comprender un punto de partida para producir una cepa mutante de *Listeria* de la presente invención. Alternativamente, se puede generar primero una cualquiera de una amplia diversidad de cepas mutantes de *Listeria* a partir de la bacteria *Listeria* de tipo silvestre mediante los métodos de intercambio alélico descritos más arriba u otros métodos conocidos por los expertos en la técnica, y entonces se puede introducir en la cepa, en un momento posterior, la mutación que atenúa la entrada de la bacteria en las células no fagocíticas (tal como *inlB*).

La idoneidad de una cepa atenuada de *Listeria* determinada (p. ej., una cepa defectuosa con respecto a la internalina B) que también tiene atenuada la diseminación de una célula a otra para el uso en una vacuna se puede valorar utilizando los mismos tipos de ensayos que se han descrito para valorar las mutaciones apropiadas que afectan a las invasinas en el apartado II.A., más arriba.

Antígenos y expresión de proteínas heterólogas

En algunas realizaciones, la bacteria *Listeria* atenuada (p. ej., las cepas mutantes de *Listeria*) comprenden una molécula de ácido nucleico que codifica un antígeno. En algunas realizaciones, el antígeno es un antígeno de *Listeria*. Alternativamente, el antígeno es un antígeno que no es de *Listeria*. En algunas realizaciones de la invención, aunque no en todas, el ácido nucleico que codifica el antígeno es heterólogo con respecto a la bacteria *Listeria* mutante. La molécula de ácido nucleico que codifica el antígeno puede estar integrada en el genoma de la bacteria *Listeria* mutante. Alternativamente, la molécula de ácido nucleico que codifica el antígeno puede estar en un plásmido o similar dentro de *Listeria*.

El antígeno que se expresa mediante el ácido nucleico heterólogo en la cepa mutante de *Listeria* puede ser autólogo o heterólogo para un animal hospedador al cual se le administra la cepa mutante de *Listeria* como parte de una vacuna o de otra composición.

Los métodos para preparar la bacteria *Listeria* que contiene ácidos nucleicos heterólogos que expresan antígenos los conocen los expertos en la técnica. La bacteria *Listeria* se puede alterar mediante métodos de ADN recombinante conocidos por los expertos en la técnica (véase, p. ej., Sambrook y Russell, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, tercera edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, (2000)). La secuencia codificante del

antígeno, o un fragmento y/o variante de la misma, se une operativamente a secuencias reguladoras apropiadas para alterar a la expresión de la secuencia del antígeno dentro de *Listeria*. Las secuencias promotoras adecuadas las conocen los expertos en la técnica. Por ejemplo, el promotor de *hly* es adecuado para el uso en construcciones de expresión. En algunas realizaciones, las construcciones de expresión que contienen las secuencias codificantes de antígenos comprenden además secuencias de péptidos señal unidos operativamente. En algunas realizaciones, la secuencia de antígeno se fusiona, directa o indirectamente, a las secuencias que codifican al menos porciones de proteínas de *Listeria* tal como LLO. Ejemplos específicos de vectores integrativos adecuados para la expresión de antígenos en *Listeria* incluyen pPL2 y pPL1, descritos en Lauer et al., *J. Bacteriol.* 184: 41777-4186 (2002) y la publicación de patente de los EE.UU. n.º 2003/0203472 A1.

- 10 La secuencia heteróloga de ácido nucleico puede codificar al menos un antígeno proteico específico u otra proteína, tal como una proteína que proporciona un tratamiento paliativo para una enfermedad. La *Listeria* se puede alterar para que contenga una o más secuencias que codifican uno o más antígenos u otras proteínas deseadas. La secuencia heteróloga de ácido nucleico que codifica un antígeno específico no se limita a una secuencia exacta de ácido nucleico, sino que es de una secuencia que es suficiente para proporcionar la expresión de un antígeno que desencadenará la respuesta inmunitaria deseada cuando se administre a un individuo. De modo similar para las secuencias heterólogas que codifican otras proteínas, las secuencias que codifican una proteína dada pueden variar siempre y cuando se exprese la proteína deseada y proporcione el efecto deseado (p. ej., un efecto paliativo) cuando se administra a un individuo. La secuencia heteróloga se puede expresar como un antígeno relacionado con una enfermedad determinada. La *Listeria* que expresa tales antígenos se puede utilizar como una vacuna, en donde la vacuna se puede utilizar como un tratamiento preventivo o como un tratamiento terapéutico. Las enfermedades que se pueden tratar mediante tales vacunas incluyen, pero sin limitarse a ellas, las enfermedades infecciosas, las enfermedades autoinmunitarias, las alergias, las neoplasias malignas y otras enfermedades hiperproliferativas.

- La bacteria *Listeria* de la invención se puede alterar para que contenga una secuencia heteróloga de ácido nucleico que codifica un antígeno que es un antígeno tumoral o que procede de un antígeno tumoral. Se ha identificado un gran número de antígenos tumorales que son reconocidos por los linfocitos T (Renkvist et al., *Cancer Immunol. Innumother* 50: 3-15 (2001)). Estos antígenos tumorales pueden ser antígenos de diferenciación (p. ej., PSMA, tirosinasa, gp100), antígenos específicos de tejido (p. ej., PAP, PSA), antígenos de desarrollo, antígenos víricos asociados a tumor (p. ej., HPV 16 E7), antígenos de cáncer de testículo (p. ej., MAGE, BAGE, NY-ESO-1), antígenos embrionarios (p. ej., CEA, fetoproteína α), antígenos oncoproteicos (p. ej., Ras, p53), antígenos de proteínas sobreexpresadas (p. ej., ErbB2 (Her2/Neu), MUC1) o antígenos de proteínas mutadas. Los antígenos tumorales que pueden estar codificados por la secuencia heteróloga de ácido nucleico incluyen, pero sin limitarse a ellos, 707-AP, anexina II, AFP, ART-4, BAGE, β -catenina/m, BCL-2, bcr-abl, bcr-abl p190, bcr-abl p210, BRCA-1, BRCA-2, CAMEL, CAP-1, CASP-8, CDC27/m, CDK-4/m, CEA (Huang et al., *Exper. Rev. Vaccines* (2002) 1: 49-63), CT9, CT10, Cyp-B, Dek-cain, DAM-6 (MAGE-B2), DAM-10 (MAGE-B1), EphA2 (Zantek et al., *Cell Growth Differ.* (1999) 10: 629-38; Carles-Kinch et al., *Cancer Res.* (2002) 62: 2840-7), ELF2M, ETV6-AML1, G250, GAGE-1, GAGE-2, GAGE-3, GAGE-4, GAGE-5, GAGE-6, GAGE-7B, GAGE-8, GnT-V, gp100, HAGE, HER2/neu, HLA-A*0201-R170I, HPV-E7, HSP70-2M, HST-2, hTERT, hTERT, iCE, inhibidores de la apoptosis (p. ej., survivina), KIAA0205, K-ras, LAGE, LAGE-1, LDLR/FUT, LAGE-1, MAGE-2, MAGE-3, MAGE-6, MAGE-A1, MAGE-A2, MAGE-A3, MAGE-A4, MAGE-A6, MAGE-A10, MAGE-A12, MAGE-B5, MAGE-B6, MAGE-C2, MAGE-C3, MAGE-D, MART-1, MART1/Melan-A, MC1R, MDM-2, mesotelina, miosina/m, MUC1, MUC2, MUM-1, MUM-2, MUM-3, neo-poliA polimerasa, NA88-A, NY-ESO-1, NY-ESO-1a (CAG-3), PAGE-4, PAP, proteinasa 3 (Moldrem et al., *Blood* (1996) 88: 2450-7; Moldrem et al., *Blood* (1997) 90: 2529-34), P15, p190, Pm1/RAR α , PRAME, PSA, PSM, PSMA, RAGE, RAS, RCAS1, RU1, RU2, SAGE, SART-1, SART-2, SART-3, SP17, SPAS-1, TEL/AML1, TPI/m, tirosinasa, TARP, TRP-1 (gp75), TRP-2, TRP-2/INT2, WT-1, y proteínas NY-ESO-ORF2 y CAMEL de traducción alternativa, procedentes de los genes de NY-ESO-1 y LAGE-1. La *Listeria* atenuada de la presente invención puede abarcar cualquier antígeno tumoral que sea capaz de desencadenar una respuesta inmunitaria específica de tumor, que incluye los antígenos aún por identificar. Se puede alterar la bacteria *Listeria* para que contenga más de una secuencia heteróloga que codifica más de un antígeno tumoral. En una realización, el antígeno es mesotelina (Argani et al., *Clin. Cancer Res.* 7(12): 3862-8 (2001)), Sp17 (Lim et al., *Blood* 97 (5): 1508-10 (2001)), gp100 (Kawakami et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 6458 (1994)), PAGE-4 (Brinkmann et al., *Cancer Res.* 59 (7): 1445-8 (1999)), TARP (Wolfgang et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97 (17): 9437-42 (2000)), o SPAS-1 (publicación de la solicitud de la patente de los EE.UU. n.º 2002/0150588).

- En algunas realizaciones, el ácido nucleico heterólogo codifica un antígeno que no es idéntico a un antígeno tumoral, sino que más bien procede de un antígeno tumoral. Por ejemplo, el antígeno expresado por la bacteria *Listeria* mutante puede comprender un fragmento de un antígeno tumoral, una variante de un antígeno tumoral, o un fragmento de una variante de un antígeno tumoral. En algunos casos, un antígeno, tal como un antígeno del tumor, es capaz de inducir una respuesta inmunitaria más significativa en una vacuna cuando la secuencia difiere de la endógena del hospedador. En algunas realizaciones, la variante de un antígeno tumoral, o un fragmento de una variante de un antígeno tumoral, difiere de la del antígeno tumoral, o de su correspondiente fragmento, en uno o más aminoácidos. El antígeno derivado de un antígeno tumoral comprenderá al menos una secuencia de epítipo capaz

de inducir la respuesta inmunitaria deseada tras la administración de la bacteria *Listeria* mutante a un hospedador.

En consecuencia, en algunas realizaciones, la bacteria *Listeria* atenuada comprende una molécula de ácido nucleico que codifica un antígeno, tal como mesotelina, SPAS-1, proteinasa 3, EphA2, SP-17, gp100, PAGE-4, TARP, Her-2/neu, WT-1, NY-ESO-1, PSMA, K-ras o CEA, o un antígeno procedente de una de esas proteínas. En algunas realizaciones, la bacteria *Listeria* atenuada comprende una molécula de ácido nucleico que codifica un antígeno, tal como mesotelina, SPAS-1, proteinasa 3, EphA2, SP-17, gp100, PAGE-4, TARP, Her-2/neu, WT-1, NY-ESO-1, PSMA, K-ras o CEA, o un antígeno procedente de una de esas proteínas. En algunas realizaciones, la bacteria *Listeria* atenuada comprende una molécula de ácido nucleico que codifica un antígeno, tal como mesotelina, SPAS-1, proteinasa 3, EphA2, SP-17, gp100, PAGE-4, TARP, WT-1, NY-ESO-1 o CEA, o un antígeno procedente de una de esas proteínas. En otras realizaciones, la bacteria *Listeria* atenuada comprende una molécula de ácido nucleico que codifica un antígeno tal como mesotelina, SPAS-1, proteinasa 3, SP-17, gp100, PAGE-4, TARP, WT-1, NY-ESO-1 o CEA, o un antígeno procedente de una de esas proteínas. En algunas realizaciones, la bacteria *Listeria* atenuada comprende una molécula de ácido nucleico que codifica la mesotelina humana, o un antígeno procedente de la mesotelina humana. En otras realizaciones, la bacteria *Listeria* atenuada comprende una molécula de ácido nucleico que codifica la EphA2 humana, o derivada de la EphA2 humana. En más realizaciones, la bacteria *Listeria* atenuada comprende una molécula de ácido nucleico que codifica la NY-ESO-1 humana, o un antígeno procedente de la NY-ESO-1 humana.

En algunas otras realizaciones, el antígeno heterólogo expresado por la bacteria *Listeria* atenuada es la proteinasa 3 o procede de la proteinasa 3. Por ejemplo, en una realización, el antígeno comprende el péptido PR1 sin HLA-A2.1 (aa 169-177; **VLQELNVTV** (SEQ ID n.º 1)). La información sobre la proteinasa 3 y/o el epítipo PR1 está disponible públicamente en las referencias siguientes: patente de los EE.UU. n.º 5 180 819, Molldrem et al., *Blood*, 90: 2529-2534 (1997); Molldrem et al., *Cancer Research*, 59: 2675-2681 (1999); Molldrem et al., *Nature Medicine*, 6: 1018-1023 (2000); y Molldrem et al., *Oncogene*, 21: 8668-8673 (2002).

Alternativamente, se puede alterar la bacteria *Listeria* atenuada de la invención para que contenga una secuencia de ácido nucleico heterólogo que codifica un antígeno específico de una enfermedad autoinmunitaria. En una enfermedad autoinmunitaria mediada por los linfocitos T, una respuesta de los linfocitos T a los autoantígenos da lugar a la enfermedad autoinmunitaria. El tipo de antígeno para el uso en el tratamiento de una enfermedad autoinmunitaria con las vacunas de la presente invención podría actuar selectivamente sobre los linfocitos T específicos responsables de la respuesta autoinmunitaria. Por ejemplo, el antígeno puede ser parte de un receptor de los linfocitos T, el idiotipo, específico de los linfocitos T que provocan una respuesta autoinmunitaria, en donde el antígeno incorporado en una vacuna de la invención desencadenaría una respuesta inmunitaria específica contra los linfocitos T que provocan la respuesta autoinmunitaria. La desaparición de esos linfocitos T sería el mecanismo terapéutico que aliviaría la enfermedad autoinmunitaria. Otra posibilidad sería incorporar un antígeno que daría lugar a una respuesta inmunitaria que actuaría selectivamente contra los anticuerpos que se generan contra autoantígenos en una enfermedad autoinmunitaria o actuando selectivamente sobre los clones de linfocitos B específicos que secretan los anticuerpos. Por ejemplo, se puede incorporar un idiotipo antigénico en la bacteria *Listeria* que dará lugar a una respuesta inmunitaria antiidiotipo contra tales linfocitos B y/o contra los anticuerpos que reaccionan con los autoantígenos en una enfermedad autoinmunitaria.

En otras realizaciones de la invención, el antígeno procede de un microorganismo patógeno animal o humano. El patógeno es opcionalmente un virus, bacteria, hongo o protozoo. En una realización, el antígeno es una proteína producida por el patógeno, o un fragmento y/o variante de una proteína producida por el patógeno.

Por ejemplo, el antígeno puede proceder del virus de la inmunodeficiencia humana (tal como gp 120, gp 160, gp41, antígenos gag tales como p24gag y p55gag, así como proteínas derivadas de pol, env, tat, vif, rev, nef, vpr, vpu y las regiones LTR del VIH), del virus de la inmunodeficiencia felina o del virus de herpes animal o humano. En una realización, el antígeno procede de los tipos 1 y 2 de virus del herpes simple (VHS) (tales como gD, gB, gH, proteína temprana inmediata tal como ICP27), del citomegalovirus (tal como gB y gH), del virus de Epstein-Barr o del virus zóster de la varicela (tal como gpl, II o III) (véanse, p. ej., Chee et al. (1990) *Cytomegaloviruses* en J. K. McDougall, ed., Springer Verlag, págs. 125-169; McGeoch et al., (1988) *J. Gen. Virol.* 69: 1531-1574; patente de los EE.UU. n.º 5 171 568; Baer et al., (1984) *Nature* 310: 207-211; y Davison et al. (1986) *J. Gen. Virol.* 67: 1759-1816).

En otra realización, el antígeno procede de un virus de la hepatitis tal como el virus de la hepatitis B (por ejemplo, antígeno de la superficie del virus de la hepatitis B), virus de la hepatitis A, virus de la hepatitis C, virus de la hepatitis δ, virus de la hepatitis E o virus de la hepatitis G. Véase, p. ej., las patentes internacionales WO 89/04669; WO 90/11089; y WO 90/14436. El antígeno de la hepatitis puede ser un antígeno de la superficie, del interior u otro antígeno relacionado. El genoma del VHC codifica varias proteínas víricas, entre ellas, E1 y E2. Véase, p. ej., Houghton et al., *Hepatology* 14: 381-388 (1991).

Un antígeno que es un antígeno vírico procede opcionalmente de un virus de una cualquiera de las familias

- Piconaviridae* (p. ej., poliovirus, rinovirus, etc.); *Caliciviridae*; *Togaviridae* (p. ej., virus de la rubéola, virus del dengue, etc.); *Flaviviridae*; *Coronaviridae*; *Reoviridae* (p. ej., rotavirus, etc); *Birnaviridae*; *Rhabdoviridae* (p. ej., virus de la rabia, etc.); *Orthomyxoviridae* (p. ej., tipos A, B y C del virus de la gripe, etc); *Filoviridae*; *Paramyxoviridae* (p. ej., virus de la parotiditis, virus del sarampión, virus sincitial respiratorio, virus paragripal, etc.); *Bunyaviridae*;
- 5 *Arenaviridae*; *Retroviridae* (p. ej., HTLV-1; HTLV-11; VIH-1; HIV11b; HIVSF2; HTVLAV; HIVLAI; HIVMN; VIH-1CM235; VIH-2; virus de la inmunodeficiencia del simio [VIS]); virus del papiloma, virus de la encefalitis transmitidos por garrapatas; y similares. Véanse, p. ej., *Virology*, tercera edición (W. K. Joklik ed. 1988); *Fundamental Virology*, tercera edición (B. N. Fields, D. M. Knipe y P. M. Howley, eds. 1996), para una descripción de estos y otros virus. En una realización, el antígeno es Flu-HA (Morgan et al., *J. Immunol.* 160: 643 (1998)).
- 10 En algunas realizaciones alternativas, el antígeno procede de patógenos bacterianos tales como *Mycobacterium*, *Bacillus*, *Yersinia*, *Salmonella*, *Neisseria*, *Borrelia* (por ejemplo, OspA u OspB o derivados de los mismos), *Chlamydia* o *Bordetella* (por ejemplo, P.69, PT y FHA), o procede de parásitos tal como *Plasmodium* o *Toxoplasma*. En una realización, el antígeno procede de *Mycobacterium tuberculosis* (p. ej., ESAT-6, 85A, 85B, 72F), *Bacillus anthracis* (p. ej., PA), o *Yersinia pestis* (p. ej., F1, V). Además, los antígenos adecuados para uso en la presente
- 15 invención pueden obtenerse o proceder de agentes causativos conocidos responsables de enfermedades que incluyen, pero sin limitarse a ellas, difteria, tos ferina, tétanos, tuberculosis, neumonía bacteriana o micótica, otitis media, gonorrea, cólera, tifus, meningitis, mononucleosis, peste, sigelosis o salmonelosis, legionelosis, borreliosis de Lyme, lepra, malaria, anquilostoma, oncocercosis, esquistosomiasis, tripamasomiasis, leishmaniasis, giardiasis, amebiasis, filariasis, borreliosis y triquinosis. Se puede obtener o derivar otros antígenos más de patógenos no convencionales tales como los agentes causativos de kuru, enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (ECJ), encefalopatía espongiiforme ovina, encefalopatía transmisible del visón y enfermedades de agotamiento crónico, o de partículas proteínicas infecciosas tales como los priones de la enfermedad de las vacas locas.
- Aún en otras realizaciones, el antígeno se obtiene o procede de un agente biológico implicado en la aparición o progresión de enfermedades neurodegenerativas (tales como la enfermedad de Alzheimer), enfermedades
- 25 metabólicas (tales como la diabetes de tipo 1) y drogadicciones (tales como adicción a la nicotina). Alternativamente, las composiciones que comprenden la cepa mutante de *Listeria* que expresa el antígeno se utilizan para el tratamiento del dolor y el antígeno es un receptor del dolor o de otro agente implicado en la transmisión de señales de dolor.
- En algunas realizaciones, se pueden optimizar los codones de la secuencia del antígeno para que se ajusten al uso de codones de la *Listeria* hospedadora que expresa el antígeno. Además, también se pueden optimizar los codones de la secuencia que codifica el péptido señal fusionado al péptido antigénico para que se ajusten al uso de codones de la *Listeria* hospedadora.
- 30

Inmunogenia de la bacteria *Listeria* atenuada

- En algunas realizaciones, las bacterias *Listeria* atenuadas (p. ej., cepas mutantes de *Listeria*) son capaces de inducir
- 35 una respuesta inmunitaria en un animal hospedador. En una realización, la respuesta inmunitaria es una respuesta inmunitaria mediada por células. En una realización, la respuesta inmunitaria eficaz inducida por la bacteria *Listeria* atenuada comprende una respuesta de los linfocitos T, tal como una respuesta de linfocitos T CD4+ o una respuesta de los linfocitos T CD8+, o ambos.
- Estas respuestas inmunitarias celulares se pueden medir mediante métodos *in vitro* e *in vivo* para determinar si la
- 40 respuesta inmunitaria de la bacteria *Listeria* de la presente invención es eficaz. La eficacia se puede determinar al comparar estas mediciones para la bacteria *Listeria* atenuada con las obtenidas para la bacteria *Listeria* sin atenuar contra cualquier proteína heteróloga o antígeno particular. Una posibilidad es medir la presentación de la proteína o antígeno de interés mediante una célula presentadora de antígeno que se ha mezclado con una población de *Listeria*. La bacteria *Listeria* se puede mezclar con una célula presentadora de antígeno o línea celular presentadora
- 45 de antígeno adecuada, por ejemplo, una célula dendrítica, y se puede medir la presentación del antígeno por la célula dendrítica a un linfocito T que reconoce la proteína o antígeno. Si las bacterias *Listeria* expresan la proteína o el antígeno en cantidad suficiente, se procesarán en fragmentos peptídicos en las células dendríticas y se presentarán a los linfocitos T en el contexto del CHM de clase I o clase II. Con el propósito de detectar la proteína o el antígeno presentado, se puede utilizar un clon de linfocitos T o una línea celular de linfocitos T que responde a la
- 50 proteína o al antígeno determinados. El linfocito T también puede ser un hibridoma de linfocito T, en donde el linfocito T se immortaliza mediante la fusión con una línea celular de cáncer. Tales hibridomas de linfocitos T, clones de linfocitos T o líneas celulares de linfocitos T pueden comprender linfocitos T tanto CD8+ como CD4+. La célula dendrítica puede hacer la presentación a los linfocitos T tanto CD8+ como CD4+, según la vía mediante la cual se procesan los antígenos. Los linfocitos T CD8+ reconocen antígenos en el contexto del CMH de clase I, mientras que
- 55 los linfocitos T CD4+ reconocen los antígenos en el contexto del CMH de clase II. El linfocito T se estimulará por el antígeno presentado a través del reconocimiento específico por su receptor de linfocitos T, dando lugar a la producción de determinadas proteínas, tales como la IL-2, el factor α de la necrosis tumoral (TNF- α) o el interferón y

(IFN- γ), que se pueden medir cuantitativamente (por ejemplo, utilizando un ensayo ELISA, un ensayo ELISPOT, o una tinción de citocinas intracelulares [TCI]). Para ejemplos específicos de ensayos que miden la inmunogenia, véanse los ejemplos 5 a 7 que vienen a continuación.

- Alternativamente, se puede diseñar un hibridoma para que incluya un gen indicador, tal como la β -galactosidasa, que se activa tras la estimulación del hibridoma de linfocitos T por los antígenos presentados. El incremento en la producción de la β -galactosidasa se puede medir fácilmente por su actividad en un sustrato, tal como clorofenol rojo- β -galactosidasa, que da lugar a un cambio de color. El cambio de color se puede medir directamente como indicador de la presentación del antígeno específico.

- Los expertos en la técnica conocen otros métodos *in vitro* e *in vivo* para valorar la expresión del antígeno de las vacunas de *Listeria* de la presente invención. También es posible medir directamente la expresión de un antígeno heterólogo determinado en la bacteria *Listeria*. Por ejemplo, se puede añadir un aminoácido marcado radiactivamente a una población de células y se puede determinar la cantidad de radioactividad incorporada en una proteína determinada. Se pueden aislar las proteínas sintetizadas por la población de células, por ejemplo, mediante electroforesis en gel o electroforesis capilar, y se puede medir cuantitativamente la cantidad de radioactividad para valorar el nivel de expresión de la proteína determinada. Alternativamente, se pueden expresar las proteínas sin radioactividad y se pueden visualizar mediante diferentes métodos, tales como un ensayo ELISA o mediante electroforesis en gel y análisis de inmunotransferencia con detección mediante un anticuerpo conjugado a una enzima o un anticuerpo marcado con fluorescencia.

- Adicionalmente, en algunas realizaciones, las bacterias *Listeria* atenuadas (p. ej., cepas mutantes de *Listeria*) que expresan antígenos heterólogos o autólogos inducen la citotoxicidad *in vivo* contra las células que expresan y/o llevan los antígenos (véase, p. ej., el ejemplo 3 que viene a continuación). En algunas realizaciones, las bacterias *Listeria* atenuadas que expresan los antígenos heterólogos o autólogos son eficaces desde el punto de vista terapéutico (véase, p. ej., el ejemplo 4 que viene a continuación).

- Aunque es posible que la modificación de la bacteria *Listeria* pueda reducir el nivel de la expresión de la proteína en comparación con la bacteria *Listeria* sin atenuar, se entiende que en algunas realizaciones la bacteria *Listeria* atenuada todavía es eficaz en una vacuna o composición inmunógena. La combinación de la atenuación de la invasión no fagocítica con la expresión de la proteína adecuada es lo importante en algunas realizaciones de la invención. La eficacia de una vacuna generalmente está relacionada con la dosis del antígeno que puede ser administrada por el microorganismo. La atenuación de la invasión no fagocítica de *Listeria* puede ser de varios logs, mientras que la expresión del gen de *Listeria* todavía se mantiene adecuadamente. Si la misma dosis de una *Listeria* atenuada se compara con la de una *Listeria* sin la modificación atenuadora, la expresión del antígeno resultante (que se valora mediante los métodos explicados más arriba) en la población de la bacteria *Listeria* atenuada es al menos el 1%, 5%, 10%, 25%, 50%, 75% o al menos el 90% de la expresión del antígeno en la población de *Listeria* sin la modificación atenuadora. Dado que puede haber una atenuación de varios log en la invasión no fagocítica, la dosis de la bacteria *Listeria* atenuada puede incrementarse con inocuidad hasta varios log, lo que da lugar a una cantidad mayor del antígeno presentado tras la vacunación por la bacteria *Listeria* atenuada con respecto a la bacteria *Listeria* sin la modificación atenuadora.

III. Vacunas y otras composiciones que comprenden la bacteria *Listeria* atenuada

- Además de la bacteria *Listeria* atenuada descrita en la presente memoria, la presente descripción da a conocer una serie de composiciones que comprenden la bacteria *Listeria* atenuada, entre ellas composiciones inmunógenas, composiciones farmacéuticas, células y vacunas (las bacterias *Listeria* atenuadas de ejemplo útiles en las composiciones de la presente invención se describen en el apartado II.A-C, más arriba, y en los ejemplos que vienen a continuación).

- Por ejemplo, la descripción da a conocer una composición farmacéutica que comprende (a) una bacteria *Listeria* atenuada que tiene atenuada la entrada en las células no fagocíticas y comprende una molécula de ácido nucleico que codifica un antígeno que no es de *Listeria*, y (b) un excipiente farmacéuticamente aceptable. La descripción además da a conocer una composición farmacéutica que comprende (a) una bacteria *Listeria* atenuada que tiene atenuada la entrada en las células no fagocíticas y la diseminación de una célula a otra, y (b) un vehículo farmacéuticamente aceptable.

- La descripción también da a conocer una composición farmacéutica que comprende una cepa mutante de *Listeria* y un vehículo farmacéuticamente aceptable, en donde la cepa mutante de *Listeria* tiene atenuada la entrada en las células no fagocíticas con respecto a una cepa de *Listeria* que no es mutante, pero que conserva la capacidad de entrar en las células fagocíticas. En una realización, la cepa mutante de *Listeria* es defectuosa con respecto a la internalina B. En otra realización, el genoma de la cepa mutante comprende al menos una mutación en al menos un gen que codifica una invasina, tal como una internalina como la internalina B. En otra realización, la secuencia codificante (o gen) de *inlB* se ha eliminado del genoma de la cepa. En otra realización más, se han eliminado las

secuencias codificantes (o genes) de *inlB* y de *actA*. Los expertos en la técnica conocen numerosos vehículos farmacéuticamente aceptables para el uso con cepas bacterianas.

- La descripción también da a conocer un método para disminuir la toxicidad de una composición farmacéutica que comprende una primera cepa de *Listeria* para la administración a un hospedador, que comprende sustituir la primera cepa por una cepa mutante de *Listeria*, en donde la cepa mutante de *Listeria* tiene atenuada la entrada en las células no fagocíticas con respecto a la primera cepa de *Listeria*, pero conserva la capacidad de entrar en las células fagocíticas. En algunas realizaciones, la cepa mutante es defectuosa con respecto a la internalina B. En otras realizaciones, la cepa mutante es defectuosa con respecto a la internalina B y a ActA.

- La descripción también da a conocer composiciones inmunógenas que comprenden la bacteria *Listeria* atenuada descrita en la presente memoria. Por ejemplo, la descripción da a conocer una composición inmunógena que comprende una bacteria *Listeria* atenuada que tiene atenuada la entrada en las células no fagocíticas y que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica un antígeno que no es de *Listeria*. La descripción además da a conocer una composición inmunógena que comprende una bacteria *Listeria* atenuada que tiene atenuada la entrada en las células no fagocíticas y la diseminación de una célula a otra.

- Además, la descripción da a conocer una composición inmunógena que comprende una cepa mutante de *Listeria*, en la que la cepa mutante de *Listeria* tiene atenuada la entrada en las células no fagocíticas con respecto a una cepa de *Listeria* que no es mutante, pero conserva la capacidad de entrar en las células fagocíticas, y comprende una molécula de ácido nucleico heterólogo que codifica un antígeno. En algunas realizaciones, la cepa es defectuosa con respecto a la internalina B y comprende una molécula de ácido nucleico heterólogo que codifica un antígeno. En otras realizaciones, la cepa mutante es defectuosa con respecto a la internalina B y a ActA.

- La descripción también da a conocer una serie de composiciones de vacuna que comprenden la bacteria *Listeria* atenuada descrita en la presente memoria. Por ejemplo, la descripción da a conocer una vacuna que comprende (a) una bacteria *Listeria* atenuada que tiene atenuada la entrada en las células no fagocíticas y que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica un antígeno que no es de *Listeria*, y (b) un vehículo farmacéuticamente aceptable y/o un adyuvante. La descripción además da a conocer una vacuna que comprende (a) una bacteria *Listeria* atenuada que tiene atenuada la entrada en las células no fagocíticas y la diseminación de una célula a otra, y (b) un vehículo farmacéuticamente aceptable y/o un adyuvante. La descripción también da a conocer una vacuna que comprende (a) una bacteria *Listeria* atenuada que tiene atenuada la entrada en las células no fagocíticas, y (b) un vehículo farmacéuticamente aceptable o un adyuvante. En algunas realizaciones, las vacunas descritas en la presente memoria comprenden más de un tipo de bacteria *Listeria* atenuada. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la vacuna comprende varios tipos diferentes de *Listeria* atenuada. Los diferentes tipos de *Listeria* atenuada pueden diferir uno del otro con respecto a los antígenos que expresan y/o a la naturaleza de sus modificaciones y mutaciones.

- La presente descripción además da a conocer una vacuna que comprende una cepa mutante de *Listeria*, en donde la cepa mutante de *Listeria* tiene atenuada la entrada en las células no fagocíticas con respecto a una cepa de *Listeria* que no es mutante, pero conserva la capacidad de entrar en las células fagocíticas. En algunas realizaciones, la cepa es defectuosa con respecto a la internalina B. En otras realizaciones, la cepa mutante en la vacuna es defectuosa con respecto a la internalina B y a ActA. En algunas realizaciones, la vacuna comprende más de una cepa mutante de *Listeria*, cada una de las cuales tiene atenuada la entrada en las células no fagocíticas.

- La terminología vacuna tal y como se utiliza en la presente memoria pretende abarcar una vacuna preventiva, tal como una administrada para inducir una respuesta inmunitaria antes de la exposición a un agente que abarca un antígeno para permitir al individuo montar una respuesta inmunitaria más fuerte durante la exposición a ese antígeno, por lo que se incrementa su capacidad para resistir al agente o a las células que llevan el agente. La terminología vacuna también pretende abarcar una vacuna terapéutica, tal como la administrada a un individuo que ya tiene una enfermedad asociada al antígeno de la vacuna, en donde la vacuna puede estimular la respuesta inmunitaria del individuo al antígeno para proporcionar un incremento de la capacidad para combatir la enfermedad o las células portadoras del antígeno.

- Los métodos para la administración de tal composición de vacuna se conocen en la técnica e incluyen las vías de administración *in vitro*, oral, intravenosa, intradérmica, interaperitoneal, intramuscular, intralinfática, intranasal y subcutánea. Las composiciones de vacuna pueden además comprender otros componentes que se conocen en la técnica para mejorar la respuesta inmunitaria a una vacuna, tales como adyuvantes o moléculas coestimuladoras. Por ejemplo, las moléculas coestimuladoras que comprenden uno o más factores seleccionados entre el grupo que consiste en GM-CSF, IL-2, IL-12, IL-14, IL-15, B7.1, B7.2 y B7-DC se incluyen opcionalmente en las composiciones de vacuna de la presente invención. Los expertos en la técnica conocen otras moléculas coestimuladoras.

- Las formulaciones de vacunas se conocen en la técnica y pueden incluir numerosos aditivos, tales como conservantes, estabilizantes, adyuvantes, antibióticos y otras sustancias. Se añaden estabilizantes, tales como la

lactosa o el glutamato de monosodio (GMS) para estabilizar la formulación de la vacuna contra numerosas condiciones, tales como variaciones de la temperatura o un proceso de liofilización. Las formulaciones de vacuna también pueden incluir un líquido para suspensión tal como agua estéril o disolución salina. En algunas realizaciones, la vacuna es una formulación congelada o liofilizada que comprende uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables que son adecuados para la administración parenteral u oral. En otras realizaciones, la vacuna es una formulación congelada o liofilizada que comprende uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables que son adecuados para la administración a las mucosas o la administración como un aerosol.

Se puede evaluar la eficacia de las vacunas mediante modelos *in vivo*, por ejemplo, un modelo de ratón. Se pueden evaluar las vacunas por su capacidad para proporcionar un efecto o bien terapéutico o bien preventivo contra una enfermedad determinada. Por ejemplo, en el caso de las enfermedades infecciosas, se puede vacunar una población de ratones con una cantidad deseada de la vacuna apropiada de la invención, en donde la bacteria expresa un antígeno asociado a una enfermedad infecciosa. Este antígeno puede ser de la propia *Listeria* o puede ser un antígeno heterólogo. Los ratones se pueden infectar posteriormente con el agente infeccioso relacionado con el antígeno de la vacuna y valorarles la protección contra la infección. Se puede observar la progresión de la enfermedad infecciosa con respecto a una población de control (no vacunada o vacunada con vehículo sólo o con *Listeria* que no expresa el antígeno apropiado).

En el caso de las vacunas contra el cáncer, existen modelos de células tumorales, en donde una línea celular tumoral que expresa un antígeno tumoral deseado se puede inyectar en una población de ratones tanto antes (modelo terapéutico) como después (modelo preventivo) de la vacunación con una *Listeria* de la invención que contiene el antígeno tumoral deseado o un antígeno procedente de un antígeno tumoral. La vacunación con una *Listeria* que contiene el antígeno tumoral se puede comparar con poblaciones de control que o no están vacunadas, o están vacunadas con un vehículo, o con una *Listeria* que no expresa el antígeno deseado. La eficacia de la vacuna en tales modelos se puede evaluar en términos de volumen tumoral en función del tiempo transcurrido desde la inyección del tumor o en términos de poblaciones supervivientes en función del tiempo después de la inyección tumoral. Por lo general, la vacuna dará lugar a una reducción del volumen del tumor en la mayor parte, o en todos, los momentos con respecto a un control negativo (tal como una muestra sin vacunar) y dará lugar a una supervivencia media mayor.

En algunas realizaciones de la descripción, el volumen del tumor en los ratones vacunados con la bacteria *Listeria* mutante es menor o igual al volumen del tumor de los ratones de control. En una realización, el volumen del tumor en los ratones vacunados con la bacteria *Listeria* mutante es al menos aproximadamente el mismo que el volumen del tumor en los ratones de control. En otra realización, el volumen del tumor en los ratones vacunados con la bacteria *Listeria* mutante es al menos aproximadamente el 10%, al menos aproximadamente el 20%, al menos aproximadamente el 30%, al menos aproximadamente el 40% o al menos aproximadamente el 50%, menor que el volumen del tumor de los ratones de control. En otra realización, este diferencial de volumen del tumor se observa al menos 7, 14, 30 o al menos 60 días después del implante de los tumores en los ratones. En una realización, el tiempo de supervivencia medio en los ratones vacunados con la bacteria *Listeria* mutante es aproximadamente el mismo que en los ratones vacunados con la bacteria *Listeria* de control. En otra realización, el tiempo de supervivencia medio en los ratones vacunados con la bacteria *Listeria* atenuada es de al menos aproximadamente 1, al menos aproximadamente 3 o al menos aproximadamente 5 días más que en los ratones vacunados con la bacteria *Listeria* de control. En otras realizaciones, el tiempo de supervivencia medio en los ratones vacunados con la bacteria *Listeria* atenuada es de al menos aproximadamente 10 días, al menos aproximadamente 20 días, al menos aproximadamente 30 días más que en los ratones vacunados con la bacteria *Listeria* de control. En una realización de la invención, la vacunación con la bacteria *Listeria* mutante se efectúa a una dosis de *Listeria* que es aproximadamente la misma que la dosis de la bacteria *Listeria* de control. En otra realización, la vacunación de la bacteria *Listeria* mutante se dosifica con inocuidad a una concentración que es al menos aproximadamente 2, aproximadamente 5, aproximadamente 10, aproximadamente 10^2 , aproximadamente 10^3 o al menos aproximadamente 10^4 veces más elevada que la dosis de vacunación de la bacteria *Listeria* de control.

Además de las mediciones de la eficacia de las vacunas, también se pueden realizar mediciones de inocuidad y toxicidad. Tales métodos para medir la inocuidad pueden incluir la determinación del número de *Listeria* mutantes que entran en los hepatocitos en comparación con una *Listeria* que no es mutante. En algunas realizaciones, la bacteria *Listeria* mutante es defectuosa con respecto a la internalina B. En otras realizaciones, la bacteria *Listeria* mutante es defectuosa con respecto a la internalina B y a ActA.

En otro aspecto, la descripción da a conocer un método para disminuir la patogenia de una cepa de *Listeria* utilizada en una vacuna, que comprende modificar la cepa para que tenga disminuida la capacidad que tiene la cepa para entrar en las células no fagocíticas, pero que conserve sustancialmente la capacidad de la cepa para entrar en las células fagocíticas. En algunas realizaciones, la descripción da a conocer un método para disminuir la patogenia de una cepa de *Listeria* usada en una vacuna, que comprende modificar la cepa para hacerla defectuosa con respecto a la internalina B. En algunas realizaciones, la cepa se modifica adicionalmente para que sea defectuosa con

respecto a ActA.

- En otros aspectos, la descripción da a conocer métodos para fabricar vacunas. Por ejemplo, la descripción da a conocer un método para fabricar una vacuna que comprende poner en contacto la bacteria *Listeria* atenuada (tal como una cepa mutante de *Listeria*) con una célula presentadora de antígeno profesional, en las condiciones adecuadas y durante un tiempo suficiente para que se carguen las células presentadoras de antígeno profesionales, en donde la bacteria *Listeria* tiene atenuada la entrada en las células no fagocíticas con respecto a una *Listeria* que no está modificada, tal como el tipo silvestre (p. ej., defectuosa con respecto a la internalina B), pero conserva la capacidad de entrar en las células fagocíticas, y comprende una molécula de ácido nucleico heterólogo que codifica un antígeno. Aún en otro aspecto, la descripción da a conocer una célula presentadora de antígeno profesional que comprende una bacteria *Listeria*, en donde la bacteria *Listeria* tiene atenuada la entrada en las células no fagocíticas. La descripción también da a conocer una célula presentadora de antígeno profesional que comprende una cepa mutante de *Listeria*, en donde la cepa mutante de *Listeria* tiene atenuada la entrada en las células no fagocíticas con respecto a una cepa de *Listeria* que no es mutante, pero conserva la capacidad de entrar en las células fagocíticas. En algunas realizaciones, la bacteria *Listeria* mutante se pone en contacto con la célula presentadora de antígeno profesional *ex vivo* o *in vivo*. En algunas realizaciones, la célula presentadora de antígeno profesional es una célula dendrítica. En otras realizaciones, la célula presentadora de antígeno profesional es un macrófago. Para las descripciones de algunos antígenos de ejemplo, véase el apartado II.C, más arriba.

IV. Métodos para inducir respuestas inmunitarias y métodos de tratamiento

- La presente descripción también da a conocer métodos para inducir respuestas inmunitarias y tratar y/o prevenir una enfermedad que comprende el uso de la bacteria *Listeria* atenuada, células, composiciones y vacunas descritas en la presente memoria (las bacterias *Listeria* atenuadas de ejemplo útiles en los métodos de la presente invención se describen en el apartado II.A-D, más arriba, y en los ejemplos que vienen a continuación. Las composiciones, vacunas y células de ejemplo se describen en el apartado III, más arriba).

- Por ejemplo, la descripción da a conocer un método para inducir en un hospedador una respuesta inmunitaria contra un antígeno que no es de *Listeria*, que comprende administrar al hospedador una cantidad eficaz de una composición que comprende una bacteria *Listeria* que tiene atenuada la entrada en las células no fagocíticas y que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica el antígeno que no es de *Listeria*. La descripción también da a conocer un método para inducir en un hospedador una respuesta inmunitaria contra un antígeno, que comprende administrar al hospedador una cantidad eficaz de una composición que comprende una bacteria *Listeria* que tiene atenuada tanto la entrada en las células no fagocíticas como la diseminación de una célula a otra, en donde la cepa mutante de *Listeria* comprende un ácido nucleico que codifica el antígeno. La descripción además da a conocer un método para inducir en un hospedador una respuesta inmunitaria contra un antígeno, que comprende administrar al hospedador una cantidad eficaz de una vacuna que comprende (a) una bacteria *Listeria* que tiene atenuada la entrada en las células no fagocíticas y (b) un vehículo farmacéuticamente aceptable y/o un adyuvante.

- La descripción también da a conocer un método para inducir una respuesta inmunitaria contra un antígeno en un hospedador que comprende administrar al hospedador una cantidad eficaz de una composición que comprende una cepa mutante de *Listeria*, en donde la cepa mutante de *Listeria* tiene atenuada la entrada en las células no fagocíticas con respecto a una cepa de *Listeria* que no es mutante, pero conserva la capacidad de entrar en las células fagocíticas, y comprende una molécula de ácido nucleico que codifica el antígeno. La respuesta inmunitaria puede ser una respuesta mediada por células. En una realización, la respuesta inmunitaria es una respuesta de linfocitos T CD8+. En otra realización, la respuesta inmunitaria es una respuesta de linfocitos T CD4+. Aún en otra realización, la respuesta inmunitaria inducida en el hospedador comprende una respuesta tanto de linfocitos T CD8+ como de CD4+. Para las descripciones de algunos antígenos de ejemplo, véase el apartado II.C, más arriba. En una realización, el antígeno es un antígeno tumoral o que procede de un antígeno tumoral. En algunas realizaciones, la cepa mutante es defectuosa con respecto a la internalina B. En otras realizaciones, la cepa mutante es defectuosa con respecto tanto a la internalina B como a ActA.

- En otro aspecto, la descripción da a conocer un método para inducir la presentación del antígeno con el CMH de clase I en una célula presentadora de antígeno profesional (*in vitro*, *in vivo* o *ex vivo*) que comprende poner en contacto una cepa mutante de *Listeria* con la célula presentadora de antígeno profesional, en donde la cepa mutante de *Listeria* tiene atenuada la entrada en las células no fagocíticas con respecto a una cepa de *Listeria* que no es mutante, pero conserva la capacidad de entrar en las células fagocíticas y comprende una molécula de ácido nucleico heterólogo que codifica un antígeno que comprende un epítipo del CMH de clase I. En algunas realizaciones, la cepa mutante es defectuosa con respecto a la internalina B. En otras realizaciones, la cepa mutante es defectuosa con respecto tanto a la internalina B como a ActA.

- Adicionalmente, la descripción da a conocer un método para inducir la presentación del antígeno con el CMH de clase I o la presentación del antígeno con el CMH de clase II sobre una célula presentadora de antígeno (*in vivo* o *in*

vitro), que comprende poner en contacto una bacteria *Listeria* con una célula presentadora de antígeno, en donde la bacteria *Listeria* tiene atenuada la entrada en las células no fagocíticas y comprende una molécula de ácido nucleico que codifica un antígeno que no es de *Listeria* que comprende un epítipo del CMH de clase I o un epítipo del CMH de clase II. La invención además da a conocer un método para inducir la presentación del antígeno con el CMH de clase II sobre una célula presentadora de antígeno profesional (*in vitro*, *in vivo* o *ex vivo*) que comprende poner en contacto una cepa mutante de *Listeria* con la célula presentadora de antígeno profesional, en donde la cepa mutante de *Listeria* tiene atenuada la entrada en las células no fagocíticas con respecto a una cepa no mutante de *Listeria*, pero conserva la capacidad de entrar en las células fagocíticas, y comprende una molécula de ácido nucleico heterólogo que codifica un antígeno que comprende un epítipo del CMH de clase II. En algunas realizaciones, la cepa mutante es defectuosa con respecto a la internalina B. En otras realizaciones, la cepa mutante es defectuosa con respecto tanto a la internalina B como a ActA.

La descripción también da a conocer un método para inducir en un hospedador una respuesta inmunitaria contra un antígeno, que comprende administrar al hospedador una cantidad eficaz de una célula presentadora de antígeno profesional que comprende una bacteria *Listeria* atenuada, en donde la bacteria *Listeria* atenuada tiene atenuada la entrada en las células no fagocíticas y comprende un ácido nucleico que codifica el antígeno.

La descripción además da a conocer un método para inducir en un hospedador una respuesta inmunitaria contra un antígeno, que comprende las etapas siguientes: (a) poner en contacto una bacteria *Listeria* atenuada con una célula presentadora de antígeno del hospedador, en las condiciones adecuadas y durante un tiempo suficiente para que se carguen las células presentadoras de antígeno, en donde la bacteria *Listeria* atenuada tiene atenuada la entrada en las células no fagocíticas y comprende una molécula de ácido nucleico que codifica el antígeno; y (b) administrar la célula presentadora de antígeno al hospedador. La invención también da a conocer un método para inducir en un hospedador una respuesta inmunitaria contra un antígeno, que comprende las etapas siguientes: (a) poner en contacto una cepa mutante de *Listeria* con una célula presentadora de antígeno profesional del hospedador, en condiciones adecuadas y durante un tiempo suficiente para que se carguen las células presentadoras de antígeno, en donde la cepa mutante de *Listeria* tiene atenuada la entrada en las células no fagocíticas con respecto a una cepa de *Listeria* que no es mutante, pero que conserva la capacidad de entrar en las células fagocíticas, y comprende una molécula de ácido nucleico que codifica un antígeno; y (b) administrar la célula presentadora de antígeno al hospedador. En una realización, el antígeno es un antígeno tumoral o procede de un antígeno tumoral. En algunas realizaciones, la cepa mutante es defectuosa con respecto a la internalina B. En otras realizaciones, la cepa mutante es defectuosa con respecto tanto a la internalina B como a ActA.

En otro aspecto, la descripción da a conocer un método para administrar selectivamente una proteína heteróloga a las células fagocíticas de un hospedador, que comprende administrar al hospedador una composición que comprende una cepa mutante de *Listeria* que tiene atenuada la entrada en las células no fagocíticas con respecto a una cepa de *Listeria* que no es mutante, pero conserva sustancialmente la capacidad de entrar en las células fagocíticas, en donde el genoma de la cepa mutante de *Listeria* comprende al menos una mutación en al menos un gen que codifica una invasina, tal como una internalina.

La descripción además da a conocer métodos para prevenir o tratar una enfermedad (tal como un cáncer, una enfermedad infecciosa o listeriosis) en un hospedador utilizando la bacteria *Listeria* atenuada descrita en la presente memoria. Por ejemplo, la invención da a conocer un método para prevenir o tratar una enfermedad en un hospedador que comprende administrar al hospedador una cantidad eficaz de una composición que comprende una bacteria *Listeria* atenuada que tiene atenuada la entrada en las células no fagocíticas y que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica un antígeno que no es de *Listeria*. La descripción también da a conocer un método para prevenir o tratar la enfermedad en un hospedador que comprende administrar al hospedador una cantidad eficaz de una composición que comprende una bacteria *Listeria* atenuada que tiene atenuada tanto la entrada en las células no fagocíticas como la diseminación de una célula a otra. La descripción además da a conocer un método para prevenir o tratar una enfermedad en un hospedador, que comprende administrar al hospedador una cantidad eficaz de una vacuna que comprende (a) una bacteria *Listeria* atenuada que tiene atenuada la entrada en las células no fagocíticas, y (b) un vehículo farmacéuticamente aceptable y/o un adyuvante.

En un aspecto, la presente descripción da a conocer un método para prevenir o tratar una enfermedad en un hospedador, que comprende administrar al hospedador una vacuna que comprende una cepa mutante de *Listeria*, en donde la cepa mutante de *Listeria* tiene atenuada la entrada en las células no fagocíticas con respecto a una cepa de *Listeria* que no es mutante, pero conserva la capacidad de entrar en las células fagocíticas. La enfermedad se previene o se trata mediante la inducción de una respuesta inmunitaria terapéuticamente beneficiosa contra un antígeno relacionado con la enfermedad. En algunas realizaciones, la cepa mutante es defectuosa con respecto a la internalina B. En otras realizaciones, la cepa mutante es defectuosa con respecto tanto a la internalina B como a ActA. En una realización, la enfermedad es cáncer. En otra realización, la enfermedad es una enfermedad autoinmunitaria. Aún en otras realizaciones, la enfermedad es una enfermedad infecciosa u otra enfermedad provocada por un microorganismo patógeno, tal como un virus, bacteria, hongo o protozoo.

La descripción también da a conocer un método para prevenir o tratar una enfermedad en un hospedador que comprende administrar al hospedador una cantidad eficaz de una célula presentadora de antígeno profesional que comprende una bacteria *Listeria* atenuada, en donde la bacteria *Listeria* atenuada tiene atenuada la entrada en las células no fagocíticas.

- 5 La descripción además da a conocer una composición que comprende una bacteria *Listeria* para uso médico, en donde la bacteria *Listeria* tiene atenuada la entrada en las células no fagocíticas y comprende una molécula de ácido nucleico que codifica un antígeno que no es de *Listeria*. En otra realización, la descripción da a conocer una bacteria *Listeria* para uso médico, en donde la bacteria *Listeria* tiene atenuada la entrada en las células no fagocíticas y comprende una molécula de ácido nucleico que codifica un antígeno que no es de *Listeria*.
- 10 La descripción también da a conocer una composición que comprende una bacteria *Listeria* para uso médico, en donde la bacteria tiene atenuada la entrada en las células no fagocíticas. La descripción también da a conocer una bacteria *Listeria* para uso médico, en donde la bacteria tiene atenuada la entrada en las células no fagocíticas.

Además, la descripción da a conocer una composición que comprende una bacteria *Listeria* para uso médico, en donde la bacteria tiene atenuada tanto la entrada en las células no fagocíticas como la diseminación de una célula a otra.

- 15 La descripción también da a conocer una bacteria *Listeria* para uso médico, en donde la bacteria tiene atenuada tanto la entrada en las células no fagocíticas como la diseminación de una célula a otra.

Adicionalmente, la descripción da a conocer el uso de una bacteria *Listeria* para fabricar un medicamento para el tratamiento de una enfermedad sin relacionar y/o no causada por la bacteria *Listeria*, en donde la bacteria *Listeria* tiene atenuada la entrada en las células no fagocíticas y comprende una molécula de ácido nucleico que codifica un antígeno que no es de *Listeria*. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la enfermedad es cáncer y el antígeno es un antígeno de tumor o es un antígeno procedente de un antígeno tumoral.

- 20 Antígeno que no es de *Listeria*. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la enfermedad es cáncer y el antígeno es un antígeno de tumor o es un antígeno procedente de un antígeno tumoral.

La descripción también da a conocer el uso de una bacteria *Listeria* para fabricar un medicamento para el tratamiento de una enfermedad sin relacionar con la bacteria *Listeria* y/o sin estar causada por ella, en donde la bacteria tiene atenuada la entrada en las células no fagocíticas. En algunas realizaciones, la bacteria *Listeria* tiene atenuada además la diseminación de una célula a otra. En algunas realizaciones, la enfermedad es cáncer y el antígeno es un antígeno tumoral o es un antígeno derivado de un antígeno tumoral.

- 25 La descripción también da a conocer el uso de una bacteria *Listeria* para fabricar un medicamento para el tratamiento de una enfermedad sin relacionar con la bacteria *Listeria* y/o sin estar causada por ella, en donde la bacteria tiene atenuada la entrada en las células no fagocíticas. En algunas realizaciones, la bacteria *Listeria* tiene atenuada además la diseminación de una célula a otra. En algunas realizaciones, la enfermedad es cáncer y el antígeno es un antígeno tumoral o es un antígeno derivado de un antígeno tumoral.

En algunas realizaciones, el uso de la bacteria *Listeria* atenuada en la prevención o el tratamiento de un cáncer comprende la administración de la bacteria *Listeria* atenuada a las células del sistema inmunitario de un individuo para prevenir o tratar un cáncer presente o al cual el individuo presenta un mayor factor de riesgo, tal como la exposición medioambiental y/o la propensión familiar. En algunas realizaciones, al individuo que se ha tratado con la vacuna se le había extirpado un tumor y/o había tenido cáncer en el pasado.

- 30 En algunas realizaciones, el uso de la bacteria *Listeria* atenuada en la prevención o el tratamiento de un cáncer comprende la administración de la bacteria *Listeria* atenuada a las células del sistema inmunitario de un individuo para prevenir o tratar un cáncer presente o al cual el individuo presenta un mayor factor de riesgo, tal como la exposición medioambiental y/o la propensión familiar. En algunas realizaciones, al individuo que se ha tratado con la vacuna se le había extirpado un tumor y/o había tenido cáncer en el pasado.

La administración de la bacteria *Listeria* atenuada, o una composición que comprende la bacteria *Listeria* atenuada, puede ser cualquier método adecuado que incluye, pero sin limitarse a ellas, las administraciones intradérmica, subcutánea, intraperitoneal, intravenosa, intramuscular, intralinfática, oral o intranasal. En algunas realizaciones, la administración de la bacteria *Listeria* atenuada es parenteral. En algunas realizaciones se utiliza la administración a las mucosas.

- 35 La administración de la bacteria *Listeria* atenuada, o una composición que comprende la bacteria *Listeria* atenuada, puede ser cualquier método adecuado que incluye, pero sin limitarse a ellas, las administraciones intradérmica, subcutánea, intraperitoneal, intravenosa, intramuscular, intralinfática, oral o intranasal. En algunas realizaciones, la administración de la bacteria *Listeria* atenuada es parenteral. En algunas realizaciones se utiliza la administración a las mucosas.

En algunas realizaciones, las composiciones que comprenden la bacteria *Listeria* atenuada se administran a un hospedador en combinación con un agente inmunoestimulador. La *Listeria* atenuada y el agente inmunoestimulador se pueden administrar simultáneamente, secuencialmente o por separado. Los ejemplos de agentes inmunoestimuladores incluyen, pero sin limitarse a ellos, IL-2, IL-12, GM-CSF, IL-15, B7.1, B7.2 y B7-DC e IL-14. En algunas realizaciones, el agente inmunoestimulador es un anticuerpo o molécula pequeña que actúa selectivamente sobre las moléculas reguladoras de los linfocitos T. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el agente inmunoestimulador es CTLA-4 o BTLA-4. En algunas realizaciones, el agente inmunoestimulador es un agente que actúa selectivamente sobre los linfocitos T reguladores. Por ejemplo, el agente inmunoestimulador utilizado junto con la bacteria *Listeria* atenuada puede ser un anticuerpo anti-CD25, un anticuerpo anti-LAG-3, o un citoxano.

- 40 En algunas realizaciones, las composiciones que comprenden la bacteria *Listeria* atenuada se administran a un hospedador en combinación con un agente inmunoestimulador. La *Listeria* atenuada y el agente inmunoestimulador se pueden administrar simultáneamente, secuencialmente o por separado. Los ejemplos de agentes inmunoestimuladores incluyen, pero sin limitarse a ellos, IL-2, IL-12, GM-CSF, IL-15, B7.1, B7.2 y B7-DC e IL-14. En algunas realizaciones, el agente inmunoestimulador es un anticuerpo o molécula pequeña que actúa selectivamente sobre las moléculas reguladoras de los linfocitos T. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el agente inmunoestimulador es CTLA-4 o BTLA-4. En algunas realizaciones, el agente inmunoestimulador es un agente que actúa selectivamente sobre los linfocitos T reguladores. Por ejemplo, el agente inmunoestimulador utilizado junto con la bacteria *Listeria* atenuada puede ser un anticuerpo anti-CD25, un anticuerpo anti-LAG-3, o un citoxano.
- 45 La bacteria *Listeria* atenuada puede ser un anticuerpo anti-CD25, un anticuerpo anti-LAG-3, o un citoxano.

El hospedador en los métodos descritos en la presente memoria es cualquier vertebrado, preferentemente un mamífero, entre ellos animales domésticos, animales de carreras, y primates, incluidos los humanos.

La dosis de las composiciones farmacéuticas o las vacunas que se administran al hospedador variarán según la especie del hospedador, el tamaño del hospedador, y la afección o enfermedad del hospedador. La dosis de las composiciones también dependerán de la frecuencia de administración de las composiciones y la vía de administración. En algunas realizaciones, una sola dosis comprende de unos 10^2 a unos 10^{12} microorganismos de *Listeria* atenuada. En otra realización, una sola dosis comprende de unos 10^6 a unos 10^{11} microorganismos de la bacteria *Listeria* atenuada. Aún en otra realización, una dosis única de la composición farmacéutica o vacuna comprende de unos 10^7 a unos 10^{10} microorganismos atenuados.

- 50 La dosis de las composiciones farmacéuticas o las vacunas que se administran al hospedador variarán según la especie del hospedador, el tamaño del hospedador, y la afección o enfermedad del hospedador. La dosis de las composiciones también dependerán de la frecuencia de administración de las composiciones y la vía de administración. En algunas realizaciones, una sola dosis comprende de unos 10^2 a unos 10^{12} microorganismos de *Listeria* atenuada. En otra realización, una sola dosis comprende de unos 10^6 a unos 10^{11} microorganismos de la bacteria *Listeria* atenuada. Aún en otra realización, una dosis única de la composición farmacéutica o vacuna comprende de unos 10^7 a unos 10^{10} microorganismos atenuados.

V. Kits

La descripción además da a conocer kits (o artículos de fabricación) que comprenden la bacteria *Listeria* atenuada de la invención (tal y como se describe más arriba y en los ejemplos que vienen a continuación).

- En un aspecto, la descripción da a conocer un kit que comprende (a) una composición que comprende una bacteria *Listeria*, en donde la bacteria *Listeria* tiene atenuada la entrada en las células no fagocíticas y comprende una molécula de ácido nucleico que codifica un antígeno que no es de *Listeria*; y (b) instrucciones para el uso de la composición en la prevención o el tratamiento de una enfermedad en un hospedador. En algunas realizaciones, las instrucciones se encuentran en una etiqueta en el exterior o en el interior del kit. En otras realizaciones, las instrucciones se encuentran en un folleto contenido en el kit.
- 10 En otro aspecto, la descripción da a conocer un kit que comprende (a) una composición que comprende una bacteria *Listeria*, en donde la bacteria *Listeria* tiene atenuada la entrada en las células no fagocíticas y comprende una molécula de ácido nucleico que codifica un antígeno que no es de *Listeria*; y (b) instrucciones para la administración de la composición a un hospedador. En algunas realizaciones, las instrucciones se encuentran en una etiqueta en el exterior o interior del kit. En otras realizaciones, las instrucciones se encuentran en un folleto que contiene el kit.
- 15 En algunas realizaciones, las instrucciones se encuentran en una etiqueta en el exterior o interior del kit. En otras realizaciones, las instrucciones se encuentran en un folleto contenido en el kit.

- En otro aspecto más, la descripción da a conocer un kit que comprende (a) una composición que comprende la bacteria *Listeria*, en donde la bacteria *Listeria* tiene atenuada la entrada en las células no fagocíticas; y (b) instrucciones para el uso de la composición para la prevención o para el tratamiento de una enfermedad en un hospedador. En algunas realizaciones, la bacteria *Listeria* tiene atenuada la diseminación de una célula a otra. En algunas realizaciones, las instrucciones se encuentran en una etiqueta en el exterior o interior del kit. En otras realizaciones, las instrucciones se encuentran en un folleto dentro del kit.
- 20 En algunas realizaciones, las instrucciones se encuentran en una etiqueta en el exterior o interior del kit. En otras realizaciones, las instrucciones se encuentran en un folleto dentro del kit.

- La descripción además da a conocer un kit que comprende (a) una composición que comprende la bacteria *Listeria*, en donde la bacteria *Listeria* tiene atenuada la entrada en las células no fagocíticas; y (b) instrucciones para la administración de la composición a un hospedador. En algunas realizaciones, la bacteria *Listeria* además tiene atenuada la diseminación de una célula a otra. En algunas realizaciones, las instrucciones se encuentran en una etiqueta en el exterior o interior del kit. En otras realizaciones, las instrucciones se encuentran en un folleto contenido dentro del kit.
- 25 En algunas realizaciones, las instrucciones se encuentran en una etiqueta en el exterior o interior del kit. En otras realizaciones, las instrucciones se encuentran en un folleto contenido dentro del kit.

Ejemplos

- 30 Los ejemplos siguientes se dan a conocer para ilustrar la invención, pero no para limitarla.

Ejemplo 1. Construcción de las cepas mutantes de *Listeria*

*A. Preparación de las cepas mutantes de *Listeria**

- Las cepas de *Listeria* proceden de 10403S (Bishop et al., *J. Immunol.* 139: 2005 (1987)). Las cepas de *Listeria* con deleciones en el marco de lectura de los genes indicados se generaron mediante SOE-PCR e intercambio alélico con los métodos establecidos (Camilli et al., *Mol. Microbiol.* 8: 143 (1993)). La cepa mutante LLO L461T (DP-L4017) se describió en Glomski et al., *J. Cell. Biol.* 156: 1029 (2002). El mutante $\Delta actA$ (DP-L4029) es la cepa DP-L3078 descrita en Skoble et al., *J. of Cell Biology*, 150: 527-537 (2000) que se ha curado de su profago (la curación del profago se describe en [Lauer et al., *J. Bacteriol.* 184: 4177 (2002); publicación de patente de los EE.UU. n.º 2003/0203472]). Los mutantes LLO⁻ (DP-L4027) (Lauer et al., *J. of Bacteriology*, 184: 4177-4186 (2002)) y LLO $\Delta 26$ (DP-L4042) (Decatur et al., *Science* 290: 992 (2000)) también se describieron previamente. La construcción de una cepa $\Delta actA \Delta uvrAB$ se describe como L4029/*uvrAB*. DP-L4029/*uvrAB* (también conocida como $\Delta act \Delta uvrAB$ o *actA*⁻/*uvrAB*⁻) se depositó en la ATCC el 3 de octubre de 2003, y se denominó PTA-5563.
- 35 40

*B. Construcción de pKSV7- $\Delta inlB$ para la deleción de *inlB* de *Listeria* mediante intercambio alélico.*

- La deleción de *inlB* de *Listeria* DP-L4029 (o de otras cepas mutantes seleccionadas o de *Listeria* de tipo silvestre) se puede efectuar mediante intercambio alélico, como se describió en Camilli et al., *Mol. Microbiol.* 8: 143-147 (1993). Se puede utilizar la PCR con extensión de solapamiento de empalme (SOE, por su nombre en inglés) para preparar la construcción utilizada en el procedimiento de intercambio alélico. La fuente del gen de la internalina B es la secuencia recogida como número de acceso a GenBank AL591975 (cepa de *Listeria monocytogenes* EGD, genoma completo, segmento 3/12; región del gen *inlB*: nts. 97008-98963), incorporada por referencia en la presente memoria en su totalidad, y/o la secuencia recogida como n.º de acceso a GenBank NC_003210 (cepa de *Listeria monocytogenes* EGD, genoma completo, región del gen *inlB*: nts. 457008-458963), incorporada por referencia en la presente memoria en su totalidad.
- 45 50

En las reacciones de PCR primarias, se amplifican aproximadamente 1000 pb de secuencia hacia arriba y hacia abajo desde los extremos 5' y 3' del gen *inlB* de *Listeria*, respectivamente, con las siguientes plantilla y cebadores:

Plantilla: ADN genómico de DP-L4056 o DP-L4029.

Pareja 1 de cebadores (para la amplificación de la región secuencia arriba desde el extremo 5' de *inlB*):

- 5 Lm-96031F: 5'-GTAAAGTTTCATGTGGACGGCAAAG (SEQ ID n.º 2) (T_m : 72 °C).

Lm-(3' *inlB*-R+) 97020R: 5'-AGGTCTTTTTCAGTTAACTATCCTCTCCTTGATTCTAGTTAT (SEQ ID n.º 3) (T_m : 114 °C).

(La secuencia subrayada es complementaria a la región secuencia abajo del extremo carboxilo de *InlB*).

Tamaño del amplicón (pb): 1007.

- 10 *Pareja 2 de cebadores* (para la amplificación de la región secuencia abajo desde el extremo 3' de *inlB*):

Lm-(5' *inlB*-F+) 98911F: 5'-CAAGGAGAGGATAGTTAACTGAAAAAGACCTAAAAAAGAA GGC (SEQ ID n.º 4) (T_m : 118 °C).

(La secuencia subrayada es complementaria a la región secuencia arriba del extremo amino de *InlB*).

Lm-99970R: 5'-TCCCCTGTTCTATAATTGTTAGCTC (SEQ ID n.º 5) (T_m : 74 °C).

- 15 Tamaño del amplicón (pb): 1074

En la reacción de PCR secundaria, los amplicones de la PCR primaria se fusionan a mediante SOE PCR, aprovechándose de la complementariedad entre el cebador inverso de la pareja 1 y el cebador directo de la pareja 2. Esto da lugar a la delección precisa de la secuencia codificante de *inlB*: nts. 97021 – 98910 = 1889 pb. Los siguientes plantilla y cebadores se utilizaron en la reacción de PCR secundaria:

- 20 *Plantilla*: reacciones de PCR primaria limpias.

Pareja de cebadores:

Lm-96043F: 5'-GTGGACGGCAAAGAAACAACCAAAG (SEQ ID n.º 6) (T_m : 74 °C).

Lm-99964R: 5'-GTTCTCTATAATTGTTAGCTCATTTTTTTC (SEQ ID n.º 7) (T_m : 74 °C).

(Tamaño del amplicón (pb): 2033).

- 25 Un protocolo para completar el proceso de construcción es el siguiente:

Se realizan las PCR primarias (ciclo de temperatura 3) utilizando la ADN polimerasa Vent (NEB) y 10 µl de un cultivo de una noche lavado de *Listeria* DP-L4056 o DP-L4029 a 30 °C. El tamaño esperado de los amplicones de *Listeria* mediante gel de agarosa al 1% es 1007 pb y 1074 pb. Las PCR primarias se purifican en gel y se eluye el ADN con GeneClean (BIO 101).

- 30 Se realiza una PCR secundaria con cantidades aproximadamente iguales de cada reacción primaria como plantilla (alrededor de 5 µl). El tamaño esperado del amplicón de *Listeria* en la PCR secundaria se verifica mediante gel de agarosa al 1% (2033 pb). Se añaden restos de adenosina en los extremos en 3' del amplicón de *Listeria* $\Delta inlB$ con Taq polimerasa.

A continuación se inserta el amplicón de *Listeria* $\Delta inlB$ en un vector pCR2.1-TOPO. El ADN plasmídico de pCR2.1-TOPO- $\Delta inlB$ se digiere con *XhoI* y *KpnI* y se purifica en gel el fragmento de 2123 pb. El fragmento de 2123 pb *KpnI/XhoI* se inserta en un vector pKSV7 que se ha preparado mediante digestión con *KpnI* y *XhoI* y el tratamiento con la fosfatasa alcalina de intestino de ternera (pKSV7- $\Delta inlB$). Luego se verifica la fidelidad de la secuencia $\Delta inlB$ en pKSV7- $\Delta inlB$. Se elimina el gen *inlB* de las cepas de *Listeria* deseadas mediante intercambio alélico con el plásmido pKSV7- $\Delta inlB$.

- 40 *C. Construcción de las cepas que expresan el antígeno.*

Se prepararon cepas mutantes de *Listeria* que expresan una forma truncada del modelo antigénico ovalbúmina (OVA), el epítipo inmunodominante del cáncer colorrectal de ratón (CT26) conocido como AH1 (SPSYVYHQF (SEQ

ID n.º 8)), y el epítipo alterado AH1-A5 (**SPSYAYHQF** (SEQ ID n.º 9); Slansky et al., *Immunity*, 13: 529-538 (2000)). Se utilizaron el vector integrativo pPL2 (Lauer et al., *J. Bacteriol.* 184: 4177 (2002); publicación de patente de los EE.UU. n.º 2003/0203472) para obtener las cepas de *Listeria* recombinantes con OVA y AH1-A5/OVA que contienen una sola copia integrada en un sitio inocuo del genoma de *Listeria*.

5 *Construcción de Listeria que expresa OVA (DP-L4056).*

Primero se prepara un casete de expresión de antígeno que consiste en LLO sin hemolisina fusionado con la OVA truncada y contenido en el vector integrativo pPL2 (pPL2/LLO-OVA). La cepa de vacuna de *Listeria*-OVA se genera introduciendo el pPL2/LLO-OVA en la cepa de *L. monocytogenes* DP-L4056 curada de fago en el sitio de adhesión tRNA^{Arg}-attBB' de PSA (Phage de ScottA).

10 Se utiliza la PCR para amplificar la LLO sin hemolisina con la plantilla y cebadores siguientes:

Fuente: ADN genómico de DP-L4056.

Cebadores:

Directo (*KpnI*-LLO nts. 1257-1276): 5'-**CTCTGGTACCTCCTTTGATTAGTATATTC** (SEQ ID n.º 10)

(T_m: específica de LLO: 52 °C. Total: 80 °C)

15 Inverso (*BamHI*-*XhoI*-LLO nts. 2811-2792): 5'-**CAATGGATCCCTCGAGATCATAATTTACTTCATCCC** (SEQ ID n.º 11)

(T_m: específica de LLO: 52 °C. Total: 102 °C).

También se utiliza la PCR para amplificar la OVA truncada mediante la plantilla y los cebadores siguientes:

Fuente: ADN plasmídico de pDP3616 de *E. coli* DP-E3616 (Higgins et al., *Mol. Molbiol.* 31: 1631-1641 (1999)).

20 Cebadores:

Directo (ADNc de OVA *XhoI*-*NcoI*, nts. 174-186): 5'-**ATTTCTCGAGTCCATGGGGGGTTCTCATCATC** (SEQ ID n.º 12)

(T_m: específica de OVA: 60 °C. Total: 88 °C).

Inverso (*XhoI*-*NotI*-*HindIII*): 5'-**GGTGCTCGAGTGCGGCCGCAAGCTT** (SEQ ID n.º 13)

25 (T_m: Total: 82 °C).

Un protocolo para completar el proceso de construcción implica primero cortar el amplicón de LLO con *KpnI* y *BamHI* e insertar el vector *KpnI*/*BamHI* en el vector pPL2 (pPL2-LLO). Después se corta el amplicón de OVA con *XhoI* y *NotI* y se inserta en el pPL2-LLO que se ha cortado con *XhoI*/*NotI* (nota: el vector de pPL2 no contiene ningún sitio de *XhoI*; pDP-3616 contiene un sitio *XhoI*, que se explota en el diseño del cebador inverso de OVA). La construcción pPL2/LLO-OVA se verifica mediante análisis de restricción (*KpnI*-LLO-*XhoI*-OVA-*NotI*) y secuenciación. Se introduce el plásmido pPL2/LLO-OVA en *E. coli* mediante transformación y después se introduce e integra en *Listeria* (DP-L4056) mediante conjugación, exactamente como describieron Lauer et al. (o en otra cepa deseada de *Listeria*, tal como un mutante Δ inB o un mutante doble Δ actA Δ inB).

35 Una descripción de la inserción de un casete de expresión de antígeno que expresa OVA también se puede encontrar en el ejemplo 8 de la solicitud provisional de los EE.UU. titulada «Free-living microbe based vaccine compositions», n.º de serie de los EE.UU. 60/511 869, registrada el 15 de octubre de 2003.

Construcción de las cepas de Listeria que expresan AH1/OVA o AH1-A5/OVA.

40 Para preparar la bacteria *Listeria* que expresa las secuencias antigénicas de o bien AH1/OVA o bien AH1-A5/OVA, primero se preparan los insertos que llevan el antígeno a partir de oligonucleótidos y luego se ligan al vector pPL2-LLO-OVA (preparado como se describe más arriba).

Los siguientes oligonucleótidos se utilizan para la preparación del inserto AH1 o AH1-A5:

Inserto del epítipo AH1 (extremos compatibles con ClaI-PstI):

Cebador de la hebra superior (AH1 superior): 5'-**CGATTCCCCTAGTTATGTTTACCACCAATTTGCTGCA** (SEQ ID n.º 14)

Cebador de la hebra inferior (AH1 inferior): 5'-**GCAAATTGGTGGTAAACATAACTAGGGGAAT** (SEQ ID n.º 15)

Inserto del epítipo AH1-A5 (extremos compatibles con ClaI-AvaII):

- 5 La secuencia del epítipo AH1-A5 es **SPSYAYHQF** (SEQ ID n.º 9) (5'-**AGT CCA AGT TAT GCA TAT CAT CAA TTT**-3') (SEQ ID n.º 16).

Superior: 5'-**CGATAGTCCAAGTTATGCATATCATCAATTTGC** (SEQ ID n.º 17).

Inferior: 5'-**GTCGCAAATTGATGATATGCATAACTTGGACTAT** (SEQ ID n.º 18).

- 10 La pareja de oligonucleótidos para un epítipo determinado se mezclan juntos a una proporción equimolar y se calientan a 95 °C durante 5 minutos. A continuación, la mezcla de oligonucleótidos se deja enfriar lentamente. Luego, los pares de oligonucleótidos hibridados se ligan a una proporción molar de 200 a 1 con el plásmido pPL2-LLO/OVA preparado mediante digestión con las enzimas de restricción relevantes. Se puede verificar la identidad de la nueva construcción mediante análisis de restricción y/o secuenciación.

- 15 Entonces, el plásmido se puede introducir en *E. coli* mediante transformación, seguida de la introducción e integración en *Listeria* (DP-L4056) mediante conjugación, exactamente como describieron Lauer et al. (o en otra cepa deseada de *Listeria*, tal como un mutante $\Delta inlB$ o un mutante doble $\Delta actA\Delta inlB$).

Ejemplo 2. Estudios de la patogenia de *Listeria*

- 20 Se determinó la dosis letal media (DL₅₀) de algunas de las cepas mutantes de *Listeria* mediante infección por vía i.v. de ratones. Se infectaron por vía i.v. de tres a cinco ratones hembra C57BL/6 con tres diluciones de 5 veces de la cepa indicada. Los ratones se monitorizaron diariamente durante 10 días y se sacrificaron cuando mostraron señales de sufrimiento. Se calculó la dosis letal media. Los datos se muestran en la tabla 1, a continuación. Los resultados muestran que las cepas mutantes de *Listeria* que son deficientes con respecto a la internalina B ($\Delta inlB$, $\Delta actA\Delta inlB$ y $\Delta actA\Delta inlAB$) son menos tóxicas cuando se combinan con una delección de *actA*. La única cepa $\Delta inlB$ muestra una toxicidad similar a la de *Listeria* de tipo silvestre.

25 Tabla 1. Cepas atenuadas de *Listeria monocytogenes*

Cepa	Genotipo	Fenotipo	DL ₅₀ de la patogenia (ufc) en ratones C57BL/6
			Parenteral
DP-L4056	De tipo silvestre; 10403S; libre de fagos	De tipo silvestre	1 x 10 ⁵
DP-L4406	$\Delta inlB$	Alteración de la infección mediada por <i>inlB</i>	1 x 10 ⁵
DP-L4029	$\Delta actA$	Diseminación efectiva de una célula a otra	1 x 10 ⁸
	$\Delta actA\Delta inlB$	Sin nucleación de actina en el hospedador; diseminación defectuosa de una célula a otra; alteración de la infección mediada por <i>inlB</i>	1 x 10 ⁸
	$\Delta actA\Delta inlAB$		1 x 10 ⁹

Ejemplo 3. Valoración de la actividad citotóxica *in vivo* en los ratones vacunados con *Listeria monocytogenes*.

- Se realizaron una serie de estudios para valorar la capacidad que los ratones vacunados tienen para lisar células diana específicas del antígeno *in vivo*. En el primer estudio, se vacunaron ratones Balb/c o bien por vía intravenosa (i.v.) o bien por vía intramuscular (i.m.) con las cepas de *Listeria monocytogenes* DP-L4029 ($\Delta actA$), DP-L4029 $\Delta inlB$ ($\Delta actA \Delta inlB$) y las mismas cepas modificadas genéticamente para que expresen AH1-A5 de acuerdo con la tabla 2. Las construcciones de *Listeria* que expresan AH1-A5 también expresan la LLO sin hemolisina y la OVA truncada (véase el ejemplo 1.C, más arriba). La dosis de la vacunación era 0,1 x DL₅₀. Se preparó una población de células diana recolectando en medio RPMI 1640 los bazos de 10 ratones Balb/c sin exposición previa. Se disociaron las células y se lisaron los hematíes. Se contaron los leucocitos y se partieron en dos poblaciones iguales. Cada grupo
- se sensibilizó con un péptido específico, bien de diana (AH1, **SPSYVYHQF** (SEQ ID n.º 8), de SynPep, Dublín, CA) o control (β -gal, **TPHPARIGL** (SEQ ID n.º 19)), a 0,5 µg/ml durante 90 minutos a 37 °C. Luego se lavaron las células 3 veces en el medio, y dos veces en PBS + SAB al 0,1%. Se volvieron a suspender las células a 1 x 10⁷ por ml en PBS caliente + SAB al 0,1% (10 ml o menos) para la marcación con carboxifluoresceínadiacetato de succinimidilo (CFSE, Molecular Probes, Eugene, OR). Para la suspensión de las células diana se añadieron 1,25 µl de una reserva a 5 mM de CFSE y se mezcló la muestra mediante agitación vorticial. Al control de suspensión celular se le añadió una dilución 10X de la reserva de CFSE y la muestra se mezcló mediante agitación vorticial. Las células se incubaron a 37 °C durante 10 minutos. Se paró la tinción añadiendo un volumen grande (> 40 ml) de PBS enfriado en hielo. Las células se lavaron dos veces a temperatura ambiente con PBS, luego se resuspendieron y se contaron. Se diluyó cada suspensión celular a 50 x 10⁶ por ml, y se mezclaron 100 µl de cada población y 6 días después de la vacunación se inyectaron a través de la vena de la cola a ratones sin exposición previa o bien a ratones vacunados. Después de 12-24 horas, se recogieron los bazos y se analizaron un total de 5 x 10⁶ células mediante citometría de flujo. Se enumeraron los picos fluorescentes elevados (diana) y bajos (control), y se utilizó la proporción de las dos para establecer el porcentaje de la lisis de células diana con respecto a la población de control de HBSS. Los resultados se muestran en la tabla 2 y en la figura 1A (las tablas de este ejemplo indican las medias de los tres ratones, mientras que las figuras muestran histogramas representativos de ratones individuales). La vacunación con $\Delta actA \Delta inlB$ frente a la vacunación con $\Delta actA$ muestra una mejora de la citotoxicidad *in vivo* específica de antígeno cuando se administra por vía i.v., pero no por vía i.m.

Tabla 2. Citotoxicidad *in vivo* (% de muerte de células diana con respecto a la muestra de control sin vacunar) de ratones Balb/c vacunados como está indicado.

Inmunización	n.º de ratones	Dosis de vacunación	% de muerte de células diana
HBSS	3	100 µl i.v.	0
$\Delta actA$	3	5 x 10 ⁶ en 100 µl i.v.	-0,1
$\Delta actA$ AH1-A5	3	5 x 10 ⁶ en 100 µl i.v.	11,5
$\Delta actA \Delta inlB$	3	1 x 10 ⁷ en 100 µl i.v.	1,7
$\Delta actA \Delta inlB$ AH1-A5	3	1 x 10 ⁷ en 100 µl i.v.	23,5
$\Delta actA$	3	5 x 10 ⁶ en 100 µl i.m.	1,5
$\Delta actA$ AH1-A5	3	5 x 10 ⁶ en 100 µl i.m.	8,5
$\Delta actA \Delta inlB$	3	1 x 10 ⁷ en 100 µl i.m.	2,8
$\Delta actA \Delta inlB$ AH1-A5	3	1 x 10 ⁷ en 100 µl i.m.	8,7

30

Se realizó otro estudio utilizando el mutante $\Delta actA$ así como el mutante doble $\Delta actA \Delta inlB$, expresando ambas cepas AH1-A5, y se vacunó por vía i.v. según la tabla 3. En este estudio, los esplenocitos sin exposición previa se sensibilizaron con β -gal, AH1 o P60-217 (**KYGVSVQDI** (SEQ ID n.º 20), un control específico de *Listeria*). Los esplenocitos sensibilizados con β -gal se marcaron con poco CFSE, los de AH1 y P60-217 con CFSE elevado. A dos

ratones de cada grupo se les inyectó el día 5 células sensibilizadas con β -gal y AH-1 como más arriba. A los dos ratones restantes de cada grupo se les inyectó el día 5 células sensibilizadas con β -gal y P60-217. Los resultados se muestran en la tabla 3 y en la figura 1B.

Tabla 3. Citotoxicidad *in vivo* (% de muertes de las células diana respecto a una muestra de control sin vacunar) de ratones Balb/c vacunados como se indica.

Inmunización	N.º de ratones	Dosis de vacunación	Diana	% de muertes
HBSS	2	100 μ l	P60-217	0
$\Delta actA$ AH1-A5	2	5×10^6 en 100 μ l	P60-217	62,4
$\Delta actA\Delta inlB$ AH1-A5	2	1×10^7 en 100 μ l	P60-217	42,0
HBSS	2	100 μ l	AH1	0
$\Delta actA$ AH1-A5	2	5×10^6 en 100 μ l	AH1	19,7
$\Delta actA\Delta inlB$ AH1-A5	2	1×10^7 en 100 μ l	AH1	28,0

Se realizó otro estudio con el mutante doble $\Delta actA\Delta inlB$ con o sin AH1-A5, vacunando por vía i.v. de acuerdo con la tabla 4. En este estudio, los esplenocitos sin exposición previa se sensibilizaron con β -gal, AH1 o AH1-A5 (SPSYAYHQF (SEQ ID n.º 9)). Las células sensibilizadas con β -gal se marcaron con poco CFSE, y las de AH1 y AH1-A5 con CFSE elevado. A tres ratones de cada grupo se les inyectó el día 6 células sensibilizadas con β -gal y AH-1 como más arriba. A los restantes tres ratones de cada grupo se les inyectó el día 6 células sensibilizadas con β -gal y AH1-A5. Los resultados se muestran en la tabla 4 y en la figura 1C.

Tabla 4. Citotoxicidad *in vivo* (% de muerte de las células de diana respecto a una muestra de control sin vacunar) de ratones Balb/c vacunados como se indica.

Inmunización	N.º de ratones	Dosis de vacunación	Diana	% de muertes
HBSS	3	100 μ l	AH1	0
$\Delta actA\Delta inlB$	3	1×10^7 en 100 μ l	AH1	0,7
$\Delta actA\Delta inlB$ AH1-A5	3	1×10^7 en 100 μ l	AH1	31,8
HBSS	3	100 μ l	AH1-A5	0
$\Delta actA\Delta inlB$	3	1×10^7 en 100 μ l	AH1-A5	5,7
$\Delta actA\Delta inlB$ AH1-A5	3	1×10^7 en 100 μ l	AH1-A5	94,9

Ejemplo 4. Vacunación terapéutica con el mutante doble de *Listeria monocytogenes* $\Delta actA\Delta inlB$

Utilizando ratones Balb/c, se inyectaron células tumorales CT26 (ATCC CRL-2639) en los ratones (2×10^5 en 100 μ l de HBSS por vía i.v.) para establecer metástasis pulmonares. Las células CT26 son un adenocarcinoma de colon murino que expresa el epítipo AH1 de gp70 de MMTV (las células además se modificaron para que expresaran un antígeno tumoral humano, aunque esta característica no es pertinente para los datos presentados aquí). Se hicieron varios estudios para valorar el uso de *Listeria monocytogenes* $\Delta actA\Delta inlB$ como cepa de vacuna terapéutica eficaz. En un estudio, las cepas de *Listeria monocytogenes* $\Delta actA$, $\Delta actA$ modificada para expresar AH1-A5, y $\Delta actA\Delta inlB$ modificada para expresar AH1-A5, se utilizaron para vacunar grupos de trece ratones. Todas las cepas se hicieron

crecer en medio BHI (Brain Heart Infusion, Fisher Scientific) a 37 °C a 300 rpm y se guardaron en congelación antes de su uso. La reserva congelada de cada cepa se diluyó en HBSS y se vacunaron los ratones por vía intravenosa con 1×10^7 UFC en 100 μ l para cada cepa cuatro días después de implantar el tumor, así como con un control de 100 μ l de HBSS. Se sacrificaron tres ratones por grupo 20 días después del implante del tumor y se recogieron los pulmones (mostrado en la figura 2A).

A los restantes 10 ratones por grupo se les monitorizó la supervivencia (datos sin mostrar). Se realizaron más estudios en grupos de 10 ratones (únicamente la supervivencia, no se recogieron pulmones de ninguno de los ratones) utilizando $\Delta actA$ AH1-A5, y $\Delta actA\Delta inlB$ AH1-A5, así como L461T que expresa OVA como control de antígeno irrelevante en un estudio y $\Delta actA$ que expresa FluHA como antígeno irrelevante en otro estudio. Los resultados de la supervivencia para estos estudios se muestran en las figuras 2B y 2C, respectivamente. El antígeno AH1 es endógeno para los ratones, de tal modo que cualquier efecto de inmunización rompería la tolerancia inmunitaria en los ratones. Los resultados indican que el mutante $\Delta actA\Delta inlB$ es una vacuna eficaz que rompe la tolerancia en este modelo y refuerza significativamente la supervivencia de los ratones portadores de tumores.

Ejemplo 5. Inmunogenia de distintas cepas de *Listeria monocytogenes* después de la administración intramuscular

- 15 A los ratones C57BL/6 (3 por grupo) se les inyectó por vía i.m. 100 μ l de HBSS que contienen 0,1 x DL₅₀ de las cepas de *Listeria monocytogenes* indicadas en la tabla 5. Todas las cepas se hicieron crecer en el medio BHI (Brain Heart Infusion, Fisher Scientific) a 37 °C a 300 rpm y se guardaron en congelación antes de su uso. Se sacrificaron los ratones 7 días después de la vacunación, se recogieron los bazo y se valoró mediante tinción de las citocinas intracelulares (TCI).
- 20 Para la TCI, los esplenocitos de grupos de ratones vacunados y de control se incubaron con el péptido SL8 OVA₂₅₇₋₂₆₄ (antígeno SL8 de OVA, **SIINFEKL** (SEQ ID n.º 21), Invitrogen, San Diego, CA) que estimula linfocitos CD8+ específicos de OVA, LLO₁₉₀ (**NEKYAQAYPNVS** (SEQ ID n.º 22), Invitrogen), un epítipo de clase II del CMH para la listeriolisina O (antígeno de *Listeria*) o LLO₂₉₆ (**VAYGRQVYL** (SEQ ID n.º 23), Invitrogen), un epítipo del CMH de clase I para la listeriolisina O, durante 5 horas en presencia de brefeldina A (Pharmingen). La brefeldina A inhibe la secreción de las citocinas producidas tras la estimulación de los linfocitos T. Los esplenocitos incubados con un péptido del CMH de clase I irrelevante se utilizaron como controles. Los esplenocitos estimulados con 2 μ g/ml de ionomicina (Sigma) y 20 ng/ml de PMA (forbol-12-miristato-13-acetato, Sigma) se utilizaron como control positivo para la tinción de las citocinas intracelulares IFN- γ y TNF- α . Para la detección de la expresión de las citocinas citoplasmáticas se tiñeron las células con Acm FITC-anti-CD4 (RM 4-5) y Acm PerCP-anti-CD8 (53-6,7), se fijaron y se permeabilizaron con la solución de Cytofix/CytoPerm (Pharmingen), y se tiñeron con Acm anti-TNF- α conjugado con PE (MP6-XT22) y Acm anti-IFN- γ conjugado con APC (XMG1.2) durante 30 minutos en hielo. Se determinó el porcentaje de células que expresan el IFN- γ y/o el TNF- α dentro de la célula mediante citometría de flujo (FACScalibur, Becton Dickinson, Mountain View, CA) y se analizaron los datos con el programa informático CELLQuest (Becton Dickinson Immunocytometry System). Como todos los marcadores fluorescentes sobre los diferentes anticuerpos se pueden distinguir con el FACScalibur, se identificaron las células apropiadas mediante la separación de los CD8+ y los CD4+ que se tiñeron o bien con uno o bien con ambos anti-IFN- γ o anti-TNF- α . Los resultados se indican en las figuras 3A-F. La cepa $\Delta actA\Delta inlB$ es una de las cepas más eficaces a la hora de desencadenar una respuesta inmunitaria específica contra OVA.

Tabla 5. Vacunación de ratones C57BL/6 con distintas cepas de *Listeria monocytogenes*.

Cepa de la vacunación	Descripción	Dosis de la vacunación
DP-L4029	$\Delta actA$	1×10^7
DP-L4017 OVA	Mutante L461T LLO, expresa OVA	$7,5 \times 10^6$
DP-L4027 OVA	Mutante ΔhI (LLO ⁻), expresa OVA	1×10^8
DP-L4029 OVA	Mutante $\Delta actA$, expresa OVA	1×10^7
DP-L4038 OVA	Mutante doble $\Delta actA$ L461T, expresa OVA	2×10^7
DP-L4042 OVA	Mutante LLO $\Delta 26$ (PEST ⁻), expresa OVA	5×10^7

DP-L4056 OVA	Tipo silvestre, expresa OVA	5×10^4
DP-L4097 OVA	Mutante S44A LLO, expresa OVA	1×10^7
DP-L4364 OVA	Mutante Δpl , expresa OVA	2×10^7
DP-L4384 OVA	Mutante doble LLO S44A/L461T, expresa OVA	5×10^7
DP-L4404 OVA	Mutante doble $\Delta inIA\Delta inIB$, expresa OVA	5×10^4
DP-L4405 OVA	Mutante $\Delta inIA$, expresa OVA	5×10^4
DP-L4406 OVA	Mutante $\Delta inIB$, expresa OVA	1×10^5
P60-LLO OVA	Mutante $\Delta P60$, expresa OVA	1×10^6
DP-L4029 $lplA^-$ OVA	Mutante doble $\Delta actA\Delta plA$, expresa OVA	2×10^8
DP-L4029 $\Delta inIB$ OVA	Mutante doble $\Delta actA\Delta inIB$, expresa OVA	1×10^8
MACKuvr ⁻ LLO OVA/AH1	Mutante Δuvr , expresa OVA/AH1	2×10^5

Ejemplo 6. Valoración de la inmunidad específica de OVA inducida por las cepas de *Listeria monocytogenes* en los ratones C57BL/6.

A los ratones C57BL/6 (3 por grupo) se les inyectó por vía i.v. 200 μ l de HBSS que contienen 0,1 x DL₅₀ de las cepas indicadas en la tabla 6. La cepa $\Delta inIB$ se inyectó a una dosis muy elevada y los ratones no sobrevivieron 7 días. Se sacrificaron los ratones 7 días después de la vacunación y se recogieron los bazo, y se valoraron las respuestas de los linfocitos T específicos contra el antígeno heterólogo ovalbúmina (OVA) y contra el antígeno de *Listeria*, LLO, mediante TCI como en el ejemplo 5. Además de estimular los esplenocitos de los ratones vacunados y de control con los epítomos de linfocitos T para OVA, SL8 (OVA₂₅₇₋₂₆₄) y para LLO (LLO₁₉₀₋₂₀₁, LLO₂₉₆₋₃₀₄), se estimularon las células durante 5 horas con timoma murino procedente de ratones C57BL/6 (EL-4), y las células EL-4 transfectadas establemente con un plásmido que codifica ovalbúmina (EG-7). Se utilizaron células estimuladoras bien vivas o bien después de la inactivación con 150 μ M de psoraleno S-59 y luz UVA a 3 J/cm² (dispositivo de irradiación FX 1019, Baxter Fenwal, Round Lake, IL). La inactivación con S-59 se denomina tratamiento fotoquímico (PCT, por su nombre en inglés) y da lugar a la inactivación completa de las células. Los resultados, excluidas las muestras estimuladas con LLO, para el IFN- γ se muestran en la figura 4. Se observó una estimulación comparable de los esplenocitos de los ratones vacunados cuando se utilizaron para la estimulación de 5 horas o bien el epítomo SL8 de los linfocitos T óptimos o bien células tumorales completas, vivas o inactivadas. La estimulación con células completas implica que los linfocitos T específicos de OVA reconocen niveles endógenos de OVA en el contexto de células tumorales. La cepa $\Delta actA\Delta inIB$ da lugar a una respuesta específica contra OVA relativamente fuerte cuando se estimula con el péptido así como con las células enteras.

Tabla 6. Vacunación de ratones C57BL/6 con distintas cepas de *Listeria monocytogenes*.

Cepa de la vacunación	Descripción	Dosis de la vacunación (UFC)
HBSS	Control	100 μ l
DP-L4029 $\Delta inIB$	Mutante doble $\Delta actA\Delta inIB$	1×10^8
DP-L4056 OVA	De tipo silvestre	5×10^4
DP-L4017 OVA	Mutante L461T LLO	$7,5 \times 10^6$

DP-L4029 OVA	$\Delta actA$	1×10^7
DP-L4364 OVA	$lplA^-$	2×10^7
DP-L4406 OVA	$\Delta inlB$	1×10^6
DP-L4038 OVA	Mutante doble $\Delta actA$ L461T	2×10^7
DP-L4029 $lplA^-$ OVA	Mutante doble $\Delta actA \Delta lplA$	2×10^8
DP-L4017 $lplA^-$ OVA	Mutante doble $lplA^-$ L461T	1×10^7
DP-L4029 $\Delta inlB$ OVA	Mutante doble $\Delta actA \Delta inlB$	1×10^8

Se realizó otro estudio para examinar una respuesta a la dosis utilizando las cepas de *Listeria monocytogenes* de tipo silvestre, $\Delta actA$ y $\Delta actA \Delta inlB$, modificadas para expresar OVA. A los ratones C57BL/6 (3 por grupo) se les inyectó por vía i.v. 200 μ l de HBSS como sigue: tipo silvestre a 5×10^4 , 5×10^3 , 5×10^2 , 5×10^1 , $\Delta actA$ a 1×10^7 , 1×10^6 , 1×10^5 , 5×10^4 , 1×10^4 y $\Delta actA \Delta inlB$ a 1×10^8 , 1×10^7 , 1×10^6 , 1×10^5 , 5×10^4 . Se sacrificaron los ratones 7 días después de la vacunación y los bazo se recogieron y valoraron mediante TCI, estimulando con los péptidos SL8, LLO₁₉₀ y LLO₂₉₆. Los resultados se muestran en la figura 5.

Ejemplo 7. Inmunogenia del mutante doble de *Listeria monocytogenes* $\Delta actA \Delta inlB$ que expresa LLO-OVA administrado por diferentes vías a los ratones.

- 10 A los ratones Balb/c se les inyectó *Listeria monocytogenes* $\Delta actA$ (DP-L4029) o el mutante doble de *Listeria monocytogenes* $\Delta actA \Delta inlB$, en donde ambos mutantes están modificados genéticamente para que expresen el antígeno OVA. A los ratones (tres por grupo) se les inyectó 1×10^7 UFC de $\Delta actA$ o 1×10^8 UFC de $\Delta actA \Delta inlB$ en HBSS, bien 200 μ l i.v. (intravenosa), 100 μ l s.c. (subcutánea), 100 μ l i.m. (intramuscular, 50 μ l en el cuádriceps de cada pierna), 50 μ l i.m. (25 μ l por el músculo tibial de cada pierna), 50 μ l i.d. (intradérmica) o 200 μ l i.p. (intraperitoneal). Siete días después de la vacunación se extirparon los bazo y se valoraron mediante tinción de las citocinas intracelulares (TCI) como en el ejemplo 5 (SL8 sólo, IFN- γ sólo). La figura 6 muestra el % de linfocitos T CD8+ específicos de OVA en el bazo, lo que indica que el mutante $\Delta actA \Delta inlB$ da una mayor respuesta que el $\Delta actA$ mediante varias vías de administración, y son las vías i.v., i.p. e i.m. las que muestran las respuestas más altas.

- 20 Ejemplo 8. Cinética del crecimiento *in vivo* del mutante de *Listeria monocytogenes* $\Delta actA \Delta inlB$ en los ratones C57BL/6 inmunocompetentes sin exposición previa.

Aunque las cepas atenuadas de *Listeria* se pueden administrar a dosis más elevadas que el tipo silvestre, es importante para el desarrollo de una vacuna segura que la infección se pueda eliminar rápidamente, sin dañar los principales órganos de la infección, a saber, hígado o bazo.

- 25 A los ratones C57BL/6 se les inyectaron las cepas de *Listeria monocytogenes* DP-L4056 (tipo silvestre), o bien DP-L4029 ($\Delta actA$), o bien DP-L4406 ($\Delta inlB$) o bien $\Delta actA \Delta inlB$. Las inyecciones eran 100 μ l de HBSS por vía i.v. a la concentración indicada en la tabla 7, 35 ratones por grupo incluido el grupo de control con HBSS. Todas las cepas se hicieron crecer en el medio BHI (Brain Heart Infusion, Fisher Scientific) a 37 °C y 300 rpm, y se conservaron en congelación antes de su utilización. Se sacrificaron tres ratones por grupo en los momentos del tiempo indicados en la tabla 7 y se recogieron sangre, bazo e hígado para el análisis. El hígado y los bazo se homogeneizaron en 5 ml de agua bidestilada con Triton X-100 al 0,05%, y se determinó el número de *Listeria* viables mediante la siembra en placa de diluciones seriadas sobre placas de BHI/estreptomycin. El hígado y los bazo de 2 ratones por grupo se fijaron en formol tamponado al 10%. Los resultados para las UFC por hígado y por bazo se indican en las figuras 7A y 8A. También se repitieron los experimentos a las concentraciones de cepas mostradas en las figuras 7B y 8B.

- 35 La infección de los ratones con la bacteria *Listeria* de tipo silvestre desapareció al cabo de 8 a 11 días de la administración. El número de bacterias de *Listeria* de tipo silvestre se incrementó sin parar significativamente durante el periodo de tiempo de 4 días y disminuyó hasta el nivel mínimo de detección en el bazo y en el hígado hacia el día 11. Es interesante que el mutante $\Delta inlB$ mostró una cinética similar en el bazo así como en el hígado, con la inducción de una inmunidad estéril el día 11. En cambio, el número de mutantes $\Delta actA$ sólo se incrementó 10 veces en el hígado durante las primeras 24 horas, pero no en el bazo y finalmente disminuyó 4 días después de la infección. El mutante doble $\Delta actA \Delta inlB$, aunque se administró a la dosis más elevada, se eliminó muy rápidamente

en el hígado en comparación con las otras tres cepas y la inmunidad estéril se indujo hacia el día 4. La desaparición acelerada de la bacteria se mantiene a diferencia de su capacidad para inducir una inmunidad protectora potente así como inmunidad específica de antígeno en un modelo tumoral terapéutico.

Tabla 8. Calendario de dosificación y muestreo para el estudio cinético del crecimiento *in vivo* de la bacteria *Listeria monocytogenes* atenuada.

Cepa	Dosis	Tiempo de extirpación después de la inyección
HBSS	100 µl	2 horas, días 1, 2, 3, 4, 7 y 10
Tipo silvestre	5×10^4	2 horas, días 1, 2, 3, 4, 7 y 10
$\Delta actA$	1×10^7	2 horas, días 1, 2, 3, 4, 7 y 10
$\Delta inlB$	5×10^4	2 horas, días 1, 2, 3, 4, 7 y 10
$\Delta actA\Delta inlB$	1×10^7	2 horas, días 1, 2, 3, 4, 7 y 10

Ejemplo 9. Infección *in vitro* de células no fagocíticas frente a células fagocíticas con distintas cepas de *Listeria monocytogenes*.

- Las cepas de *Listeria monocytogenes* de tipo silvestre, $\Delta actA$, $\Delta inlB$ y $\Delta actA\Delta inlB$ se incubaron (37 °C con CO₂ al 5%) con la línea celular de monocitos humanos THP-1 (ATCC n.º TIB-202), monocitos humanos primarios, línea celular de hepatocitos humanos HepG2 (de Drew Pardoll, Johns Hopkins University; también disponible como ATCC n.º HB8065) o hepatocitos humanos primarios (*In vitro* Technologies, Baltimore, MD). Se prepararon monocitos humanos primarios de sangre completa en un gradiente Ficoll para purificar linfocitos, luego se aislaron los monocitos con perlas magnéticas conjugadas con un anticuerpo específico contra monocitos (Miltenyi Biotec). THP-1 y los monocitos humanos se incubaron en el medio RPMI complementado con suero bovino fetal (SBF) inactivado con calor al 10%, bicarbonato de sodio a 23,8 mM, aminoácidos no esenciales a 1x, L-glutamina a 2 mM, tampón HEPES a 10 mM y piruvato de sodio a 1 mM. Se añadieron las cepas de *Listeria* a 5×10^5 UFC a 5×10^5 células THP-1 y $3,5 \times 10^4$ UFC a $3,5 \times 10^5$ monocitos. Se incubaron las células HepG2 en el medio esencial mínimo de Eagle complementado con suero de ternera fetal inactivado por calor al 20%, L-glutamina a 2 mM y aminoácidos no esenciales a 1x. Se añadieron las cepas de *Listeria* a 1×10^6 UFC a 1×10^5 células HepG2. Se incubaron los hepatocitos humanos primarios en el medio de incubación de crecimiento de hepatocitos (*In vitro* Technologies) antes de añadir la bacteria *Listeria* y se incubaron en DMEM complementado con FBS al 10%, L-glutamina a 2 mM y aminoácidos no esenciales a 1x después de añadir la bacteria *Listeria*. Se añadieron las cepas de *Listeria* a $3,5 \times 10^6$ UFC a $3,5 \times 10^5$ hepatocitos. Después de la incubación durante una hora, se lavaron las células con medio completo con gentamicina (50 µg/ml) para matar cualquier bacteria extracelular. A continuación se lisaron las células con 225 µl de agua estéril, y luego se añadieron 25 ml de PBS a 10x. La disolución resultante se sembró en BHI con diluciones seriadas para valorar la titulación bacteriana de cada muestra. El número de *Listeria* que infectan las células se dividió por el número de *Listeria* añadido a las células para determinar la infectividad de la cepa, normalizada por la infectividad de la cepa de tipo silvestre.
- Los resultados se muestran en la figura 9. Tal y como se muestra en la figura 9, todas las cepas son capaces de infectar las células THP-1 y los monocitos humanos a una velocidad similar, lo que demuestra que la ausencia de ActA o de InlB no afecta a la infección de las células fagocíticas. Sin embargo, la infección de los hepatocitos disminuyó significativamente en las cepas de *Listeria* que carecen de InlB. Se redujo la infección de hepatocitos humanos aproximadamente el 60% y se redujo el 80% la de las células HepG2 cuando se infectan con cualquiera de las cepas del mutante sin InlB, $\Delta inlB$ o $\Delta actA\Delta inlB$. Estos estudios demuestran que la eliminación de la proteína InlB selecciona que la capten las células fagocíticas al impedir la infección de hepatocitos cultivados y primarios.

Ejemplo 10. Infección *in vitro* de las células no fagocíticas frente a las células fagocíticas con *Listeria monocytogenes* opsonizada.

- Se preincubó la bacteria *Listeria* de tipo silvestre con suero de ratón específico contra *Listeria* de titulación elevada obtenido de ratones infectados por vía i.v. con el mutante de *Listeria* $\Delta actA$ (dilución 1:20) o con HBSS como control durante 1 hora en hielo. La línea celular de tipo células dendríticas fagocíticas (DC 2.4) y la línea de células epiteliales de colon no fagocíticas (Caco-2) se infectaron a una MDI de 1 y 10, respectivamente, durante 1 hora a 37

°C. Las células se lavaron tres veces para retirar las bacterias extracelulares. Se cultivaron las células durante otras 2 horas más en presencia de gentamicina a 50 mg/ml para matar las bacterias que queden en el exterior celular. Para determinar la infectividad de las líneas celulares, se lisaron las células con dH₂O que contenía Triton X-100 al 0,01%. Se determinó el número de bacterias *Listeria* viables mediante la siembra de diluciones seriadas sobre placas de BHI con agar.

Tal y como se muestra en la figura 10, las bacterias *Listeria* Δ actA incubadas con suero inmunitario de alta titulación de ratones vacunados tienen menos capacidad para infectar la línea celular no fagocítica Caco-2, pero no la línea de células dendríticas fagocíticas DC2.4. La disminución de la infección de las células no fagocíticas por la bacteria *Listeria* opsonizada es comparable a la cepa de *Listeria* atenuada que carece de actA y de inlB (figura 9). Sin desear comprometerse con ninguna teoría, el uso de los anticuerpos específicos contra *Listeria* (anticuerpos monoclonales, o Ac policlonales, contra internalinas) podría bloquear los receptores sobre la superficie de la bacteria *Listeria* Δ actA que permiten la infección de las células no fagocíticas *in vivo*.

Ejemplo 11. Tratamiento de ejemplo de la bacteria *Listeria* con psoraleno S-59 y UVA

Una cepa del mutante Δ actA Δ uvrAB de *Listeria* (DP-L4029 uvrAB) se modificó para que expresara el antígeno OVA. Esta cepa y DP-L4029 modificada para que expresara OVA se trataron con el psoraleno S-59 a distintas concentraciones. Las cepas de *Listeria* se hicieron crecer durante una noche a 37 °C y se diluyó una alícuota de 2 ml en 100 ml de BHI y se hizo crecer aproximadamente 4 horas a 37° C hasta una DO₆₀₀ de 0,5 (aproximadamente 1 x 10⁹ UFC/ml). Una alícuota de 5 ml de cada cepa de *Listeria* se añadió a un tubo de 15 ml y se centrifugó durante 20 minutos a 2300 x g, se retiró el sobrenadante, y se resuspendieron las bacterias en 5 ml de PBS que da lugar a aproximadamente 1 x 10⁹ UFC/ml. Para la cepa del mutante uvrAB, se diluyeron 33,3 µl de la reserva de S-59 a 3 mM en 10 ml de PBS para dar una solución a 10 µM, y las alícuotas apropiadas de esto se añadieron a la bacteria *Listeria* para obtener concentraciones finales de 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 y 100 nM, mientras que para DP-L4029 se añadió S-59 para obtener concentraciones finales de 100, 200, 400, 800 y 1000 nM en un volumen final de 5 ml. Éstas se transfirieron a una placa de cultivo con 6 pocillos y se irradiaron a una dosis de 0,5 J/cm² (dispositivo de UVA FX1019). Se transfirieron las muestras a tubos de 15 ml, se añadieron 5 ml de PBS y se centrifugaron durante 20 minutos a 2300 x g para lavar el psoraleno que no reaccionó. Se retiró el sobrenadante y se resuspendieron las bacterias en 5 ml de PBS, y se transfirieron a placas de 6 pocillos nuevas. Éstas se irradiaron con una dosis de UVA de 5,5 J/cm² para convertir monoadductos de psoraleno a entrecruzamientos. Una muestra de cada cepa de *Listeria* también se mató con calor mediante tratamiento a 72 °C durante 3 horas.

La presentación del antígeno de las muestras bacterianas se valoró utilizando una línea de células DC 2.4 murinas (línea de células dendríticas del Dana Farber Cancer Institute, véase Shen et al., *J. Immunol.* 158 (6): 2723-30 (1997)) y un hibridoma de linfocitos T B3Z (obtenidos del Dr. Shastri, Universidad de California, Berkeley). El B3Z es un hibridoma de linfocitos T CD8+ inducible por lacZ que expresa un gen de la β -galactosidasa tras el reconocimiento del antígeno OVA en el contexto de moléculas del CMH de clase I. Se utilizó el metabolismo del CPRG (clorofenol rojo- β -D-galactopiranosido, Calbiochem La Jolla, CA), un sustrato de la β -galactosidasa, para valorar la cantidad de β -galactosidasa producida, que está directamente correlacionada con la cantidad de antígeno OVA presentado por las células DC 2.4. Las células DC 2.4 y el híbrido de linfocitos T B3Z se mantuvieron en el medio de cultivo RPMI 1640 (RPMI, Invitrogen) con SBF al 10% (suero bovino fetal, HyClone). Se transfirieron las células DC 2.4 en alícuotas de 200 µl a los pocillos de una placa de cultivo de 96 pocillos (1 x 10⁵ DC 2.4 por pocillo). Las muestras bacterianas se diluyeron en serie con 50 µl de la reserva en 450 µl de PBS hasta 1 x 10⁵ UFC/ml (las muestras tratadas con S-59 son equivalentes de UFC, a saber, es el número de unidades formadoras de colonias antes del tratamiento con S-59). Una alícuota a 20 µl de cada dilución se transfirió a un pocillo que contiene las células DC 2.4 para dar aproximadamente 1 x 10⁴, 1 x 10⁵, 1 x 10⁶, 1 x 10⁷ o 1 x 10⁸ UFC/ml. Además, una alícuota a 20 µl de PBS sólo se añadió como control negativo. Las muestras se incubaron durante 1 hora a 37 °C en CO₂ al 5%. Se lavó la placa tres veces con PBS para retirar las bacterias extracelulares. Se añadió a cada pocillo una alícuota de 200 µl de linfocitos T B3Z (1 x 10⁵ células) y gentamicina a 100 µg/ml (Sigma). Como control positivo, a un pocillo con 1 x 10⁵ de cada una de las células DC 2.4 y B3Z se le añadió el péptido SL8 OVA₂₅₇₋₂₆₄ a 100 nM (antígeno SL8 de OVA, SIINFEKL (SEQ ID n.º 21), Invitrogen, San Diego, CA). Las muestras se incubaron durante una noche a 37 °C en CO₂ al 5%. Se centrifugó la placa durante 3 minutos a 400 x g y se lavó cada pocillo con 250 µl de PBS. Se añadió a cada pocillo una alícuota de 100 µl de PBS que contiene 2-mercaptoetanol a 100 µM, MgCl₂ a 9 mM, Igepal CA-630 al 0,125% ((octafenoxi)polietoxietanol, Sigma) y CPRG a 0,15 mM. Las muestras se incubaron a 37 °C durante al menos 4 horas. Se midió la absorbancia a 595 nm con una medición de referencia a 655 nm en un lector de placas.

Los resultados para las muestras tratadas con S-59 se encuentran en la tabla 8A y en las figuras 11A y 11B (presentación de antígeno en 1 *Listeria* por célula DC 2.4, calculada sin sustraer el ruido de fondo). Los resultados para ambas cepas matadas con calor mostraron una titulación por debajo del límite de detección (inactivación completa) y las bacterias matadas con calor no presentaban antígeno OVA en el ensayo con B3Z. Los resultados indican que el mutante uvrAB muestra una presentación de antígeno muy fuerte incluso con atenuación de la

- proliferación hasta el límite de detección en donde la cepa que no es mutante de *uvrAB* muestra una mayor reducción de la presentación del antígeno en función de la atenuación de la proliferación (hasta aproximadamente el ruido de fondo con una inactivación esencialmente completa). Esto demuestra que el mutante *uvrAB* conserva la presentación con el CMH de clase I en el contexto de la bacteria *Listeria* atenuada con psoraleno y debe proporcionar una vacuna con una respuesta inmunitaria eficaz y un incremento significativo de la inocuidad.

Tabla 8A. Atenuación en log y presentación del antígeno OVA de la cepas de *Listeria* tratadas con UVA con diferentes concentraciones de psoraleno S-59.

[S-59] nM	Atenuación en log		% de antígeno OVA presentado*	
	DP-L4029-OVA	DP-L4029 <i>uvrAB</i> -OVA	DP-L4029-OVA	DP-L4029 <i>uvrAB</i> -OVA
10		2,47		84
20		3,93		84
30		5,28		76
40		6,44		76
50		6,92		68
60		> 7,62		84
70		> 7,62		84
80		> 7,62		88
90		> 7,62		92
100	3,85	> 7,62	50	92
200	5,48		47	
400	6,78		19	
800	> 7,78		13	
1000	> 7,78		13	

* Como porcentaje de lo sin tratar, medido a 1 *Listeria* por célula DC 2.4.

- 10 Se realizó otro estudio con las mismas cepas. En este estudio se hicieron crecer las bacterias *Listeria* en BHI a 37 °C durante una noche. Éstas se diluyeron 1:50 en BHI y se hicieron crecer a 37 °C a 300 rpm hasta una DO₆₀₀ de 0,5, en cuyo momento se transfirieron 50 ml de la solución a un matraz limpio y se añadió S-59 hasta los niveles indicados en la tabla 12B. Se incubaron estas muestras a 37 °C a 300 rpm durante aproximadamente 1 hora (DO₆₀₀ de aproximadamente 1,0, aproximadamente 1×10^9 /ml). Se retiró una alícuota de 1 ml para valorar la titulación y se transfirió el resto a una placa Petri de 150 mm y se irradió a una dosis de 6 J/cm² (FX1019). Para cada muestra se determinó la titulación después de la irradiación y se valoró la presentación del antígeno OVA como antes. Los resultados se encuentran en la tabla 8B y en las figuras 11C y 11D (presentación de antígeno a 10 *Listeria* por célula DC 2.4, calculada sin sustraer el ruido de fondo). Los resultados indican que para la cepa original, la presentación del antígeno se encuentra en los niveles de ruido de fondo, donde hay esencialmente una inactivación completa,
- 15 mientras que para el mutante *uvrAB*, hay aproximadamente un intervalo de concentración de S-59 de 10 veces sobre el cual hay esencialmente una inactivación completa junto con una presentación de antígeno adecuada.

Tabla 8B. Atenuación en log y presentación del antígeno OVA de las cepas de *Listeria* tratadas con UVA con diferentes concentraciones de psoraleno S-59 presentes durante el crecimiento de las bacterias.

[S-59] μ M	Atenuación en log		% del antígeno OVA presentado*	
	DP-L4029-OVA	DP-L4029 <i>uvrAB</i> -OVA	DP-L4029-OVA	DP-L4029 <i>uvrAB</i> -OVA
0,025		3,64		91
0,05		5,70		86
0,1		> 8,10		87
0,2		> 8,10		86
0,25	2,00		50	
0,4		> 8,10		74
0,5	5,28		31	
0,8		> 8,10		50
1,0	7,57		14	
1,6		> 8,10		35
2,0	> 8,38		11	
3,2		> 8,10		16
4,0	> 8,38		10	
6,4		> 8,10		11
8,0	> 8,38		10	
16,0	> 8,38		11	

* Como porcentaje de lo sin tratar, medido a 10 *Listeria* por célula DC 2.4.

5 Ejemplo 12. Eficacia de los mutantes de *Listeria* a la hora de estimular las respuestas específicas de antígeno en presencia de inmunidad y/o anticuerpos ya existentes.

Se indujo la inmunidad previa anti-*Listeria* infectando ratones C57BL/6 i.p. con 0,1 x DL₅₀ de *Listeria* de tipo silvestre dada una vez o tres veces (a intervalos de 10 días). Los ratones con inmunidad contra *Listeria* (1 o 3 veces) y los ratones sin exposición previa se vacunaron por vía i.p. 32 días después de la última exposición de *Listeria* con 0,1 x DL₅₀ de la cepa de *Listeria* indicada. Siete días después, se recolectaron los bazo y se determinó la frecuencia de los linfocitos T CD8+ específicos contra OVA mediante tinción de las citocinas intracelulares para el IFN- γ . Los resultados se muestran en la figura 12A. Se observó la sensibilización de las respuestas de los linfocitos T CD8+ específicos contra OVA en los ratones a un nivel de inmunidad previa que protegía contra una provocación letal de la bacteria *Listeria* de tipo silvestre.

- 15 Se indujo la inmunidad previa anti-*Listeria* en todos los ratones C57BL/6 infectando por vía intraperitoneal con 0,1 x DL₅₀ de *Listeria* de tipo silvestre. Se vacunaron los ratones por vía i.p. 70 días después con 0,1 x DL₅₀ de la cepa de

Listeria indicada. Después de 21 días se implantaron células tumorales 2e5 B16-OVA debajo de la piel de los ratones y se midieron los tumores dos veces a la semana. Los resultados se muestran en la figura 12B. Los estudios del tumor demuestran que la respuesta inmunitaria específica contra OVA montada en presencia de la inmunidad anti-*Listeria* es capaz de proteger con eficacia contra la provocación del tumor B16-OVA.

- 5 Se generó suero inmunitario de alta titulación infectando ratones C57BL/6 por vía intravenosa cuatro veces con 0,1 x DL₅₀ de la cepa indicada. Se recogió suero inmunitario y no inmunitario, y se determinó la titulación mediante ELISA específico de *Listeria*. A los ratones C57BL/6 sin exposición previa se les inyectaron por vía i.v. 200 µl de disolución salina, suero (inmunitario o no inmunitario) o anticuerpo anti-*Listeria* policlonal de conejo los días -1 y 1. Se vacunaron ratones por vía i.v. con 0,1 x DL₅₀ de *Listeria ΔactA*-OVA el día 0. Se recogieron los bazo y se determinó
- 10 la frecuencia de los linfocitos T CD8+ específicos contra OVA mediante tinción de las citocinas intracelulares para el IFN-γ. Los resultados se muestran en la figura 12C. Los resultados muestran que la transferencia pasiva del anticuerpo específico contra *Listeria* a los ratones sin exposición previa no redujo la sensibilización de una respuesta inmunitaria celular primaria específica contra OVA en los ratones tratados.

REIVINDICACIONES

1. Bacteria *Listeria monocytogenes* atenuada que es una *Listeria monocytogenes* $\Delta actA\Delta inlB$, comprendiendo dicha bacteria adicionalmente una molécula de ácido nucleico que codifica un antígeno que no es de *Listeria*, estando dicha molécula de ácido nucleico unida operativamente a una secuencia reguladora capaz de expresar dicho antígeno.
2. Bacteria *Listeria monocytogenes* atenuada de acuerdo con la reivindicación 1, que además comprende al menos una mutación en uno o más genes seleccionados entre el grupo que consiste en *lplA*, *plcA*, *plcB* y *mpl*.
3. Bacteria *Listeria monocytogenes* atenuada de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en la que el antígeno es un antígeno tumoral o procede de un antígeno tumoral.
4. Bacteria *Listeria monocytogenes* atenuada de acuerdo con la reivindicación 3, en la que el antígeno es un antígeno tumoral o procede de un antígeno tumoral seleccionado entre el grupo que consiste en mesotelina, sp17, PAGE-4, gp-100, PSMA, K-ras, TARP, proteinasa 3, WT-1, NY-ESO-1, CEA, Her-2 y SPAS-1.
5. Bacteria *Listeria monocytogenes* atenuada de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que el antígeno es un antígeno de enfermedad infecciosa o procede de un antígeno de enfermedad infecciosa.
6. Bacteria *Listeria monocytogenes* atenuada de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la bacteria es defectuosa con respecto a una enzima de reparación del ADN y en donde el ácido nucleico de la bacteria se ha modificado al hacerla reaccionar con un compuesto que actúa selectivamente sobre el ácido nucleico y que reacciona directamente con el ácido nucleico, de manera que la proliferación de la bacteria está atenuada, por lo que la bacteria tiene atenuada la diseminación de una célula a otra.
7. Bacteria *Listeria monocytogenes* atenuada de acuerdo con la reivindicación 6, en la que el ácido nucleico de la bacteria se ha modificado al ponerlo en contacto con un psoraleno activado mediante irradiación UVA.
8. Composición inmunógena, que comprende la bacteria *Listeria monocytogenes* atenuada de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores.
9. Vacuna, que comprende (a) la bacteria *Listeria monocytogenes* atenuada de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, y (b) un vehículo farmacéuticamente aceptable o un adyuvante.
10. Célula presentadora de antígeno profesional, que comprende la bacteria *Listeria monocytogenes* atenuada de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.
11. Bacteria *Listeria monocytogenes* atenuada de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, o composición inmunógena de acuerdo con la reivindicación 8, o una vacuna de acuerdo con la reivindicación 9, o una célula presentadora de antígeno profesional de acuerdo con la reivindicación 10, para uso en un método de inducción de una respuesta inmunitaria en un hospedador contra un antígeno que no es de *Listeria*.
12. Bacteria *Listeria monocytogenes* atenuada de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, o composición inmunógena de acuerdo con la reivindicación 8, o una vacuna de acuerdo con la reivindicación 9, o una célula presentadora de antígeno profesional de acuerdo con la reivindicación 10, para uso en un método de prevención o tratamiento de una enfermedad en un hospedador.

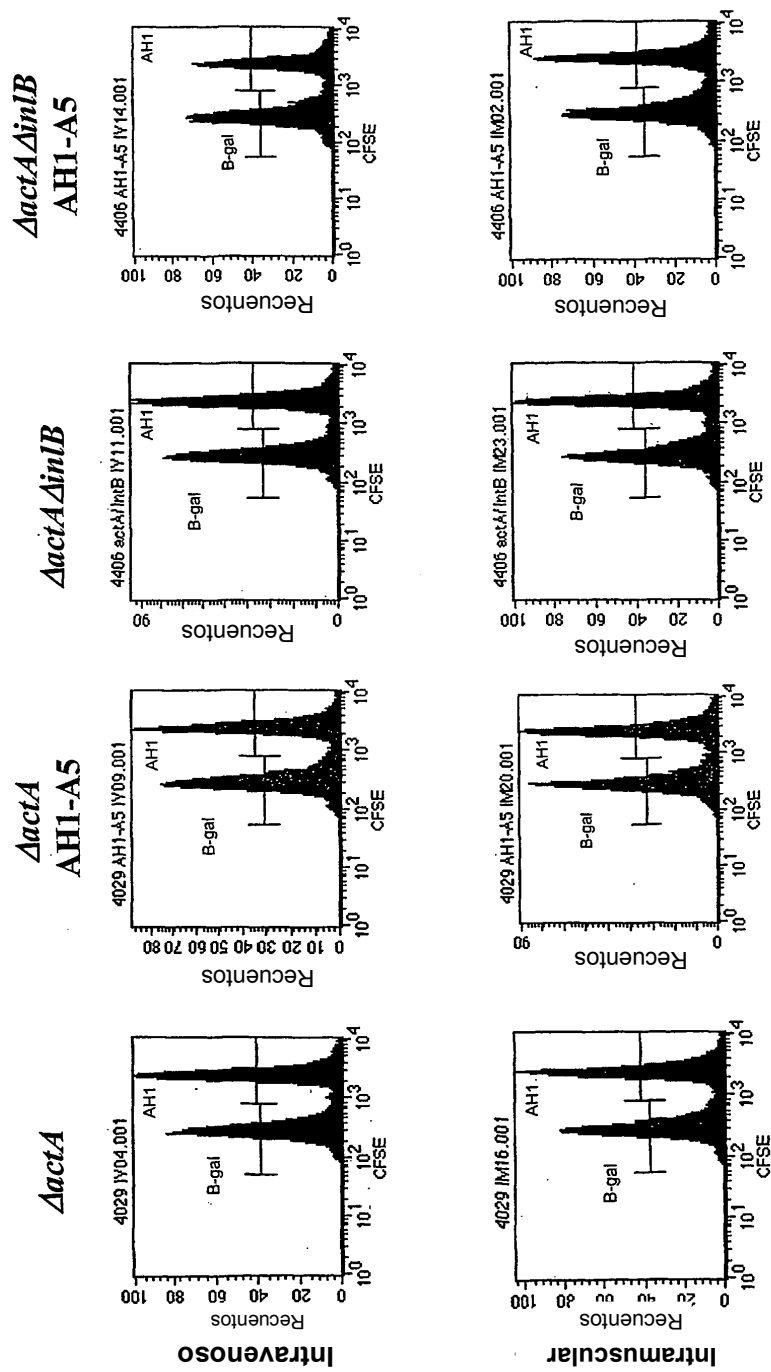


Figura 1A

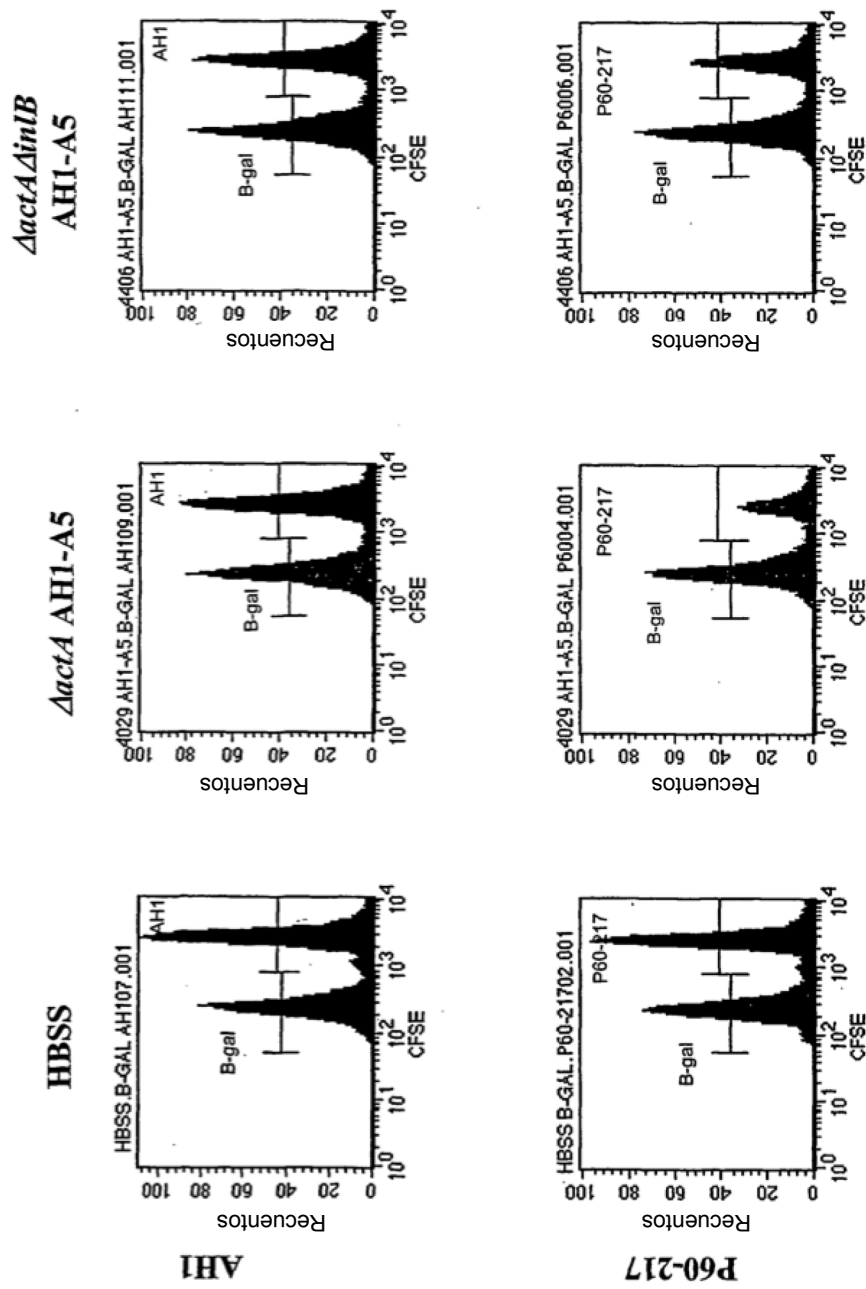


Figura 1B

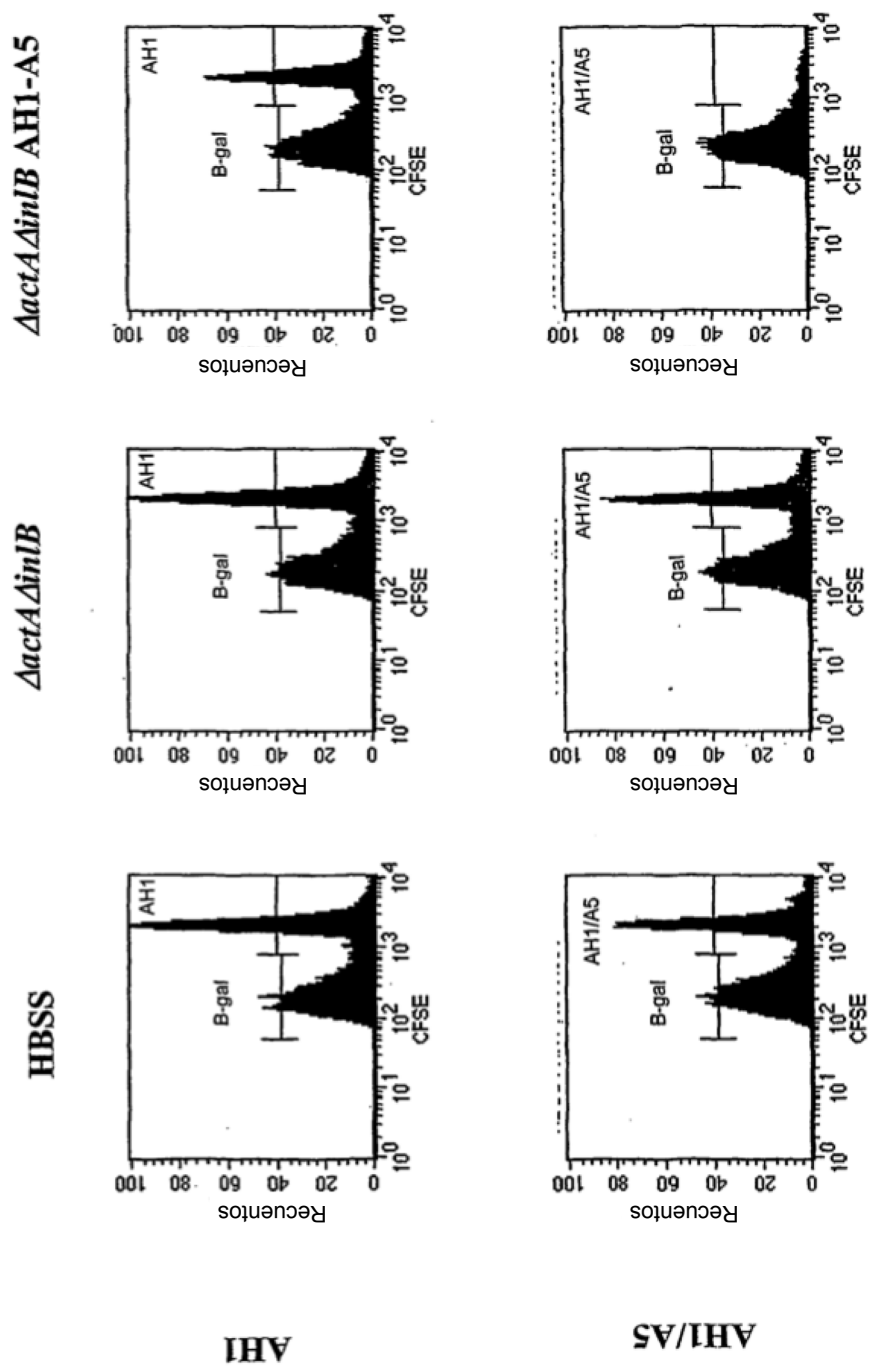


Figura 1C

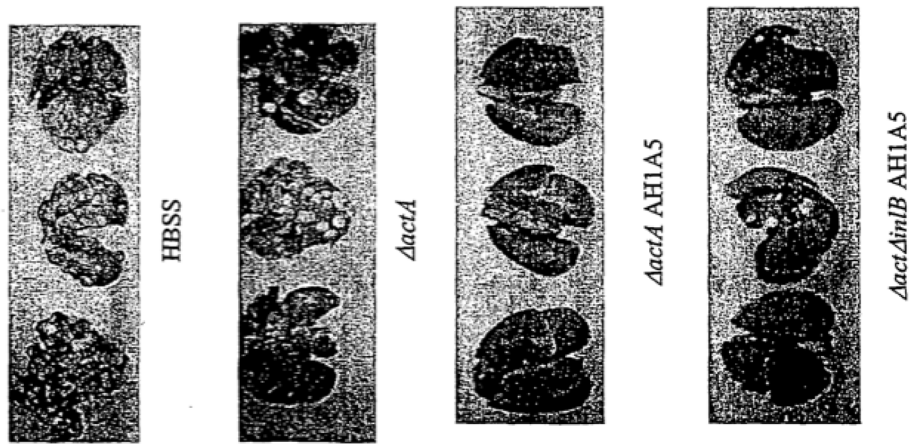


Figura 2A

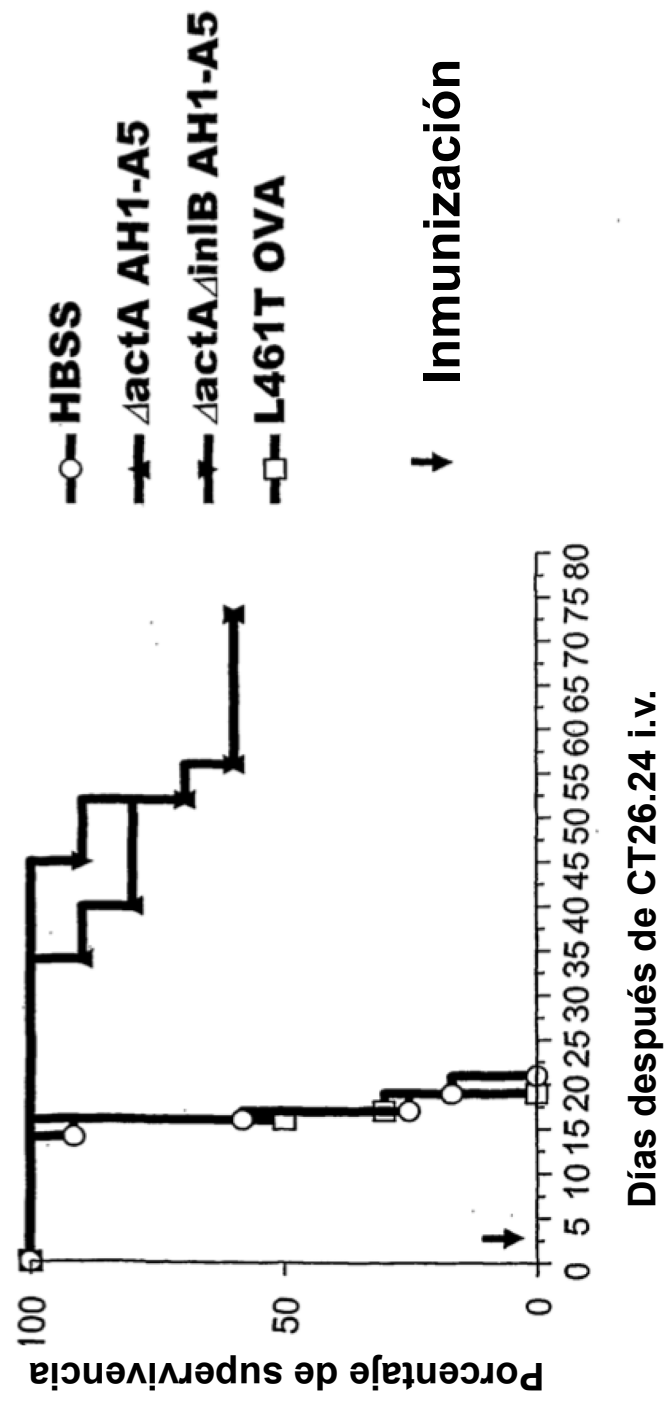


Figura 2B

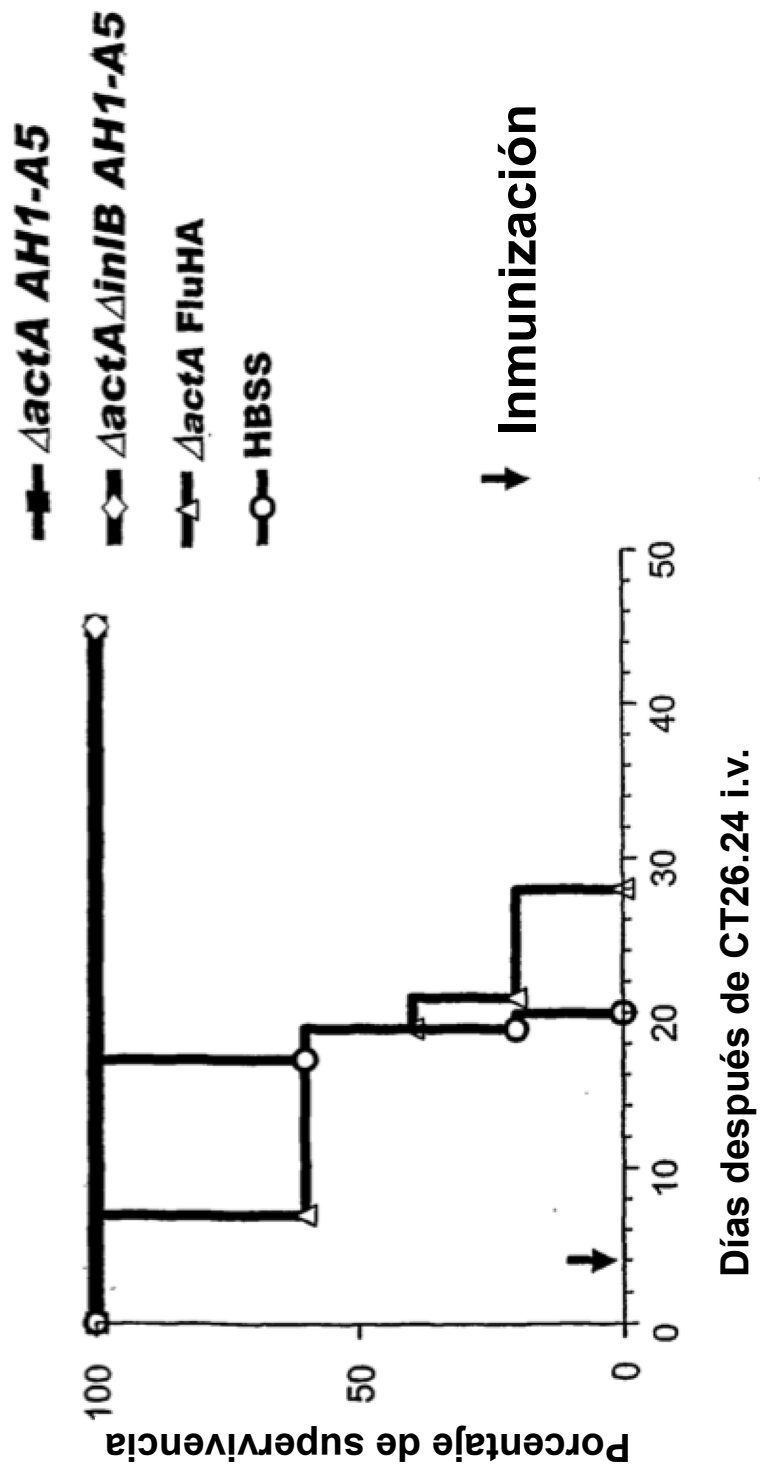


Figura 2C

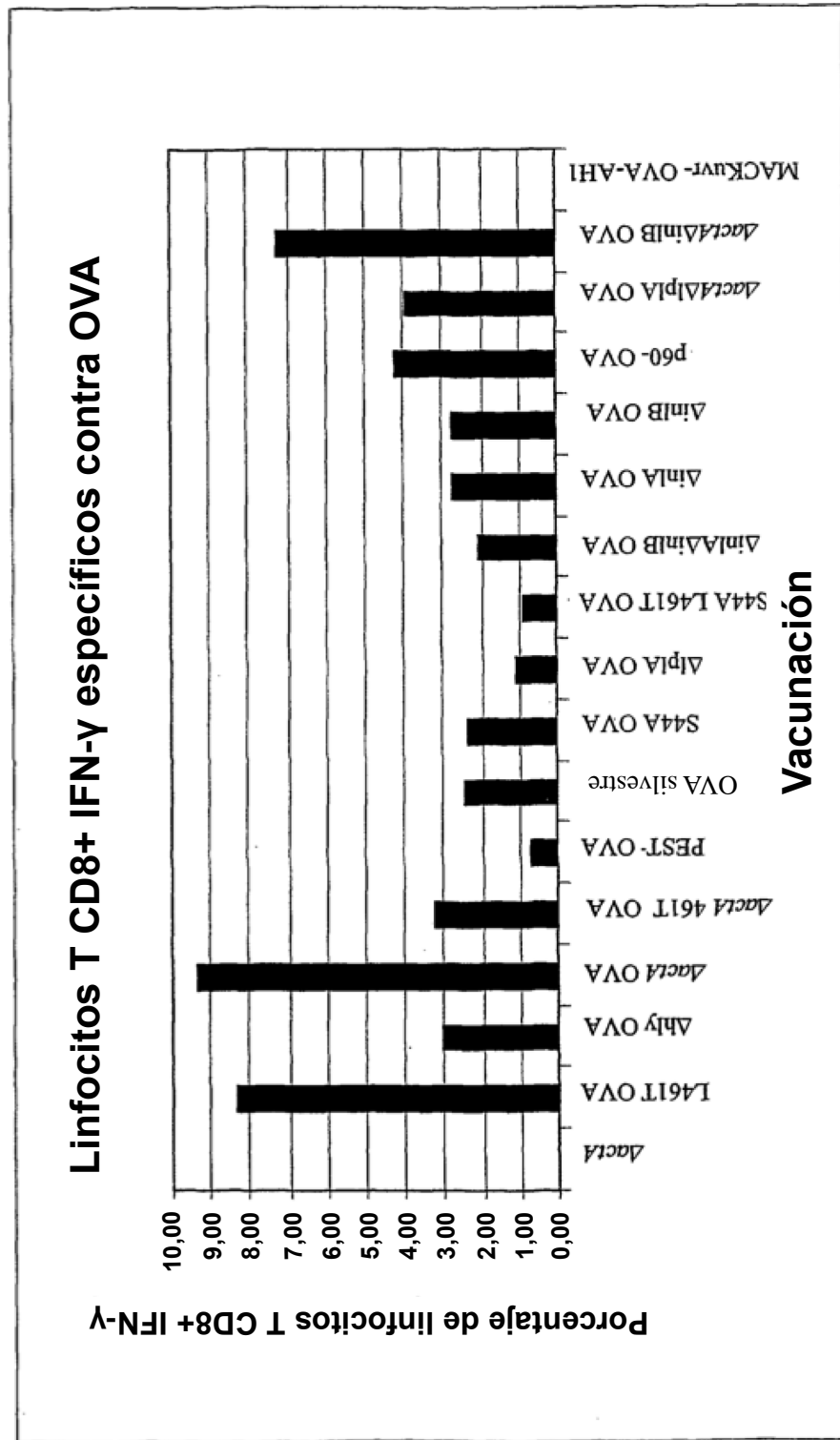


Figura 3A

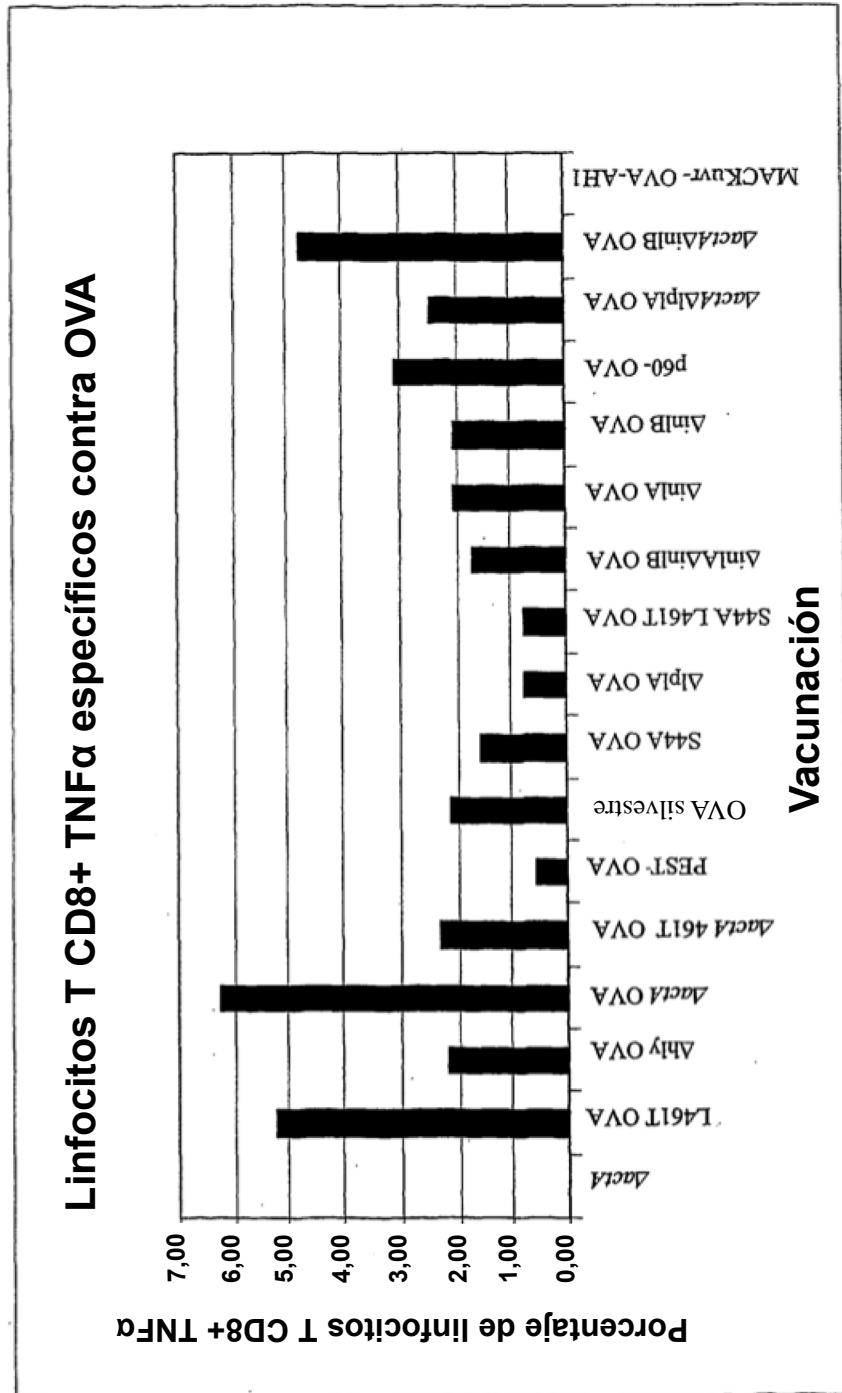


Figura 3B

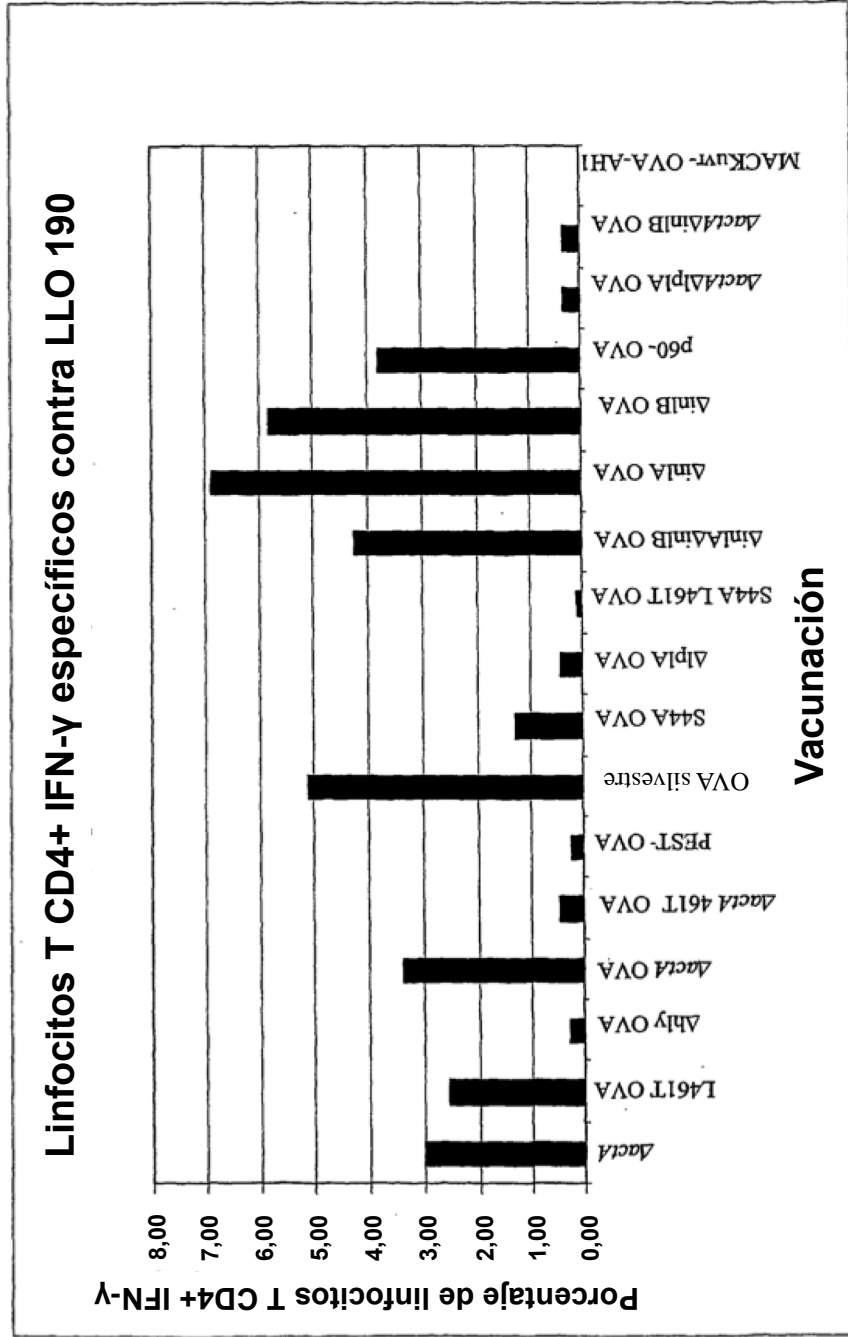


Figura 3C

Linfocitos T CD4+ TNF- α específicos contra LLO 190

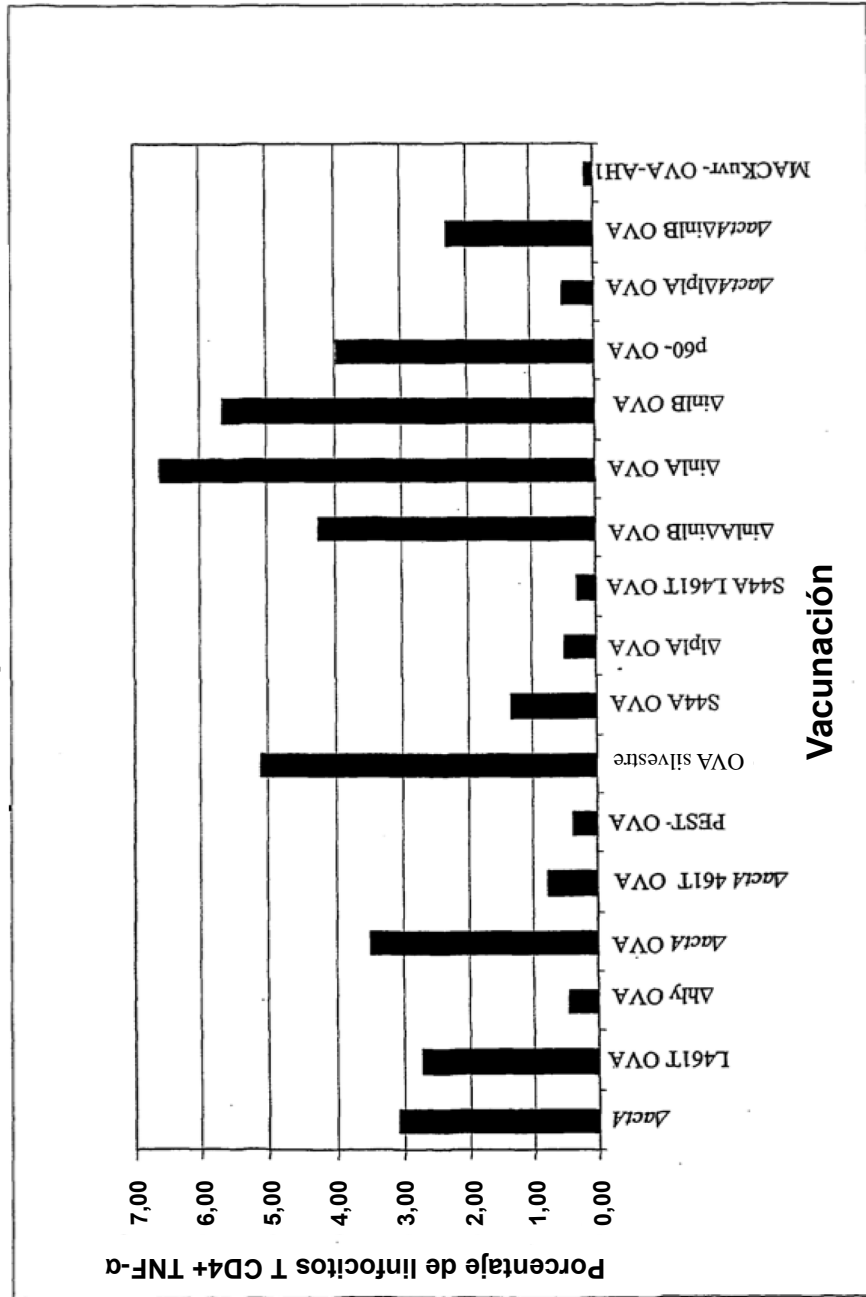


Figura 3D

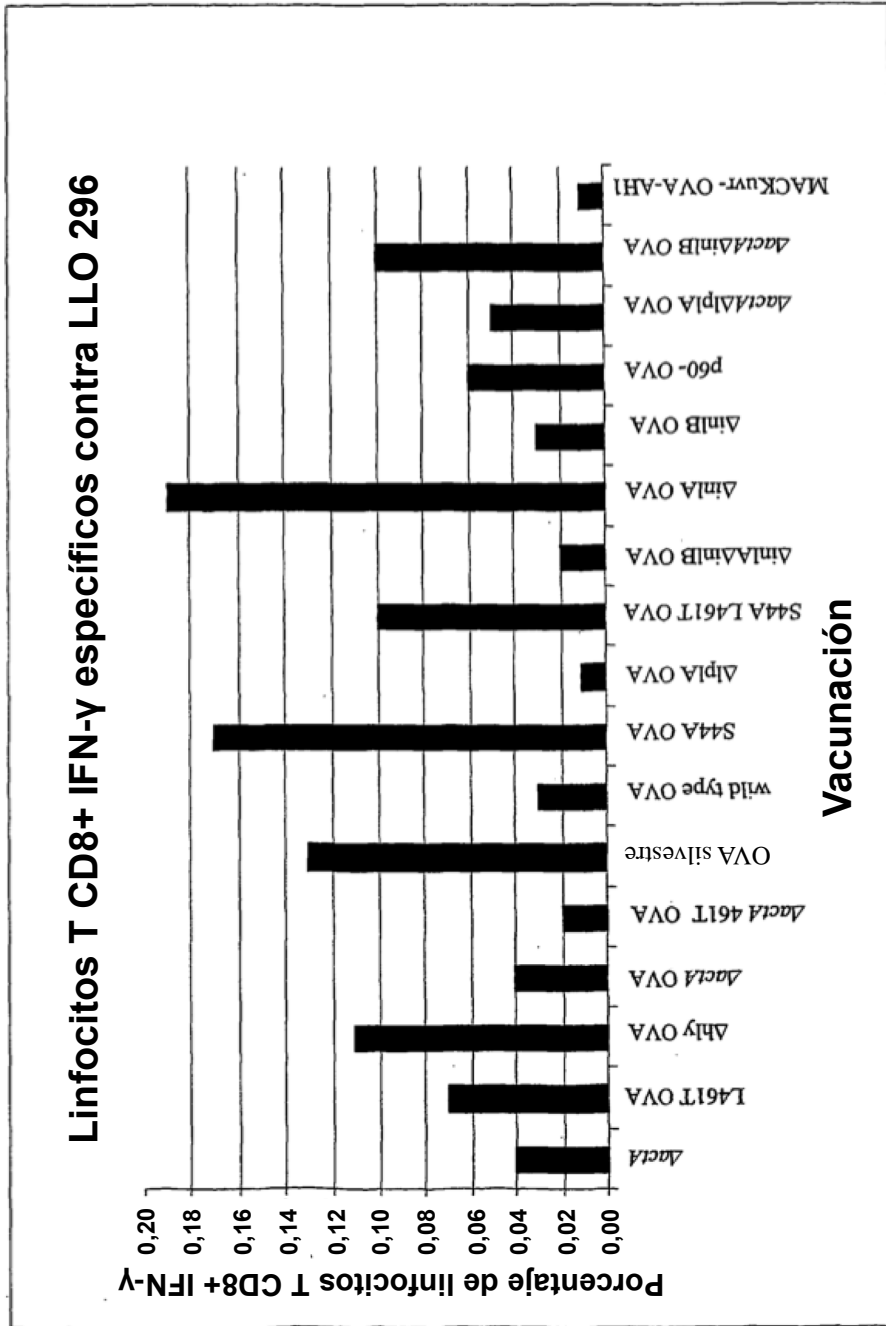


Figura 3E

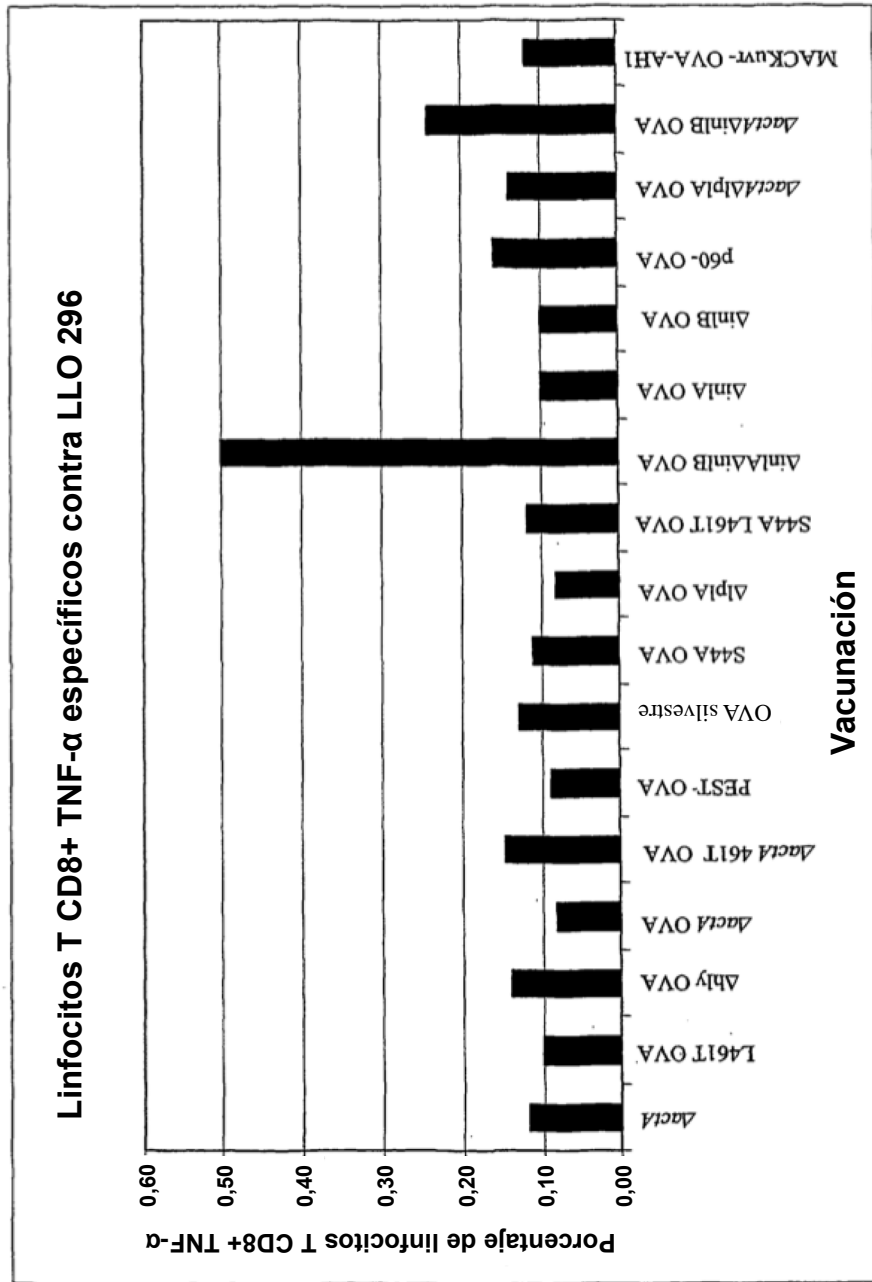


Figura 3F

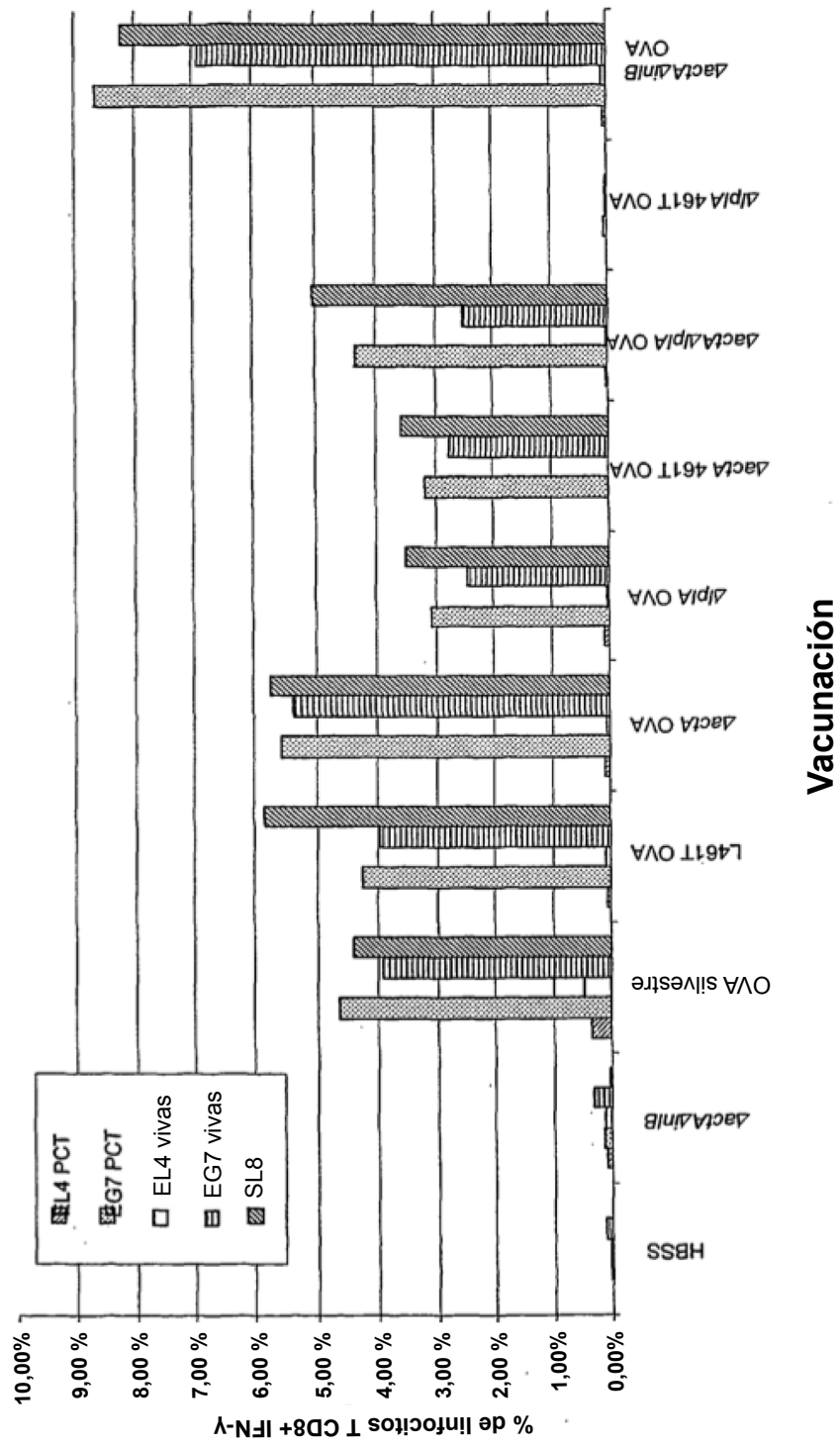


Figura 4

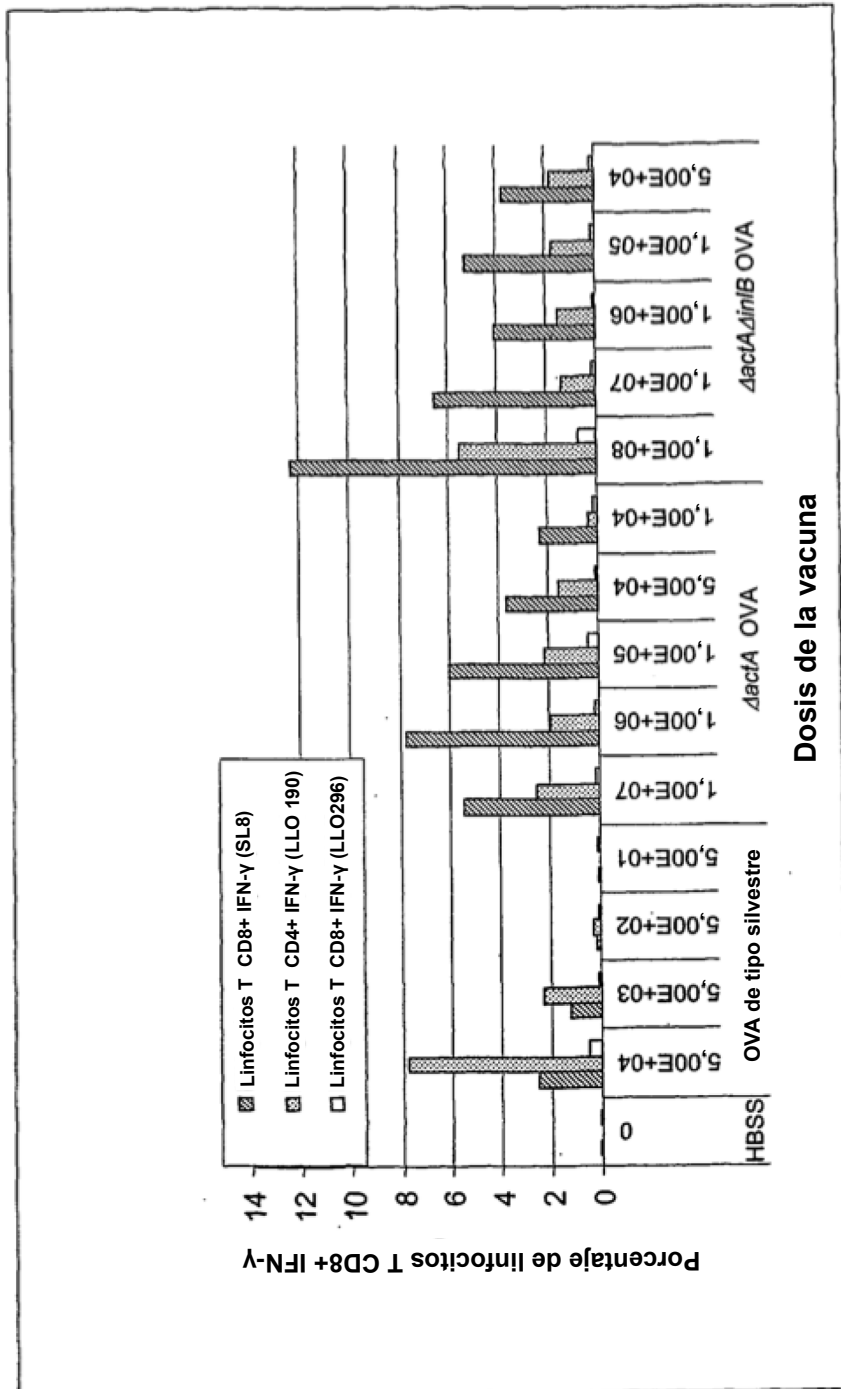


Figura 5

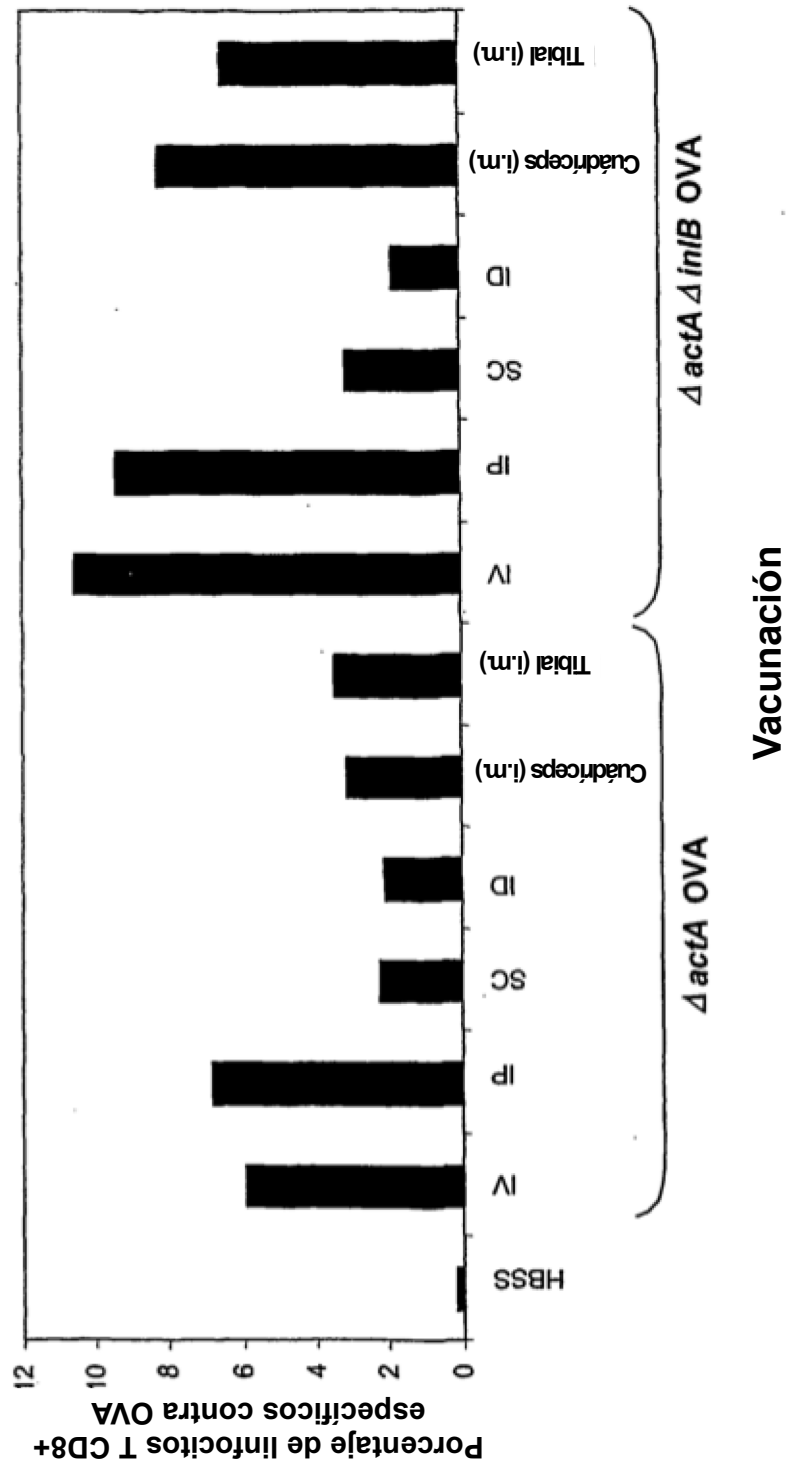
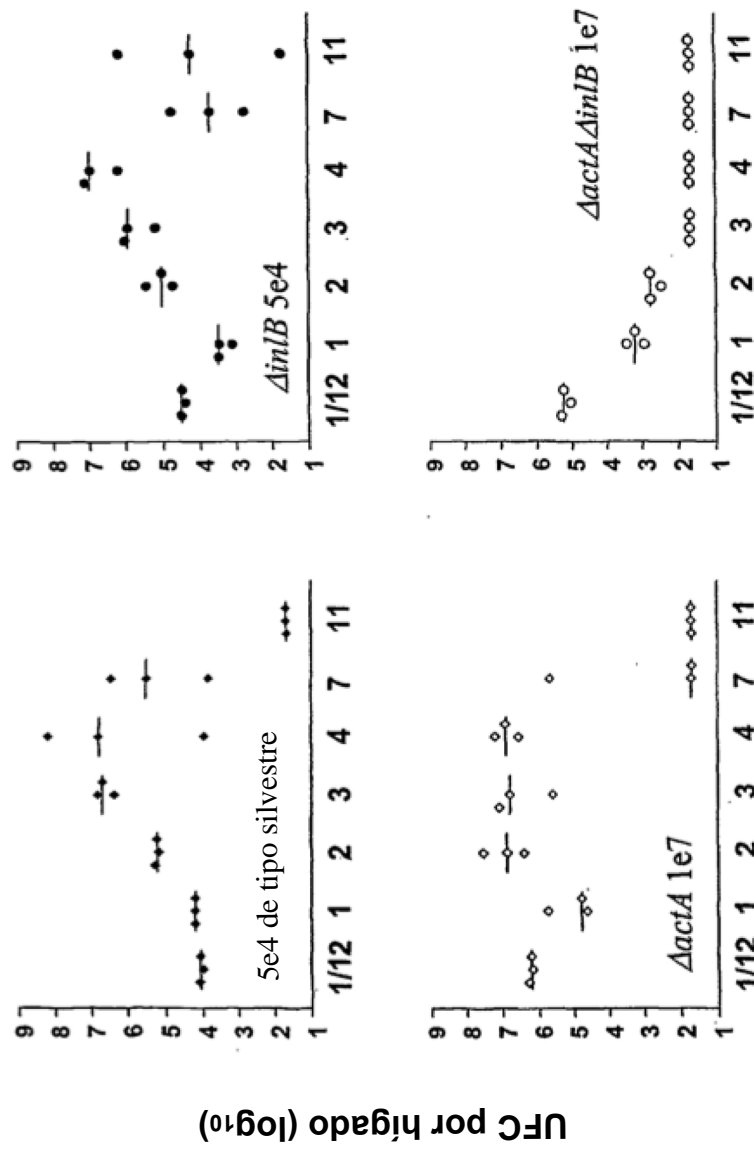
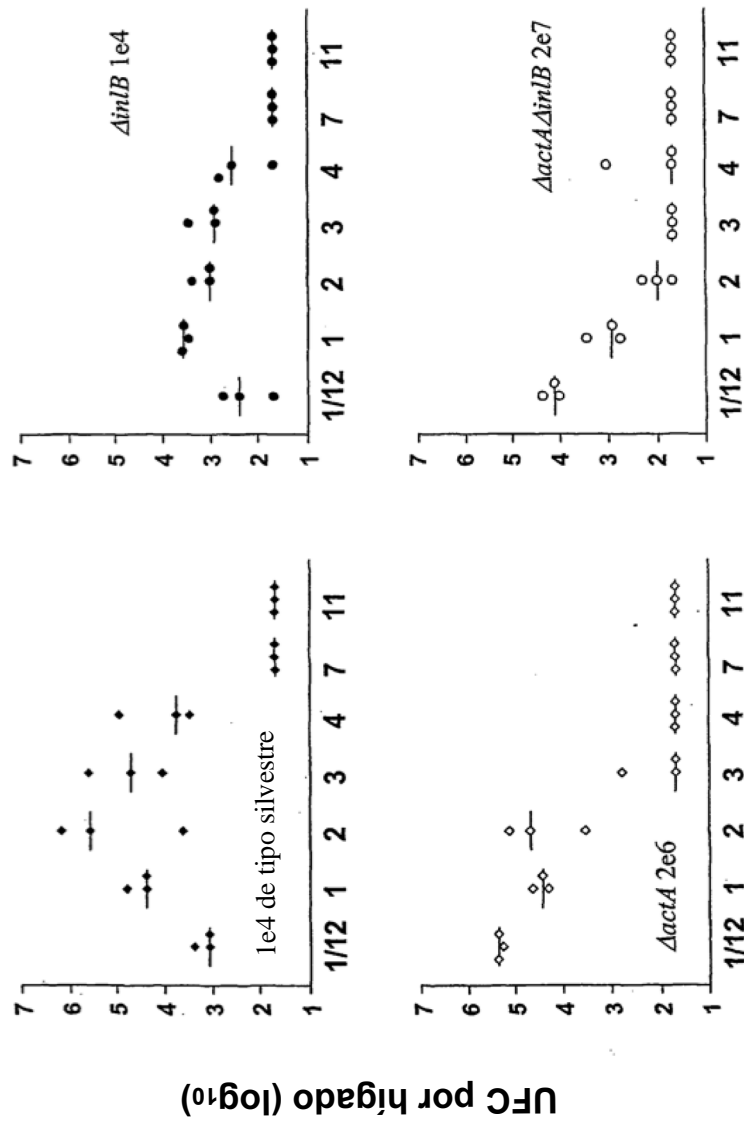


Figura 6



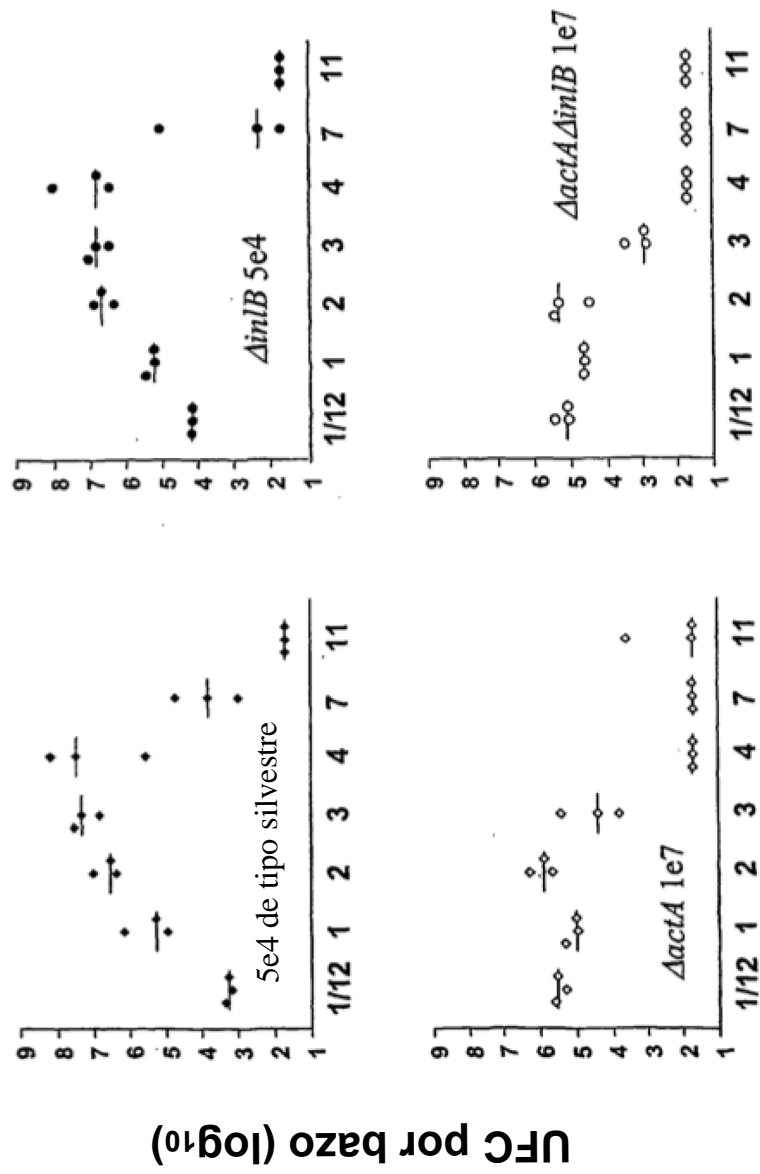
Días después de la infección

Figura 7A



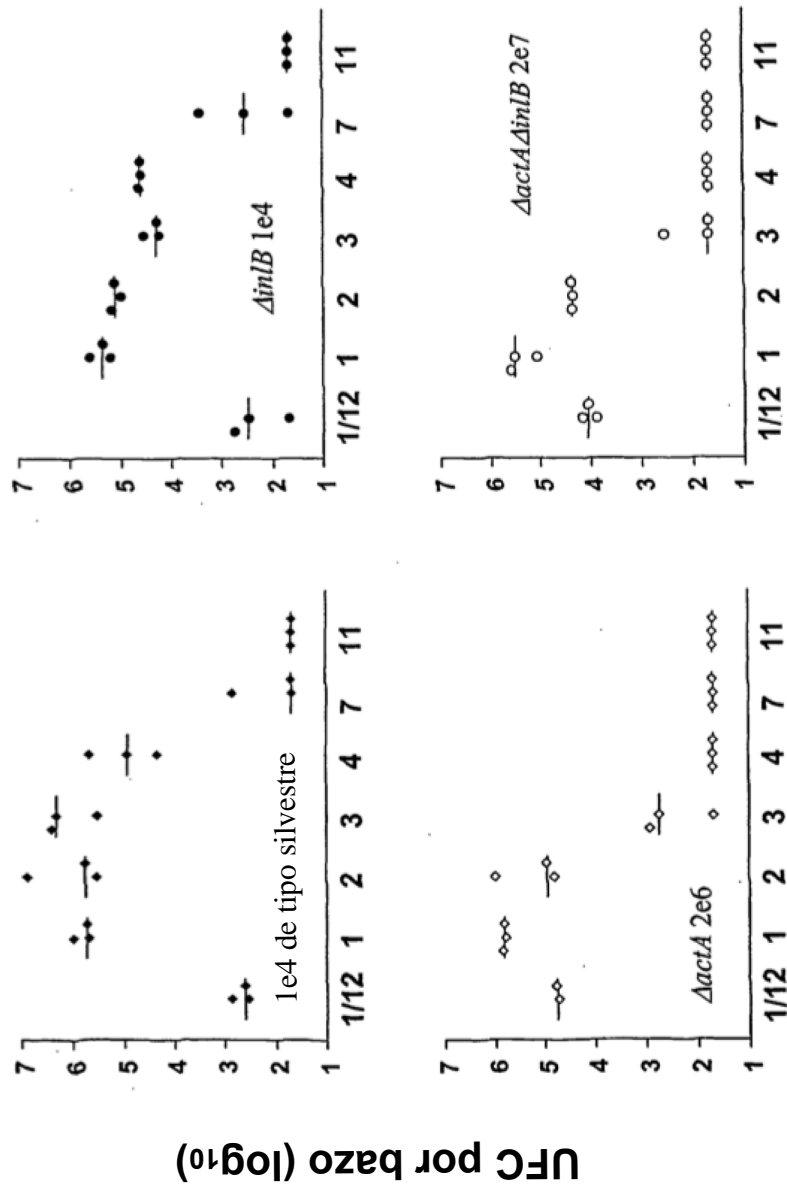
Días después de la infección

Figura 7B



Días después de la infección

Figura 8A



Días después de la infección

Figura 8B

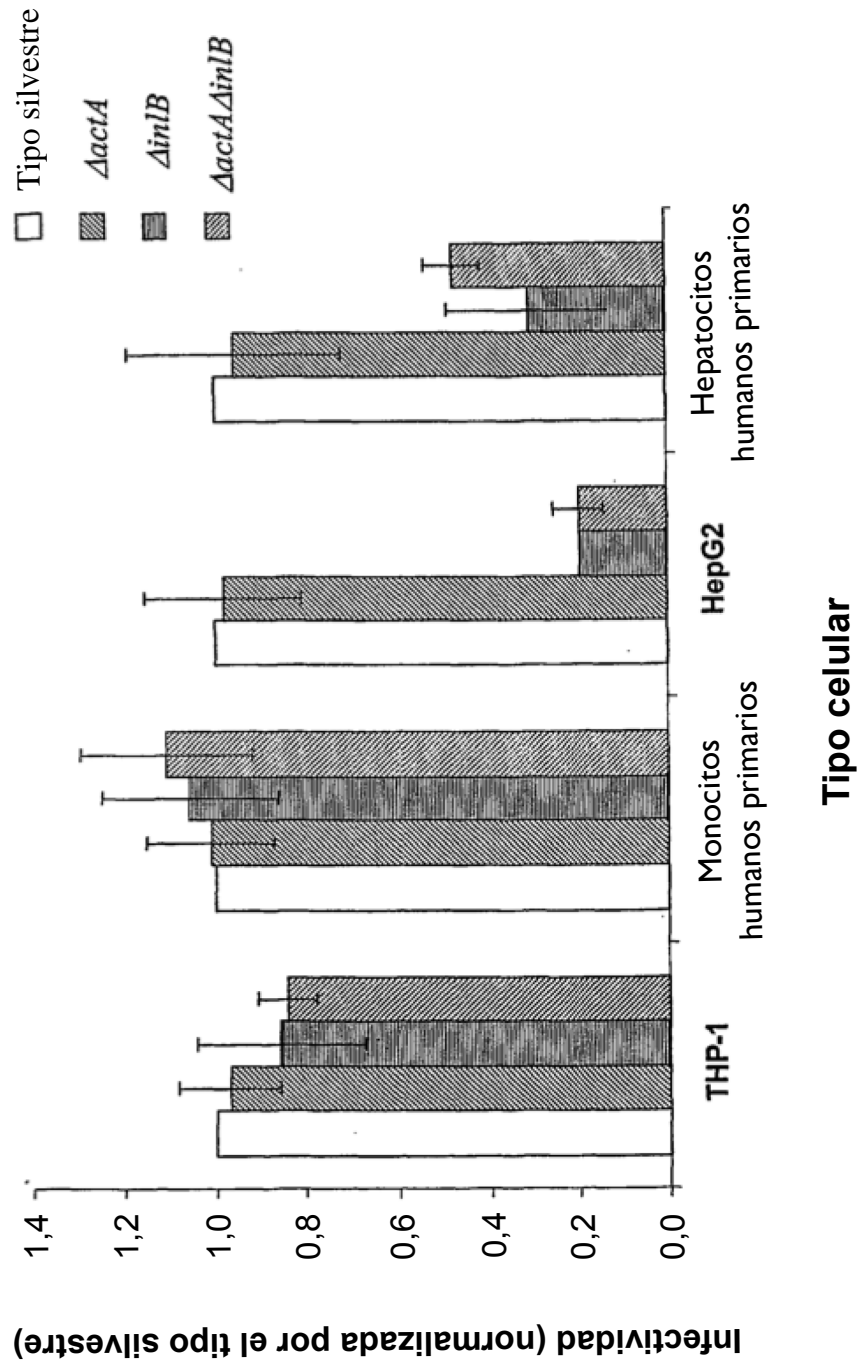


Figura 9

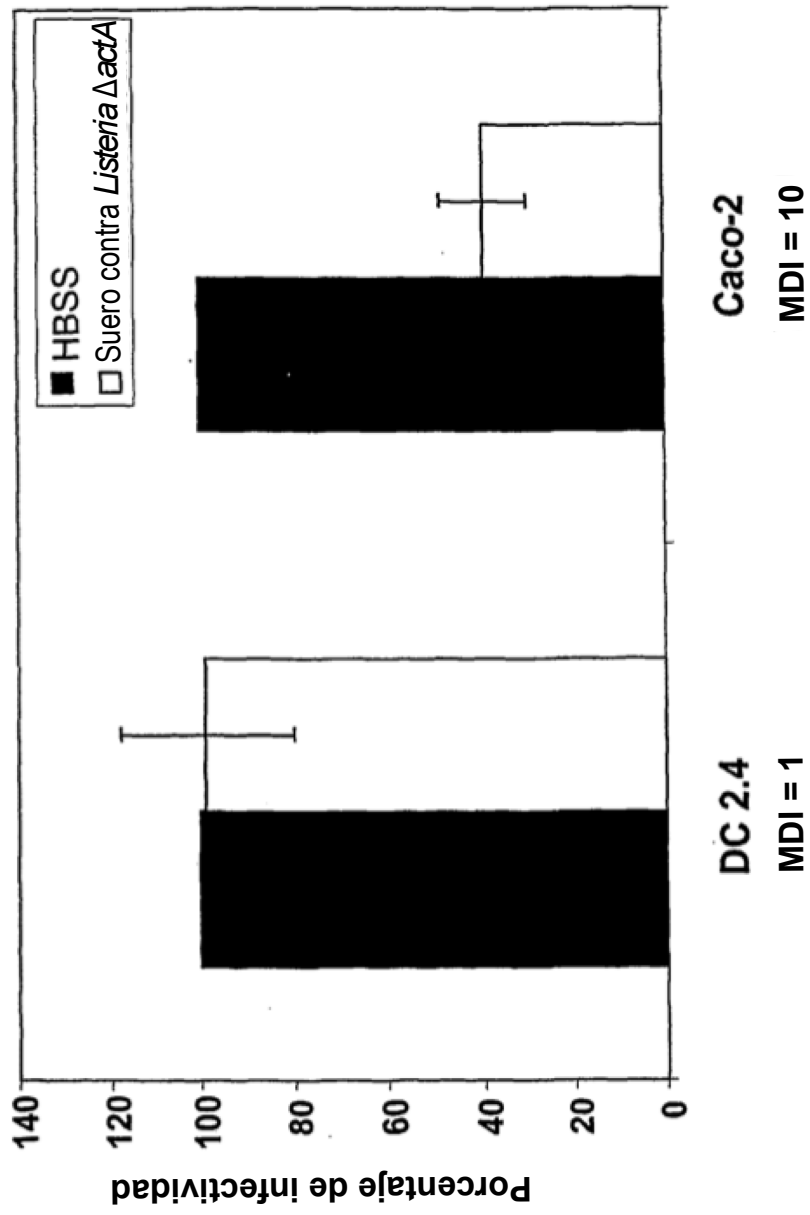


Figura 10

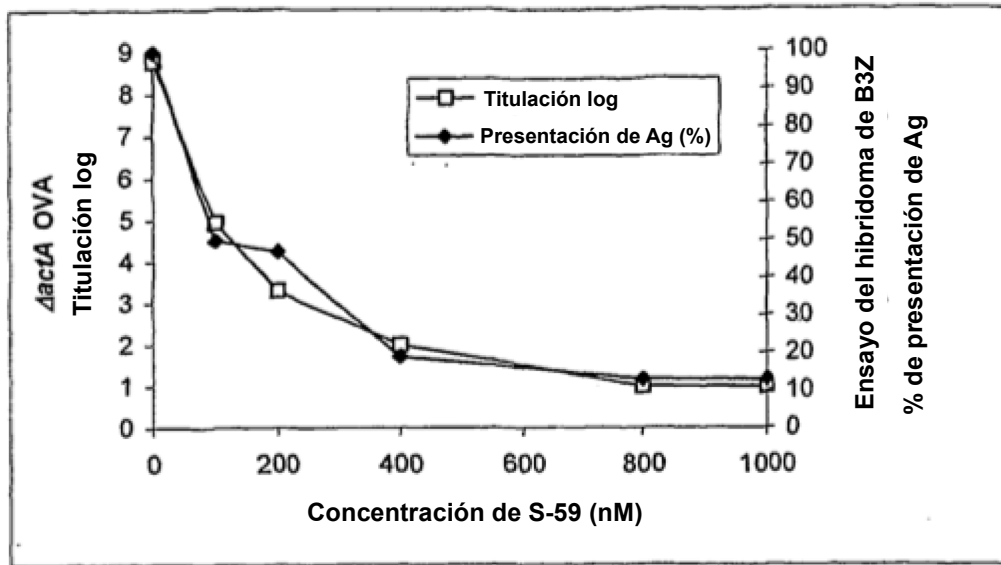


Figura 11A

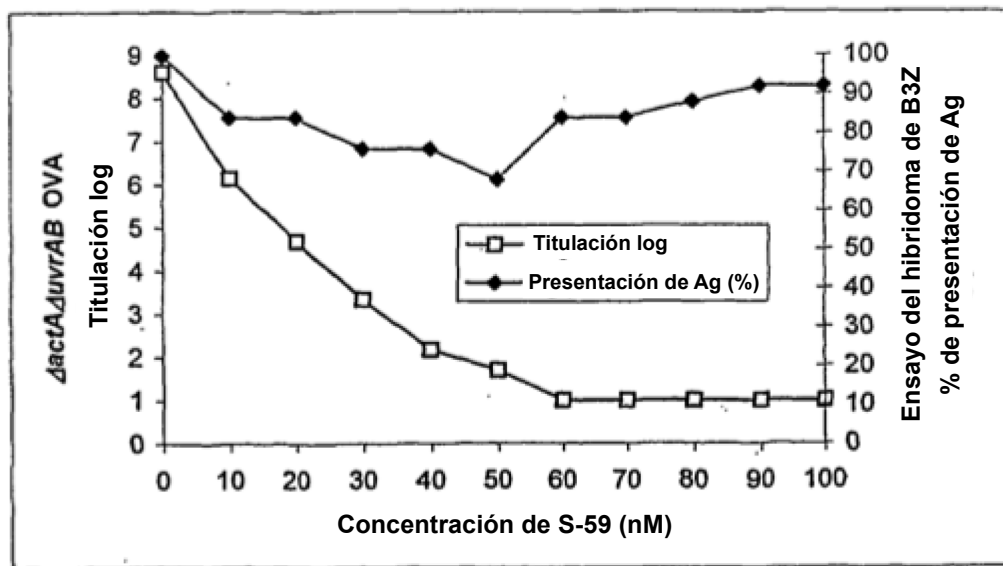


Figura 11B

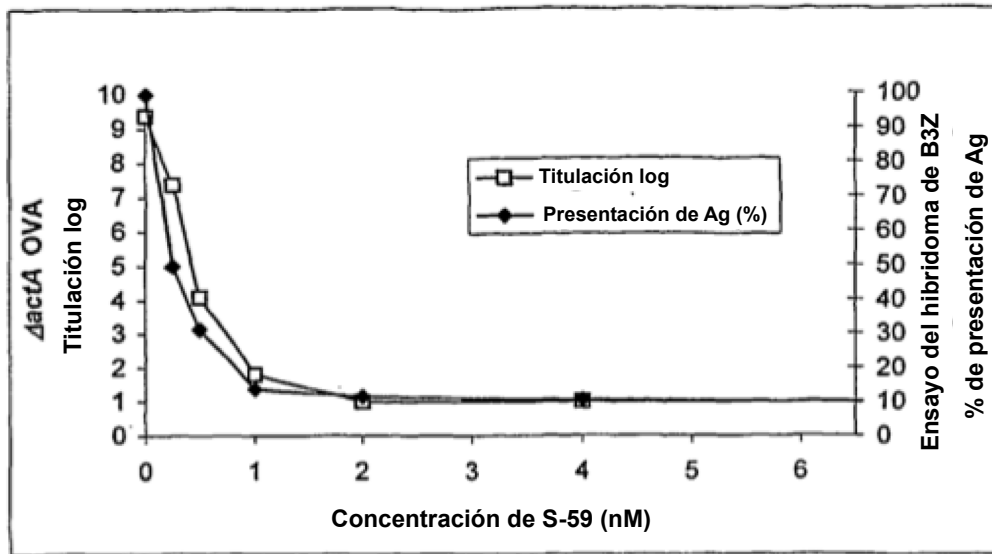


Figura 11C

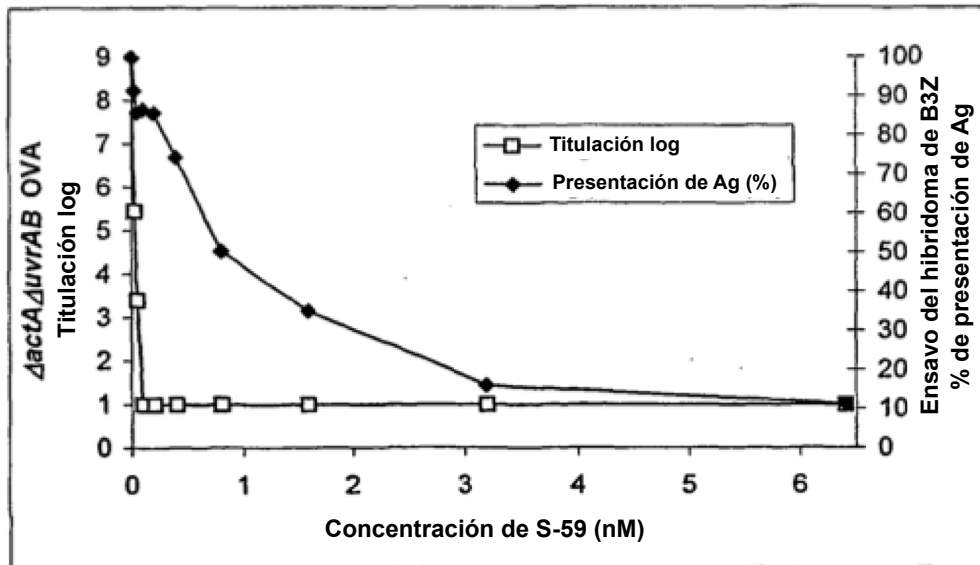


Figura 11D

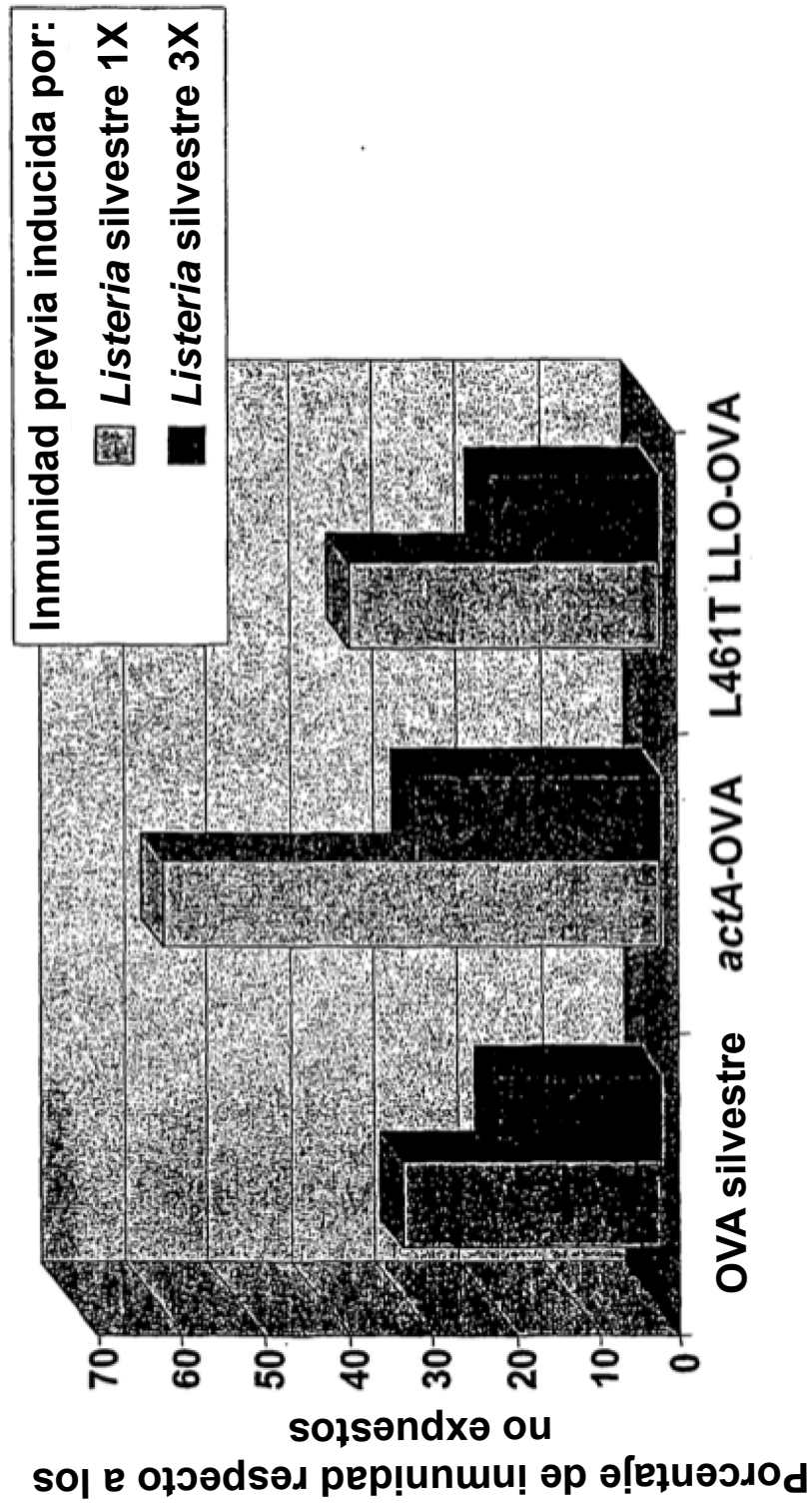
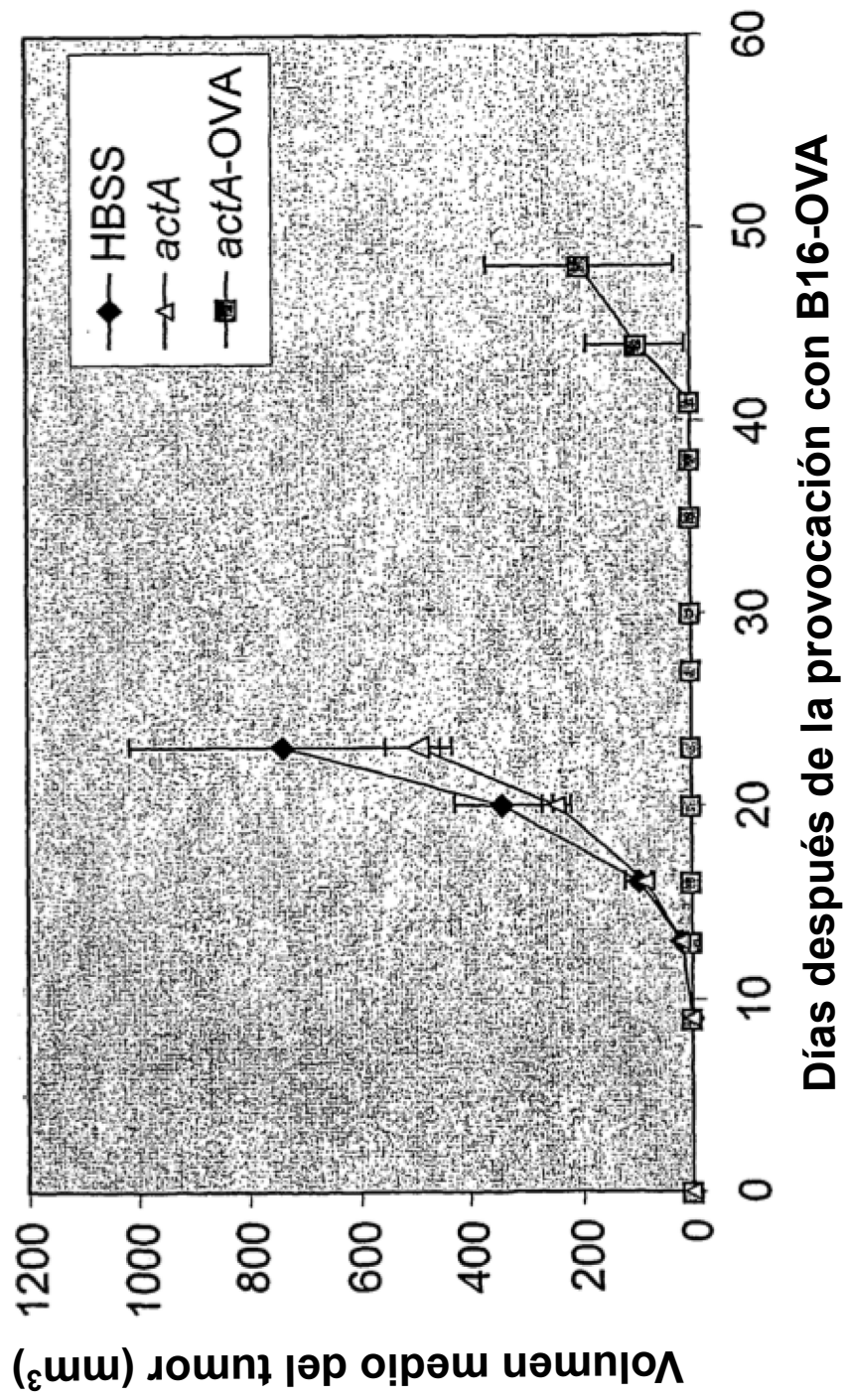


Figura 12A

**Figura 12B**

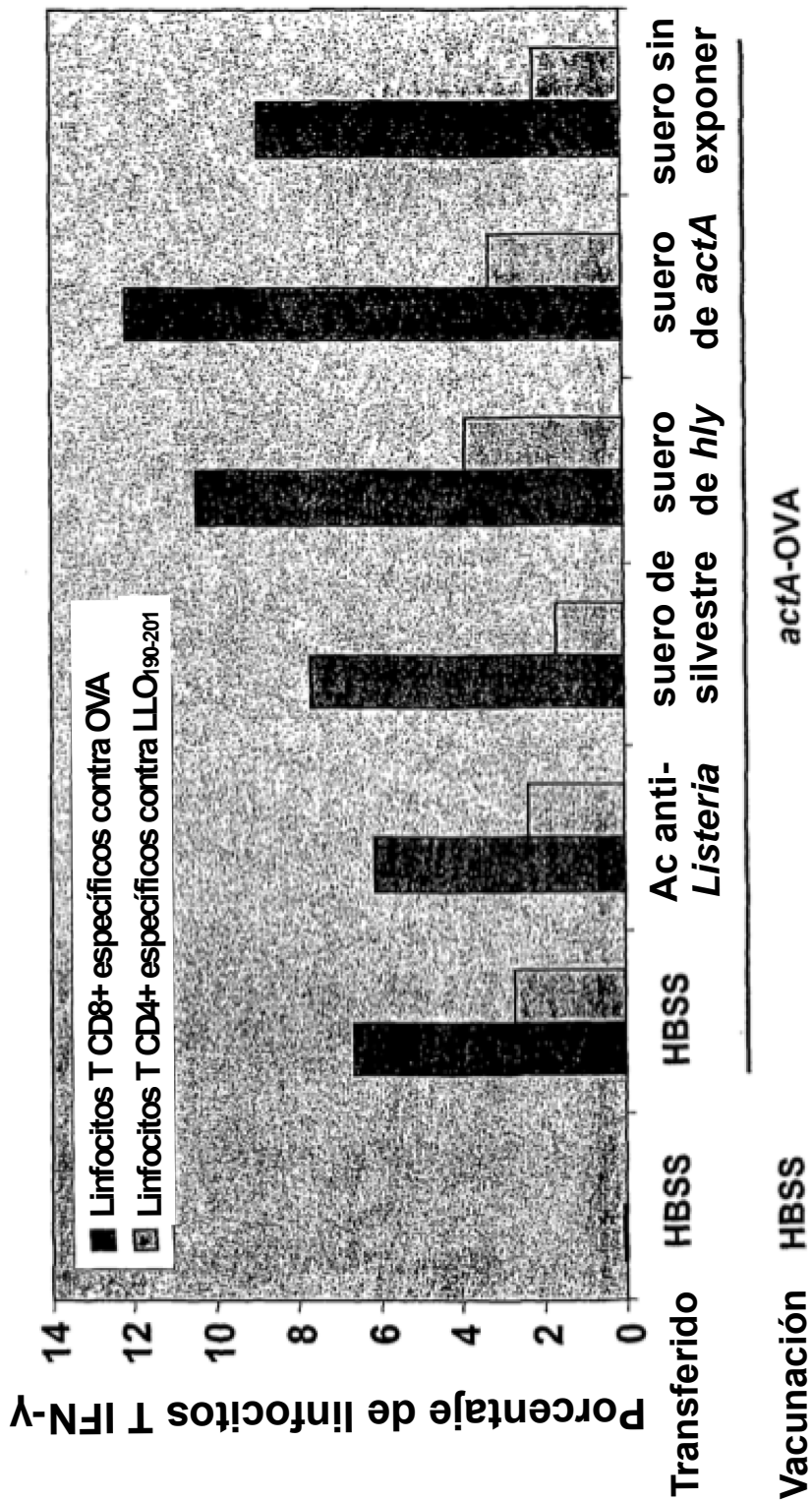


Figura 12C